



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA

ARARAQUARA

**INVESTIGAÇÃO ELETROQUÍMICA E APLICAÇÃO DE ELETRODOS DE
CARBONO VÍTREO MODIFICADOS POR FILMES DE POLI-L-LISINA NA
DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES.**

ELAINE RENATA DE CASTRO VIANA PEREIRA

ABRIL/2010

ELAINE RENATA DE CASTRO VIANA PEREIRA

Investigação eletroquímica e aplicação de eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de poli-L-lisina na determinação de antioxidantes.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora Prof^a Dr^a Maria Valnice Boldrin

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

P436i Pereira, Elaine Renata de Castro Viana
Investigação eletroquímica e aplicação de eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de poli-L-lisina na determinação de antioxidantes / Elaine Renata de Castro Viana Pereira – Araraquara : [s.n], 2010
148 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Valnice Boldrin

1. Química analítica. 2. Eletroquímica. 3. Quercetina. 4. Catequina.
I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ELAINE RENATA DE CASTRO VIANA PEREIRA

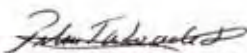
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 16 de abril de 2010.

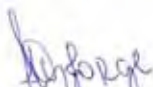
BANCA EXAMINADORA



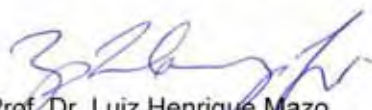
Profª Drª Maria Valnice Boldrin (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Sonia Maria Alves Jorge
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu



Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo
Instituto de Química – USP, São Carlos



Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado
Instituto de Química - USP, São Carlos

Dados Pessoais

Nome Elaine Renata de Castro Viana Pereira
Endereço eletrônico ercviana@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006 - 2010** Doutorado em Química Analítica (Arar.).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Investigação Eletroquímica e Aplicação de Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado por Filmes de Poli-L-Lisina na Determinação de Antioxidantes, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Prof^a Dr^a Maria Valnice Boldrin
Bolsista a: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso
Palavras-chaves: Eletrodos Modificados, Poliaminoácidos, Antioxidantes, Poli-L-Lisina, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Áreas do conhecimento: Química Analítica, Eletroanalítica, Instrumentação Analítica
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico
- 2001 - 2003** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Investigação Eletroquímica E Aplicação De Eletrodo De Carbono Vítreo Modificado Por Filmes De Poli-L-Lisina Na Determinação Do Corante Reativo Cibacron Blue F3GA, Ano de obtenção: 2003
Orientador: Prof^a Dr^a Maria Valnice Boldrin Zanoni
Palavras-chaves: Eletroquímica, Eletrodos Modificados, Corantes Reativo, Poliaminoácidos
Áreas do conhecimento: Eletroanalítica, Análise de Traços e Química Ambiental
Setores de atividade: Produtos e Serviços Voltados Para A Defesa e Proteção do Meio Ambiente, Incluindo O Desenvolvimento Sustentado, Fabricação de Produtos Têxteis
- 1995 - 2000** Graduação em Licenciatura e Bacharelado Em Química.
Fundação Educacional de Barretos, FEB, Barretos, Brasil
Título: Análise do Teor de Flúor em Águas Minerais
Orientador: Prof. Dr. Jeosadaque José de Sene

Formação complementar

- 2009 - 2009** Biossensores.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Palavras-chaves: Eletroanalítica, Sensores Eletroquímicos
- 2008 - 2008** Treinamento de Análise Voltamétrica modelo 663.
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
Palavras-chaves: Treinamento em equipamento
- 2007 - 2007** Treinamento POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO PGSTAT 302.
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
Palavras-chaves: Informação
- 2006 - 2006** Treinamento Operação e Manutenção básica no Sistema de HPLC.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Palavras-chaves: Treinamento em equipamento
- 2002 - 2002** Extensão universitária em Temas Geradores no Ensino da Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Extensão Universitária Em Tecnologia da

Informação.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo,
Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Vínculo institucional

2005 - 2008 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Estudante Colaborador, Carga horária: 40 horas. Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

10/2005 - 04/2008 Projetos de pesquisa, Departamento de Química
*Participação em projetos:
Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para avaliação da capacidade antioxidante total de extratos de Plantas Medicinais*

2. Sistema de Ensino Tristão de Athaíde - SETA

Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: Professor, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 40 horas. Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

03/2005 - 09/2005 Ensino médio
*Especificação:
Química Geral, Físico-Química, Química Orgânica*

3. Secretaria Educacional de Educação - SEE

Vínculo institucional

2000 - 2005 Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 33 horas. Regime: Parcial

Atividades

03/2000 - 05/2005 Ensino médio
*Especificação:
Físico-Química, Química Geral, Química Orgânica*

4. Laboratório de Análise Clínica São Matheus - LABORATÓRIO

Vínculo institucional

1999 - 1999 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Estagiária, Carga horária: 30 horas. Regime: Parcial

Atividades

06/1999 - 07/1999 Estágio, Particular
*Estágio:
Analista*

Linhas de pesquisa

1. Construção e aplicação de eletrodos modificados com poliaminoácidos na análise antioxidantes

Objetivo: Investigar a formação e aplicação de filmes dos poliaminoácidos poli-L-lisina sobre eletrodos de carbono vítreo com o intuito de estudar a interação para determinação de alguns antioxidantes.

Palavras-chaves: Antioxidantes, catequina, quercetina

Áreas do conhecimento: Eletroanalítica

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico

Projetos

2005 - 2010 Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para avaliação da capacidade antioxidante total de extratos de Plantas Medicinais

Áreas de atuação

1. Eletroanalítica
2. Instrumentação Analítica
3. Química dos Produtos Naturais

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. VIANA, E. R. C., PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.
Electrochemical reduction and determination of Cibacron Blue F3Ga at poly-L-lysine modified glassy carbon electrode. *Dyes e Pigment*. v.71, p.148 - 155, 2006.

Palavras-chaves: Dye determination, Poly-L-lysine, Reactive dyes, Modified electrode

Áreas do conhecimento: Eletroanalítica, Análise de Traços e Química Ambiental

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. VIANA, E. R. C., SERAFIM, D. M., ZANONI, M. V. B.
Redução eletroquímica e determinação voltamétrica do tinidazol em formulação farmacêutica. In: XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002, Araraquara.
XIII Simpósio Brasileiro De Eletroquímica E Eletroanalítica, 2002.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VIANA, E. R. C., CASTILHO, M., ZANONI, M. V. B.
Eletrodo modificado por filme de poli-L-lisina/siloxano propilenoglicol para determinação de catequina. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza-CE.
XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009.

2. Viana, E. R. C., CASTILHO, M., ZANONI, M. V. B.
Aplicação de eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de poli-L-lisina na determinação de quercetina. In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2007, João Pessoa - Pb.
XIV Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA. Enqa, 2007.

3. VIANA, E. R. C., SANTOS, M P, TEREZO, A. J., KAWASHITA, N H, CASTILHO, M.
Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante do extrato da planta *Vatairea macrocarpa* In: Simpósio Brasileiro de Química, 2006, Águas de Lindóia.
Reunião Anual do Simpósio Brasileiro de Química, 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. VIANA, E. R. C., PEREIRA, F. C., ZANONI, M. V. B.
Determinação do corante têxtil Cibacron Blue F3GA usando eletrodo de carbono vítreo modificado por poli-L-lisina In: XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Teresópolis.
XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004.
2. SERAFIM, D. M., VIANA, E. R. C., SENE, J. J., STRADIOTTO, N. R.
Determinação de Oxamniquina em Produtos Farmacêuticos por Voltametria de Onda Quadrada In: XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002, Araraquara.
XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002.
3. VIANA, E. R. C.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.
Determinação do corante Cibacron Blue F3GA em eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de poli-L-lisina. In: XV Congresso da Sociedade Iberoamericano de Electroquímica, 2002, Évora.
XV Congresso da Sociedade Iberoamericano de Electroquímica, 2002.

Apresentação de Trabalho

1. VIANA, E. R. C., CASTILHO, M., ZANONI, M. V. B.
Eletrodo modificado por filme de poli-L-lisina/siloxano propilenoglicol para determinação de catequina, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. VIANA, E. R. C., CASTILHO, M., ZANONI, M. V. B.
Aplicação de eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de poli-L-lisina na determinação de quercetina, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. VIANA, E. R. C., SANTOS, M P, KAWASHITA, N H, TEREZO, A. J., CASTILHO, M.
Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante do extrato da planta Vatairea macrocarpa, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Demais Trabalhos

1. Viana, E. R. C., SERAFIM, D. M., NASRRALLAH, A. A., SENE, J. J.
Determinação de Flúor em Águas Minerais, 1999.

Eventos

Participação em eventos

1. **Global Sustainable Bionergy (GSB) Latina American Convencion, 2010.** (Simpósio).
2. Apresentação de Paineis no **XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009.** (Congresso)
Eletrodo modificado por filme de poli-L-lisina/siloxano propilenoglicol para determinação de catequina.
3. Apresentação de Paineis no **14º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2007.** (Congresso)
Aplicação de eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de poli-L-lisina na determinação de quercetina.
4. Apresentação de Paineis no **29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.** (Congresso)
Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante do extrato da planta Vatairea macrocarpa.
5. Apresentação de Paineis no **XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002.** (Simpósio)
Redução eletroquímica e determinação voltamétrica do tinidazol em formulação farmacêutica.

À Deus, por ter me dado forças durante toda caminhada, por conduzir meus passos na direção exata e em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Élcio e Isaura, por ser parte imprescindível em na minha vida, pelo carinho, amor e ensinamentos.

Aos meus irmãos Edilson e Edgar por sempre me apoiarem apesar da distância e da falta de encontros, mas em pensamentos e palavras nas horas mais necessárias.

AMO VOCÊS!!!!!!!!!!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao esposo Gustavo pelo amor, compreensão, companheirismo, paciência e o essencial de tudo, por me incentivar e apoiar a minha escolha independente da distância e da saudade.

AMO VOCÊ!!!!!!!!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço

A Prof^a Dr^a Maria Valnice Boldrin, pela confiança, respeito e amizade adquirido durante todos esses anos. Por ter acreditado no meu potencial e pelos ensinamentos e orientação, que contribuíram para o meu aprendizado e crescimento profissional e pessoal.

A Prof^a Dr^a Marilza Castilho e Prof. Dr. Ailton José Terezo por terem me acolhido no grupo de pesquisa em eletroquímica e eletroanalítica de UFMT (Cuiabá), pelas horas de trabalhos, discussões e especialmente pela amizade e carinho durante toda a minha permanência no grupo e fora dele.

Às Prof^a Dr^a Hideko e Pillar, por ter me incentivado em todos os aspectos: amizade, paciência e conhecimentos transmitidos, contribuindo de alguma maneira a minha vida.

Ao Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto, pelas discussões científicas e disposição em contribuir para minha formação, além da amizade adquirida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos (e anjos da guarda) Thiago (Pessoa), Michelle (Cunhada) e Paula (amiga-irmã) por tudo o que passamos, vivemos e comemoramos juntos. Esses anos não seriam os mesmos sem vocês!!!!!!!!!!!!!!
Muito obrigada.

Especialmente as minhas amigas (irmãs de alma) Diana, Fernanda e Paula.....vocês são a minha família que escolhi AMO VOCÊS!!! A Josiane,

Mariana, Marly pela verdadeira amizade, convivência divertida e alegre, troca de experiências, incentivo, amizade, companheirismo, pelas palavras de conforto e apoio incansável em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório NDCOM: Marcelo Faber, Daniela, Lahys, Tina, Leonardo Paim e aos ex-participantes Priscila, Magno (Maguinho) e Leandro pela grande amizade e pelos momentos de descontração durante o tradicional café da tarde. A todo grupo de Eletroanalítica.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação (Sandra, Célia, Patrícia e Wennia) e da Biblioteca especialmente a Cristina (Cris), pela simpatia, amizade, atenção e paciência com que sempre me receberam.

A FAPEMAT pela bolsa concedida e aos demais órgãos de fomento (FAPESP, CAPES, CNPq), pelo apoio financeiro concedido para a manutenção da infra-estrutura do laboratório.

*“Basta ser sincero e desejar profundo Você será capaz de sacudir
o mundo”*

Raul Seixas

RESUMO

O presente trabalho reporta estudos sobre o uso do polímero Poli-L-Lisina (PLL) na modificação de eletrodo de carbono vítreo e sua aplicação na determinação dos antioxidantes quercetina e catequina. A imobilização desses poliaminoácido na superfície de eletrodo de carbono vítreo foi investigada usando diferentes metodologias: tais como a deposição direta de PLL, ligação cruzada com glutaraldeído (PLL/GA), imobilização com Quitosana (PLL/QTS) e polímeros híbridos de polipropilenoglicol (PPO), testando-se a pré-concentração e retenção de quercetina nestas matrizes. O método de incorporação mais eficiente para o antioxidante foi o uso de filmes híbridos de PPO, que mostrou ser um agente ancorante adequado para PLL na matriz polimérica do filme. Várias metodologias para pré-concentração e retenção do antioxidante no filme foram investigadas. A melhor condição experimental para formação de filme estável e retenção da quercetina foi obtida pela deposição de 0,5 μL de PPO, seguido da adição de 10 μL de PLL (PLL/PPO). A oxidação voltamétrica de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina no eletrodo modificado por filmes ppo/pll apresenta um par de picos redox em +0,42/+0,40 V, cuja corrente é aproximadamente duas vezes maior que no eletrodo sem modificação. Utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, construiu-se uma curva analítica no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de detecção foi $2,76 \pm 0,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. O método proposto foi aplicado para a análise deste antioxidante em amostras de chá verde e comparado por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (CLAE/DAD), no qual resultados compatíveis ($7,36 \pm 0,76 \text{ mg/g}$ CLAE e $6,60 \pm 0,80 \text{ mg/g}$) foram obtidos para quercetina na amostra. Os eletrodos modificados por filmes PPO/PLL, também, foram usados para a determinação de catequina. Um par de pico redox reversível em +0,46/+0,42 V foi obtido para a catequina em tampão B-R (pH 4). A curva analítica foi obtida no intervalo de $1,0 \times 10^{-8}$ a $7,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para usando a voltametria de pulso diferencial. O método apresenta limites de detecção de $6,2 \pm 0,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. O método foi aplicado para a determinação de catequina em amostra de extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* no qual foi detectado a concentração de 22,4 mg/g de catequina. A metodologia proposta apresentou resultados compatíveis quando comparada com a análise espectrofotométrica utilizada para testar o método.

Palavras-chaves: eletrodos modificados; poli-L-lisina; polipropilenoglicol, antioxidantes.

ABSTRACT

This paper reports studies on the use of polymer poly-L-lysine (PLL) in the modification of glassy carbon electrode and its application in the determination of the antioxidants quercetin and catechin. The immobilization of this polyaminoacids on the surface of glassy carbon electrode was investigated using different methodologies such as the direct deposition of PLL, cross-linked with glutaraldehyde (PLL / GA), immobilization with chitosan (PLL / QTS) and hybrid polymers of polypropylene glycol (PPO), testing the pre-concentration and retention of Quercetin on these matrices. The incorporation method more efficient for the antioxidant was the use of hybrid films of PPO, which proved to be an agent suitable for anchoring PLL in the polymer matrix of the film. Several methodologies for pre-concentration and retention of the antioxidant in the film were investigated. The best experimental conditions for the formation of the stable film and retention of the Quercetin were obtained by deposition of 0.5 μL of PPO, followed by the addition of 10 μL of PLL (PLL / PPO). The voltammetric oxidation of $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ of Quercetin on the modified electrode by PPO / PLL films shows a pair of redox peaks at +0.42 / +0.40 V whose the current is approximately two times higher than the unmodified electrode. Using the technique of square wave voltammetry, we constructed a calibration curve in the concentration range of 1.0×10^{-8} to $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The limit of detection was $2,76 \pm 0,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. The proposed method was applied to the analysis of this antioxidant in green tea samples and compared by high performance liquid chromatography with diode array (HPLC/DAD), in which consistent results ($7.36 \pm 0.76 \text{ mg / g}$ HPLC and $6,60 \pm 0.80 \text{ mg / g}$) were obtained for quercetin in the sample. The modified electrodes by PPO/PLL films, too, were used for the determination of catechin. A pair of reversible redox peak at +0.46 / +0.42 V was obtained for the Catechin in B-R buffer (pH 4). The calibration curve was obtained in the range of 1.0×10^{-8} to $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ for using the differential pulse voltammetry. The method shows the limit of detection of $6,2 \pm 0.4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. The method was applied for the determination of catechins in a sample of the ethanol extract of *Vatairea macrocarpa* which was detected the concentration of 22.4 mg/g of catechin. The proposed methodology showed consistent results when compared with the spectrophotometric analysis used to test the method.

Keywords: modified electrodes; poly-L-lysine; polypropylene glycol; antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da Poli-L-Lisina.	39
Figura 2 - Esquema de reações da síntese e policondensação dos precursores híbridos siloxano-PPO (Tagliavini <i>et. al.</i> 2008)	42
Figura 3 - Estrutura química do antioxidante quercetina.	43
Figura 4 - Estrutura química do antioxidante catequina.	44
Figura 5 - Voltamograma cíclico correspondentes à oxidação de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ de QT sobre ECV em solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	57
Figura 6- Voltamograma cíclico correspondentes à oxidação de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ de QT sobre eletrodo de carbono vítreo em solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	58
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para ECV (A) recoberto por filmes de PLL após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de QT transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0 e (B) eletrodo sem modificar. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	60
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo de carbono vítreo recoberto por filmes de PLL/GA após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	61
Figura 9 - Voltamograma cíclico obtidos para eletrodo de carbono vítreo recoberto por filmes de PLL/QTS* após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	62
Figura 10 - Voltamograma cíclico obtido para eletrodo de carbono vítreo recoberto por filmes de PLL/QTS após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	63
Figura 11- Voltamograma cíclico obtido para eletrodo de carbono vítreo recoberto por filmes de PPO após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mVs ⁻¹ .	65
Figura 12 - Voltamograma cíclico obtido para oxidação do filme de PLL/ PPO imobilizado sobre eletrodo de carbono vítreo em solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50$ mV s ⁻¹ .	66

- Figura 13 - Voltamograma cíclico obtido para eletrodo de carbono vítreo recoberto por filmes de PLL/PPO após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$. **67**
- Figura 14 - Esquema de formação do filme PLL/PPO* sobre eletrodo de carbono vítreo. **68**
- Figura 15 - (A) Voltamogramas cíclicos com varreduras sucessivos de potencial para eletrodo modificado PLL/PPO* carregados com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, (B) transferido solução hidro-etanólica pH 2,0. (C) Efeito da variação do número de ciclos. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **69**
- Figura 16 - Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO*, incorporação eletroquímica QT. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **70**
- Figura 17 - Voltamograma cíclico modificado PLL/PPO* com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT incorporado em circuito aberto e transferidos tampão B-R pH 2,0. (B) Gráfico de I_{pa} vs. número de ciclos. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **71**
- Figura 18 - Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO*, incorporação de QT em circuito aberto. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **72**
- Figura 19 - Esquema de formação do filme PLL/PPO sobre eletrodo de carbono vítreo. **73**
- Figura 20 - (A) Voltamogramas cíclico com varreduras sucessivas de potencial (60 ciclos) realizados para eletrodo modificado PLL/PPO carregados com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em tampão B-R pH 2,0. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamograma representativo após a incorporação transferido o eletrodo para eletrólito e (C) Efeito da variação de número de ciclos sobre corrente de pico anódica. **74**
- Figura 21 - Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO, incorporação eletroquímica de QT. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **74**
- Figura 22 - Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) voltamograma cíclico para oxidação de QT sobre filme de PLL/PPO, incorporação em circuito aberto. (B) Efeito da variação de número de ciclos sobre corrente de pico anódica. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **75**
- Figura 23 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO incorporação circuito aberto. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **76**

- Figura 24 - Efeito do tempo de acúmulo sobre voltamogramas cíclicos correspondentes a oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Q em pH 2,0 sobre eletrodo modificado por filme de PLL/PPO. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. **78**
- Figura 25 - Influência do tempo de imersão do eletrodo modificado com PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica pH 2,0. **79**
- Figura 26 - Voltamogramas cíclicos com varredura sucessivos de potencial (10 ciclos) realizados para eletrodo modificado PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. **80**
- Figura 27 - Efeito da variação do número de ciclos sobre a corrente de pico anódico para o eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica pH 2,0. **80**
- Figura 28 – Efeito de E_{pa} vs. pH em $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre eletrodo de carbono vítreo (A) com modificação (B) sem modificação. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **82**
- Figura 29 - Efeito de I_{pa} vs. pH em $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre eletrodo de carbono vítreo (A) com modificação e (B) sem modificação. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **83**
- Figura 30 - Voltamogramas cíclicos de QT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão hidro-etanólico pH 2,0 sobre eletrodo modificado em diferentes v . **84**
- Figura 31 - Gráfico de I_{pa} vs. v em solução de QT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão hidro-etanólico pH 2,0 sobre eletrodo modificado. **85**
- Figura 32 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos (A) para o eletrodo modificado por filmes de PLL/GA e (B) ECV carregados com $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de QT. ($f = 75 \text{ Hz}$, amplitude 50,0 mV e incremento de potencial 2,0 mV). **86**
- Figura 33 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para determinação de QT em solução tampão B-R pH 2,0 em diferentes concentrações variando-se de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO. **87**
- Figura 34 - Curva analítica para oxidação de QT imobilizado em eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO. **88**
- Figura 35 - Voltamograma de pulso diferencial obtidos para 5 μL de solução de chá verde em solução hidro-etanólica pH 2,0 sobre (A) ECV e (B) PLL/PPO. **89**

- Figura 36 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de QT em chá verde por filmes de PLL/PPO carregados durante 8 minutos em solução tampão B-R pH 2,0 após adição de alíquotas de solução padrão de QT ($7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$). **90**
- Figura 37 - Gráfico da I_{pa} vs. Concentração para oxidação de QT em chá verde por filmes de PLL/PPO carregados durante 8 minutos em solução tampão B-R pH 2,0. **90**
- Figura 38 - Estruturas química do ácido ascórbico (AA), ácido cafeico (AC), ácido clorogênico (ACL), ácido gálico (AG), catequina (CT) e rutina (R). **92**
- Figura 39 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico sobre eletrodo (a) ECV e (b) modificado por PLL/PPO. **93**
- Figura 40 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico sobre eletrodo (a) ECV e (b) modificado por PLL/PPO. **93**
- Figura 41 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico sobre eletrodo (a) ECV e (b) modificado por PLL/PPO. **94**
- Figura 42 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido gálico sobre eletrodo (a) ECV e (b) modificado por PLL/PPO. **94**
- Figura 43 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de catequina sobre eletrodo (a) ECV e (b) modificado por PLL/PPO. **95**
- Figura 44 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina sobre eletrodo (a) ECV e (b) modificado por PLL/PPO. **95**
- Figura 45 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de chá verde na presença de ácido ascórbico no intervalo de concentração de 0,5 a $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO. **97**
- Figura 46 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de ácido cafeico no intervalo de concentração de 0,5 a $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO. **97**
- Figura 47 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de ácido clorogênico no intervalo de concentração de 0,5 a $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO. **98**

- Figura 48 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de ácido gálico no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO. **98**
- Figura 49 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de catequina no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO. **99**
- Figura 50 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de rutina no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO. **99**
- Figura 51 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, em solução hidro-etanólica pH 2,0. **101**
- Figura 52 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cafeico em solução hidro-etanólica pH 2,0. **101**
- Figura 53 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em solução hidro-etanólica pH 2,0. **102**
- Figura 54 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido gálico em solução hidro-etanólica pH 2,0. **102**
- Figura 55 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de catequina em solução hidro-etanólica pH 2,0. **103**
- Figura 56 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina em solução hidro-etanólica pH 2,0. **103**
- Figura 57 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução hidro-etanólica pH 2,0. **104**
- Figura 58 - Cromatograma correspondente à injeção de 20 μL do padrão de AA, AC, ACI, AG, CT, QT e R na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$. **106**
- Figura 59 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μL do padrão de AA na concentração a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido

fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50 % de B (9 min.), 50-70 % B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190 nm e λ_{final} = 800 nm. **107**

Figura 60 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de AC na concentração a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1 % e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280nm. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190 nm e λ_{final} = 800 nm. **107**

Figura 61 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de ACI na concentração a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70 %B (15 min.) 70-5 %B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190 nm e λ_{final} = 800 nm. **108**

Figura 62 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de AG na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190 nm e λ_{final} = 800 nm. **108**

Figura 63 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de CT na concentração a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190 nm e λ_{final} = 800 nm. **109**

Figura 64 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de QT na concentração a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido

fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280\text{nm}$. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. $\lambda_{\text{inicial}} = 190 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{final}} = 800 \text{ nm}$. **109**

Figura 65 - Cromatograma correspondente à injeção de $20 \mu\text{L}$ do padrão de R na concentração a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$. (B) Espectro de absorbância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. $\lambda_{\text{inicial}} = 190 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{final}} = 800 \text{ nm}$. **110**

Figura 66 - Cromatogramas CLAE/DAD correspondentes à injeção de $20\mu\text{L}$ do padrão de QT nas concentrações de 1) $QT_1 = 1,0 \times 10^{-6}$, 2) $QT_2 = 5,0 \times 10^{-6}$, 3) $QT_3 = 1,0 \times 10^{-5}$, 4) $QT_4 = 5,0 \times 10^{-5}$, 5) $QT_5 = 1,0 \times 10^{-4}$, 6) $QT_6 = 5,0 \times 10^{-4}$ e 7) $QT_7 = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$. **111**

Figura 67 - Curva analítica obtida no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$. **112**

Figura 68 - Cromatogramas CLAE/DAD correspondentes à injeção de $20 \mu\text{L}$ da solução de chá verde em metanol e respectivas adições do padrão de QT na concentração de: 1) $QT_1 = 1,0 \times 10^{-6}$, 2) $QT_2 = 2,0 \times 10^{-6}$ e 3) $QT_3 = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$. **113**

Figura 69 - Gráfico da Área vs. Concentração de padrão adicionado em chá verde nas concentrações de: 1) $QT_1 = 1,0 \times 10^{-6}$, 2) $QT_2 = 2,0 \times 10^{-6}$ e 3) $QT_3 = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$. **113**

- Figura 70 - Sobreposição de espectros de absorção na região o UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra de chá verde e do padrão QT na concentração $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.), fluxo 1 mL min^{-1} . **114**
- Figura 71 - Voltamograma cíclico correspondente à oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R (pH 4,0) sobre eletrodo de carbono vítreo. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ **116**
- Figura 72 - Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em B-R 4,0. Curvas: (a) ECV e (b) recoberto por filme de PLL/PPO. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. **118**
- Figura 73 - Efeito do tempo de acúmulo sobre voltamogramas cíclicos correspondentes à oxidação $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em pH 4,0 sobre eletrodo modificado por filme de PLL/PPO. **119**
- Figura 74 - Influência do tempo de imersão do eletrodo modificado com PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R pH 4,0. **120**
- Figura 75 - Voltamogramas cíclicos com varreduras sucessivos de potencial, (10 ciclos) realizados para eletrodo modificado PLL/PPO carregados com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em tampão B-R pH 4,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **121**
- Figura 76 - Efeito da variação do número de ciclos vs. I_{pa} para o eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R pH 4,0. **121**
- Figura 77 - Efeito do pH sobre potencial de oxidação de CT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodo (A) modificado com filme de PLL/PPO. (B) eletrodo de carbono vítreo. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$. **122**
- Figura 78 - Efeito do pH na corrente de pico para solução $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT obtida para (A) eletrodo modificado com filme de PLL/PPO. (B) eletrodo de carbono vítreo. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. **123**
- Figura 79 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em pH 4,0 sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de PLL/PPO. **124**
- Figura 80- Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ em solução de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão B-R pH 4,0 sobre eletrodo modificado. **125**

- Figura 81 - Voltamogramas de pulso diferencial obtido sobre (A) ECV e (B) PLL/PPO para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R pH 4,0 com tempo de acúmulo de 10 minutos. **126**
- Figura 82 - Voltamogramas de pulso diferencial obtido para oxidação de CT em tampão B-R pH 4,0 sobre eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO. **127**
- Figura 83 - Curva analítica obtida para oxidação de CT imobilizado em eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO. **128**
- Figura 84 - Voltamograma de pulso diferencial para 0,05 g de EB EtOH de *Vatairea macrocarpa* sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por PLL/PPO em solução B-R pH 4,0. **129**
- Figura 85 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para oxidação de CT na concentração de 1) $1,0 \times 10^{-6}$, 2) $2,0 \times 10^{-6}$ e 3) $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em EB EtOH de *Vatairea macrocarpa* por filmes de PLL/PPO carregados durante 10 minutos em solução tampão B-R pH 4,0. **130**
- Figura 86 - Gráfico de I_{pa} vs. Concentração para oxidação de CT em extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* por filmes de PLL/PPO carregados durante 10 minutos em solução tampão B-R pH 4,0 **130**
- Figura 87 - Espectros de absorvância de CT em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 variando-se a concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. **131**
- Figura 88 - Curva analítica obtidas através dos espectros de absorção de CT em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0. **132**
- Figura 89 - Espectros de absorvância de EB EtOH de *Vatairea macrocarpa* em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 e adições de $1,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-5}$ e $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão de CT. **133**
- Figura 90 - Gráfico da Absorvância vs. Concentração para espectros de absorvância de EB EtOH de *Vatairea macrocarpa* e CT em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 e adições de $1,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-5}$ e $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão de CT. **133**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de recuperação encontrados de quercetina utilizando PLL/PPO.	91
Tabela 2 - Parâmetros voltamétricos comparativos entre eletrodo de carbono vítreo e modificado por filme PLL/PPO.	96
Tabela 3- Determinação de quercetina em chá verde empregando o método proposto usando eletrodo modificado por PLL/PPO e CLAE/DAD.	114
Tabela 4 - Determinação de catequina em extrato bruto etanólico de <i>Vatairea macrocarpa</i> empregando o método proposto e o espectrofotométrico.	134

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2 – Esquema de oxidação da quercetina. (Ghica e Brett, 2003)	58
Esquema 1 – Provável interação entre quercetina e filme de PLL.	77
Esquema 3 - Esquema de oxidação da catequina (Janeiro e Brett, 2004)	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - ácido ascórbico

AC - ácido caféico

ACI - ácido clorogênico

AG - ácido gálico

B-R - solução tampão Britton-Robinson

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CT - catequina

EBEtOH - extrato bruto etanólico

ECV - eletrodo de carbono vítreo

GA - glutaraldeído

PLL - poli-L-lisina

PPO - óxido de polipropilenoglicol

QT - quercetina

QTS - quitosana

R - rutina

LISTA DE SÍMBOLOS

v - velocidade de varredura

$v^{1/2}$ – raiz da velocidade de varredura

μ - micro

E_{pa} - pontencial de pico anódico

E_{pc} - potencial de corrente catódica

f – frequência

I_{pa} - corrente de pico anódica

I_{pc} - corrente de pico catódica

mV – mili Volte

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	31
1.1 - Antioxidantes	31
1.2 - Métodos analíticos para análise de antioxidantes	33
1.3 - Eletrodos modificados	36
1.4 - Eletrodos modificados por filmes de poli-L-lisina	38
1.5 - Filmes de siloxano-propilenoglicol preparados por método sol-gel	41
1.6 - Quercetina e Catequina	43
1.7 - Chá verde	45
1.8 - Extrato bruto etanólico da entre-casca da <i>Vatairea macrocarpa</i>	46
2 – OBJETIVO	48
3. - PARTE EXPERIMENTAL	49
3.1 – Reagentes, soluções, solventes e amostras	49
3.1.1 – Reagentes	49
3.1.2 – Soluções e solventes	49
3.1.3 – Síntese do precursor	50
3.2 – Experimentos voltamétricos e potenciométricos	51
3.2.1 – Preparação dos eletrodos modificados por filmes de poli-L-lisina	51
3.2.2 – Imobilização A (PLL/PPO*)	52
3.2.3 – Imobilização B (PLL/PPO)	52
3.2.4 – Incorporação do analito sobre o filme de PLL/PPO	52
3.2.5 – Determinação de quercetina em chá verde	53
3.2.6 – Determinação de catequina em extrato bruto etanólico de <i>Vatairea macrocarpa</i> sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por filme PLL/PPO	53
3.3 – Experimentos cromatográficos	54
3.3.1 – Determinação de quercetina em amostras de chá verde por cromatografia.	54
3.4 – Experimentos espectrofotométricos	55
3.4.1 – Determinação de flavonóide e ácidos fenólicos em amostras de chá verde por espectrofotometria	55

3.4.2 – Obtenção da curva analítica e determinação da catequina em amostra de extrato bruto etanólico de <i>Vatairea macrocarpa</i> por espectrofotometria	55
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.2 - Comportamento voltamétrico da quercetina sobre eletrodo de carbono vítreo	57
4.2 - Eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de poli-L-lisina (PLL)	59
4.2.1 - Modificações do eletrodo de carbono vítreo por filmes híbridos de polipropilenoglicol óxido (PPO) e PLL	64
4.2.2 - Influência da técnica de imobilização de PLL/PPO sobre eletrodo de carbono vítreo	68
4.2.2.1 - Imobilização com depósito de filmes de PLL/PPO*	68
4.2.2.2 - Incorporação eletroquímica	68
4.2.2.3 - Incorporação em circuito aberto	70
4.2.3 - Imobilização B (PLL/PPO)	72
4.2.3.1 - Incorporação eletroquímica	73
4.2.3.2 - Incorporação em circuito aberto	74
4.2.4 - Tempo de pré – concentração da quercetina sobre eletrodo modificado com filme de PLL/PPO	78
4.2.5 -Efeito do ph sobre a pré-concentração de quercetina	81
4.2.6 - Influência da velocidade de varredura de potencial na oxidação da quercetina	84
4.2.7 - Curva de calibração para quercetina	85
4.2.8 - Aplicação do eletrodo modificado com pll/ppo na determinação de chá verde	88
4.2.9 - Estudo de interferentes	91
4.2.10 - Comparação do método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da quercetina em chá verde	105
4.2.11 - Avaliação do método proposto para determinação de quercetina e amostras de chá verde com CLAE/DAD	111
4.3 - Oxidação voltamétrica de catequina	116
4.3.1 - Oxidação voltamétrica de catequina sobre eletrodo de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO.	117
4.3.2 - Tempo de pré – concentração da catequina sobre eletrodo modificado com filme de PLL/PPO	118

4.3.3 - Efeito do pH sobre os parâmetros voltamétricos	122
4.3.4 - Influência da velocidade de varredura de potencial na oxidação da catequina	124
4.3.5 - Curva analítica para determinação catequina	125
4.3.6 - Aplicação do método em amostra de extrato bruto etanólico de <i>Vatairea macrocarpa</i>	128
4.3.7 - Comparação do método proposto por espectrofotometria para determinação da catequina em extrato bruto etanólico de <i>Vatairea macrocarpa</i>	131
5 - CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIA	136

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Antioxidantes

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões celulares causadas pelos radicais livres. Eles podem ser compreendidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL, 1990, SUNDQUIST, BRIVIBA, e SIES, 1994). Em decorrência da ineficiência parcial do sistema antioxidante endógeno do organismo humano, torna-se necessária a contribuição de antioxidantes obtidos através da dieta (PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998).

Os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, seqüestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (WANG e LIN, 2000) e a maioria de seus efeitos biologicamente ativos são derivados das funções antioxidantes (VELIOGLU *et al.*, 1998). O estudo de substâncias naturais que apresentam efeitos antioxidantes em nível biológico vem crescendo muito nos últimos anos. Em geral, os agentes antioxidantes protegem as células contra danos oxidativos ou atuam como sequestradores de espécies reativas de oxigênios (EROs), incluindo radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). O desequilíbrio entre a formação e eliminação destas espécies oxidativas em organismos vivos está relacionada a diversas doenças, como câncer e a arterosclerose, além de aceleração dos sinais de envelhecimento. Por isso, a ingestão de antioxidantes através da dieta tem uma importante função na prevenção destas doenças (BERG, 1999).

A oxidação no sistema biológico ocorre devido à ação de radicais livres presentes no organismo humano. Estas moléculas possuem um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outro elétron, e por isso são extremamente reativas. As EROs podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. Os antioxidantes de defesa têm função de prevenção da geração de EROs, destruição de potenciais oxidantes e degradação das EROs formadas. Dessa forma, os danos dos tecidos induzidos pelo estresse oxidativo são mínimos

(BENZIE, 1996). Os antioxidantes podem agir em diferentes níveis no processo oxidativo: (1) sequestrando os radicais iniciais, (2) ligação a íons metálicos, (3) aprisionamento de radicais peroxilas e (4) remoção de biomoléculas danificadas pela oxidação (BRIVIBA *et al.* 1993).

Assim, de modo mais geral um antioxidante biológico é definido como qualquer substância que, presente em baixas concentrações reduz ou previne significativamente a oxidação de um substrato oxidável (BENZIE, 1996).

Dentre vários compostos antioxidantes os compostos fenólicos têm merecido destaque. As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante com que cada fenol exerce sobre determinado meio, que por sua vez, depende da estrutura química. Usualmente, esses compostos estão divididos em grupos de: flavonóides, triterpenos e derivados dos ácidos fenólicos, tais como: ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e seus derivados, curcuminas entre outros.(JACKSON, 1994).

Para BITSCH (1996), a maioria das substâncias fenólicas presentes nos alimentos pode ser classificada em dois principais grupos: os ácidos carboxílicos fenólicos e os flavonóides. Os flavonóides são várias classes de substâncias naturais que contém dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono, que se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal, com diversas propriedades farmacológicas (HUTCHINGS, 1994). Dentre eles, os flavonóides derivados do 2-fenil-benzopireno são classificados como o grupo mais importante. Os principais subgrupos são as catequinas e proantocianidinas, as antocianidinas e os flavonóis ou flavonas (HERRMANN, 1994). O reconhecimento dos benefícios à saúde, por parte das catequinas e proantocianidinas, levou ao uso de extratos de semente de uva como suplementação alimentar (LAPARRA; MICHAUD; MASQUELIER, 1979, VAN ACKER *et al.*, 1996; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999; SOARES, 2002).

De acordo com RICE-EVANS *et al.* (1996), as propriedades químicas relacionadas a atividade antioxidante dos polifenóis, são correlacionadas à capacidade dos grupos fenólicos de seqüestrar radicais livres. Para esses compostos serem definidos como antioxidantes, eles devem satisfazer duas condições básicas: (i) prevenir a auto-oxidação ou a oxidação gerada por radicais livres, quando presentes em baixa concentração relativa ao substrato a ser

oxidado, e (ii) o radical formado após a ligação deve formar produto final mais estável.

O conteúdo dos compostos fenólicos, presentes nas frutas e hortaliças, é um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante destes alimentos e sua concentração pode estar influenciada por fatores como: maturação, espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento (KIM, 2003).

Como a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente ligada à sua estrutura química, e capacidade de estabilizar radicais livres, alguns pesquisadores enaltecem sua participação na prevenção de processos degenerativos celulares que provocam arteriosclerose, câncer e outras doenças (MAMEDE; PASTORE, 2004, FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDRE, 1995, KOVAC e PEKIC, 1991).

Mais de 6.000 diferentes estruturas já foram identificadas para flavonóides presentes em plantas e este número continua a aumentar (BOBBIO e BOBBIO, 1989; FENNEMA, 1993; SLUIS *et al.*, 2001; AHERNE e O'BRIEN, 2002; CORDENUNSI *et al.*, 2002). Dentre esses flavonóides, os que merecem destaque são: a quercetina e a catequina, objetivo de interesse no presente trabalho.

1.2 - Métodos analíticos para análise de antioxidantes

Atualmente, há um crescente interesse no estudo de alimentos e plantas com comprovada ação antioxidante, devido ao elevado potencial econômico. Na busca de novos agentes que possam atuar como supressores de radicais livres, muitos métodos têm sido propostos para testar as propriedades antioxidantes de amostras biológicas, frutas, extratos de plantas e substâncias puras, sendo estas amostras submetidas a diversos ensaios "*in vitro*" (PRIOR e CAO, 1999).

Os métodos cromatográficos, por serem mais seletivos, permitem separar e quantificar individual ou simultaneamente cada um dos compostos polifenólicos presentes na amostra. Portanto, é possível determinar se uma, entre as várias classes dessas substâncias, é mais representativa que outra.

Com relação aos métodos espectrofotométricos, substâncias fenólicas têm espectro característico na região ultravioleta. Sendo assim, estes métodos têm sido usados para detectar adulteração em suco de laranja (ESCARPA e

GONZALEZ, 2001; BOCCHI *et al.*, 1996). No entanto, geralmente empregam reações de oxidação e não é possível quantificar classes específicas desses compostos, uma vez que apresentam bandas de absorção muito próximas entre si. Embora haja alguma controversa com relação à seletividade dos métodos colorimétricos, muitos métodos são empregados para determinação de polifenóis totais. Por exemplo, Dressler, Machado e Martins (1995) e Celeste *et al.* (1994) têm usado métodos baseados em etapas de oxidação com reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico para determinação de taninos e polifenóis totais, respectivamente.

Dentre os principais métodos encontrados na literatura, destaca-se o teste de inibição do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por espectrofotometria na região do visível que é estável a temperatura ambiente. Esta supressão é acompanhada pela mudança da coloração violeta do DPPH em solução etanólica quando em estado radicalar, monitorando a banda de absorção característica no espectro visível no comprimento de onda em 517-518 nm ($\lambda_{\text{max}} = 9660/\text{M}/\text{cm}$). Quando o DPPH-H volta ao estado reduzido, este se torna transparente. A solução etanólica/DPPH em contato com o material a ser testado, deste modo, diminui proporcionalmente à atividade antioxidante da amostra em estudo (NEILL *et al.*, 2002; NAIK *et al.*, 2002). Apesar de amplamente usado na literatura e grande simplicidade, seu emprego é limitado devido à baixa sensibilidade e alto custo do reagente DPPH.

A quantificação de antioxidantes em alimentos e plantas tem despertado grande atenção na química analítica, tanto para desenvolvimento de métodos analíticos necessários para sua identificação e quantificação, quanto para entender os seus processos de atuação no metabolismo humano.

Métodos analíticos mais comumente encontrados na literatura para sua direta quantificação baseiam-se principalmente nas técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. Estes trabalhos envolvem cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diversos tipos de detectores. Usando estes métodos é possível determinar compostos fenólicos por CLAE em suco de laranja, após etapa de derivatização e/ou extração em fase-sólida acoplada com ultravioleta, arranjo fotodiodo e detecção fluorescente (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1995; BOCCHI *et al.*, 1996; MOSKVIN *et al.*, 1999;

KARAVICOKÁ e SIMKO, 2000; MILLER *et al.*, 1997; CHRISTOFERSEN e CARDWELL, 1996).

O uso da voltametria para a determinação da capacidade antioxidante total em diferentes amostras tem sido bastante empregado. O uso de técnicas voltamétricas pode também ser uma importante ferramenta para a avaliação da capacidade antioxidante de vários polifenóis e suas misturas (HOTTA *et al.*, 2001; CHEVION, ROBERT, CHEVION, 2000, MANNINO *et al.*, 1998) através da avaliação de suas propriedades redox. O grupo fenólico dos flavonóides pode ser eletroquimicamente oxidado, e a maioria dos flavonóides mostra pelo menos um pico anódico (YANG *et al.*, 2001) e seus comportamentos voltamétricos podem ser comparados ao seqüestro dos radicais livres através do teste com radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), (HOTTA *et al.*, 2002).

A técnica voltamétrica mostrou ser uma ferramenta instrumental conveniente, e tem sido aplicada para a quantificação dos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM) hidrofílicos e lipofílicos presentes em amostras de plasma sangüíneo e extrato de pele (KOHEN, *et al.*, 2000; CHEVION, *et al.*, 2000).

CHEVION *et al.* (1999) também empregaram a voltametria cíclica para avaliar a capacidade antioxidante total de vegetais e frutas. Os ABPM foram extraídos de diversos vegetais, como couve-flor, tomate, batata, brócolis etc., e a recuperação para vitamina C foi 93%. Os trabalhos de KILMARTIN *et al.* (2001, 2003) apresentam metodologias utilizando a voltametria cíclica como ferramenta adequada para caracterizar e quantificar antioxidantes em vinhos, infusões de chá verde e preto e também em café.

A voltametria cíclica foi usada para a determinação da contribuição relativa de compostos antioxidantes fenólicos em suco de laranja processado (SOUSA *et al.*, 2004). Os grupos hidroxila, presentes nos compostos fenólicos, são oxidados via transferência de dois elétrons levando a geração de uma quinona depois da liberação de $2H^+$. Os autores observaram que quanto maior o número de hidroxilas no anel aromático dos compostos analisados, menor o potencial de pico e, portanto maior sua atividade antioxidante.

O extrato aquoso de uma erva natural *Terminalia chebula* foi testado pelo potencial atividade antioxidante (NAIK *et al.*, 2002). O extrato mostrou ser um excelente seqüestrador do radical DPPH. Para entender o princípio ativo responsável pela sua atividade, foi feita análise do extrato por HPLC constando a

presença de compostos tais como, ácido ascórbico, ácido gálico e ácido elágico. Ainda no mesmo trabalho, utilizou-se a voltametria cíclica, para confirmar a atividade antioxidante do extrato.

BRETT *et al.* (GHICA, BRETT, 2004; BRETT, GHICA, 2003; JANEIRO, BRETT, 2005) têm estudado o processo de eletro-oxidação de flavonóides, tais como: rutina, quercetina, catequina respectivamente no qual envolve uma etapa de adsorção de intermediários na superfície eletródica do carbono vítreo.

Um biossensor amperométrico de pasta de carbono foi desenvolvido para a determinação de polifenóis em extratos vegetais (MELLO, 2003). O biossensor foi preparado com o compósito de sílica-titânio, DNA e peroxidase. Essa imobilização foi feita empregando a adsorção e ligação cruzada usando glutaraldeído 5% (m/v) seguido de secagem em temperatura ambiente. Após a homogeneização com pó de grafite e óleo mineral, essa pasta foi colocada na cavidade de 1mm entre as paredes de um tubo de vidro selado na extremidade com um disco de platina. Após otimizar todas as condições experimentais, o biossensor apresentou curva analítica em um intervalo de concentração de ácido clorogênico de 1 a 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método de Folin-Ciocalteu.

Um estudo eletroquímico detalhado de quatro flavonóides, incluindo a rutina com identificação de seus produtos de oxidação sobre eletrodo de carbono vítreo foi investigado por HENDRICKSON (1994), utilizando técnicas de voltametria cíclica e disco rotatório.

A quantificação da rutina em chá foi investigada por MALAGUTTI, 2006, usando voltametria de onda quadrada sobre eletrodo de carbono vítreo e eletrodo compósito de grafite/poliuretano. O limite de detecção foi de $7,1 \times 10^{-9} \text{mol L}^{-1}$ para o eletrodo modificado e de $1,7 \times 10^{-8}$ para mol L^{-1} para o eletrodo de carbono vítreo.

A aplicação de eletrodos modificados pela adição direta de poli ácido glutâmico (1,0%) mostrou-se eficaz na pré-concentração ácido caféico sobre a superfície eletródica, na quantificação do mesmo em amostras de vinho tinto. Os valores encontrados foram concordantes com o apresentado na literatura e a validação do método confirma sua sensibilidade. (SANTOS *et al.*, 2005).

1.3 - Eletrodos modificados

O aumento na demanda de testes analíticos cada vez mais sensíveis, rápidos, simples e econômicos para determinação de compostos biológicos importantes tem motivado inúmeros pesquisadores na busca por sensores eletroquímicos que atendam a essas exigências. Conseqüentemente, muito esforço tem sido despendido na modificação de eletrodos de platina, ouro, carbono vítreo e outros.

A imobilização de microestruturas químicas na superfície de eletrodos tem apresentado notável crescimento na eletroquímica nos últimos anos (MURRAY, 1984, 1987; ABRUNA, 1986; WANG, 1991). Um eletrodo utilizado como suporte para a construção de um eletrodo modificado funciona como um conector para o fluxo de elétrons em um circuito eletrônico apropriado proporcionando condições para que possa ocorrer a transformação redox com filme imobilizado. Comparado a um eletrodo convencional, um maior controle das características e reatividade na superfície de um eletrodo modificado podem ser alcançados.

Uma forma conveniente de incorporação de um modificador na superfície de um eletrodo pode ser realizada simplesmente pela utilização de uma camada de um filme polimérico. Muitos polímeros são aplicados para revestir superfícies eletródicas simplesmente pela combinação de propriedades de adsorção, atração eletrostática e baixa solubilidade na solução eletrolítica, ou ainda pela utilização de polímeros pré-formados ou obtidos através de polimerização eletroquímica.

A vantagem de pré-concentração de espécies, observada com a utilização de um eletrodo modificado, pode ser obtida através do recobrimento de uma superfície com uma fina camada de um filme de um polímero de troca iônica (UGO, 1995).

O sucesso da pré-concentração e determinação eletroquímica de um analito sobre um eletrodo recoberto com um filme poliônico começa com a escolha do polímero de troca-iônica e da variedade de técnicas disponíveis para detecção, tais como: voltametria de varredura linear, de onda quadrada e pulso diferencial e voltametria de re-dissolução utilizando-se eletrodo rotatório entre outras.

O estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com poliaminoácidos iônicos e suas interações com compostos de interesse biológico e farmacêutico são de grande importância não só na área da eletroanálise, mas

em outras áreas correlacionadas, tais como aquelas envolvendo a saúde humana, uma vez que pode ser usado como modelo de interações mais complexas.

Dentre estes modificadores, polieletrólitos sintéticos têm recebido particular atenção, devido à sua importância como modelos simplificados de polieletrólitos naturais tais como, proteínas e ácidos nucleicos. O uso destes polieletrólitos sintéticos como reagentes ancorados em superfícies eletródicas, tem permitido, além do estudo de interações mais complexas, aumentar a seletividade e sensibilidade analítica de métodos de detecção através de etapas de pré-concentração ocorrida através de interações específicas de grupos do polieletrólito e a espécie eletroativa.

A escolha do polímero de troca-iônica a ser usado como modificador tem levado em consideração, principalmente, a facilidade de se obter filmes estáveis e reproduzíveis sobre a superfície eletródica. A deposição do filme pode ser obtida de diferentes maneiras, onde alguns métodos têm sido mais empregados (MURRAY, 1984). O procedimento mais simples é baseado na adição do polímero sobre a superfície eletródica, seguida de lenta evaporação do solvente. Outro procedimento bastante efetivo é a preparação envolvendo eletropolimerização, baseada principalmente na oxidação de precursores monoméricos eletroativos (MURRAY, 1984; HILLMAN, 1987). Adicionalmente, algumas vezes, a estabilidade da camada polimérica é melhorada utilizando-se reações inter-cruzadas através de adição de contra-íons ou irradiação.

1.4 - Eletrodos modificados por filmes de Poli-L-Lisina

Baseados nas propriedades destes poliaminoácidos, em especial a da Poli-L-Lisina (PLL) e suas facilidades em modificar uma superfície eletródica, com propriedades de troca iônica ou de promover uma ação eletrocatalítica, o sistema tem grande potencial para o estudo da interação com substâncias que apresentam atividade antioxidante.

Sendo assim, polímeros derivados do poliaminoácido PLL podem ser usados com sucesso no desenvolvimento de sensores eletroquímicos através de métodos simples e rápidos na preparação e obtenção de eletrodos modificados.

O polímero PLL é um poliaminoácido sintético obtido pela condensação de várias unidades de seu monômero, lisina. Esta unidade monomérica é um α -

aminoácido dotado de uma cadeia de hidrocarbonetos com cinco grupamentos CH_2 e outra função- NH_2 em posição ε . Comercialmente, pode ser encontrado sobre diversos pesos moleculares resultantes do número de unidades matriciais utilizadas para sua confecção. O polímero apresenta um $\text{pK}_a = 10,7$ (ANSON, 1983).

De acordo com a literatura (IMMANENI, 1998; DAVIDSON, 1967), as reações de formação do polímero ocorrem entre as unidades monoméricas da lisina através da formação de ligações peptídicas entre os resíduos α ($-\text{NH}_2$) de uma unidade com o terminal ($-\text{OH}$) da função carboxílica de outra matriz gerando a correspondente função peptídica. A estrutura final do polímero apresenta as funções peptídicas e o terminal ε ($-\text{NH}_2$) conforme mostra a Figura 1.

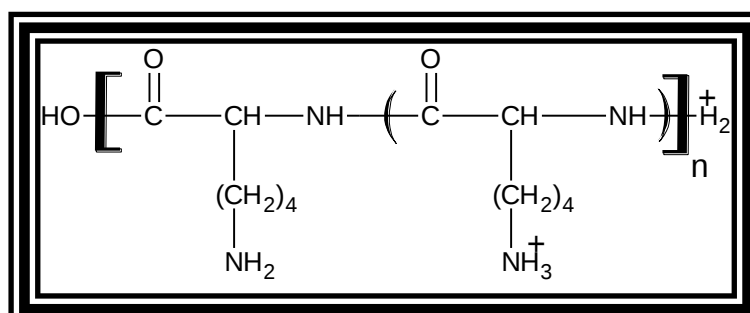


Figura 1 - Estrutura molecular da Poli-L-Lisina.

A modificação de eletrodos com PLL têm sido investigada por diversos autores, utilizando-se diversos materiais eletródicos, e diferentes técnicas de recobrimento nas aplicações analíticas. O uso de eletrodos recobertos por filmes de polieletrólitos com possibilidades analíticas tem se baseado em mecanismos típicos de troca-iônica, na incorporação de pares redox no recobrimento polimérico conferindo propriedades eletro-catalíticas ao eletrodo ou ainda, com características ligantes capazes de interagir especificamente com o analito através de reações de complexação (UGO e MORETTO1995).

Os estudos pioneiros foram demonstrados por ANSON *et al.*, 1983a, 1983b no qual estes estudos mostram que soluções aquosas de PLL quando aquecidas à 80°C sobre eletrodo de grafite, promovem a aderência do polímero à superfície eletródica, com mudança na sua conformação α -helicoidal para a conformação β -laminar.

Desde 1995, MIZUTANI e colaboradores tem trabalhado intensamente na construção de biossensores com eletrodos modificados com PLL. Eletrodos de

carbono vítreo modificados por membranas poliiônicas complexas, formadas por sanduíches de PLL e poli-(4-estirenosulfonato)(1995a), foram preparados pelos autores e utilizados como biossensores amperométricos em imobilização de lactato oxidase (1995b), colina oxidase, glucose oxidase (1996) e NADH (2000).

A utilização de PLL na modificação de eletrodo de mercúrio foi investigada por FOGG *et al.*, 1994a, 1994b. A aplicação do eletrodo de mercúrio modificado com PLL foi realizada na análise de compostos farmacêuticos aniônicos, tais como; nitroprussiato de sódio que é usado como vasodilatador no controle da pressão arterial e nedocromil de sódio que é usado como droga antiasmática. Um aumento de sensibilidade foi observado em relação ao eletrodo de mercúrio convencional.

Do mesmo modo, a utilização da PLL no recobrimento do eletrodo de mercúrio, também, permite a análise voltamétrica de ceftazidima em matrizes biológicas. A adição de PLL na célula eletroquímica provoca grande incremento de corrente, propiciando um método sensível e seletivo para análise de ceftazidima em urina humana cujo limite de detecção encontrado foi de $1,0 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ (FERREIRA, *et al.*, 1999).

CAMPBELL, 2001 mostra que os grupos amino da PLL podem ser utilizados na complexação com derivados da vitamina B₁₂. As propriedades catalíticas deste complexo foram avaliadas e mostraram eficiência na redução de alcenos halogenados. Um sensor eletroquímico foi construído para monitorar a formação do etanol durante processos de fermentação. O sensor é baseado na detecção amperométrica pulsada usando as disposições do microeletrodo de platina modificadas com uma membrana PLL e PVC (WARRINER *et al.*, 2002).

A aplicabilidade de eletrodos recobertos por filmes de PLL tem sido investigada como modelo de polieletrólitos eletricamente carregados capazes de modificar a superfície de diversos materiais eletródicos, e como potencialidade para a determinação de compostos farmacêuticos importantes (PEREIRA, *et al.*, 2004).

PEREIRA *et al.*, 2004 mostraram que a utilização de glutaraldeído (GA), em reação cruzada com PLL, tem melhorado sensivelmente a aderência e retenção do poliaminoácido na superfície do eletrodo de carbono vítreo, permitindo analisar com alta estabilidade e sensibilidade o par ferri/ferrocianeto presente em solução aquosa. Neste caso, os filmes de PLL aderiram melhor à

superfície do eletrodo de carbono vítreo quando a PLL foi entre-cruzada parcialmente por meio do GA. Uma composição do filme de PLL e GA de 97,5%/2,5% confere boa adesão e retém a potencialidade de troca aniônica do PLL. O eletrodo modificado foi aplicado para a determinação do iodeto envolvendo a oxidação ao iodo. O método foi aplicado com sucesso à determinação do idoxuridina em amostra de urina (PEREIRA *et al.*, 2005).

O eletrodo modificado por filmes de PLL/GA foi empregado na análise de nitroprussiato de sódio, um vasodilatador comercial. A faixa de resposta linear do nitroprussiato em tampão B-R (pH 4,0) foi $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e o limite de detecção foi $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O sensor voltamétrico foi aplicado diretamente a determinação do nitroprussiato em plasma humano e amostras de urina e a recuperação média para essas amostras foi cerca de 95-97%, sem qualquer pré-tratamento. (PEREIRA e ZANONI 2007).

Os filmes de PLL / GA foram testados para determinação do corante reativo Cibacron Blue F3GA (CB). Os filmes podem ser usados para detectar níveis baixos do corante usando seu pico da oxidação em +0.75V por voltametria cíclica. O método descrito foi aplicado para a determinação do corante em água da torneira e amostras coletadas do reservatório de tratamento municipal com uma recuperação de $89,2\% \pm 5,4$ e $88,0\% \pm 6,5$, respectivamente (VIANA *et al.*, 2006).

Embora recobrimentos da superfície eletródica de carbono vítreo com filmes de Poli-L-Lisina sejam bem explorado, a maioria dos estudos mostra que sua aderência à superfície é limitada e melhores sensores são construídos quando outros agentes ancorantes são usados como no caso do glutaraldeído que permite fixação do poliaminoácido à superfície. Deste modo, foram exploradas outras formas de imobilização da PLL na superfície usando matrizes híbridas (orgânica-inorgânica) obtidas pelo processo sol-gel.

1.5 - Filmes de siloxano-polipropilenoglicol (PPO) preparados por método sol-gel

A formação de filmes híbridos, obtidos pelo processo sol-gel, pode oferecer uma matriz físico-quimicamente apropriada para imobilização eficiente de diferentes compostos (GILL, BELLESTROS, 1998). No processo sol-gel,

usualmente, uma molécula do precursor metal alcoóxido de baixo peso molecular (tetrametoxisilano ou tetraetoxisilano), é primeiramente hidrolisado na presença de água, catalisador ácido e solvente. A hidrólise resulta na formação de grupos silanóis (Si-OH) que reagem para a formação de uma suspensão coloidal (sol) e eventualmente gel. Depois desse processo, os solventes são evaporados para formação uma rede de poros sub-micrométricos e cadeias poliméricas. O tamanho da cadeia polimérica (parte orgânica da molécula) influencia a compactação das cadeias, assim como, o tamanho dos poros formados. Outro fator importante é o catalisador empregado durante a poli-condensação do precursor, na qual há o empacotamento dos átomos de silício, conferindo maior rigidez à matriz polimérica. Essa é uma característica importante no filme para que o material fique retido (ocluído) no interior dessa matriz híbrida em soluções aquosas para que não seja lixiviado para solução.

Diante das vantagens demonstradas pelas matrizes híbridas, é de interesse deste trabalho avaliar a utilização de filmes de siloxano-polipropilenoglicol (PPO) preparados pelo processo sol-gel (DAHMOUCHE *et al.* 1999), com a estrutura semelhante à mostrada na Figura 2, na tentativa modificar eletrodos de carbono vítreo e aumentar a aderência do poliaminoácido PLL na superfície.

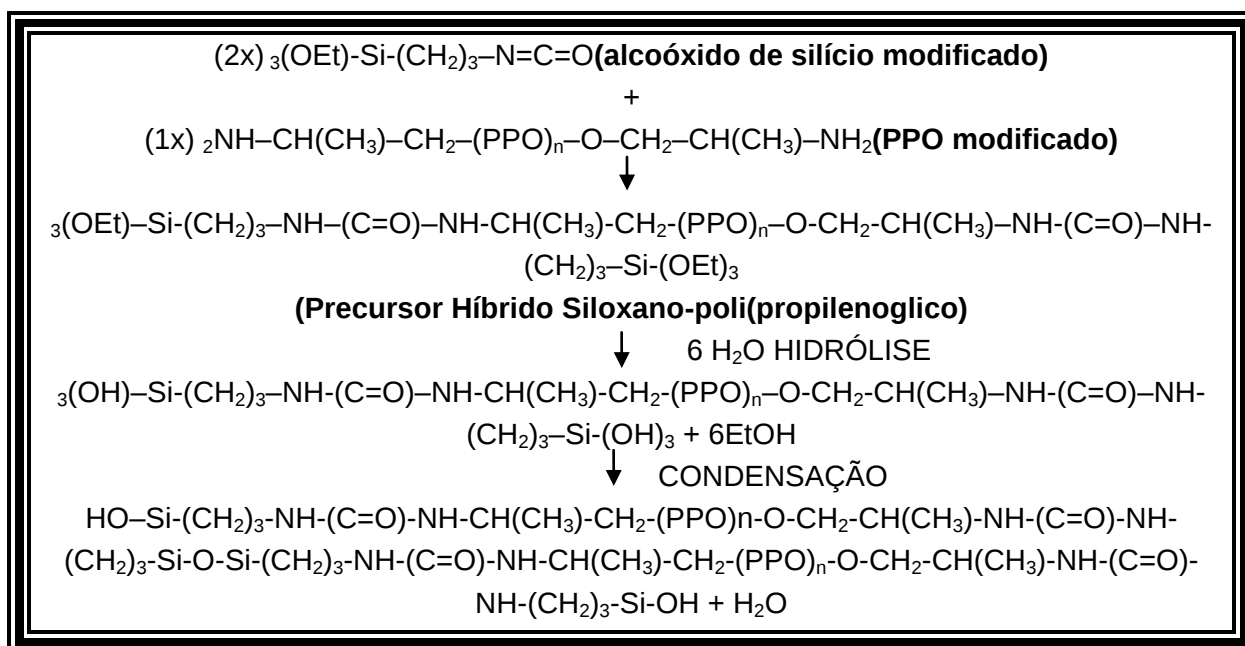


Figura 2 - Esquema de reações da síntese e policondensação dos precursores híbridos siloxano-PPO. (Tagliavini *et al.* 2008)

Considerando as características e os êxitos das aplicações de eletrodos modificados com PLL, aliados à capacidade de promover interação eletrostática com ânions, ou exibir grupos amino na forma não-protonada disponíveis para reações específicas com moléculas portadoras de hidroxilas, seria bastante relevante investigar novos métodos eletroanalíticos para determinação de flavonóides em meio aquoso utilizando eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL.

Dentro deste contexto, é de interesse desenvolver sensores voltamétricos para determinação de dois flavonóides, quercetina e catequina em amostras de chá verde e extratos de plantas.

1.6 - Quercetina e Catequina

Quercetina (QT) é um flavonóide de ocorrência generalizada em plantas (alcaparra, brócolis, alface, espinafre) e alimentos de origem vegetal (cebolas, maçãs além de vários chás). Apresentam em sua estrutura química (Figura 3) grupos hidroxilas adjacentes (orto-difenóis), localizados no anel B da molécula duplas ligações nos anéis benzênicos e dupla ligação da função oxo ($-C=O$), que em conjunto conferem a esses compostos, alta atividade antioxidante.

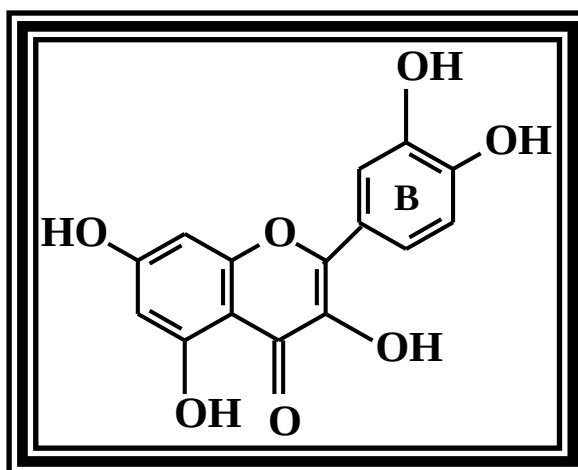


Figura 3 - Estrutura química do antioxidante quercetina.

Seu comportamento eletroquímico tem sido investigado em diferentes materiais eletródicos por diversos autores (ZARE, NAMAIZAN E NASIRIZADE, 2005; ZIELINSKA, NAGELS E PISKULA, 2008, TIMBOLA *et al.* 2006), bem como

na determinação da capacidade antioxidante em produtos usados na alimentação humana (OSMAN, MAKRIS E KEFALAS, 2008).

Segundo (BRETT e GHICA, 2004), a oxidação eletroquímica mostra três picos de oxidação e um pico de redução dependente das condições experimentais. Um processo de oxidação envolvendo dois prótons e dois elétrons no primeiro pico conduzem à formação da *orto*-quinona correspondente.

As catequinas (CT) são encontradas em várias frutas, no vinho tinto, mas as maiores fontes são o chá verde e o chocolate (MANACH, 2004), cuja estrutura química é mostrada na Figura 4.

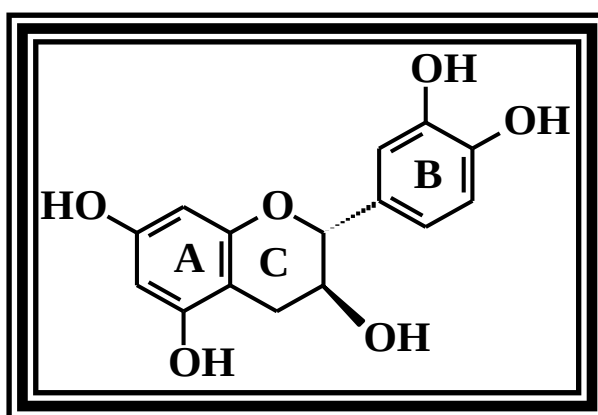


Figura 4 - Estrutura química do antioxidante catequina.

A catequina como outros flavonóides, apresenta uma estrutura com dois anéis aromáticos que são ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (MANACH, 2004). O número de grupos hidroxilas nas moléculas da quercetina e catequina no anel B é o mesmo, mas a atividade antioxidante dessas moléculas é bem diferente. A dupla ligação na posição 2,3 e a função oxo ($-C=O$) no anel C da quercetina promovem uma maior atividade antioxidante quando comparado com a catequina. Entretanto, não são apenas os grupos hidroxilas do anel C que são importantes para a atividade antioxidante dos flavonóides. Os grupos substituintes no anel B têm papel relevante nesta atividade, por ativar/desativar o grupo hidroxila, o qual é responsável pela maior atividade antioxidante em relação à catequina, mas não em relação à quercetina. (RICE-EVANS *et al.*, 1995).

O interesse na quantificação de catequina está relacionado à sua identificação e validação de seus benefícios potenciais em termos de saúde humana. A catequina tem sido correlacionada à vários efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo antioxidante, anti-carcinogênica, anti-mutagênica, anti-

inflamatório, e as atividades antimicrobiana além de poder combater os radicais livres que danificam as células humanas sob condições oxidativas causando perturbações graves no metabolismo celular (MASUKAWA, 2006).

A determinação e quantificação de catequinas por HPLC têm ocorrido particularmente com detectores espectrofotométricos na região do ultravioleta (MERKEN e BEECHER, 2000; DALLUNGE e NELSON, 2000, WANG, PROVAN e HALLIWELL, 2003), fluorimétricos (NAGAOKA, TOYOSHIMA e TAKEDA, 2002), de massa (DALLUGE e NELSON, 2002) e eletroquímicos (SANO *et al.*, 2001).

O mecanismo de oxidação eletroquímico da catequina foi investigado previamente por JANEIRO e BRETT (2004), em ampla faixa de pH, utilizando as técnicas de voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada. O mecanismo de oxidação ocorre segundo etapas bem definidas envolvendo o grupamento catecol e é dependente do pH. A oxidação do catecol (3,4-dihidroxila) ocorre em potenciais positivos muito baixos, e é uma reação caracterizada por um processo reversível.

Deste modo, pretende-se imobilizar filmes de poli-L-lisina sobre o filme de PPO (PLL/PPO) diminuindo a possibilidade de lixiviação pelo encapsulamento da mesma no interior do polímero. O eletrodo assim modificado será empregado na determinação destes antioxidantes em amostras complexas de chá verde e extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa*.

1.7 - Chá verde

A *Camellia sinensis* (L) O Kuntze é uma planta da família *Theaceae*, conhecida popularmente por chá verde ou “green tea”. Suas folhas secas possuem cerca de 30% de compostos polifenólicos, cuja principal atividade terapêutica é sua propriedade antioxidante (SIMÕES *et al.*, 2004). O chá, uma das bebidas mais consumidas no mundo, é uma das fontes mais ricas em flavonóides. Produzidos a partir de folhas de *Camelia sinensis*, o chá verde e preto são largamente consumidos em países orientais e ocidentais, respectivamente. O chá verde é constituído de folhas secas colhidas de diferentes partes da planta, o que determina os vários tipos de chás disponíveis. Já o chá preto passa por diversas etapas de processamento, dentre elas a de

“fermentação”, que consiste, na verdade, de uma oxidação enzimática dos flavanóis a teaflavinas, que constituem um grupo característico deste tipo de chá.

Os flavonóis, quercetina, miricetina e kaempfero foram quantificados em diversos tipos de chás, encontrando, para chá verde, teores 1,3 para miricetina, 1,6 para quercetina e 1,5 para kaempferol em mg/g de folha seca. (TOYODA *et al.*, 1997)

Os pesquisadores, WANG e HALLIWELL (2000), encontraram valores entre 0,8 a 1,6 e 0,2 a 0,5 de miricetina; 1,8 a 4,0 e 1,0 a 3,0 de quercetina e 1,6 a 3,3 e 1,7 a 2,3 de kaempferol em mg/g de folha seca de quatro tipos de chá verde e dois tipos de chá preto, respectivamente.

1.8 - Extrato bruto etanólico da entre-casca da *Vatairea macrocarpa*

No Brasil, quase toda a população faz uso de plantas medicinais (TEIXEIRA *et al.*, 2006); o uso das plantas é, em muitos casos, único recurso terapêutico disponível. Os conhecimentos etnobotânicos (cultura popular), freqüentemente, guiam as pesquisas com produtos naturais, podendo contribuir para descobertas de fármacos. A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas, onde se constatou que aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos em todo mundo, originam-se de plantas com compostos ativos utilizados em uso comum, (RATTES, 2001). O termo planta medicinal (CALIXTO, 2000) pode ser definido como plantas utilizadas para aliviar, prevenir e curar certas doenças e distúrbios fisiológicos.

A *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke (Leguminosae) é uma árvore selvagem nativa de flora brasileira e amplamente distribuída em todo o território brasileiro. É conhecida como Amargosa, por seu gosto amargo, maleiteira ou como Angelim do Cerrado. O chá da *Vatairea macrocarpa* é extensivamente usado na medicina popular para tratar sintomas de diabetes (GUARIM NETO, MORAIS, 2003). O uso tradicional recomenda ferver um pedaço da entrecasca de qual um chá avermelhado amargo é obtido com um rendimento de 2.5% (v/v) de extração. Na medicina popular, o chá da entrecasca desta planta é extensamente usado no combate de Diabetes Mellitus. A atividade anti-diabética do extrato bruto etanólico da entre-casca *Vatairea macrocarpa*, testada em ratos, mostrou que a

longo prazo seu uso poderá ser útil no tratamento de condições diabéticas (OLIVEIRA, *et al.* 2008). Em estudos recentes, foram isolados do extrato da entrecasca da *Vatairea macrocarpa*, dois flavonóides a catequina e epicatequina, tendo uma maior porcentagem de massa a forma catequina (PEREIRA, 2008).

2 – OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é modificar eletrodos de carbono vítreo com filmes do poliaminoácido poli-L-lisina usando diferentes modos de imobilização, dentre eles o uso de filmes híbridos de siloxano-polipropilenoglicol (PPO) preparados por sol-gel. Considerando as características dos eletrodos modificados com PLL, aliados a capacidade de promover interação eletrostática com ânions, ou reações específicas com moléculas portadoras de hidroxilas, pretendem-se aplicar estes eletrodos na determinação de dois flavonóides, quercetina e catequina em amostras de chá verde e extratos de plantas, respectivamente.

3. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Reagentes, soluções, solventes e amostras

3.1.1 – Reagentes

Os padrões dos flavonóides utilizados nos experimentos foram quercetina (QT), rutina (R) e catequina (CT) obtido da Sigma-Aldrich. Os ácidos fenólicos foram os ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACI) e ácido gálico(AG) obtidos da Fluka e ácido ascórbico(AA) da Merck.

Os reagentes utilizados em soluções de eletrólito de suporte foram adquiridos das seguintes companhias: ácido acético, ácido bórico, ácido ortofosfórico e hidróxido de sódio (Merck), todos foram de grau de pureza analítico. E para os experimentos cromatográficos foram utilizados solventes Metanol (J. T. Baker) e ácido fórmico (Merck) grau HPLC.

3.1.2 – Soluções e solventes

Soluções estoque de Q, CT, R, AA, AC, ACI e AG ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas a partir da dissolução de quantidades apropriadas do soluto em metanol (grau HPLC, J. T. Baker) mantidas sob refrigeração até a sua utilização. Soluções diluídas na concentração desejada foram preparadas imediatamente antes das análises por diluição de alíquotas da solução estoque ou por adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

Para as análises cromatográficas as soluções estoques dos padrões foram filtradas em filtro MILLEX Millipore ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$). Metanol (J. T. BAKER), ácido fórmico (MERCK) e água desmineralizada e deionizada em sistema Millipore (Milli-Q) foram utilizados como fase móvel para a separação dos antioxidantes. As soluções tampão usadas como eletrólito suporte foram preparadas da seguinte forma: Tampão Britton-Robinson (B-R): mistura de ácido acético $0,04 \text{ mol L}^{-1}$

(Merck), ácido bórico $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) e ácido ortofosfórico $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck). Ajustando-se o pH desejado com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck).

Previamente às medidas eletroquímicas, todas as soluções foram submetidas à desoxigenação através de borbulhamento de gás nitrogênio durante dez minutos. As vidrarias foram previamente lavadas com solução de Extran básico e água destilada e quando necessário colocado no aparelho de Ultra-som (Odontobras 1440D) e posteriormente seco em estufa à 80°C .

Solução de trabalho do polímero Poli-L-Lisina (Sigma) (peso molecular = 32.400) foi obtida pela dissolução direta de 25 mg do composto em 2,5 mL (solução a 1%) em água purificada de qualidade Milli-Q. Alíquotas de 0,1 mL foram mantidas em frasco hermeticamente fechado em freezer e descongeladas diariamente para uso. A solução alcoólica utilizada como catalisador da reação de policondensação da matriz híbrida foi fluoreto de amônio $[\text{NH}_4\text{F}] / [\text{Si}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.1.3 – Síntese do precursor

Uma classe de nanocompósitos correspondente aos híbridos siloxano-poliésteres (siloxano-polipropilenoglicol) foi utilizada para a formação dos filmes híbridos orgânico-inorgânico preparados por processo sol-gel.

O precursor foi obtido (DAHMOUCHE, *et al.*, 1997) a partir da reação do alcoóxido de silício modificado 3-isocianatopropiltrietoxisilano (IsoTrEOS) e o polímero derivado do siloxano-polipropilenoglicol modificado $(\text{NH}_2\text{-(PPO)}_n\text{-NH}_2)$, de nome comercial Jeffamine (o sub-índice n indica a repetição do monômero). Quantidades equimolares de IsoTrEOS e O,O' Bis((2-aminopropil)-polipropilenoglicol) (MM = 4000) foram misturadas adequadamente em tetrahidrofurano (THF) e mantidos sob agitação e refluxo à 80°C por aproximadamente 20 horas. Em seguida o solvente foi extraído com o auxílio de um evaporador rotatório acoplado a uma bomba de vácuo, obtendo-se o híbrido siloxano-polipropilenoglicol puro. A solução do precursor híbrido foi armazenada em frasco de vidro e mantida em dessecador.

O precursor foi submetido à reação de hidrólise e condensação resultando na formação de um filme. As quantidades adotadas na preparação dos filmes híbridos orgânicos-inorgânicos foram as seguintes: 1,0 g de precursor, 2,0 mL de

etanol contendo o catalisador da reação de condensação $\text{NH}_4\text{F}=1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 0,4 mL de água. Após agitação, obteve-se um sol homogêneo e transparente. Os filmes obtidos foram utilizados apenas para melhor aderência do poliaminoácido PLL.

3.2 – Experimentos voltamétricos e ponteciométricos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB modelo PGSTAT 30 (Eco Chemie) interfaceado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9 (Eco Chemie) para aquisição dos dados. Um sistema convencional de três eletrodos foi usado, composto por um eletrodo de carbono vítreo (ECV) (diâmetro de 2,0 mm) como eletrodo trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl ($E_{\text{Ag/AgCl}}$) usado como eletrodo de referência e um fio de platina usado como eletrodo auxiliar. Para este sistema, uma célula convencional com capacidade máxima de 10,0 mL foi usada para as medidas eletroquímicas.

Todas as medidas de pH foram realizadas em um elétrodo de vidro combinado (Corning) conectado a um pH-metro digital (Corning, modelo pH/ion analyzer 455). A água deionizada foi purificada com um sistema de Milli-Q (modelo Simplicity 185, Millipore). Para a limpeza das vidrarias e preparo de algumas soluções utilizou-se um Ultrassom Odontobras modelo 1440D.

A caracterização dos eletrodos modificados por filmes de PLL/PPO foi realizada testando-se o substrato antes e após a modificação por meio de técnicas voltamétricas. Dentre elas utilizaram-se as técnicas de voltametria cíclica, onda quadrada e pulso diferencial. As análises foram realizadas por meio da medida de intensidade de corrente em função do potencial aplicado.

As medidas foram realizadas pela imersão do eletrodo convencional ou modificado na célula eletroquímica contendo o analito de interesse e subsequentes análises.

3.2.1 – Preparação do eletrodo modificado por filmes de Poli-L-Lisina

Primeiramente o eletrodo de carbono vítreo foi polido com alumina 0,3 μm dispersa sobre tecido aveludado, seguido de lavagem com água e depois seco a

temperatura ambiente. A obtenção dos filmes de PLL sobre a superfície do filme foi testada usando dois procedimentos conforme descritos a seguir.

3.2.2 – Imobilização A (PLL/PPO*)

Filmes de Poli-L-Lisina (PLL) e do híbrido siloxano poliéster (PPO) foram preparados pela mistura de 5 µL de solução de PLL (1%) e 0,5 µL de PPO e adicionadas diretamente sobre a superfície do eletrodo. Após a volatilização do solvente, o eletrodo foi submetido a aquecimento em estufa a 80°C durante 2 minutos com intuito de promover a mudança de conformação do filme de PLL (ANSON, 1980) da forma de α -hélice para planar, proporcionando maior aderência ao eletrodo.

3.2.3 – Imobilização B (PLL/PPO)

Filmes de Poli-L-Lisina (PLL) e Sol-Gel do híbrido siloxano poliéster (PPO) foram obtidos pela deposição de 0,5 µL do PPO na superfície do eletrodo seguido de evaporação do solvente resultando na formação de uma fina camada na superfície do eletrodo. Após esse processo uma alíquota de 10 µL de PLL foi colocada sobre esse filme. Após ambos os processos, realizou-se uma etapa da volatilização do solvente em estufa a 80°C por 10 minutos.

3.2.4 – Incorporação do analito sobre o filme de PLL/PPO

A incorporação do analito ao eletrodo recoberto por filmes de PLL foi realizada de duas maneiras: A) incorporação eletroquímica: imersão do eletrodo modificado em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina submetido à ciclagem sucessiva do eletrodo entre potenciais de +0,2 a +0,7 V (50 ciclos), e B) através da imersão do eletrodo modificado em um béquer contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina mantido sob agitação com tempo controlado entre 0 a 10 minutos. Completado este período, o eletrodo foi submetido à lavagem em água destilada e transferido para célula eletroquímica contendo solução hidro-etanólica de 50% solução tampão B-R e 50% etanol para quercetina ou somente o eletrólito de suporte para catequina.

3.2.5 – Determinação de quercetina em chá verde

A solução de chá verde foi preparada com amostras de chá verde da marca Mate Leão. O preparo do chá foi através da infusão de 1g de chá verde por 10 minutos em água Milli-Q em ebulição (LIMA, MELO E LIMA, 2004), para maior extração dos compostos fenólicos. Em seguida, a infusão foi filtrada á vácuo em papel de filtro sendo resfriada em temperatura ambiente. Alíquota de 5 μL dessa solução foi transferida diretamente para um béquer contendo 10 mL de solução hidro-etanólica pH 2,0. O eletrodo modificado pelo filme de PLL/PPO foi imerso nesta solução agitando-se durante 10 minutos. Em seguida, este eletrodo foi transferido para uma célula eletroquímica e os voltamogramas de onda quadrada foram registrados ($f = 75\text{Hz}$, amplitude de pulso de 50 mV e incremento potencial 2 mV). Os valores das correntes de pico foram obtidos e a concentração da QT foi determinada através do método da adição de padrão (HARRIS, 2001), adicionando-se alíquotas de uma solução $7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina a amostra original. Esta solução foi submetida ao tempo de deposição de 8 minutos e os voltamogramas foram registrados após cada adição.

3.2.6 – Determinação de catequina em extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por filme PLL/PPO

A análise de catequina foi realizada em amostras de extrato bruto etanólico (EBEtOH) de *Vatairea macrocarpa* (planta típica do cerrado matogrossense) obtido após coleta do material secagem em estufa a 40°C e posterior trituração. Ao pó foi adicionada uma solução etanólica 70% (v/v) a qual foi macerada durante sete dias à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado por rota-evaporação. O solvente residual foi evaporado em estufa a 40°C e o extrato obtido armazenado sob refrigeração. A abordagem fitoquímica do extrato apresentou teste positivo para várias classes de antioxidantes inclusive a catequina.

Uma massa de 0,05 mg do extrato foi transferida para célula eletroquímica e o volume completado para 10 mL com solução tampão B-R (pH 4,0), esta solução foi submetida à análise voltamétrica utilizando-se o eletrodo modificado

com PLL/PPO. Após prévio tempo de acúmulo (10 minutos) os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados no intervalo de 0,2 a 0,6 V sob as seguintes condições: $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$, amplitude de pulso de 50 mV e incremento potencial 2 mV). A quantificação foi realizada pelo método da adição de padrão, na qual se realizou três adições de CT, resultando em concentrações finais de 1,0, 2,0 e 3,0 $\times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3 – Experimentos Cromatográficos

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodo foram efetuadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu HPLC SCL-10AVP, degaseificador DGV-14 A, mixer FCV-10ALVP, bomba LC-10ATVP, auto-injetor SIL-10ADVP, forno CTO-10AVP e válvula de injeção Rheodyne 7725i.

A separação dos componentes foi efetuada utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex[®] Luna C-18 (2) (250,0 x 4,6 mm, 5 μm), que possui uma pré-coluna Phenomenex[®] (SecurityGuard Holder, Phenomenex[®], C-18, 4,0 x 3,0 mm). Todas as amostras foram filtradas, antes de cada injeção com auxílio de uma seringa em filtros MILLEX Millipore (0,45 μm).

O sistema cromatográfico foi estabilizado pela passagem da fase móvel na proporção e vazão requerida para as análises. Após a estabilização, as soluções contendo a mistura dos analitos foram filtradas em membranas filtrante 0,45 μm (Millipore) e injetadas (20 μL). Para a realização da corrida cromatográfica utilizou-se a fase móvel ácido fórmico/água 0,1% (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) com vazão de 1 mL por minuto e volume de injeção de 20 μL , método gradiente Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). O comprimento de onda usado foi 285 nm para todos.

3.3.1 – Determinação de quercetina em amostras de chá verde por cromatografia.

A extração dos fenólicos das amostras de chá verde foi baseado no trabalho desenvolvidos por Spáčil (2008) com algumas modificações. Para tanto,

foram realizados estudos de recuperação com os antioxidantes em três níveis de fortificação, realizando-se três repetições, avaliando alguns parâmetros de validação, tais como exatidão e precisão.

A solução de chá verde foi preparada com amostras de chá verde da marca Mate Leão. O preparo do chá foi através da infusão de 1,0 g de chá verde por 10 minutos em 100 mL água Milli-Q aquecida (LIMA, MELO E LIMA, 2004), para maior extração dos fenólicos. Em seguida, 25 mL da amostra foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL o qual foi completado com metanol. Aproximadamente 2 mL dessa solução foram filtradas em filtro Millex Millipore (0,45 μm) e 20 μL dessa amostra foram injetadas no CLAE-DAD.

3.4 – Experimentos espectrofotométricos

Um espectrofotômetro Hewlett Packard (modelo 8453) equipado com célula de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico e operando em um intervalo de comprimento de onda de 190 a 1200 nm foi usado para as medidas espectrofotométricas.

3.4.1 – Determinação de flavonóide e ácidos fenólicos em amostras de chá verde por espectrofotometria

Uma alíquota de 1,0 mL de chá verde foi adicionada em balão de 5 mL completado com solução hidro-etanólica (solução tampão B-R/etanol), em seguida alíquotas de 10,0 μL da solução estoque ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) dos padrões foram adicionadas. A absorbância foi medida monitorando os sinais de comprimento de onda utilizando a solução hidro-etanólica como branco.

3.4.2 – Obtenção da curva analítica e determinação da catequina em amostra de extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* por espectrofotometria

A curva analítica para CT foi obtida no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se soluções previamente preparada pela dissolução do padrão em etanol. A absorbância foi medida monitorando o máximo

de sinal em comprimentos de onda de 280 nm, utilizando solução tampão B-R como branco.

A quantificação de CT em amostras de extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* foi realizada pelo método de adição do padrão, a partir da diluição de 5 µL da amostra fortificada com $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de CT para 5 mL da solução tampão B-R. A mistura resultante foi submetida à análise espectrofotométrica, registrando espectros na região do visível e o máximo de absorbância foi medida em comprimentos de onda de 280 nm.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Comportamento voltamétrico da QT sobre eletrodo de carbono vítreo

A oxidação voltamétrica de solução hidro-etanólica (tampão B-R/etanol) de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em pH 2,0 foi investigada sobre eletrodo de carbono vítreo e mostrada na Figura 5.

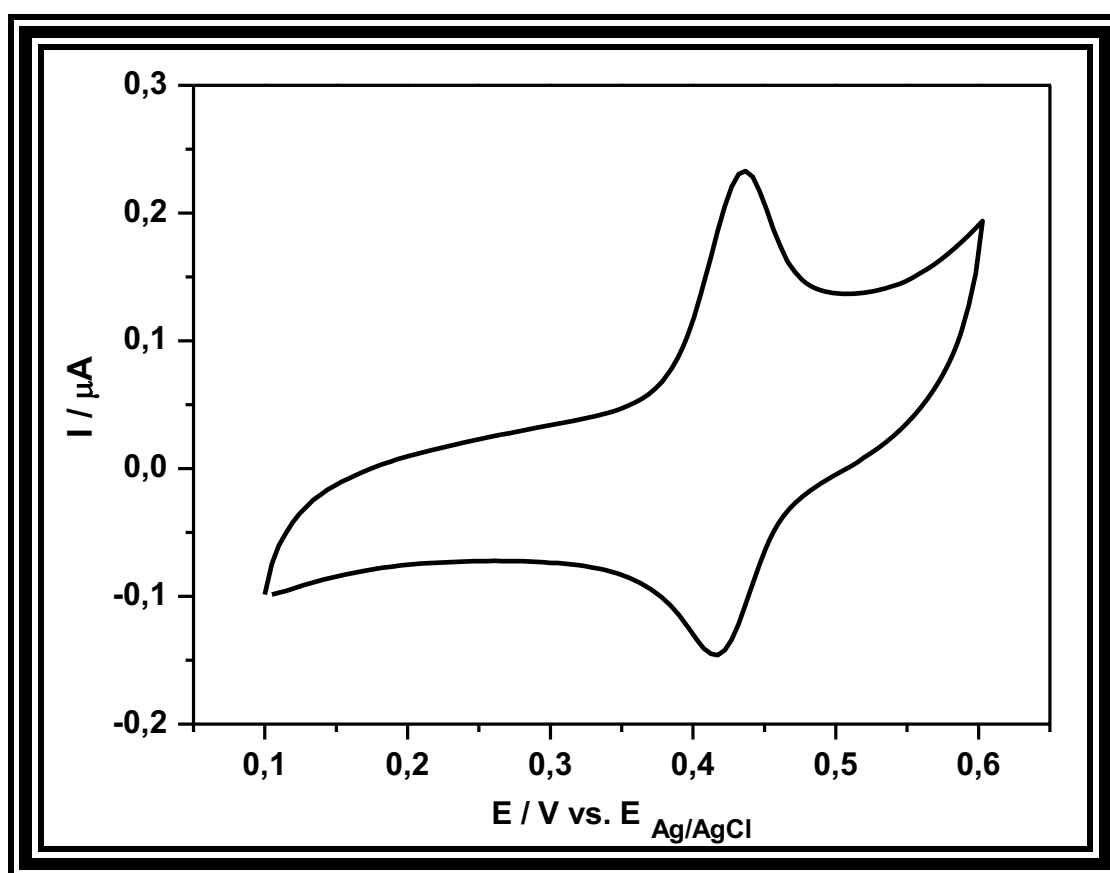
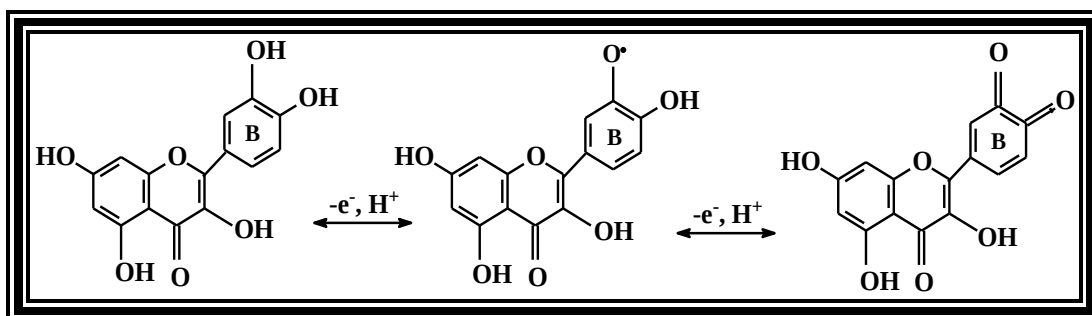


Figura 5 - Voltamograma cíclico correspondentes à oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre ECV em solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

A análise da Figura 5 mostra que QT, em meio ácido (pH 2,0), apresenta um pico de oxidação bem definido ao redor de +0,45 V (pico I). Já na varredura reversa, observa-se um pico de redução do produto em $E_{pc} = 0,410 \text{ V}$ e separado por $\Delta E_p = 25 \text{ mV}$ do pico anódico. A relação entre a corrente de pico catódica e anódica (I_{pa}/I_{pc}) é 1,00, para todos os valores de pH estudados, sugerindo que o processo de oxidação de QT sobre eletrodo de carbono vítreo é caracterizado por

um processo reversível (BARD, FAULKNER, 2001), envolvendo a transferência de 2 elétrons.

Segundo Ghica e Brett (2003), este pico está relacionado à oxidação dos grupos catecóis do anel B e envolve um processo de transferência reversível de dois elétrons e dois prótons com formação do radical semi-quinona como intermediário, de acordo com esquema apresentado no Esquema 1.



Esquema 1 – Esquema de oxidação da quercetina. (Ghica e Brett, 2003).

Voltamogramas cíclicos obtidos em ampla janela de potencial mostra que QT apresenta ainda mais dois picos de oxidação de pequena intensidade em potenciais de +0,65 V (pico II) e +0,81 V (pico III), como mostra a Figura 6.

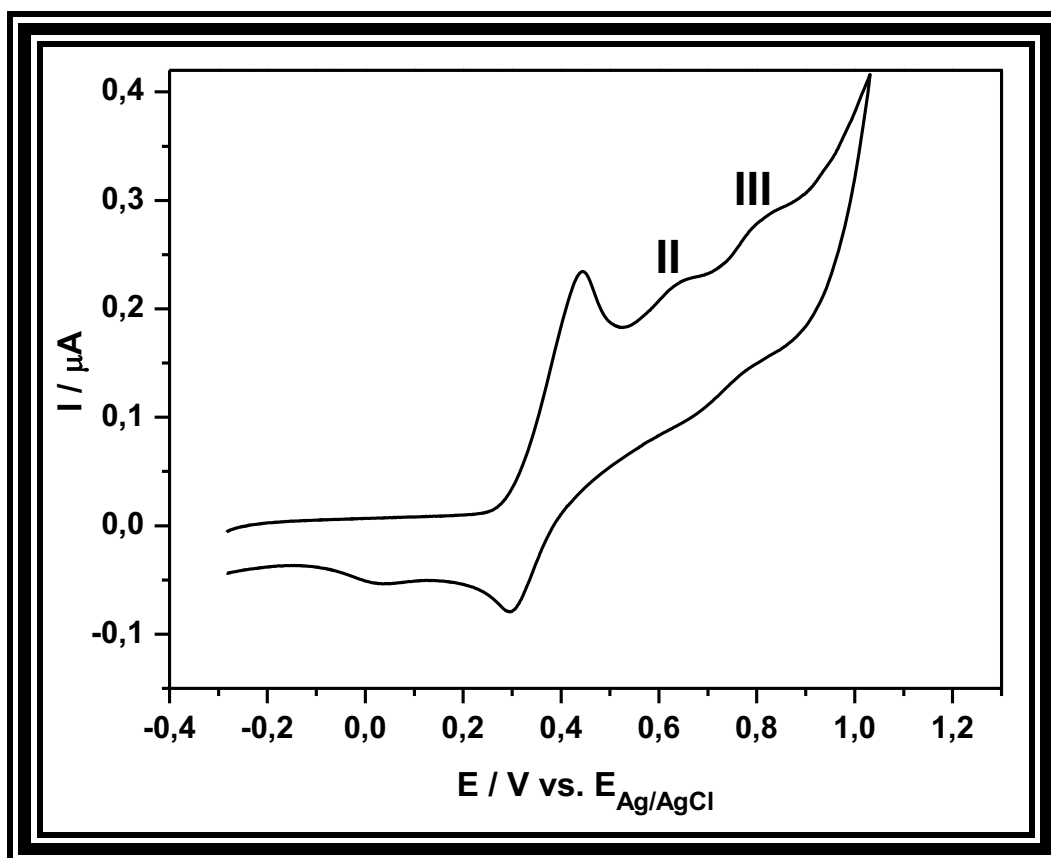


Figura 6 - Voltamograma cíclico correspondentes à oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre ECV em solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos na literatura para oxidação de QT sobre eletrodo de carbono vítreo (Hendrikson, 1994; Yang, 2001, Brett e Ghica, 2003 e Nematollahi, 2003, e Timbola, 2006).

4.2 – Eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de Poli-L-Lisina (PLL)

Nesta primeira etapa do trabalho, investigou-se a formação de filme de PLL utilizando as diferentes metodologias descritas acima, visando obter um sensor voltamétrico para antioxidantes. Considerando, que usualmente o anel catecol da QT é oxidado segundo um processo reversível de dois elétrons em potenciais de 0,45V / 0,41V (BRETT e GHICA, 2003), esta foi utilizada como composto modelo pra testar o efeito de pré-concentração e estabilidade destes filmes.

A resposta voltamétrica dos filmes de PLL imobilizados sobre eletrodo de carbono vítreo foi investigada primeiramente utilizando-se depósitos de soluções do poliaminoácido. Em temperatura ambiente, o polímero apresenta uma forma enovelada, porém atingindo temperaturas maiores, como por exemplo, 80°C, essa estrutura assume uma forma planar, que aparentemente apresenta melhor aderência à superfície (ANSON, 1983a, e 1983b). Sendo assim, após adição de 10 µL de uma solução (1,0% m/v) de PLL, o eletrodo foi submetido ao aquecimento em estufa a 80°C por 10 minutos e submetido à incorporação do analito.

Após 10 minutos de pré-concentração em circuito aberto em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (solução tampão Briton-Robinson (B-R) e etanol 50:50 (v/v; pH 2,0) sob agitação constante, o eletrodo foi lavado com água milli-Q e transferido para uma célula eletroquímica contendo somente a solução hidro-etanólica (pH 2,0), o resultado é mostrado na Figura 7.

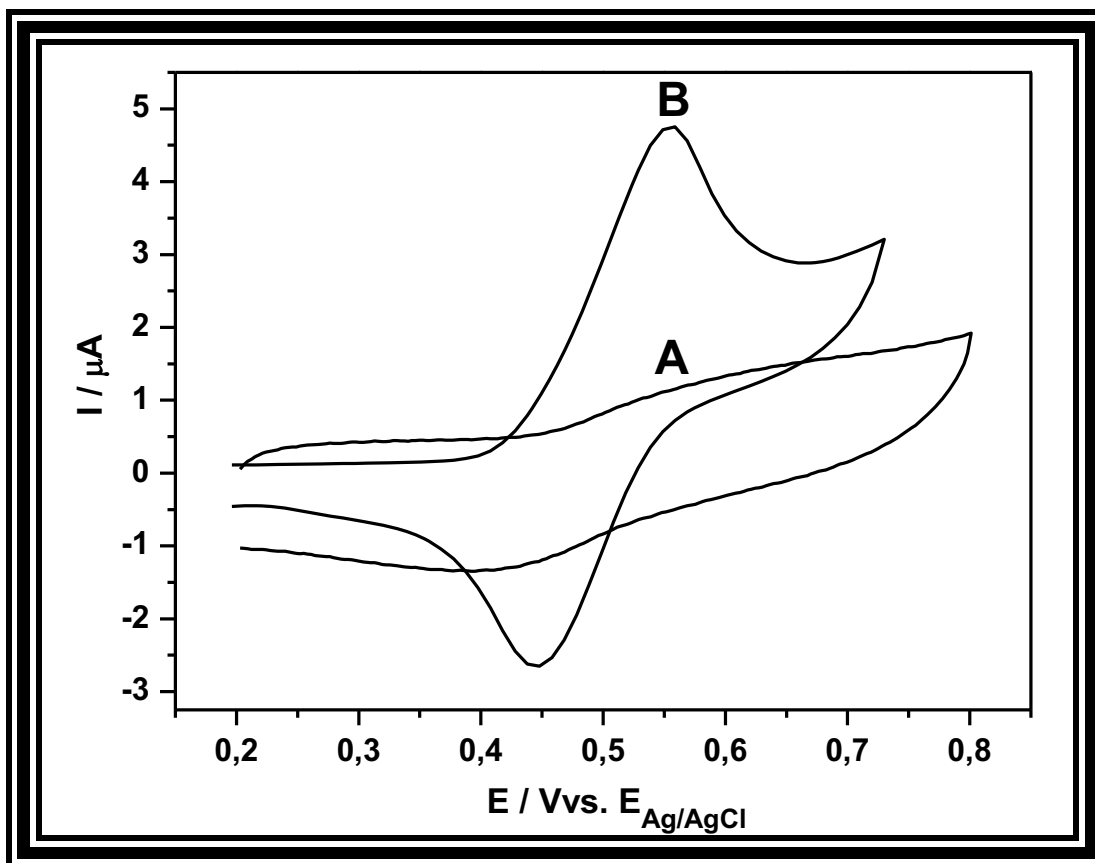


Figura 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para ECV (A) recoberto por filmes de PLL após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0 e (B) sem modificação, $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Na oxidação da QT sobre o eletrodo modificado por filmes de PLL, Figura 7A, pode-se observar uma má formação da onda voltamétrica com baixa intensidade de corrente de pico indicando, assim, que a espécie não está incorporada ao filme.

A seguir investigou-se o preparo de filmes de PLL pela ligação cruzada com glutaraldeído (Pereira, 2002). Uma alíquota de 10 μL , produto da reação da mistura de 10 μL de PLL (1,0%) e 10 μL de glutaraldeído (GA) (0,05% m/v), foi transferida para superfície eletródica. Este eletrodo foi levado a estufa, a 80°C , por 2 minutos e em seguida transferido para um solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (pH 2,0) por 10 minutos sob agitação constante. Transcorrido esse tempo, o mesmo foi lavado e transferido para uma célula eletroquímica contendo somente o eletrólito de suporte, na qual o voltamograma foi registrado conforme apresentado na Figura 8.

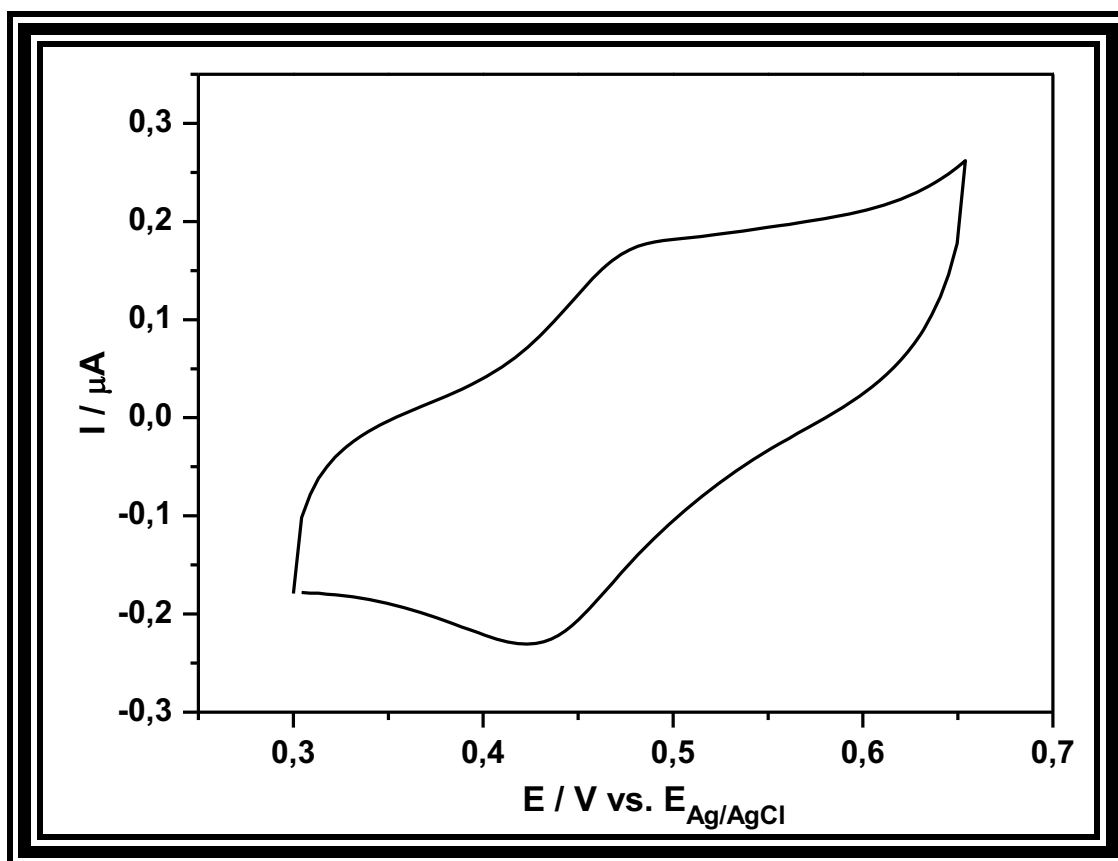


Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para ECV recoberto por filmes de PLL/GA após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

O voltamograma obtido para o eletrodo modificado PLL/GA apresenta um par de picos voltamétricos bem definidos, porém, de baixa intensidade em potenciais de $E_{pa} = 0,48 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,43 \text{ V}$ vs. $E_{Ag/AgCl}$. A drástica redução nas correntes de pico para a solução de QT, mostra que essa composição da mistura não é adequada para a retenção de quercetina no filme, provavelmente devido à uma quantidade inferior de sítios da Poli-L-Lisina disponíveis para a pré-concentração da QT, uma vez que parte dos sítios $R-NH_2$ encontra-se ligado aos grupos aldeídos do glutaraldeído.

A possibilidade de utilizar quitosana (QTS) como agente ancorante de PLL foi investigado a seguir. O método de modificação é baseado na propriedade de aderência da quitosana às superfícies do eletrodo de carbono vítreo, previamente reportado na literatura (ABDULLAH et. al. 2006; MAGALHÃES e MACHADO 1998, OLIVEIRA E VIEIRA, 2006).

A quitosana (BABEL E KUMIAWAN, 2003 e LAUS et. al. 2006) é um biopolímero, obtido a partir da reação de desacetilação da quitina (presente nas cascas de crustáceos e fungos). Os diversos trabalhos da literatura têm reportado

o uso de quitosana como agente modificador de eletrodos para a subsequente imobilização de enzima em biossensores. A versatilidade física que pode ser obtida a partir desses polímeros é destacada, levando à obtenção de fibras, filmes, géis, microesferas e membranas.

Nesta etapa, testou-se filmes obtidos pela mistura de 10 μL de QTS (1,0 %) em solução e 10 μL de PLL a 1,0 % seguida de evaporação do solvente. Para dar a conformação a PLL (PLL/QTS*), o eletrodo modificado foi levado à estufa 80°C por 2 minutos e em seguida transferido para uma solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (pH 2,0) por 10 minutos e agitação constante. Em seguida, foi transferido novamente para célula contendo somente a solução eletrolítica (B-R/etanol), o voltamograma obtido é mostrado na Figura 9.

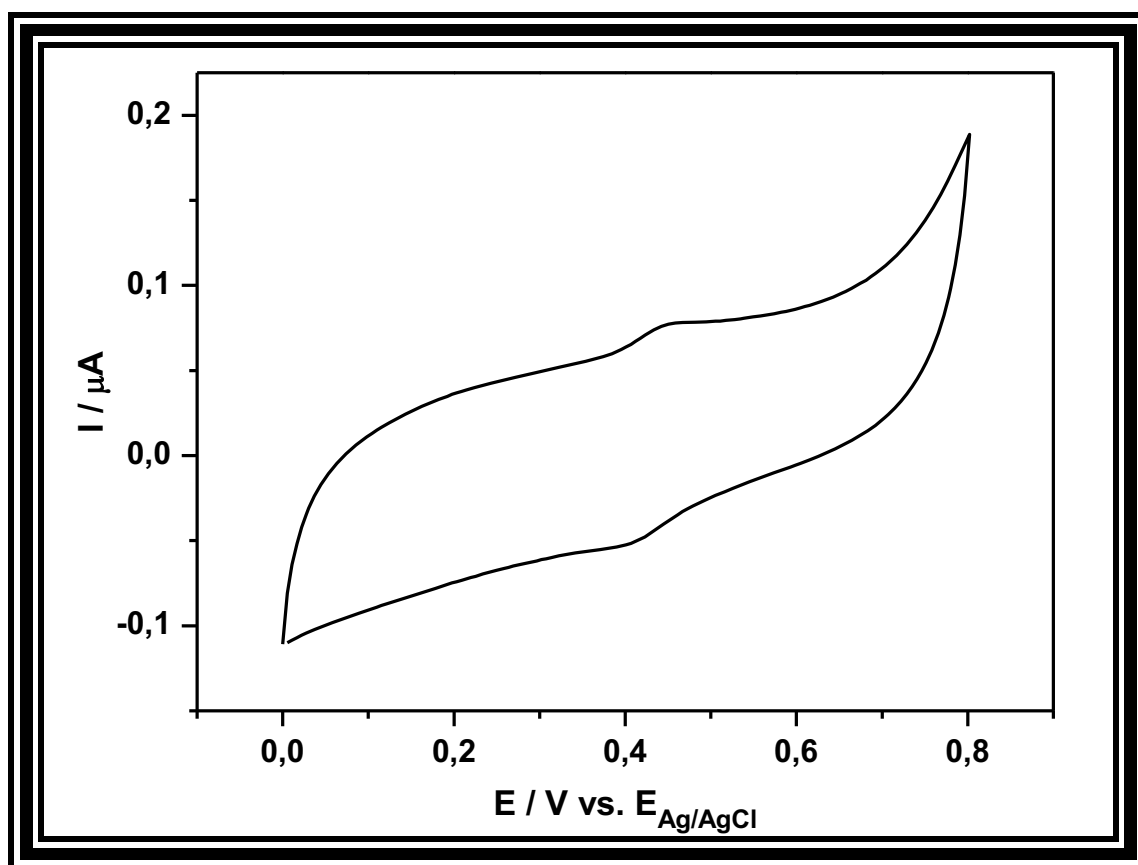


Figura 9 - Voltamograma cíclico obtidos para ECV recoberto por filmes de PLL/QTS após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Analisando-se a Figura 9, pode-se observar que apesar de apresentar potencial de corrente de pico característico para oxidação da QT ($E_{pa} = 0,45 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,40 \text{ V}$), os filmes de PLL imobilizados dessa maneira oferece baixíssimo

sinal de corrente ($I_{pa} = I_{pc} = 0,02 \mu A$) demonstrando que não é um método apropriado para a obtenção do filme.

Sendo assim, a fim de se obter filmes mais estáveis, eletrodos modificados foram avaliados e construídos através da adição de 10 μL de QTS na superfície do eletrodo de carbono vítreo, seguida de evaporação dos solventes e com adição de 10 μL de PLL (1,0%) (PLL/QTS). O eletrodo modificado foi seco em estufa a 80°C por 10 minutos e em seguida foi realizada a incorporação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em presença de solução hidro-etanólica (pH 2,0) por 10 minutos. Dando prosseguimento ao método proposto, o eletrodo foi lavado com água milli-Q e transferido para solução contendo somente o eletrólito (Figura 10).

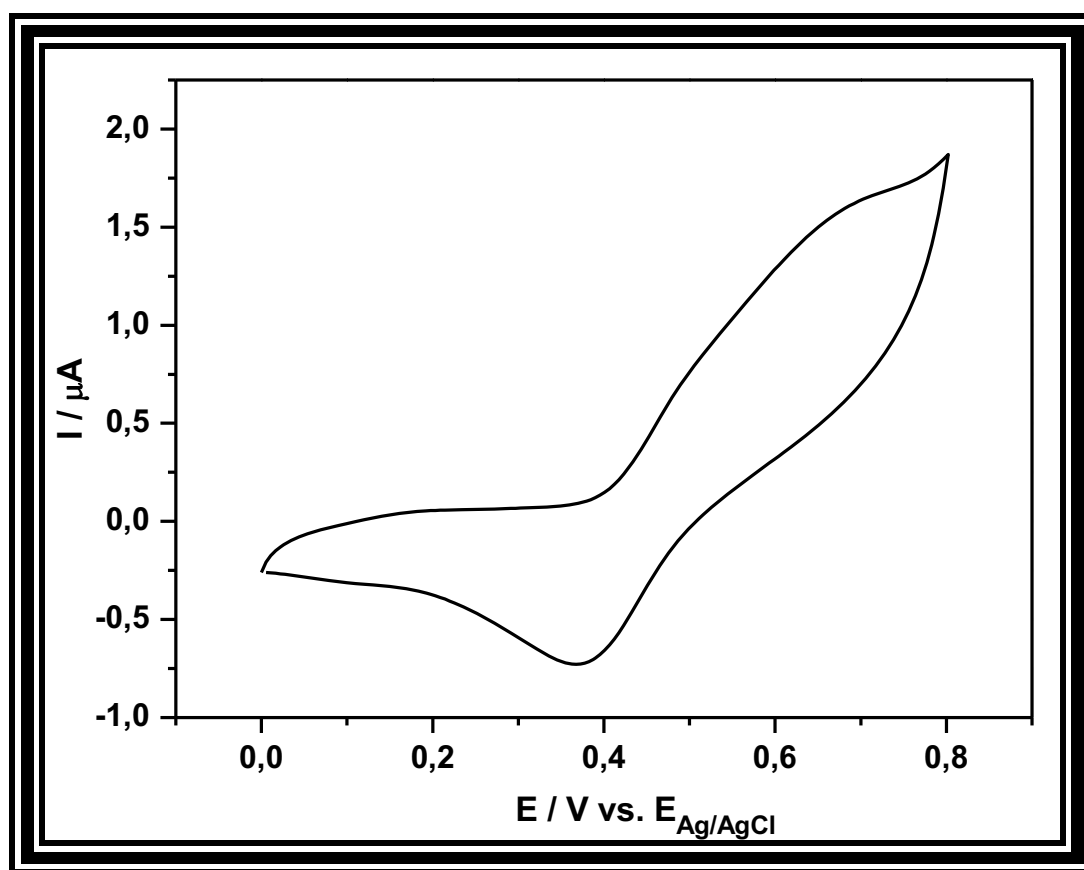


Figura 10 - Voltamograma cíclico obtido para ECV recoberto por filmes de PLL/QTS após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Pela análise do voltamograma (Figura 10) a modificação da superfície eletródica através da metodologia descrita anteriormente, mostra que os filmes de PLL/QTS apesar de possuírem uma corrente de pico satisfatória, apresentam uma deformação da onda voltamétrica para a oxidação de QT, demonstrando que a QTS não é o composto ideal para o ancoramento do poliaminoácido.

Os resultados obtidos mostraram que a modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo por filmes de PLL foi insatisfatória para construir filmes estáveis. Sendo assim, buscou-se uma nova maneira para melhor imobilizar a Poli-L-Lisina, usando filmes híbridos de siloxano-polipropilenoglicol (PPO) obtidos pelo método sol-gel ainda não explorados na literatura.

4.2.1 - Modificações do eletrodo de carbono vítreo por filmes híbridos de óxido de polipropilenoglicol (PPO) e PLL

A crescente busca por materiais com altos desempenhos tem levado pesquisadores a combinar propriedades de componentes orgânicos com as dos inorgânicos, estratégia que levou ao desenvolvimento de materiais híbridos orgânico-inorgânicos (JOSÉ e PRADO, 2005). O precursor óxido de siloxano-polipropilenoglicol foi estudado por DAHMOUCHE e colaboradores (1999), usando membranas dopadas com sais de sódio e de potássio para desenvolvimento de eletrólito sólido polimérico (CHAKER, 2002).

Esse precursor tem sido avaliado também como agente encapsulador de biomoléculas para construção de biossensores eletroquímicos segundo RICCIARDI, 2005 e TAGLIAVINI, 2008. O processo consiste na oclusão de biomoléculas na grade de uma matriz polimérica formada pelo PPO evitando assim a lixiviação do material (BICKETSTAFF, 1997). Sendo assim investigou-se a seguir a possibilidade de confinar as moléculas de Poli-L-Lisina na matriz polimérica dos filmes híbridos de PPO.

Os filmes foram testados usando metodologia previamente proposta (BICKETSTAFF, 1997). Após a policondensação do precursor PPO 4000 (descrito na parte experimental), depositou-se na superfície do eletrodo de carbono vítreo uma alíquota de 0,5 μL do PPO. Após a evaporação do solvente o eletrodo foi transferido para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina em solução hidro-etanólica pH 2,0 por 10 minutos. Em seguida o eletrodo foi lavado e transferido para a célula eletroquímica contendo apenas o eletrólito de suporte, com mostra a Figura 11.

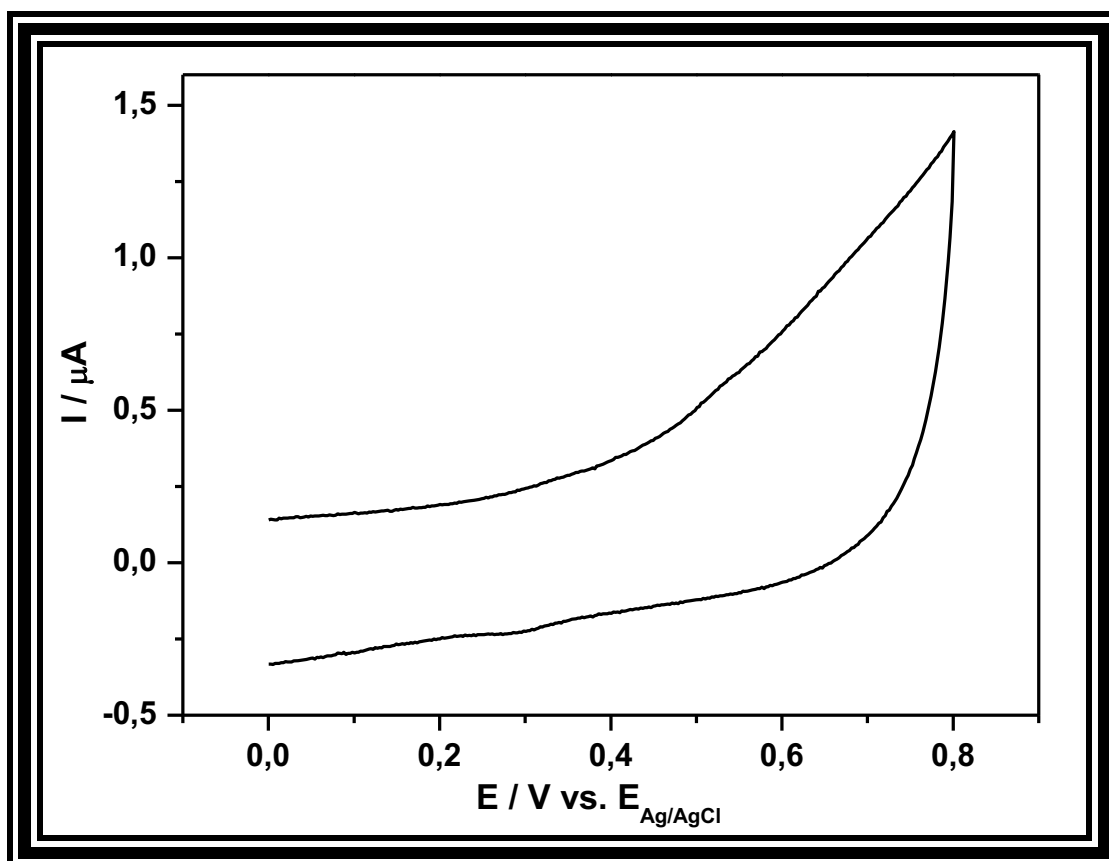


Figura 11 - Voltamograma cíclico obtido para ECV recoberto por filmes de PPO após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT e transferidos para solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

O voltamograma cíclico obtido para o filme de PPO (Figura 11) não apresenta nenhum pico anódico no intervalo de potencial de 0,0 a +0,8 V, indicando que a QT não é retida no filme, isso pode estar ocorrendo porque os filmes híbridos apresentam grande porosidade na matriz polimérica formada, fazendo com que o analito sofra lixiviação. No entanto, essa propriedade poderia ser favorável para a imobilização de PLL nas cadeias polimérica do filme híbrido PPO, melhorando assim a aderência de PLL a superfície do eletrodo.

Sendo assim, uma alíquota de 0,5 μL de PPO 4000, foi depositada na superfície do eletrodo para a formação de filme híbrido de PPO, depois da evaporação do solvente, uma alíquota de 10 μL de PLL (1,0%) foi adicionada e o eletrodo modificado levado à estufa por 10 minutos a 80°C (para conformação do polímero). Posteriormente, o mesmo foi transferido para uma célula eletroquímica contendo somente o eletrólito. O voltamograma cíclico representativo do comportamento voltamétrico do filme de PLL/PPO na superfície de eletrodo de carbono vítreo em célula eletroquímica contendo somente o eletrólito de suporte é mostrado na Figura 12.

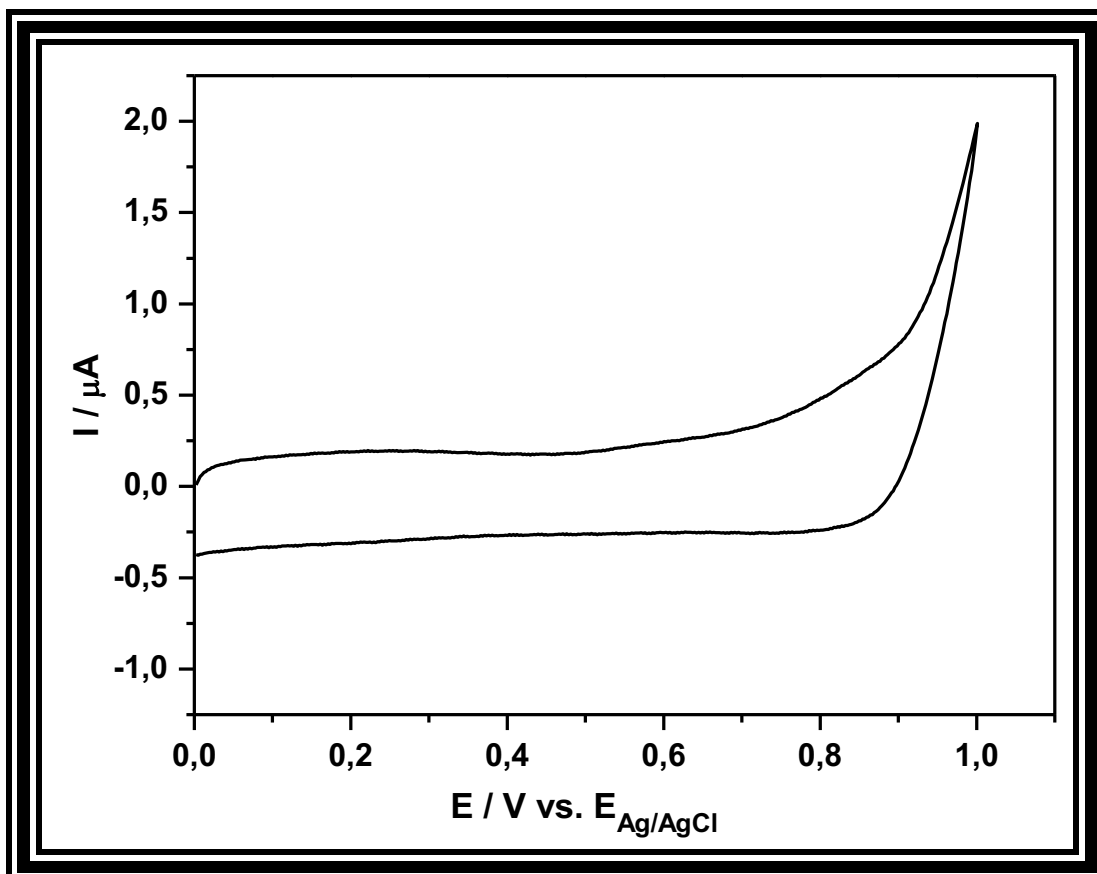


Figura 12 - Voltamograma cíclico obtido para oxidação do filme de PLL/ PPO imobilizado sobre ECV em solução hidro-etanólica pH 2,0. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 12 não mostra nenhum pico de oxidação para o filme de PLL/PPO* em pH 2,0. Esse perfil voltamétrico mostra que o eletrodo revestido com o filme não é eletroativo no intervalo de potencial de 0 à +1,0 V e não apresenta grande variação de corrente capacitiva quando comparado com eletrodo não modificado.

O eletrodo assim modificado foi então transferido para uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (pH 2,0) por 10 minutos para incorporação do analito. Transcorrido esse tempo, o eletrodo foi lavado com água e transferido para uma célula eletroquímica contendo apenas o eletrólito, cujo voltamograma cíclico é exibido na Figura 13.

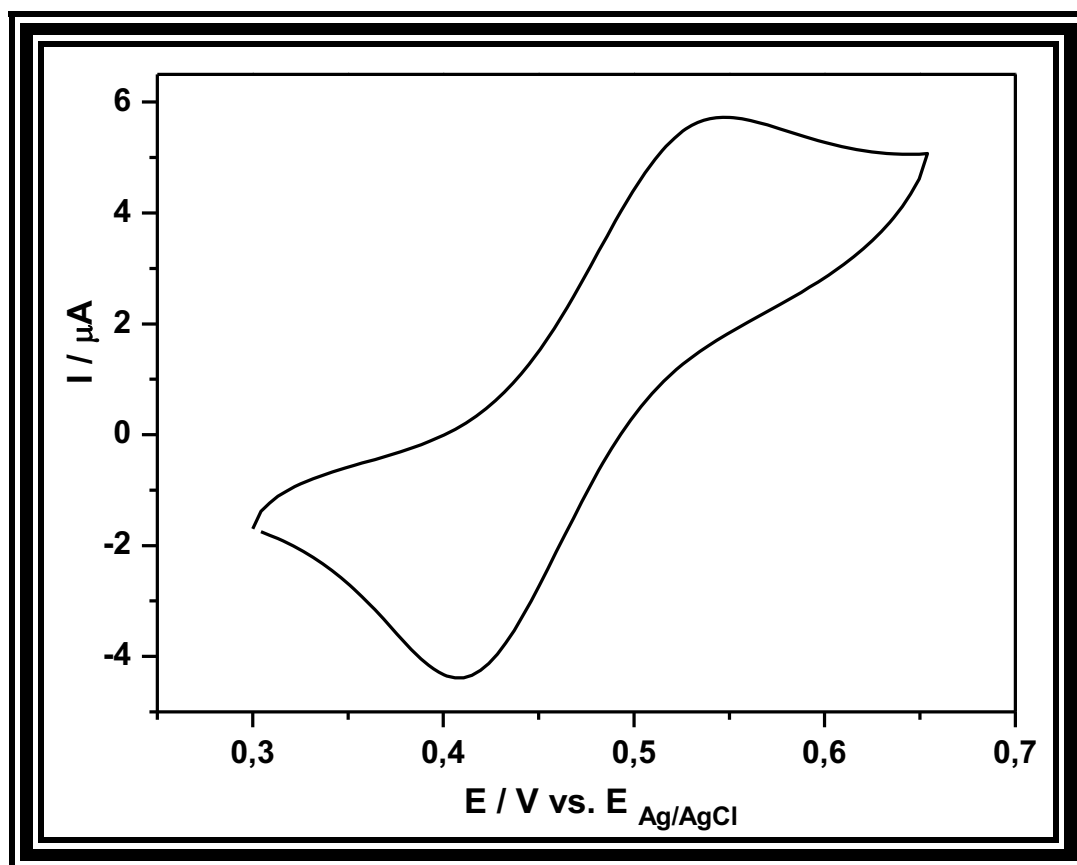


Figura 13 - Voltamograma cíclico obtido para ECV recoberto por filmes de PLL/PPO após 10 minutos de imersão em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT e transferidos para solução hidroetanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

O respectivo voltamograma cíclico (Figura 13) mostra que a oxidação de QT imobilizada no eletrodo modificado por PLL/PPO, apresenta um voltamograma bem definido caracterizado por um par de picos em $E_{pa} = 0,54 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,41 \text{ V}$ na varredura reversa, característico e semelhante aos obtidos para oxidação de QT em eletrodo não modificado. Em comparação com eletrodo não modificado há um ligeiro aumento da corrente de pico indicando que pode estar ocorrendo a pré-concentração de QT na superfície no filme.

Os resultados obtidos mostram que o filme de PLL/PPO exibe melhor interação entre o filme e o analito possibilitando, assim, seu monitoramento em outro meio reacional contendo somente o eletrólito de suporte. Isso pode fazer diferença na análise de princípios ativos contidos em matrizes complexas, como extratos de plantas. Assim, os filmes obtidos através do procedimento PLL/PPO poderiam remover a espécie de interesse contidos nestas matrizes para ser analisadas em outro ambiente, favorecendo a etapa da pré-concentração e minimizando efeito de matriz.

4.2.2 - Influência da técnica de imobilização de PLL/PPO sobre eletrodo de carbono vítreo

4.2.2.1 - Imobilização com depósito de filmes de PLL/PPO*

Filmes de Poli-L-Lisina e filmes híbridos de siloxano-polipropilenoglicol óxido obtidos pelo método sol-gel (PLL/PPO*) foram inicialmente obtidos através da mistura de soluções de 10 μL PLL (1%) e 0,5 μL PPO foram adicionado sobre a superfície do eletrodo. Após a volatilização do solvente, o eletrodo foi submetido à temperatura de 80°C em estufa durante 2 minutos para promover a mudança de conformação do filme de PLL (ANSON, 1980) da forma α -hélice para planar. Alíquotas da mistura, adicionadas sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo após secagem, mostraram filmes que, quando imersos em solução hidro-etanólica (pH 2,0), apresentaram voltamogramas característicos. O esquema de formação do filme é apresentado na Figura 14.

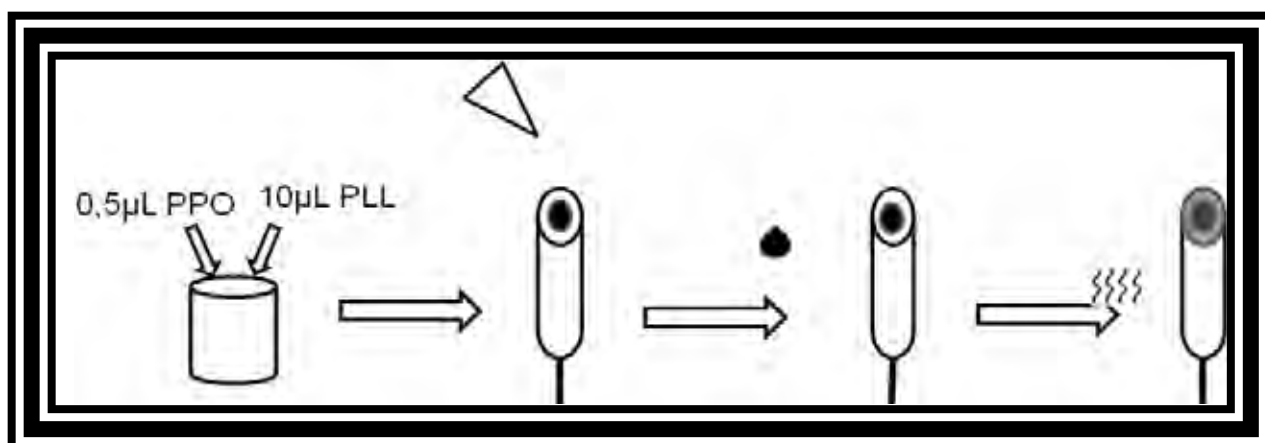


Figura 14 - Esquema de formação do filme PLL/PPO* sobre eletrodo de carbono vítreo.

4.2.2.2 - Incorporação eletroquímica

A resposta voltamétrica do eletrodo PLL/PPO* foi avaliada para oxidação da QT através da incorporação da mesma na superfície do eletrodo. A incorporação foi realizada por dois métodos, os quais foram definidos na seção experimental. A Figura 15A mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para incorporação da QT por ciclagem contínua (50 ciclos) em solução hidro-etanólica (pH 2,0) contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT no intervalo de potencial de 0,2 à 0,7V.

Após esta etapa, o eletrodo foi lavado com água e recolocado em célula eletroquímica contendo apenas solução de eletrólito de suporte (Figura 15B).

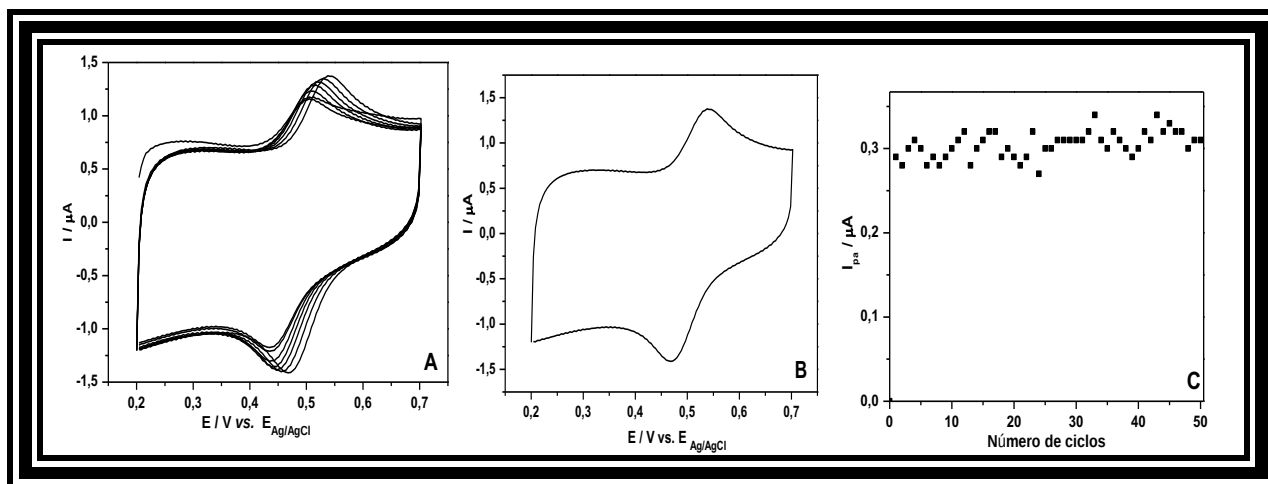


Figura 15 - (A) Voltamogramas cíclicos com varreduras sucessivos de potencial para eletrodo modificado PLL/PPO* carregados com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT, (B) transferido para solução hidro-etanólica pH 2,0. (C) Efeito da variação do número de ciclos. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 15A mostra um aumento de corrente entre 0 e 35 ciclos, mantendo-se constantes em valores superiores, além de ligeiro deslocamento de potencial. Após a incorporação da espécie, o eletrodo foi lavado com água e transferido para uma nova solução contendo somente o eletrólito de suporte (Figura 15B). A análise da curva voltamétrica obtida sugere que a QT está incorporada no filme de PLL/PPO e é oxidada de forma semelhante à obtida em solução. Uma diminuição na diferença entre potenciais de pico $E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}}$ (de 110 mV para o eletrodo não modificado e 70 mV para o modificado) é observado para o eletrodo modificado verificando um melhor processo reversível. A estabilidade do sinal voltamétrico correspondente à oxidação de QT imobilizada no filme foi testada (Figura 15C), sendo observado um sinal praticamente constante para os 50 ciclos, indicando excelente repetibilidade, embora baixos valores de corrente sejam observados.

Na Figura 14 se comparado os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre eletrodo de carbono vítreo sem modificação (A) e com modificação (B). Os resultados experimentais mostram que a QT é oxidada em potencial de $E_{\text{pa}} = 0,55 \text{ V}$ com um pico de redução na varredura reversa (Figura 16). Sobre eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO* (Figura 16b) após ciclagem em solução hidro-etanólica, valores de corrente muito menores são apresentados quando comparados com aqueles obtidos com ECV.

indicando, portanto, que a metodologia não se mostra eficiente para construção do sensor.

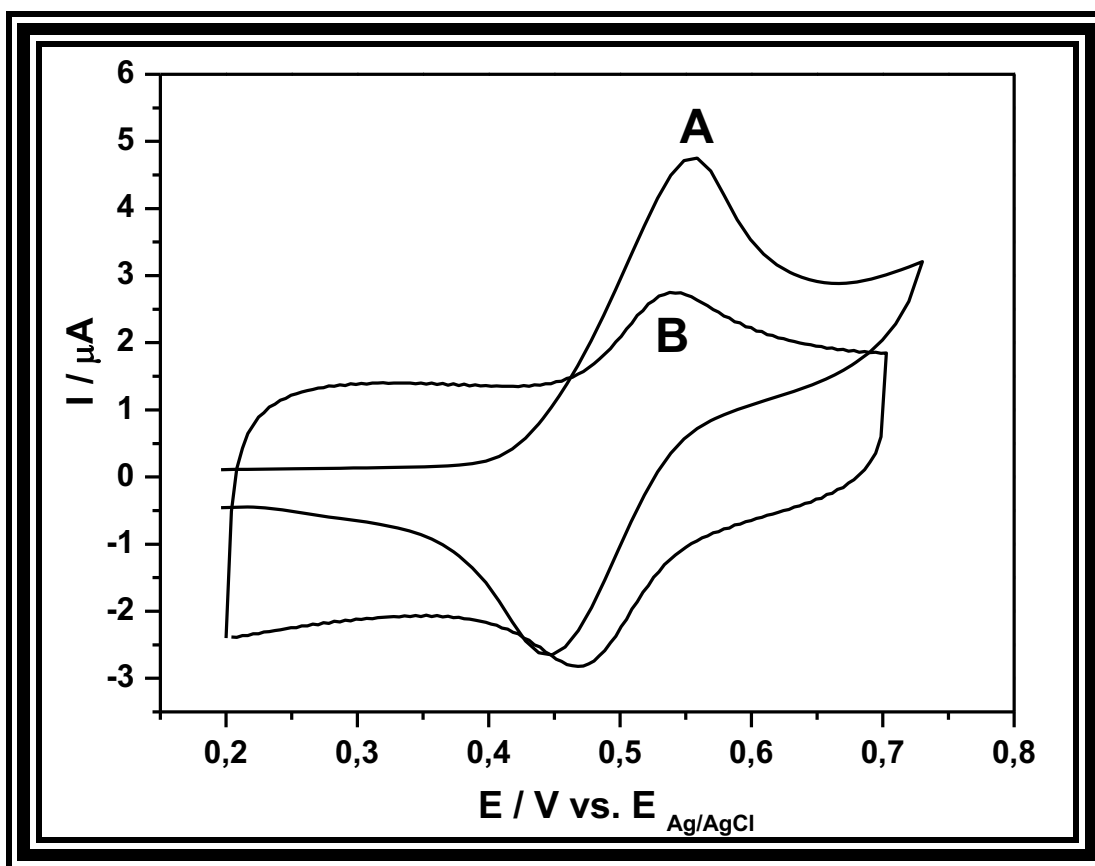


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO* com incorporação eletroquímica de QT. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.2.3 - Incorporação em circuito aberto

A incorporação foi realizada através da imersão do eletrodo modificado com PLL/PPO* em um béquer contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidroetanólica (pH 2,0) durante 10 minutos. Completado este período, o eletrodo foi lavado com água milli-Q e transferido para a célula voltamétrica contendo somente o eletrólito de suporte, cuja curva voltamétrica é mostrada na Figura 17.

O voltamograma cíclico obtido para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT apresenta um pico em $E_{pa} = +0,575 \text{ V}$. No entanto, a corrente de pico torna-se maior quando o analito é pré-concentrado no filme indicando, assim, que a QT fica retida no filme polimérico. O ΔE_p da QT sobre o filme de PLL/PPO* incorporado dessa maneira apresenta valores ao redor de 0,160 V, indicando desvios no comportamento reversível da QT quando comparado ao eletrodo sem modificação ($\Delta E_p = 110 \text{ mV}$). A variação do sinal (Figura 17B) foi testada através

da ciclagem sucessiva (50 ciclos). Pode-se notar que os valores de corrente obtidos diminuem a cada ciclo evidenciando que a quercetina é lixiviada do filme, ou o seu produto de oxidação envenena o eletrodo.

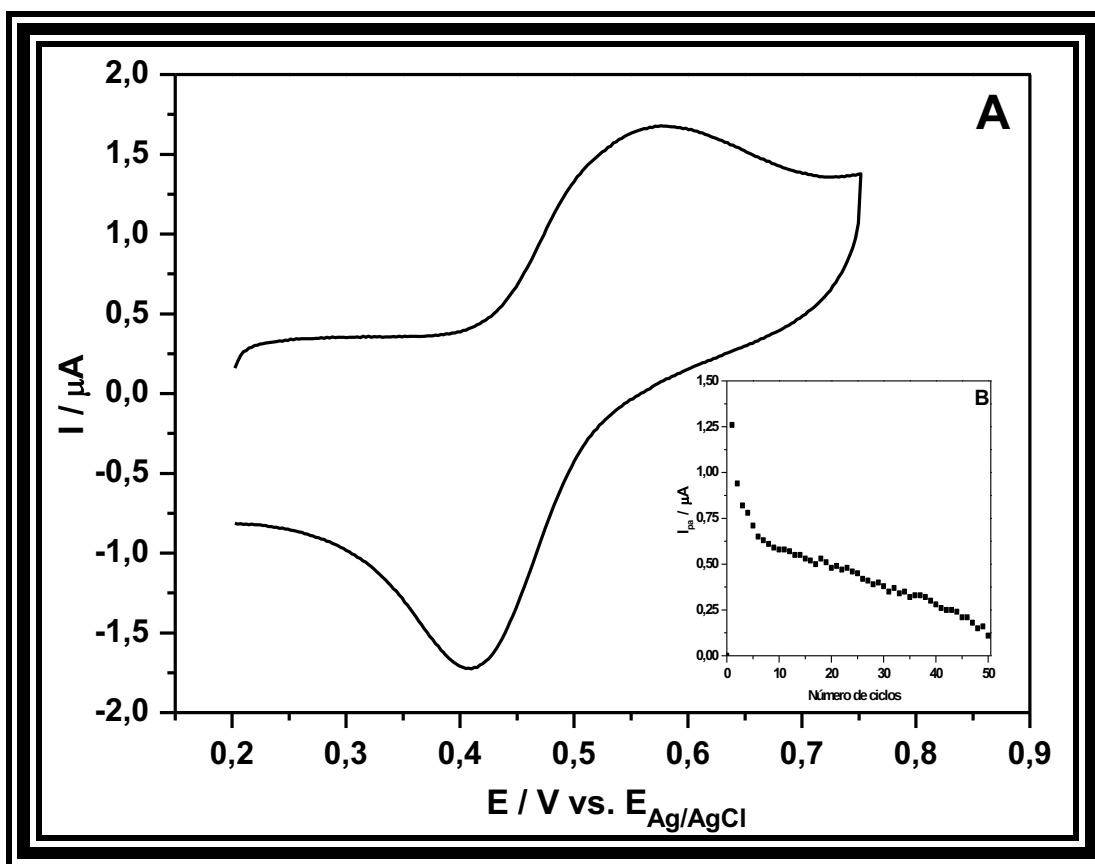


Figura 17 - Voltamograma cíclico modificado PLL/PPO* com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT incorporado em circuito aberto e transferidos para tampão B-R pH 2,0. (B) Gráfico de I_{pa} vs. número de ciclos. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de quercetina sobre eletrodo de carbono vítreo e para oxidação de QT sobre filme de PLL/PPO* são mostrados na Figura 18.

Comparativamente, os resultados da presente investigação mostraram algumas diferenças dependentes do modo como se processou a incorporação da QT. Por via eletroquímica, observaram-se valores para correntes de pico muito mais baixos do que a incorporação por imersão, sugerindo que a QT é melhor pré-concentrada no filme por interação espontânea (devido aos maiores valores de corrente de pico), no entanto esta metodologia não apresenta estabilidade suficiente, uma vez que a lixiviação do analito ou o envenenamento do sensor, é bastante acentuada. Baseados nisso, pode-se concluir que a imobilização do filme de PLL/PPO*, através desse método, não é efetiva para a construção do

sensor (Figura 18). Buscando melhores condições experimentais para a formação de filmes estáveis e reprodutíveis, o desempenho do eletrodo modificado foi testado por outra forma de imobilização.

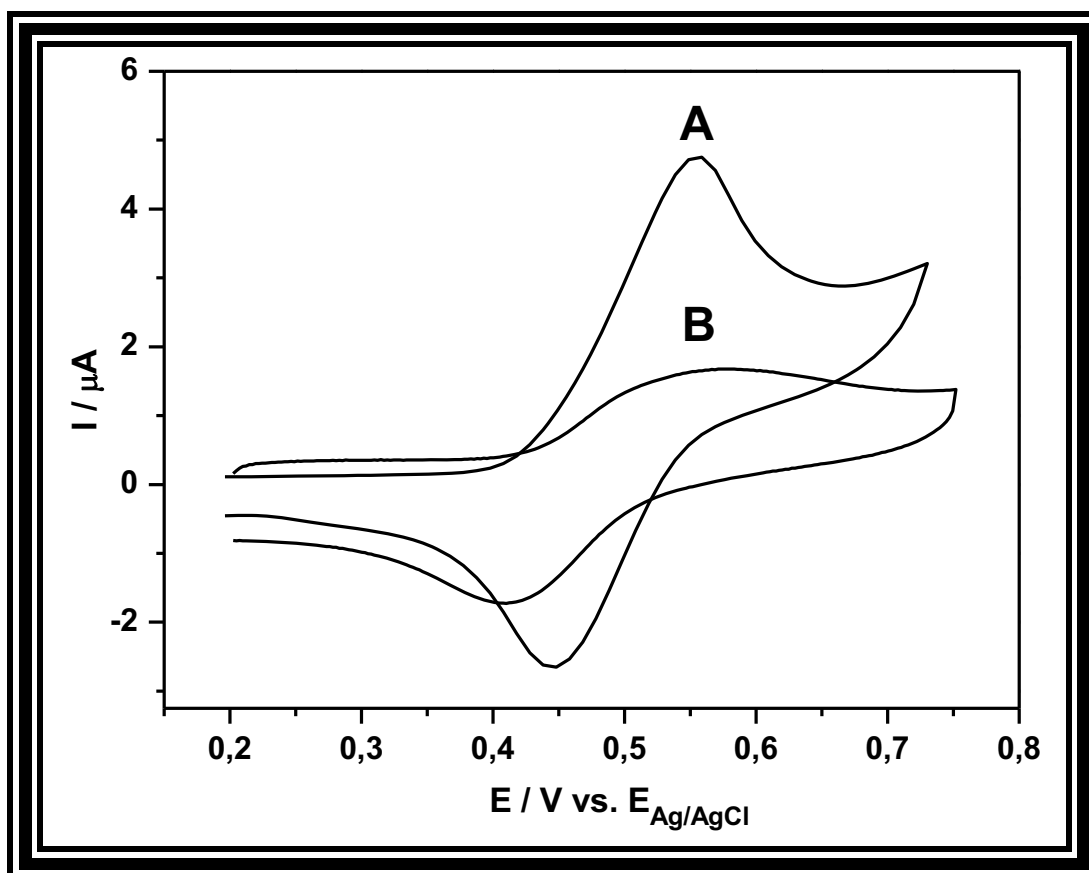


Figura 18 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO* com incorporação de QT em circuito aberto. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.3 - Imobilização B (PLL/PPO)

Nesta etapa, investigou-se o recobrimento da superfície eletródica por deposição de 0,5 μL do PPO seguido de evaporação do solvente, o que resultou na formação de uma fina camada polimérica, sobre a qual foi depositada uma alíquota de 10 μL de PLL e seguida de volatilização do solvente em estufa a 80°C por 2 minutos. O esquema representativo da formação do filme é apresentado na Figura 19.

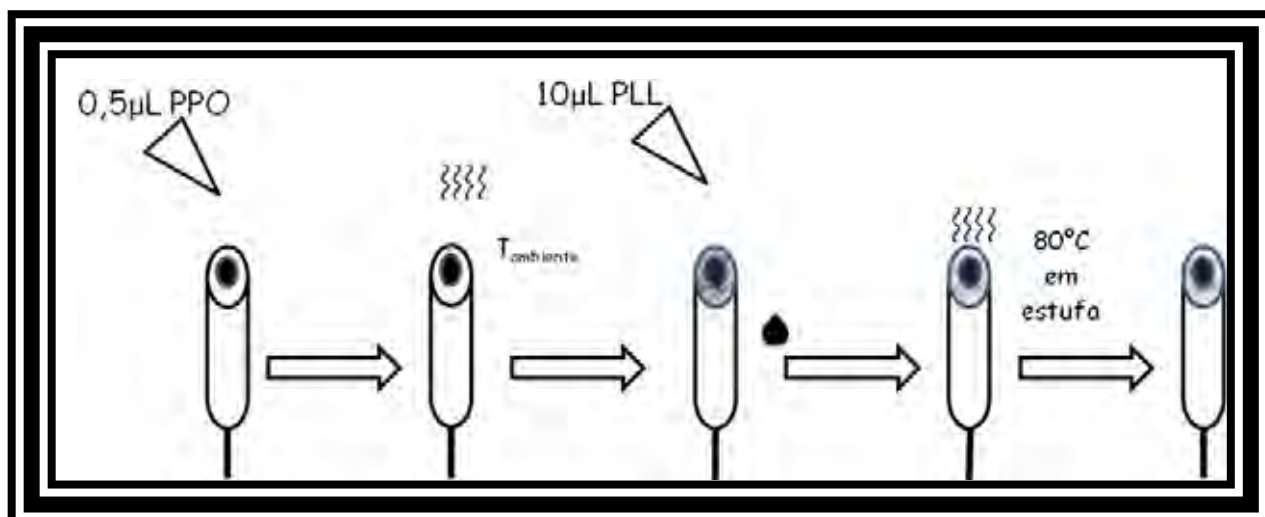


Figura 19 - Esquema de formação do filme PLL/PPO sobre eletrodo de carbono vítreo.

4.2.3.1 - Incorporação eletroquímica

Após o preparo desse filme, o eletrodo foi transferido para uma célula eletroquímica contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (pH 2,0). Os voltamogramas cíclicos sucessivos (50 ciclos) obtidos durante a incorporação de QT, a velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} são apresentados na Figura 20.

A análise da Figura 20A mostra que o eletrodo modificado apresenta um par de picos redox em potenciais $E_{pa} = +0,56 \text{ V}$ e $E_{pc} = +0,41 \text{ V}$, cuja corrente diminui quando submetido às sucessivas varreduras até um valor constante após 40 ciclos. O voltamograma cíclico obtido após transferência do eletrodo modificado para célula eletrolítica contendo apenas a solução hidro-etanólica mostra que QT apresenta dois picos com valores de potenciais $E_{pa} = +0,48 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,41 \text{ V}$ (Figura 20B). O deslocamento dos valores de potenciais para valores menos positivos indica que o filme formado, por esse procedimento, facilita a oxidação da QT. No entanto, o estudo da repetibilidade do sinal indica um decréscimo sucessivo nos valores de corrente de pico indicando que a QT não é retida na superfície do filme (Figura 20C) e a corrente de pico é muito baixa quando comparada ao eletrodo sem modificação (Figura 21), mostrando uma resposta insatisfatória e inadequada para construção de um sensor.

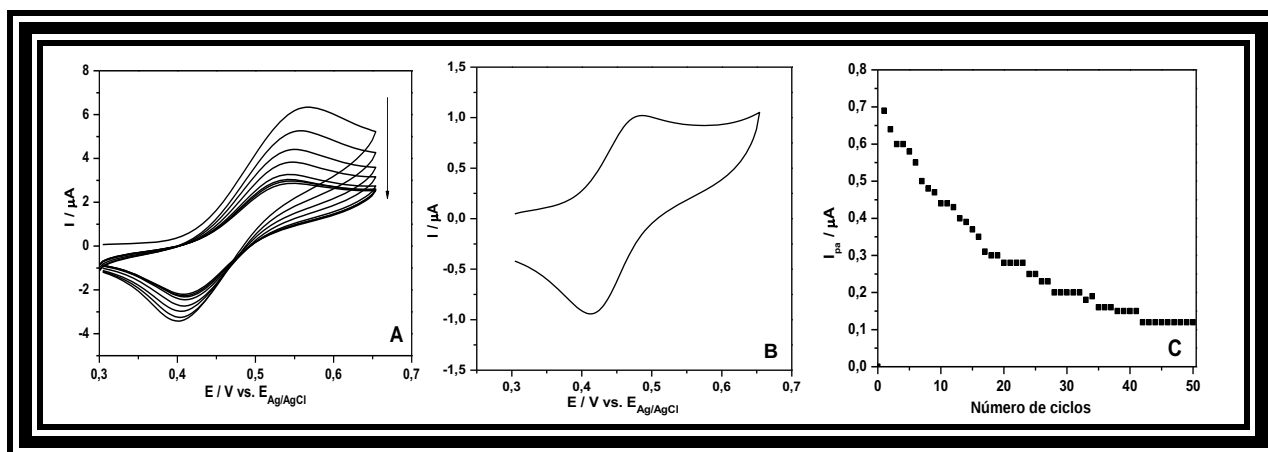


Figura 20 - (A) Voltamogramas cíclicos com varreduras sucessivas de potencial (60 ciclos) realizadas para eletrodo modificado PLL/PPO carregados com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em tampão B-R pH 2,0. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamograma representativo após a incorporação e transferido para eletrólito e (C) Efeito da variação de número de ciclos sobre corrente de pico anódica.

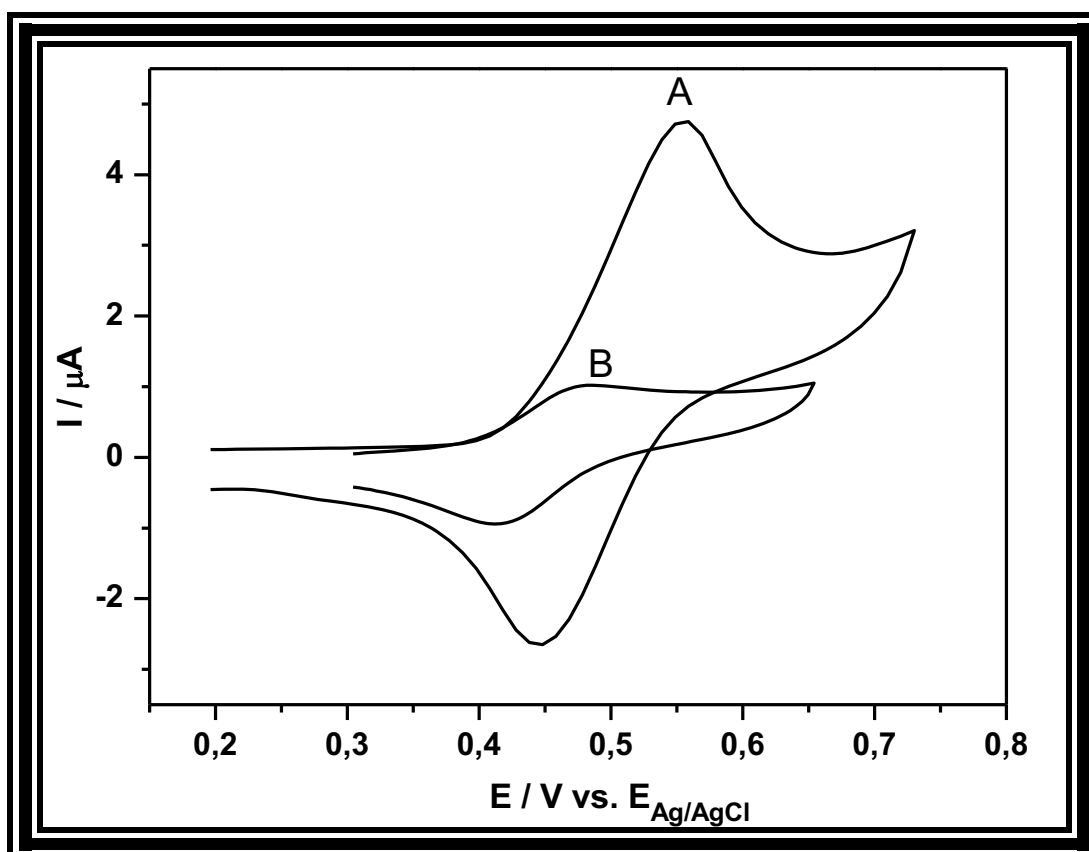


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO, com incorporação eletroquímica de QT. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.3.2 - Incorporação em circuito aberto

A pré-concentração do analito no filme de PLL/PPO formado foi avaliada pela simples imersão do eletrodo modificado em solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT por 10 minutos. Este eletrodo foi transferido para uma nova solução eletrolítica de pH 2,0 após lavagem com água. O voltamograma cíclico obtido após a

transferência para nova solução mostra a obtenção de uma corrente maior para QT retida no eletrodo modificado (Figura 22) quando comparada ao eletrodo não modificado (Figura 22a). A estabilidade do eletrodo foi avaliada através de ciclagem sucessiva (50 ciclos), mostrando que os valores das correntes são praticamente constantes (Figura 22B), sendo, portanto o mais apropriado para a construção do sensor.

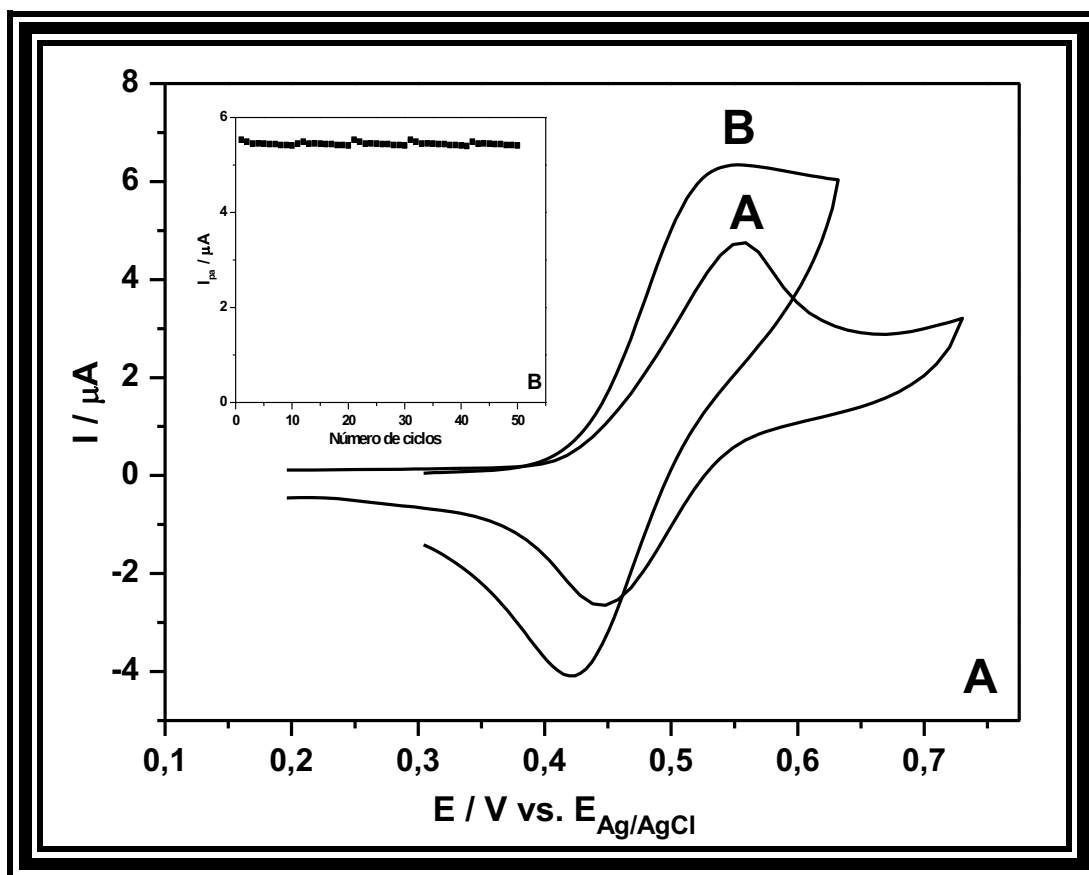


Figura 22 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO com incorporação de QT em circuito aberto (B) Efeito da variação de número de ciclos sobre corrente de pico anódica. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A comparação dos métodos de imobilização do filme de PLL/PPO permite concluir que os melhores valores de corrente de pico e repetibilidade das medidas podem ser obtidos através da Imobilização B, isto é realizando-se primeiramente a adição de PPO sobre a superfície do eletrodo, e depois de seco recobre-se o filme com nova adição de PLL, seguida de evaporação em estufa a 80°C .

O melhor método para incorporação de QT foi pela imersão do filme PLL/PPO na solução de QT sob agitação constante em circuito aberto, seguido de lavagem e transferência para célula eletroquímica contendo apenas o eletrólito de suporte. O filme apresentou-se estável na superfície do eletrodo, já que o sinal

voltamétrico obtido para a oxidação do analito pode ser restituído apenas com a transferência do eletrodo modificado para a solução de QT.

Mesmo apresentando bom sinal voltamétrico para a concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre filme de PLL/PPO, os sítios ativos do polímero poderiam estar sendo saturados a essa concentração. Sendo assim, foi testado o comportamento deste eletrodo modificado em presença de uma menor concentração de QT conforme mostra a Figura 23.

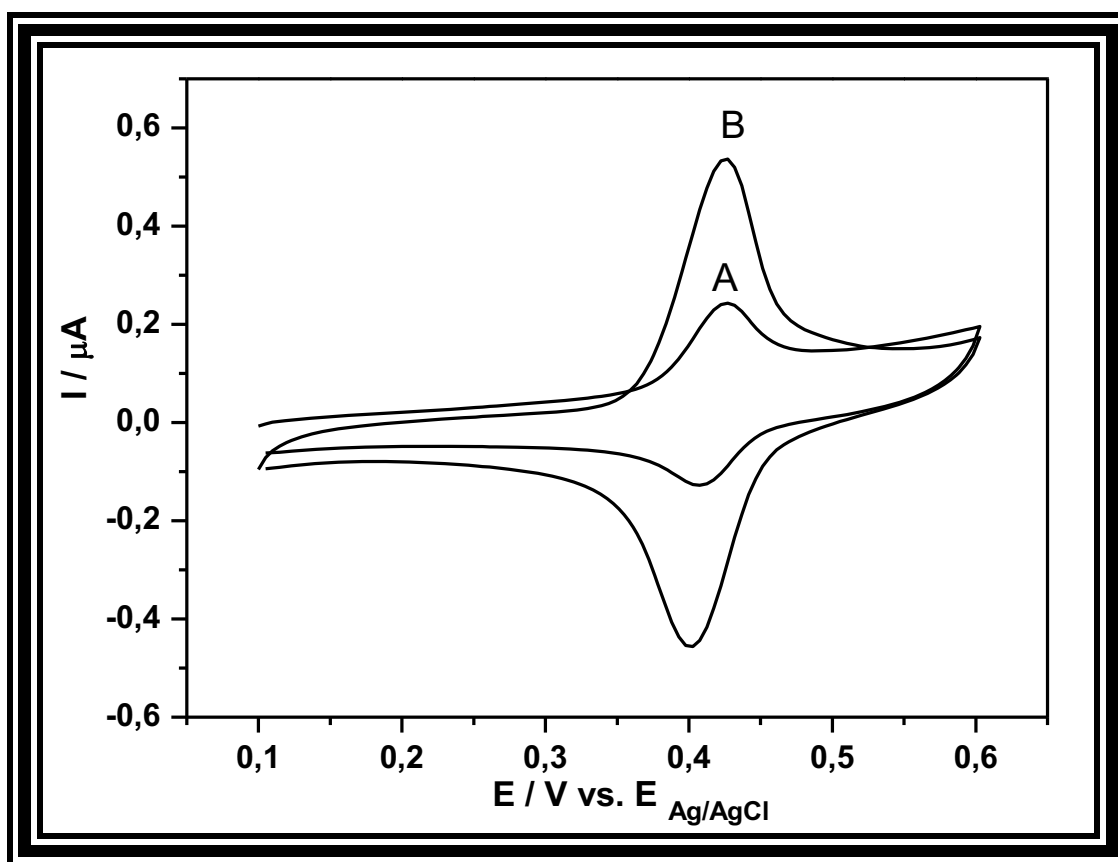


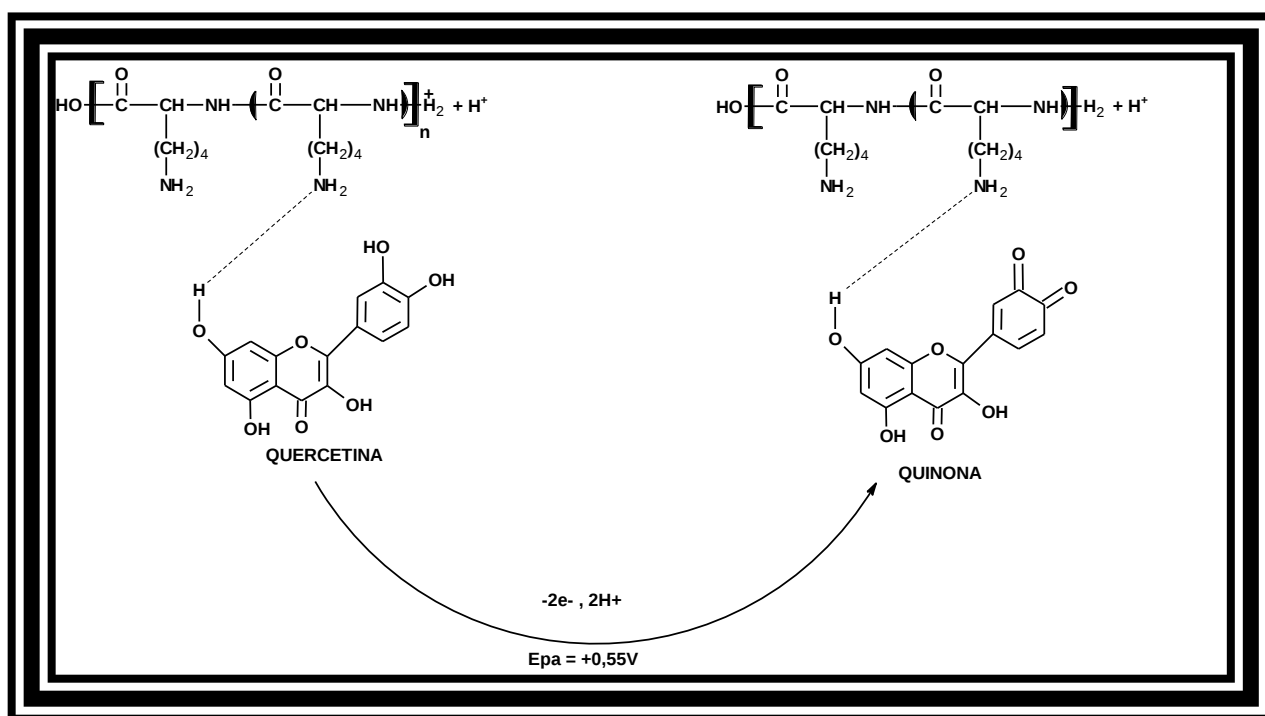
Figura 23 - Voltamograma cíclico para a oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO, incorporação em circuito aberto. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se na Figura 23 que o comportamento voltamétrico para oxidação de Q em tampão hidro-etanólica (pH 2,0) sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de PLL/PPO é semelhante aquele observado para eletrodo sem modificação com um aumento significativo na intensidade das correntes de pico significando que não houve mudança nas propriedades eletroquímicas da QT.

O voltamograma cíclico obtido para oxidação de QT sobre o eletrodo modificado para filme de PLL/PPO caracteriza-se por um par de picos em +0,42 V / +0,40 V na varredura reversa, com ΔE_p de 20 mV e com razão de $I_{pa}/I_{pc} = 1,00$.

O fato da relação de I_{pa}/I_{pc} ser igual a 1 indica que QT também é oxidada segundo o processo reversível com transferência de 2 elétrons em pH 2,0, como observado anteriormente. A análise da Figura 23 mostra que o filme apresenta um acentuado aumento na resposta voltamétrica quando carregado com QT, comprovando o seu efeito de pré-concentração do antioxidante.

Estes resultados indicam que provavelmente a Poli-L-Lisina encontra-se oclusa entre os interstícios da cadeia de PPO (BICKETSTAFF, 1997). O poliaminoácido PLL exibe grupos amino na forma protonada em toda região de $pH < 10$ ($pK_a = 10,4$). Sendo assim, os flavonóides com grupos hidroxilas, em sua estrutura molecular, poderiam apresentar a interação com a PLL via formação de ligações de hidrogênio entre a amina protonada do filme de PLL e as hidroxilas (anel A) da QT, conforme mostra o Esquema 2. Entretanto deixando as hidroxilas do anel B livres para serem oxidadas



Esquema 2 – Provável interação entre quercetina e filme de PLL

Esta propriedade permite que os filmes de PLL/PPO possam ser utilizados na construção de sensores seletivos para antioxidantes, devido à provável interação mostrada no Esquema 2. Conseqüentemente, filmes de PLL mostraram-se efetivos tanto no melhoramento cinético de transferência de carga como na facilidade de pré-concentração via complexação.

Considerando o incremento de corrente de pico obtida na oxidação de QT sobre eletrodo modificado, investigou-se a seguir o efeito do tempo de acúmulo no processo.

4.2.4 - Tempo de pré – concentração da QT sobre eletrodo modificado com filme de PLL/PPO

A pré-concentração da QT no filme de PLL/PPO foi investigada pela imersão do eletrodo em solução hidro-etanólica (pH 2,0) de QT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, seguida do registro do voltamograma após transferência do eletrodo para solução contendo apenas o eletrólito de suporte. O eletrodo recoberto por filmes de PLL / PPO foi submetido à imersão em um béquer contendo solução de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT por um tempo controlado de 1 a 10 minutos.

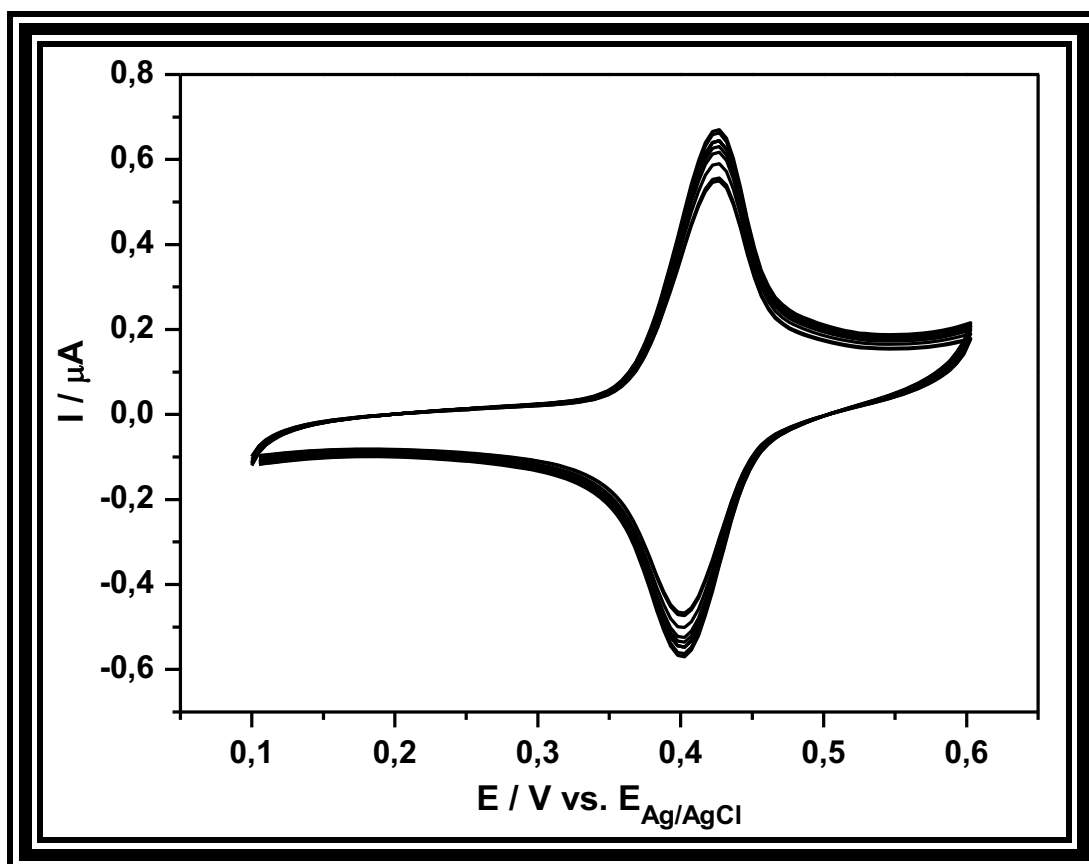


Figura 24 - Efeito do tempo de acúmulo sobre voltamogramas cíclicos correspondentes a oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em pH 2,0 sobre eletrodo modificado por filme de PLL/PPO. $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

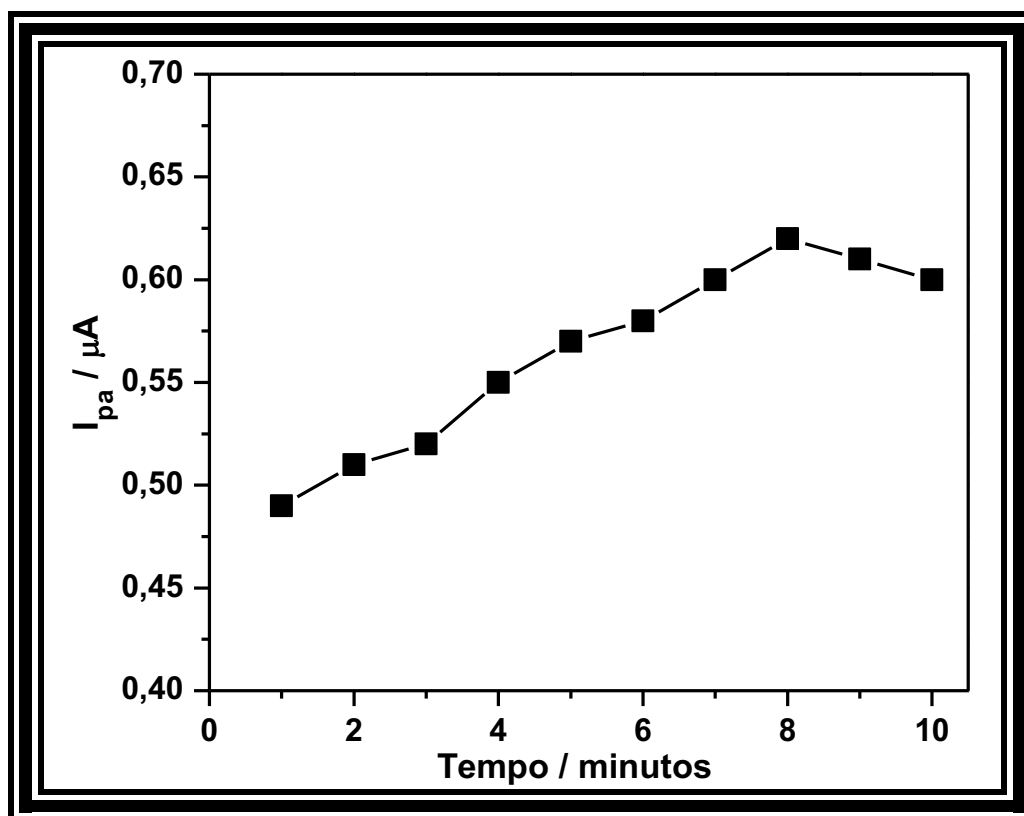


Figura 25 - Influência do tempo de imersão do eletrodo modificado com PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica pH 2,0.

Após completar o período de incorporação, o eletrodo foi submetido à lavagem e transferido para solução tampão B-R (pH 2,0). A repetição do registro de cada voltamograma foi seguida de lavagem do eletrodo com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e água, onde se conseguiu a completa regeneração do filme. Os respectivos voltamogramas são apresentados na Figura 24 e os valores de I_{pa} Vs. tempo de acúmulo são mostrados na Figura 25.

A corrente de pico anódica da QT, no filme, aumenta com o tempo de imersão, mostrando o efeito de pré-concentração sobre o filme. A análise da Figura 25 ilustra este comportamento pela relação linear de corrente vs. tempo de acúmulo, dado pela equação: $I_{pa} (\mu A) = 0,099 + 0,014 T$ ($R = 0,970$ para $n = 8$). Pelo gráfico, pode-se observar que a corrente de pico fica constante em tempos superiores quando a QT é pré-concentrada no filme de PLL/PPO até o tempo de 8 minutos. Este comportamento sugere ocorrer à saturação intersticial através da interação com PLL, indicando que a quercetina poderia estar sendo incorporada no filme.

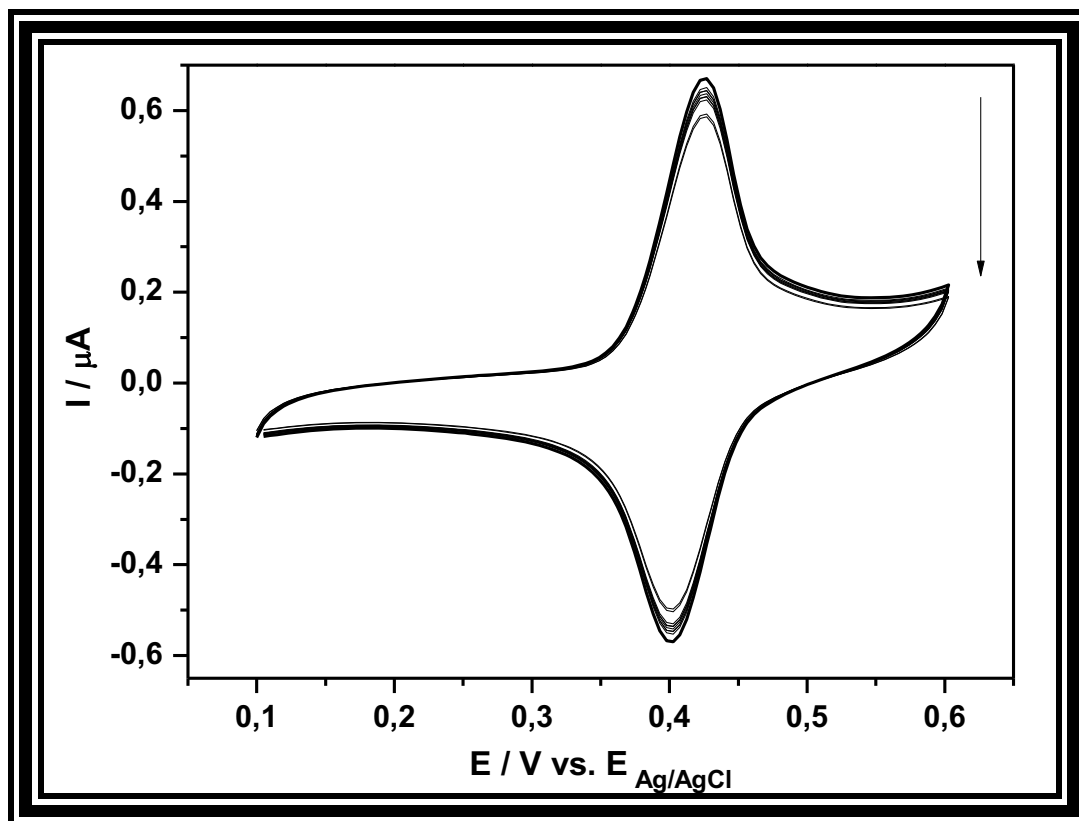


Figura 5 - Voltamogramas cíclicos com varredura sucessivos de potencial (10 ciclos) realizados para eletrodo modificado PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica pH 2,0. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

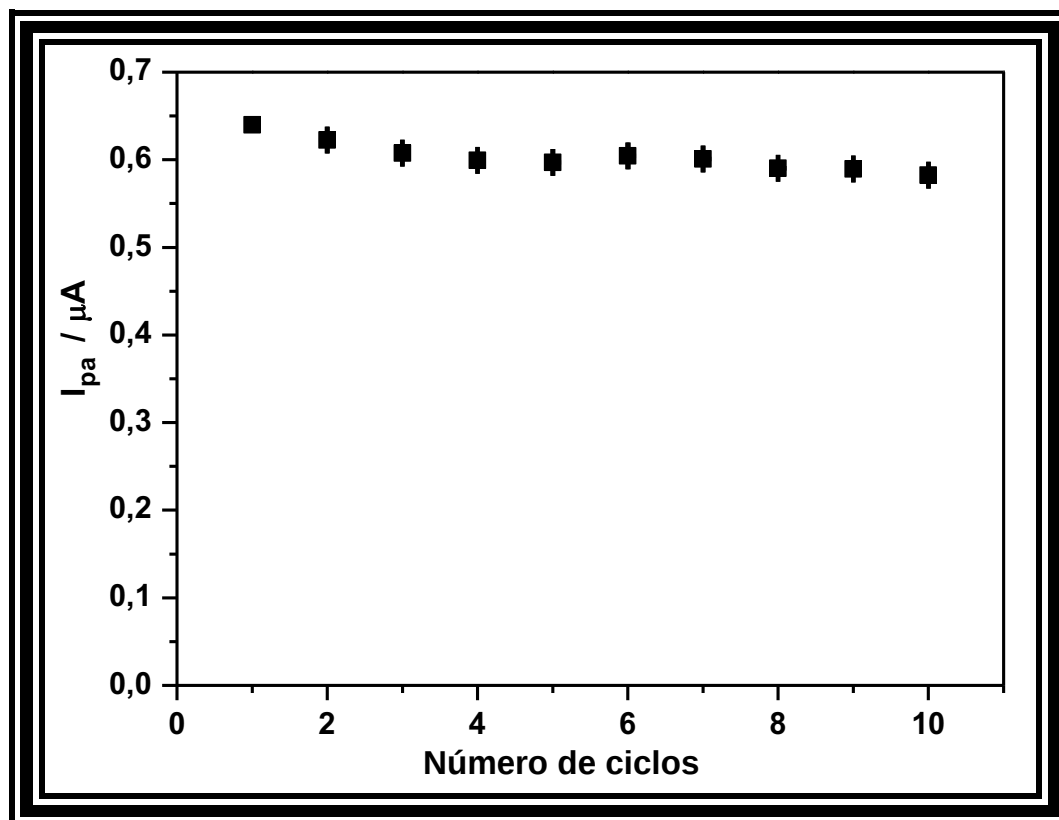


Figura 27 - Efeito da variação do número de ciclos sobre a corrente de pico anódico para eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica pH 2,0.

A capacidade de retenção da quercetina nos filmes de PLL/PPO foi testada usando registros consecutivos de voltamogramas cíclicos (Figura 26) para o mesmo filme carregado com QT, através de etapa prévia de pré-acúmulo em solução $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em pH 2,0 durante 8 minutos e transferência para solução hidro-etanólica (pH 2,0). Os valores de corrente de pico apresentam-se praticamente constantes, conforme apresentado na Figura 27.

Como pode ser observado pelos voltamogramas cíclicos (Figura 26), PLL/PPO apresenta picos bem definidos para o par redox de QT, porém, esses sinais são quase inalterados em função da repetição do número de ciclos. Os respectivos valores de corrente em função do número de ciclos são mostrados na Figura 27. Este comportamento indica que o eletrodo modificado com PLL/PPO retém fortemente a QT na superfície do eletrodo em pH 2,0, e este pode ser removido para nova solução de eletrólito sem perder o sinal. A completa remoção do filme ocorre apenas após polimento do sistema com alumina.

4.2.5 - Efeito do pH sobre a pré-concentração de quercetina

O efeito da variação de pH sobre a incorporação de QT em filmes de PLL/PPO foi investigado com imersão do eletrodo em solução de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução tampão B-R/etanol no intervalo de pH 2,0 a 12,0. O eletrodo foi colocado na solução do analito onde foi mantido durante 8 minutos, sob constante agitação. Após esta etapa, o eletrodo foi submetido à lavagem com água e subsequente transferido para célula voltamétrica contendo solução eletrolítica no referido pH. Após cada voltamograma, o filme foi recuperado com NaOH e água. Os respectivos valores de potencial de pico obtidos para os voltamogramas registrados em diferentes valores de pH são mostrados no gráfico da Figura 28. Para efeito de comparação, foram colocados no mesmo gráfico, os dados obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT nas mesmas condições experimentais, porém usando o eletrodo sem modificação (Figura 28, curva B)

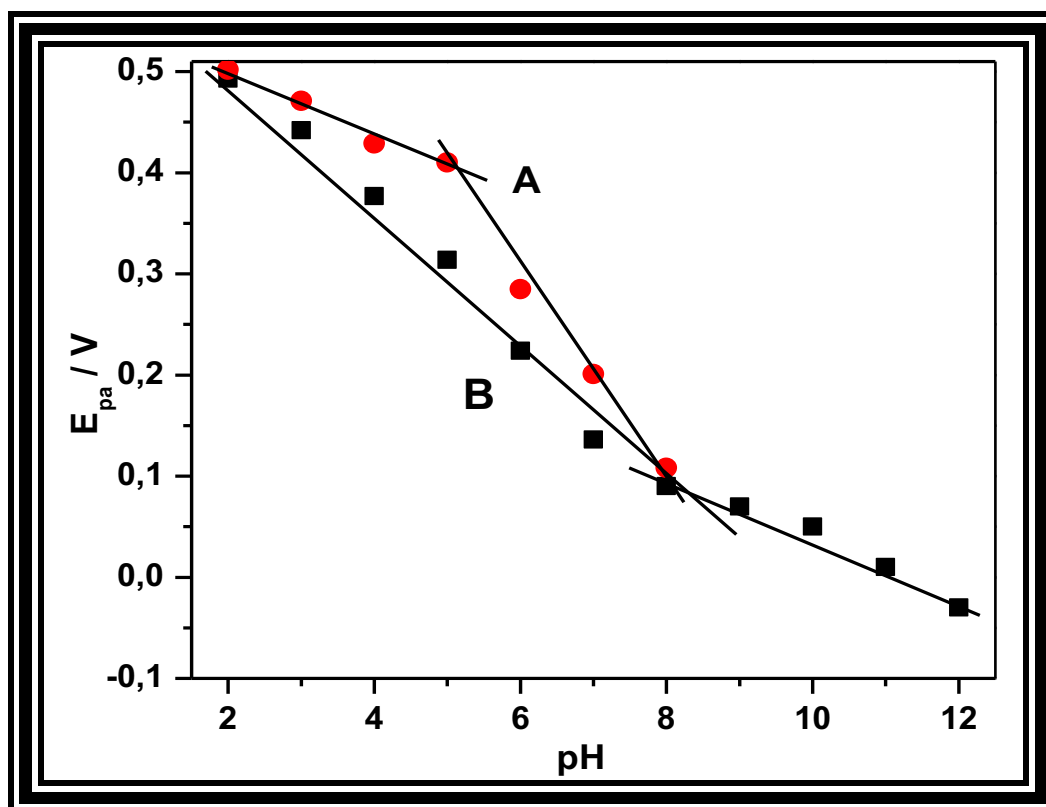


Figura 28 – Efeito de E_{pa} vs. pH em $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre eletrodo de carbono vítreo (A) com modificação e (B) sem modificação. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A oxidação do flavonóide sobre eletrodo de carbono vítreo sem modificação ocorre em toda a região de pH 2,0 a 12,0 (Figura 28, curva B). No entanto, o comportamento eletroquímico de QT sobre eletrodo modificado por filme de PLL (Figura 28, curva A) apresenta picos bem definidos apenas no intervalo de $2,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$. Este comportamento indica que, provavelmente, o flavonóide é pré-concentrado no eletrodo apenas na região de $\text{pH} \leq 8,0$ onde o filme de PLL apresenta-se protonado ($\text{pK}_a = 10,7$). Gráficos de E_{pa} vs. pH indicam que o aumento dos valores de pH promove um deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos, cuja relação apresenta uma mudança de inclinação em $\text{pH} = 5,0$. A inclinação apresenta dois segmentos lineares, um no intervalo de pH de 2,0 a 5,0 e outro no intervalo de pH de 5,0 a 8,0 (Figura 28), cujo intercepto em pH 5,0 indica o pK_a da molécula.

O primeiro incremento linear (pH de 2,0 a 5,0) apresentou uma equação de regressão linear: $E_{pa} \text{ (V)} = 0,564 - 0,031 \text{ pH}$ ($r = 0,99$), enquanto que o segundo incremento com linearidade no intervalo de pH de 5,0 a 8,0 apresentou a seguinte equação: $E_{pc} \text{ (V)} = 0,817 - 0,088 \text{ pH}$ ($r = 0,999$).

A partir da relação: $\Delta E_p / \Delta pH = 59m_{H^+} / n$, em que m_{H^+} é o número próton envolvido na etapa química e, n número elétrons consumidos na etapa eletroquímica, a inclinação de $31,0 \text{ mV pH}^{-1}$ na região de $2,0 \leq \text{pH} \leq 5,0$ indica um valor de m_{H^+} de 1,9, assumindo que dois elétrons estão sendo transferidos na etapa eletroquímica. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que o processo de oxidação de QT sobre filme de PLL/PPO ocorre através de uma transferência eletrônica envolvendo dois elétrons e dois prótons, provavelmente pela oxidação dos grupos catecol (Ghica e Brett, 2003, Timbola, 2006)

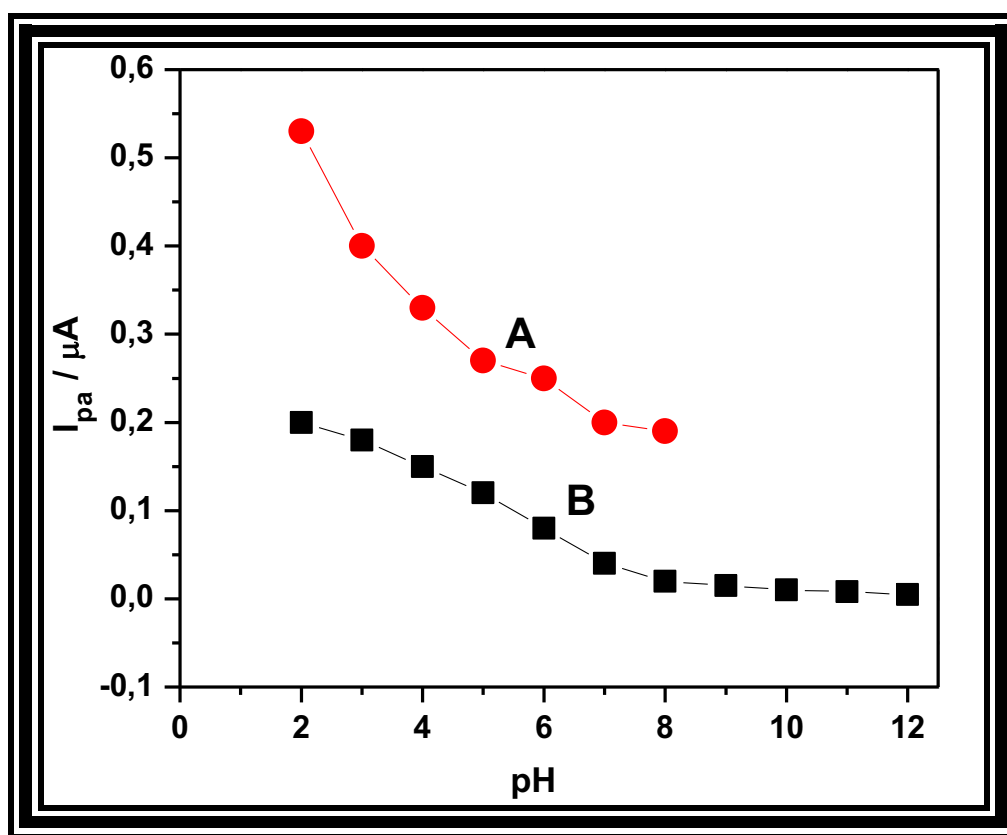


Figura 29 - Efeito de I_{pa} vs. pH em $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT sobre eletrodo de carbono vítreo (A) com modificação e (B) sem modificação. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O efeito de pH sobre a corrente de pico obtido para a oxidação de QT sobre eletrodo modificado (A) e sem modificação (B) é mostrado na Figura 29. A intensidade de corrente é máxima em pH 2,0 para ambos os eletrodos. No eletrodo modificado, a intensidade diminui até pH = 6,0. Em valores de $\text{pH} > 7,0$, a corrente de pico é acentuadamente diminuída e a onda desaparece em $\text{pH} > 8,0$. O polímero de PLL apresenta grupos aminos protonados (ANSON, 1983) até pH ao redor de 10,0, ($\text{pK}_{a\text{PLL}} = 10,7$) (Pereira, 2003). No entanto, a QT apresenta

carga negativa apenas em valores de pH alcalinos, uma vez que, apresenta $pK_a = 7,0$.

Desse modo, a pré-concentração de QT sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de PLL poderia ser atribuída a uma reação entre grupos amino do poliaminoácido e grupos hidroxilas do anel A da QT. Para fins analíticos, escolheu-se o valor de pH 2,0 como valor de pH apropriado para pré-concentração de QT no filme de PLL/PPO e também para monitoramento do sinal analítico.

4.2.6 - Influência da velocidade de varredura de potencial na oxidação da quercetina

O estudo do efeito da velocidade de varredura sobre o sinal voltamétrico para o filme de PLL/PPO na incorporação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (pH 2,0) foi investigado para valores de v 10 a 100 mVs^{-1} (Figura 30).

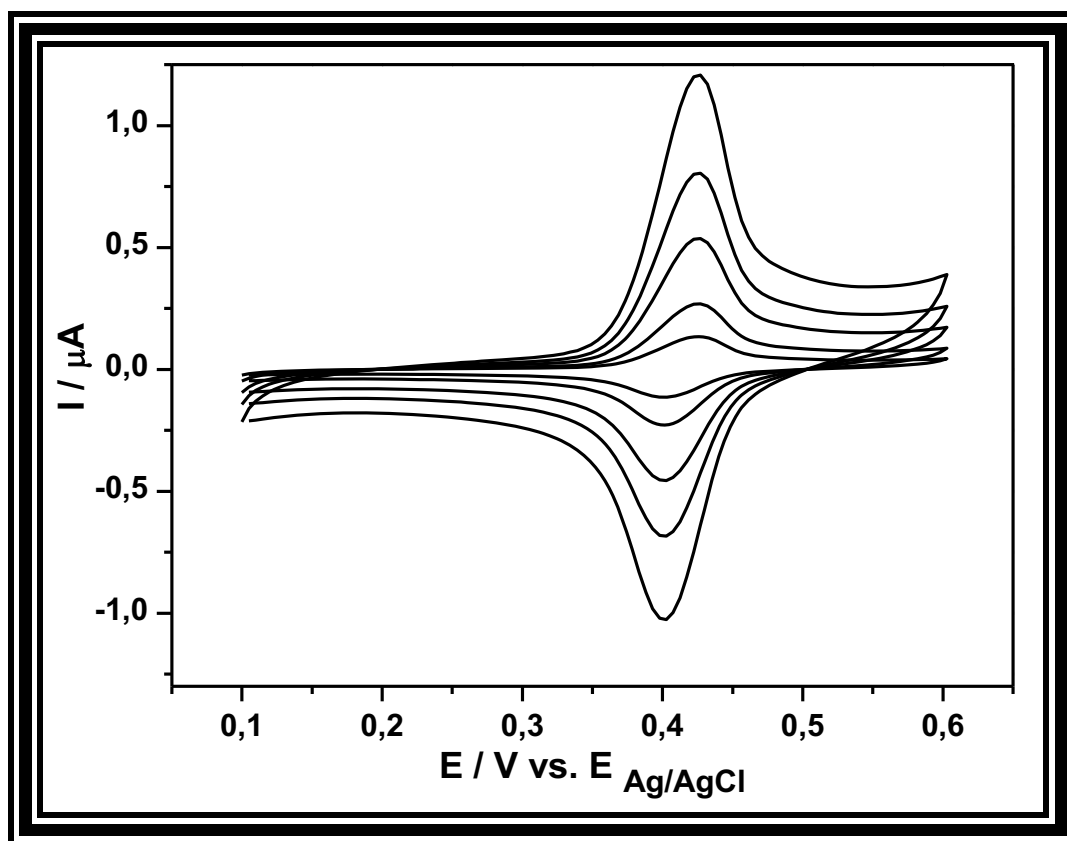


Figura 30 - Voltamogramas cíclicos de QT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão hidro-etanólico pH 2,0 sobre eletrodo modificado em diferentes v .

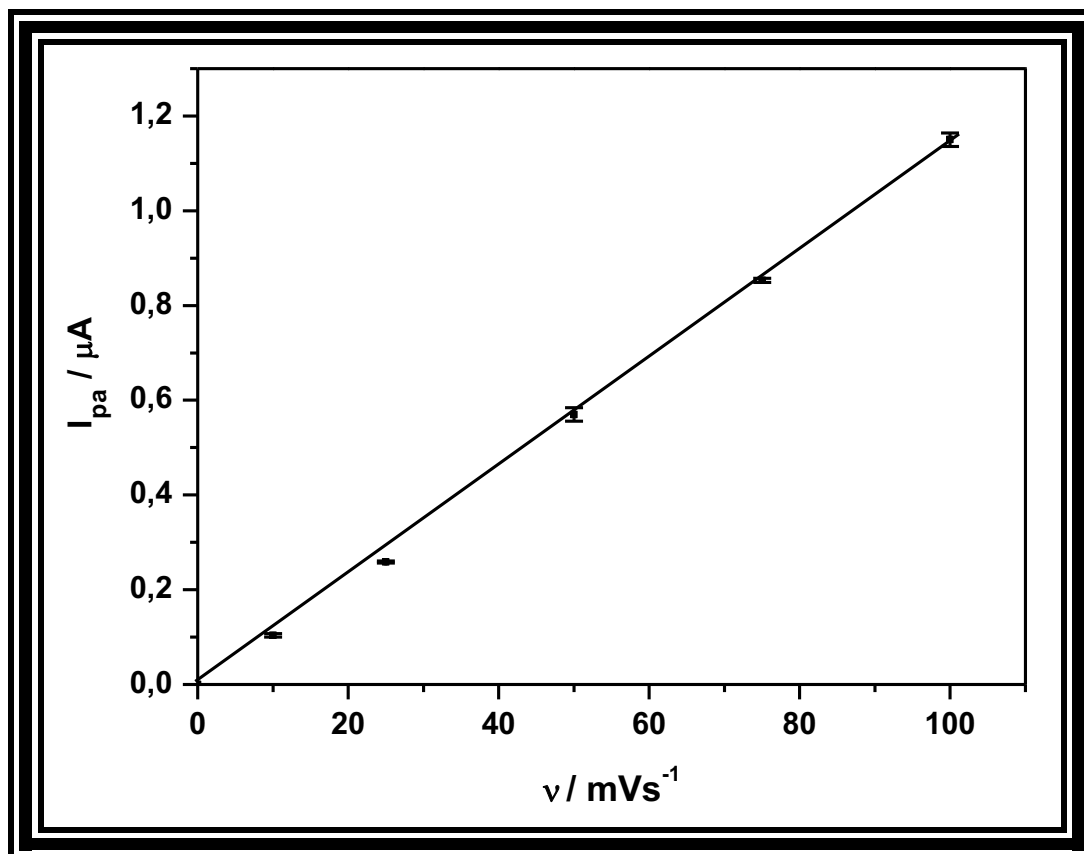


Figura 31 - Gráfico de I_{pa} vs. v em solução de QT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão hidro-etanólico pH 2,0 sobre eletrodo modificado.

A Figura 30 mostra os respectivos voltamogramas obtidos após a incorporação de QT sobre PLL/PPO em solução de eletrólito de suporte (pH 2,0) variando-se a velocidade de varredura. Observa-se que as relações de I_{pa} são proporcionais ao aumento da velocidade de varredura de potencial (v) (Figura 31) segundo a equação: $I_{pa} (\mu A) = -0,013 + 0,011v$, $R = 0,999$, $n = 5$. Este comportamento sugere que a QT está sendo oxidada na forma imobilizada sobre o eletrodo de PLL/PPO, tal como esperado.

4.2.7 - Curva de calibração para quercetina

Considerando que sistemas reversíveis podem ser explorado pela técnica de voltametria de onda quadrada a qual apresenta melhor potencialidade analítica quando comparada à voltametria cíclica, devido a maior sensibilidade do método, investigou-se a seguir a possibilidade de se construir uma curva analítica para QT, utilizando-se as melhores condições experimentais definidas para esta

técnica analítica e definida como: frequência 75Hz, amplitude 50mV e incremento de potencial de 2 mV.

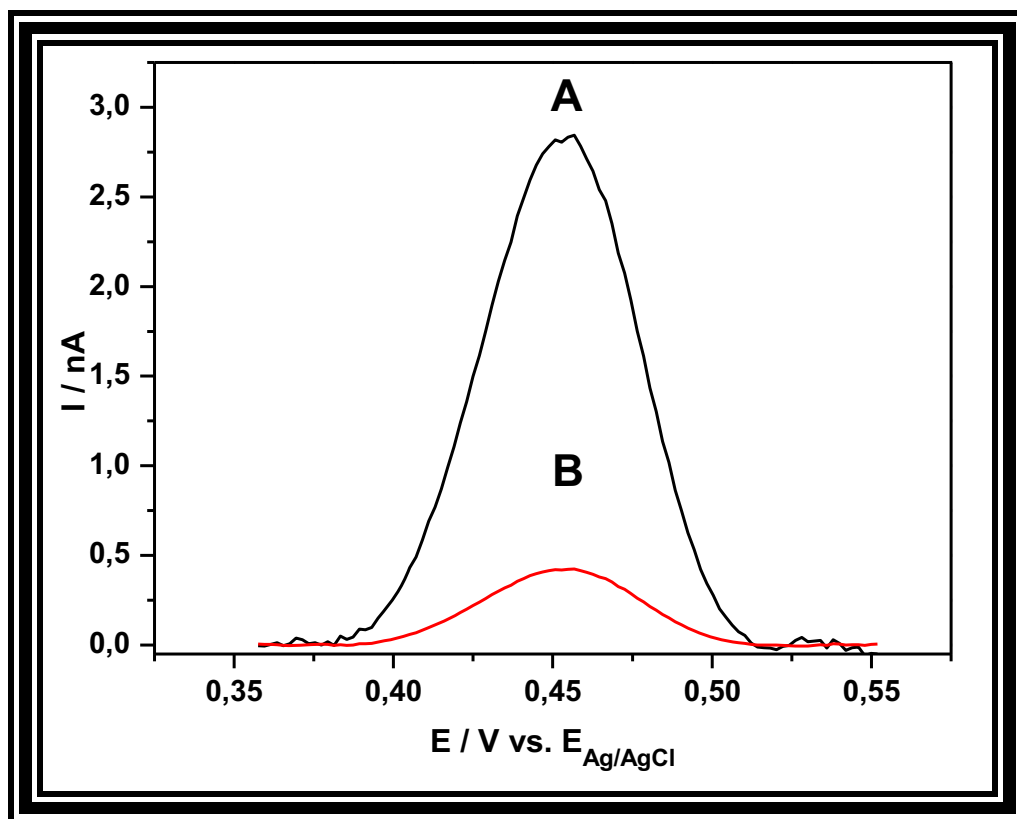


Figura 32- Voltamogramas de onda quadrada obtidos (A) para o eletrodo modificado por filmes de PLL/GA e (B) ECV carregados com $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de QT. ($f = 75 \text{ Hz}$, amplitude 50,0 mV e incremento de potencial 2,0 mV).

A curva analítica foi construída para a oxidação de QT utilizando-se o procedimento de imersão do eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO em um béquer contendo $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de QT em solução hidro-etanólica (pH 2,0) durante o período de 8 minutos, sob constante agitação. Completado este período, o eletrodo, após lavagem em água purificada, foi transferido para a célula voltamétrica contendo somente a solução tampão B-R pH 2,0. O referido voltamograma é apresentado na Figura 32 (curva A). O respectivo voltamograma obtido é comparado para o eletrodo nu imerso na mesma solução (curva B).

O voltamograma de onda quadrada obtido na Figura 32 mostra que o QT é pré-concentrado sobre a superfície do eletrodo (curva B) e a corrente anódica é aproximadamente 20 vezes maior que no eletrodo nu. Este comportamento indica que uso da técnica de onda quadrada associada ao uso de eletrodo modificado amplia sensivelmente a potencialidade analítica do método.

A seguir, construiu-se uma curva analítica para determinação de QT, usando o sistema proposto de incorporação, lavagem e transferência para solução de eletrólito em pH 2,0. Voltamogramas de onda quadrada bem definidos são obtidos em todo o intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, como mostra a Figura 33.

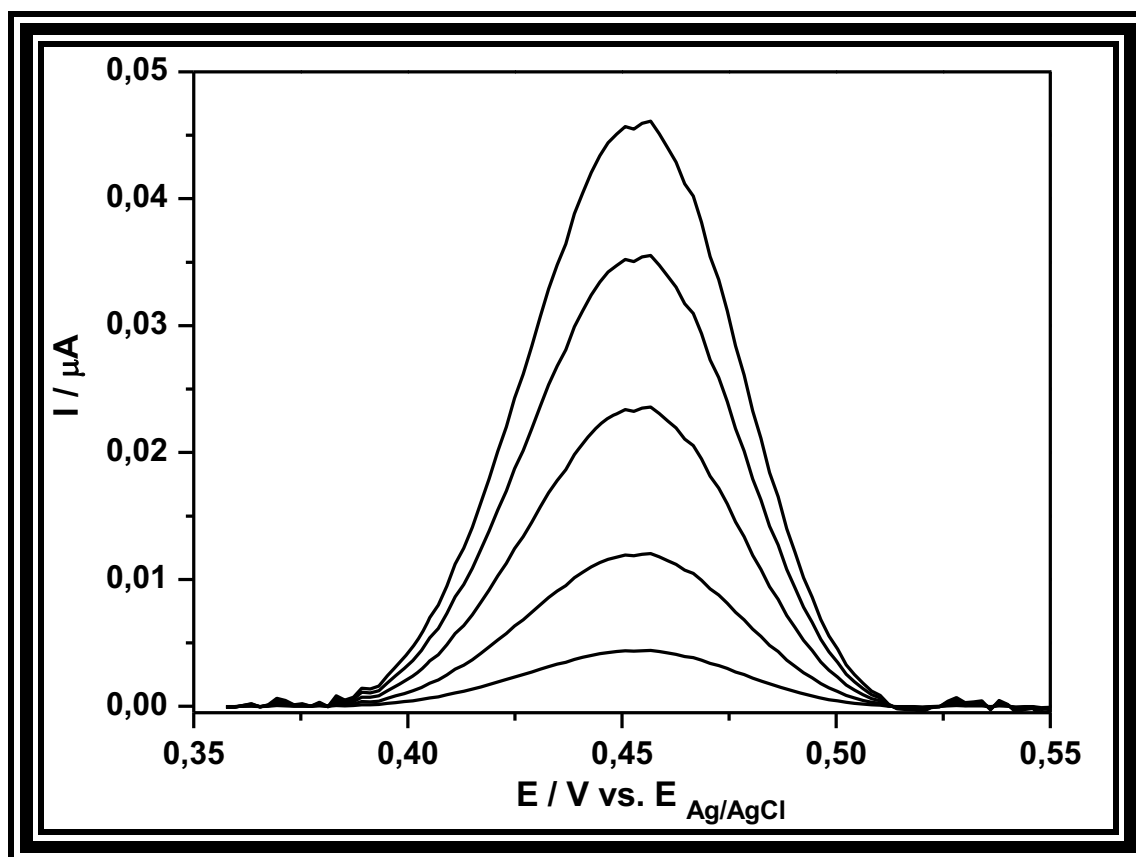


Figura 33 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para determinação de QT em solução tampão B-R pH 2,0 em diferentes concentrações variando-se de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO.

A Figura 34 apresenta a relação linear obtida entre a corrente de pico anódico e a concentração de QT no intervalo de concentração estudadas, a qual segue a equação $I_{pa} (\mu\text{A}) = 9,92 \times 10^{-11} + 0,452 \text{ QT (mol L}^{-1})$, $R = 0,9997$. Este gráfico foi construído obtendo-se valores em triplicata. O limite de detecção foi calculado através da relação $(3 \times \text{SD}) / b$ cujo valor encontrado foi de $2,76 \pm 0,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

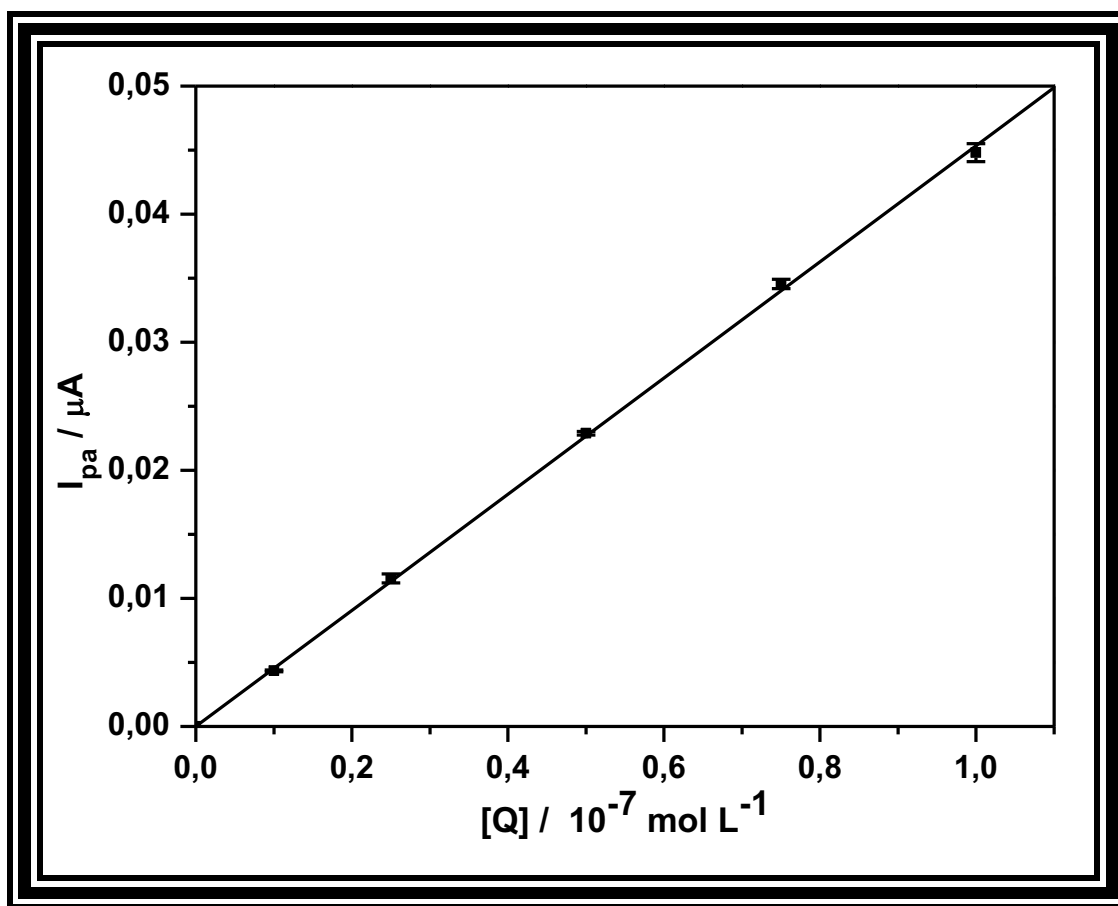


Figura 34 - Curva analítica para oxidação de QT imobilizado em eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO.

4.2.8 - Aplicação do eletrodo modificado com PLL/PPO na determinação de chá verde

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de QT em amostras de chá verde cujo procedimento é descrito na parte experimental. Para isto, registraram-se voltamogramas de onda quadrada correspondente à solução contendo 5 μL de Chá verde diluído em 10 mL de solução hidro-etanólica (pH 2,0). Eletrodo de carbono vítreo sem e com a modificação de PLL/PPO foi imerso nesta solução e os respectivos voltamogramas de onda quadrada registrados após 8 minutos de pré-acúmulo (Figura 35). Os parâmetros correspondentes à técnica de voltametria de onda quadrada foram: frequência 75 Hz, amplitude 50,0 mV e incremento de potencial 2,0 mV.

Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de chá verde diluído em solução hidro-etanólica (pH 2,0) sobre ambos os eletrodos apresentam dois picos anódicos em potenciais de 0,39 V e 0,48 V, identificados como pico I e II nas curvas A e B da Figura 35. As oxidações dos mesmos componentes do chá

ocorrem em ambos os eletrodos, porém a intensidade de corrente no eletrodo modificado é maior que no eletrodo nu. Estes resultados mostram que os filmes de PLL/PPO podem agir para pré-concentrar antioxidantes presentes no chá verde sem perder suas características eletroquímicas

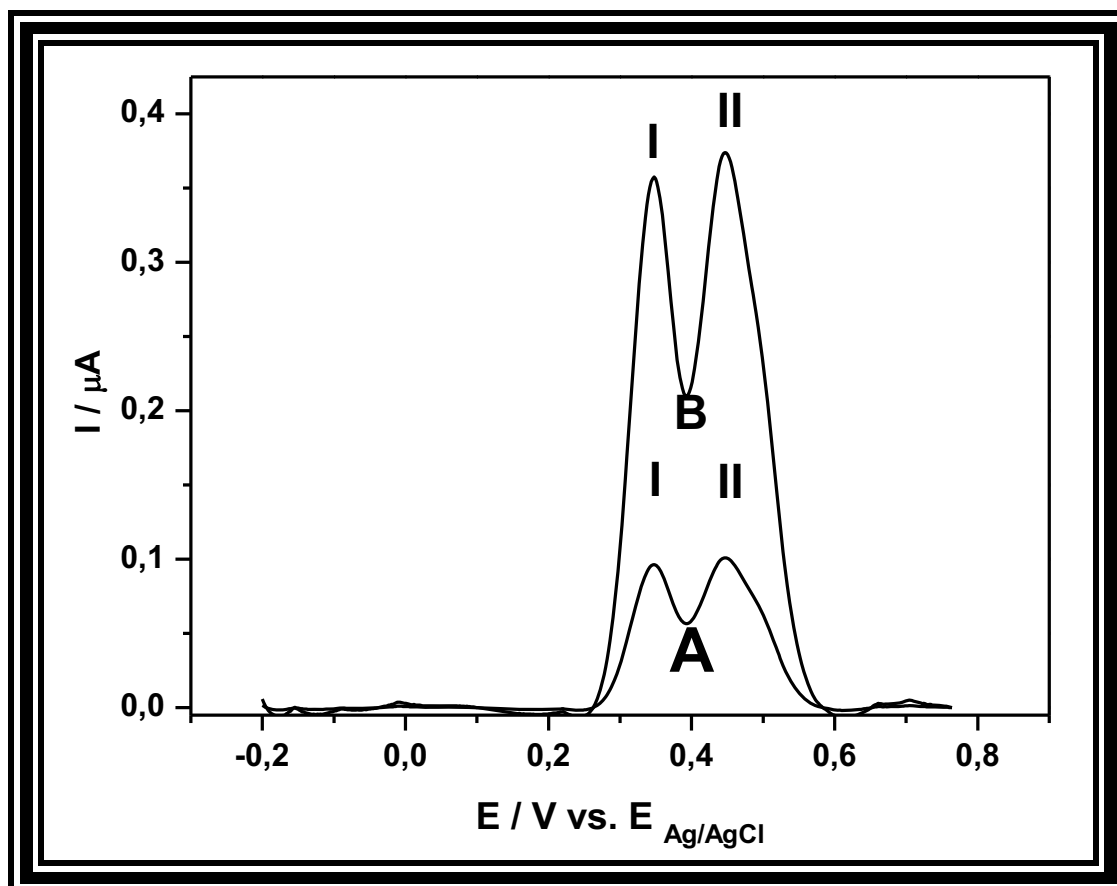


Figura 35 - Voltamograma de onda quadrada obtidos para 5 μL de solução de chá verde em solução hidro-etanólica pH 2,0 sobre (A) ECV e (B) PLL/PPO.

Posteriormente, alíquotas de solução padrão de QT ($7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionadas sobre a solução de chá verde já existente na célula com posterior registro das curvas voltamétricas. Os resultados obtidos para este estudo são apresentados na Figura 36. A corrente de ambos os picos aumentam com a adição do padrão QT. A corrente do pico II, quando submetida à adição do padrão de QT aumenta linearmente como mostra indicando que os componentes endógenos do chá verde não interferem no presente ensaio. No entanto, o aumento do pico I, em potenciais menos positivos que aquele identificado para QT sugere um comportamento interessante. Pois também aumenta com QT embora o mesmo não seja atribuído a este antioxidante em especial.

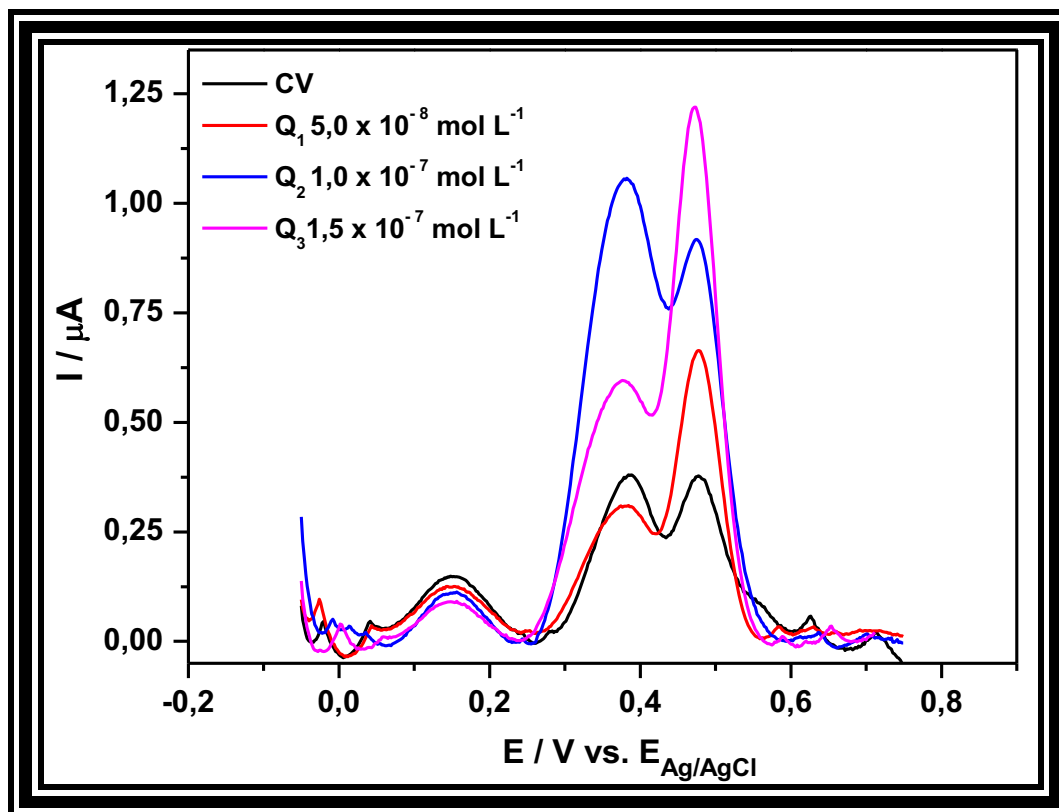


Figura 36 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de QT em chá verde por filmes de PLL/PPO carregados durante 8 minutos em solução tampão B-R pH 2,0 após adição de alíquotas de solução padrão de QT ($7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

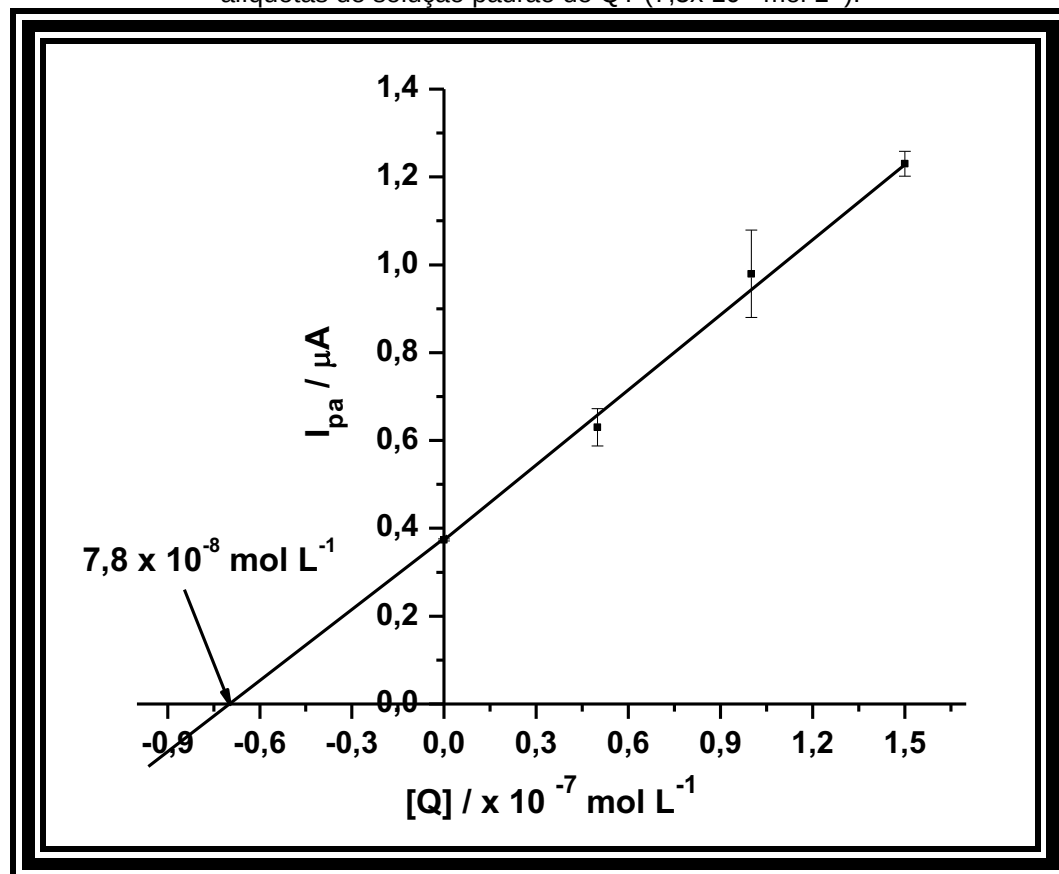


Figura 37 - Gráfico da I_{pa} vs. Concentração para oxidação de QT em chá verde por filmes de PLL/PPO carregados durante 10 minutos em solução tampão B-R pH 2,0.

Na Figura 37, pode-se observar que com as adições de padrão de QT sobre a alíquota de chá verde os valores da corrente do pico II aumentam proporcionalmente. Os valores obtidos para as amostras do chá submetido à adição do padrão apresentam uma relação linear, segundo a equação: $I_{pa} (\mu A) = 8,9 \times 10^{-8} + 1,33C$, com $R = 0,995$. A extrapolação da reta indicou que uma concentração de $0,078 \mu M$ de QT está presente no chá verde.

A determinação de QT em amostra de chá verde foi ainda testada enriquecendo-se o mesmo com $7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ do analito. A amostra do chá preparada, segundo procedimento descrito na parte experimental, foi analisada pela diluição direta de uma alíquota de $5 \mu L$ da amostra em 10 mL de eletrólito de suporte, solução hidro-etanólica em pH 2,0. As amostras foram submetidas a adições de solução de QT, com concentrações definidas, resultando em concentração ao redor de $7,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de Recuperação encontrados na determinação de quercetina utilizando PLL/PPO.

Réplica	[QT] adicionado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	[QT] encontrado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação / %
1	0,075	0,078	104,0
2	0,075	0,073	97,3
3	0,075	0,069	92,0

Os valores obtidos indicaram que a média do componente QT no chá ocorre ao redor de $7,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ levando a valores de recuperação ao redor de 92 a 104%.

4.2.9 - Estudo de interferentes

Como a matriz de chá verde pode conter muitas substâncias fenólicas, outras espécies eletroativas podem estar presentes numa amostra real e afetar o sinal do eletrodo, apesar dos estudos prévios mostrarem certa seletividade para a QT. Sendo assim, tornou-se necessário investigar o efeito da presença de outros antioxidantes no pico do chá verde usando a metodologia proposta. Para isto, estudou-se o comportamento voltamétrico de onda quadrada para os compostos: Ácido ascórbico (AA), ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACI), ácido gálico (AG), catequina (CT) e rutina (R), que contém hidroxilas substituintes oxidáveis e

possíveis de serem detectados por voltametria conforme mostram as estruturas químicas na Figura 38.

Os respectivos voltamogramas de onda quadrada obtido para $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em solução hidro-etanólica pH 2,0 contendo de cada analito foi registrado separadamente sobre eletrodo de carbono vítreo antes e após a modificação por filmes de PLL/PPO e representado nas Figuras 39 a 44. Os parâmetros voltamétricos de cada curva (E_{pa} e I_{pa}) para ambos os eletrodos foram calculados e são apresentados na Tabela 2.

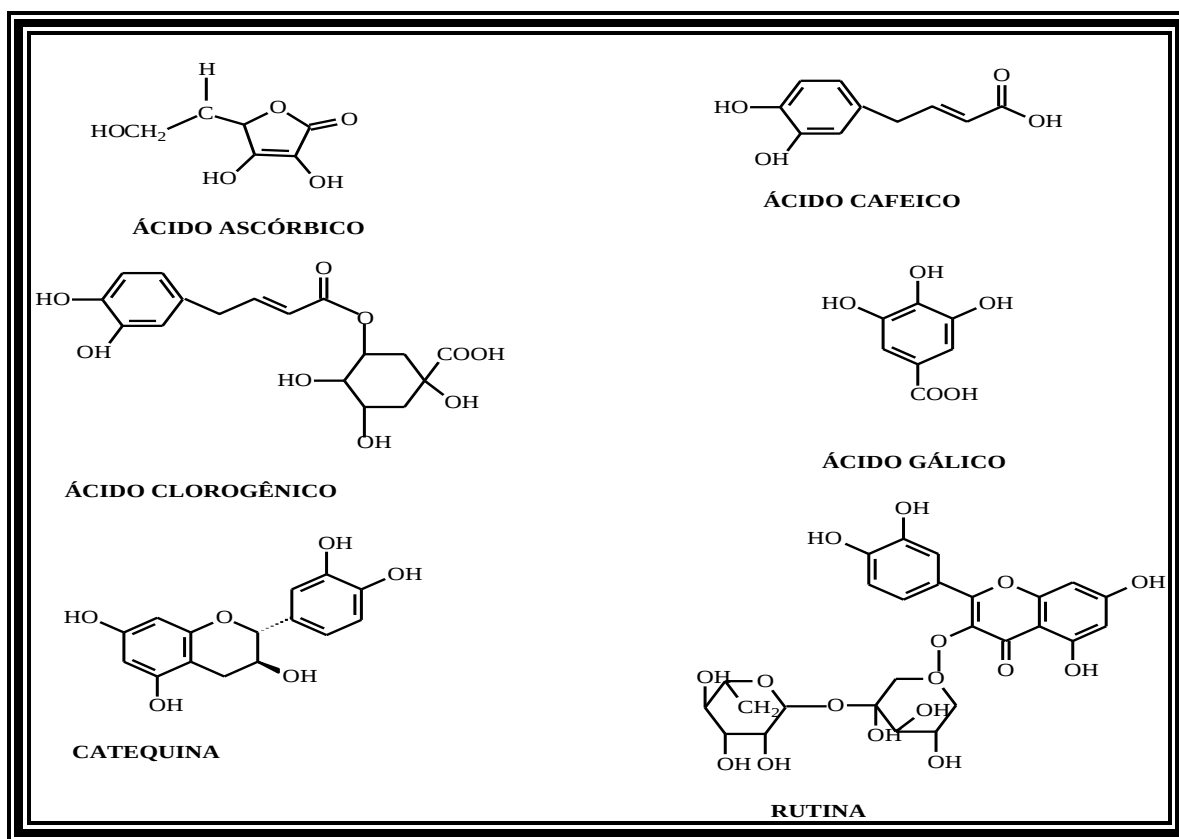


Figura 38 - Estruturas química do ácido ascórbico (AA), ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACI), ácido gálico (AG), catequina (CT) e rutina (R).

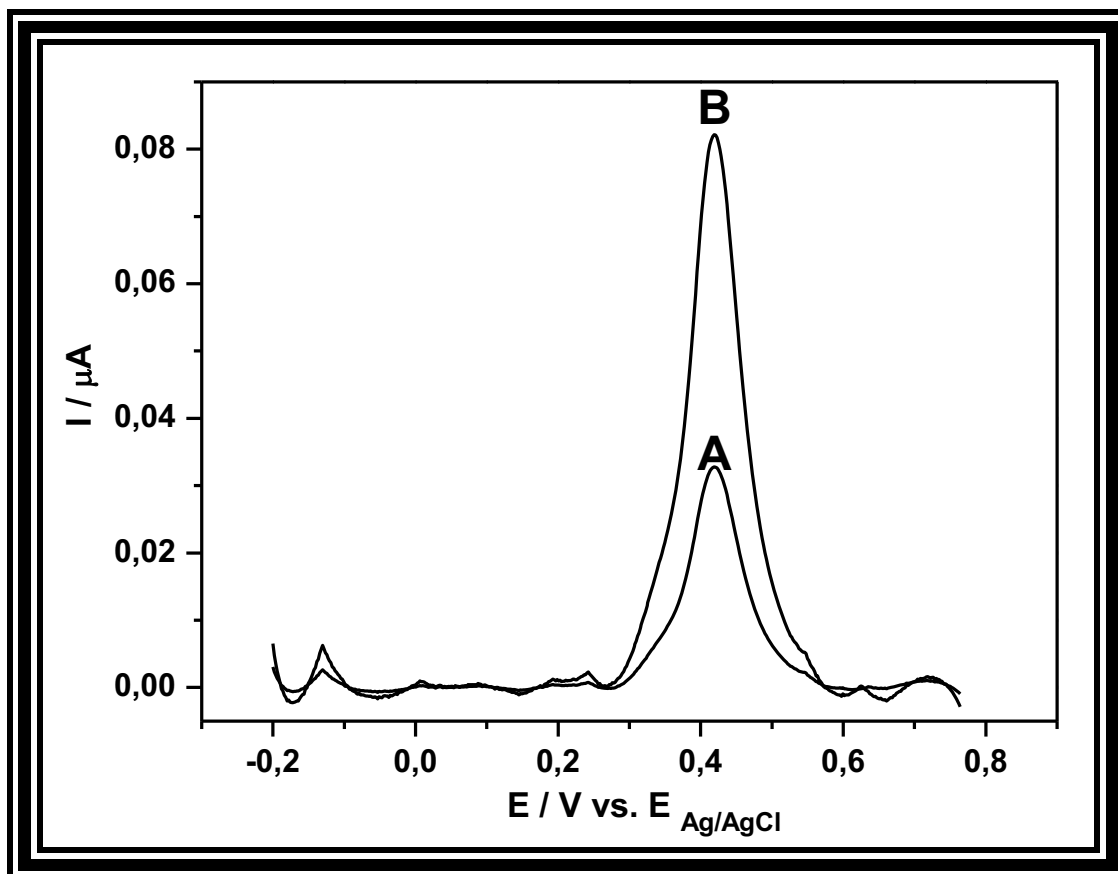


Figura 39 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico sobre eletrodo (a) ECV e (b) filme PLL/PPO.

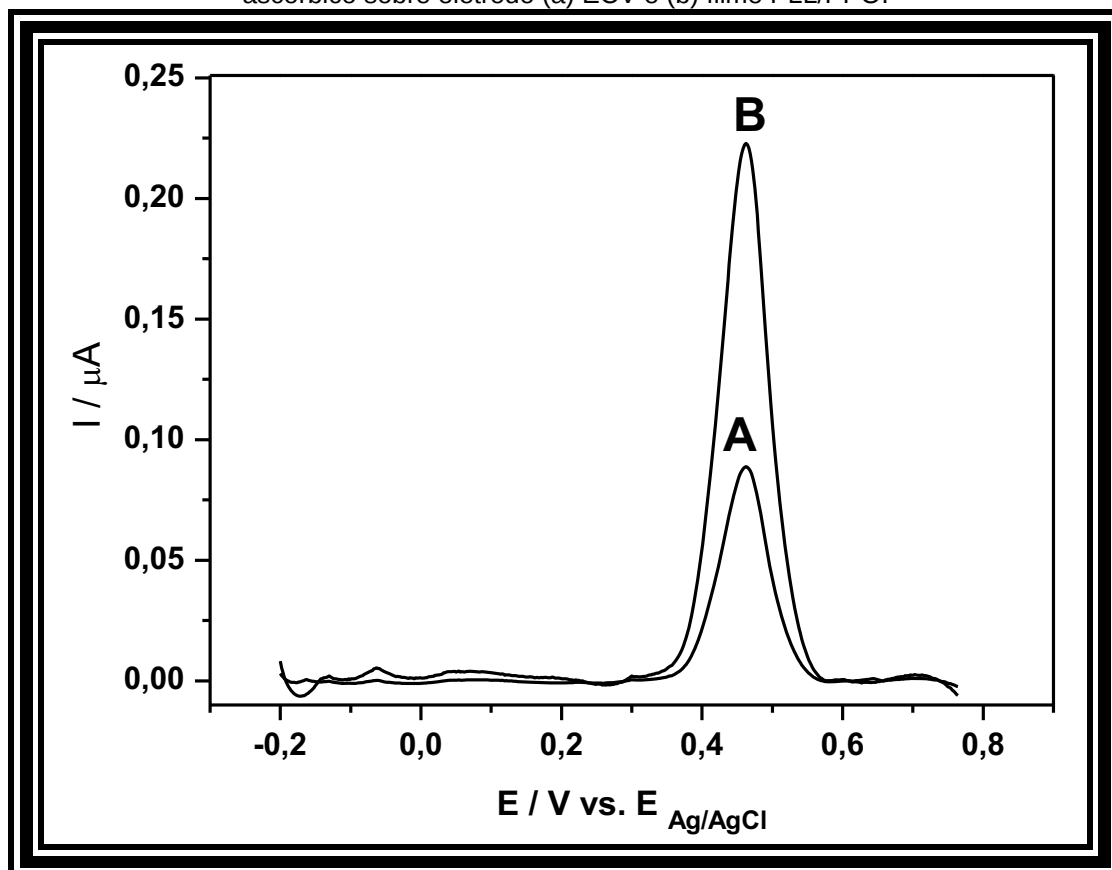


Figura 40 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido caféico sobre eletrodo (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO.

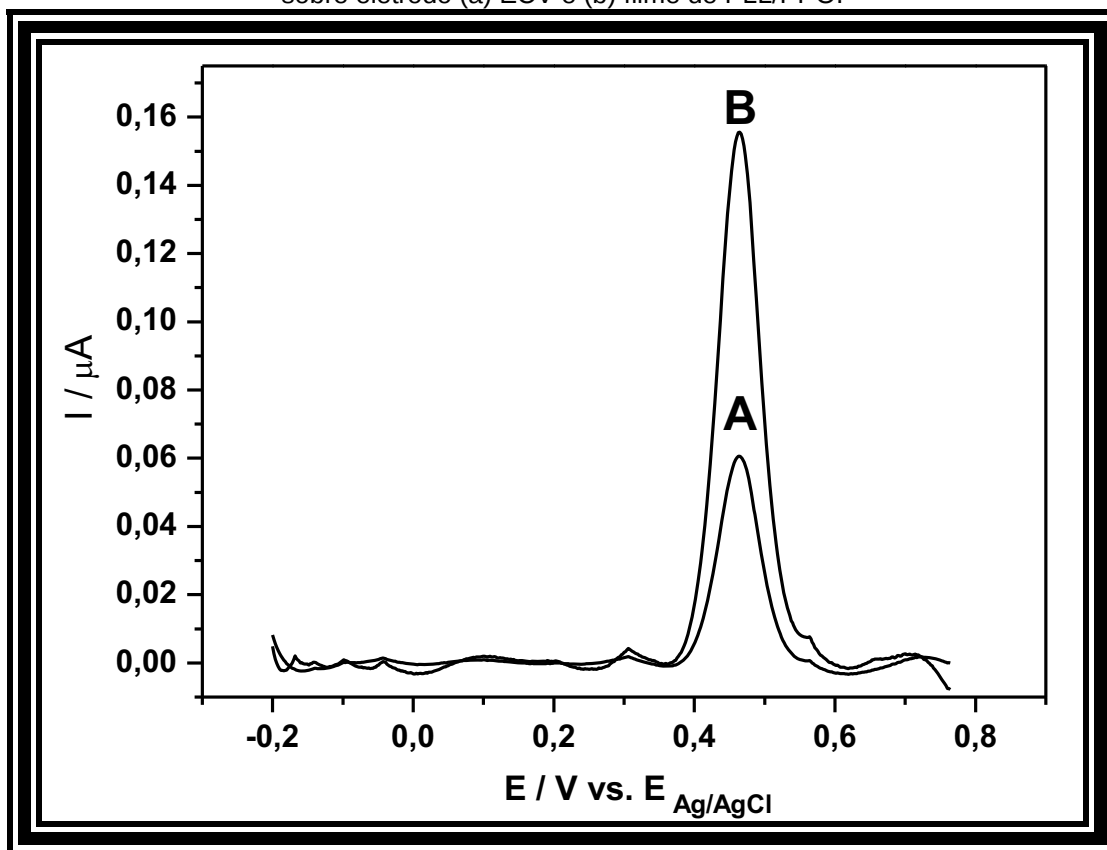


Figura 41 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico sobre eletrodo (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO.

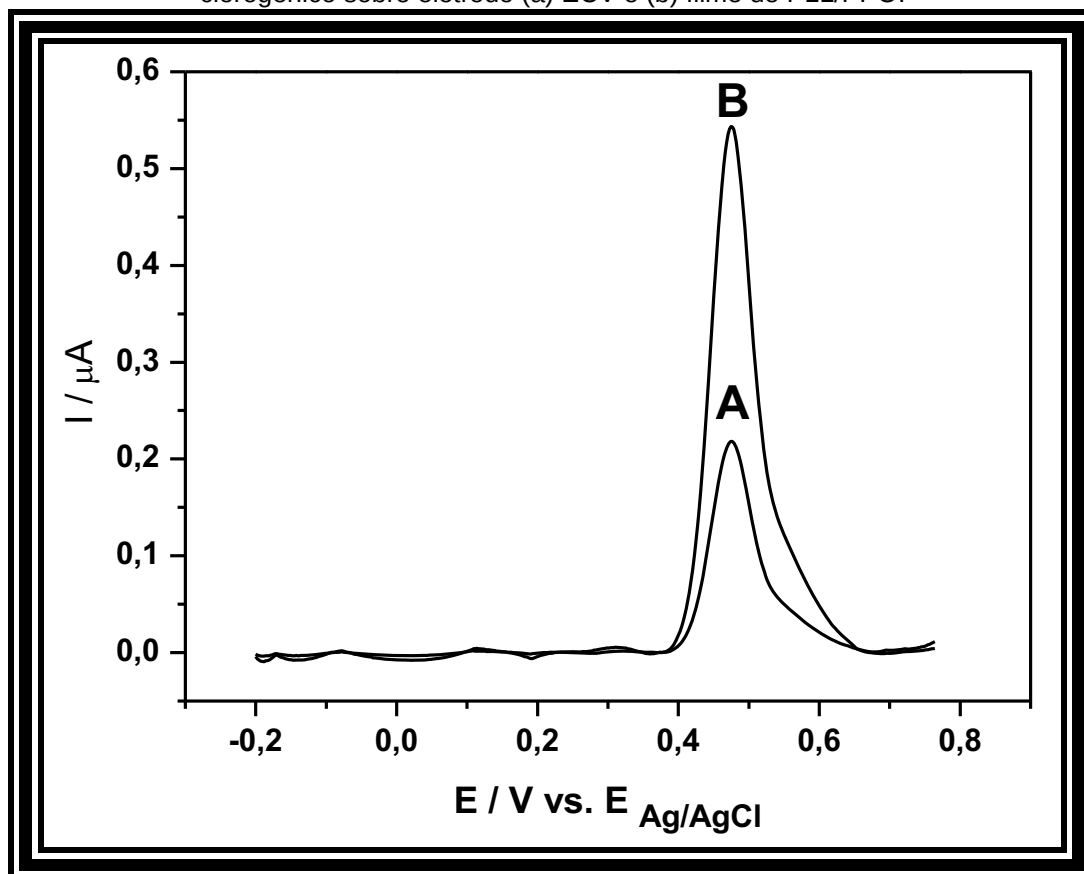


Figura 42- Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido gálico sobre eletrodo (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO.

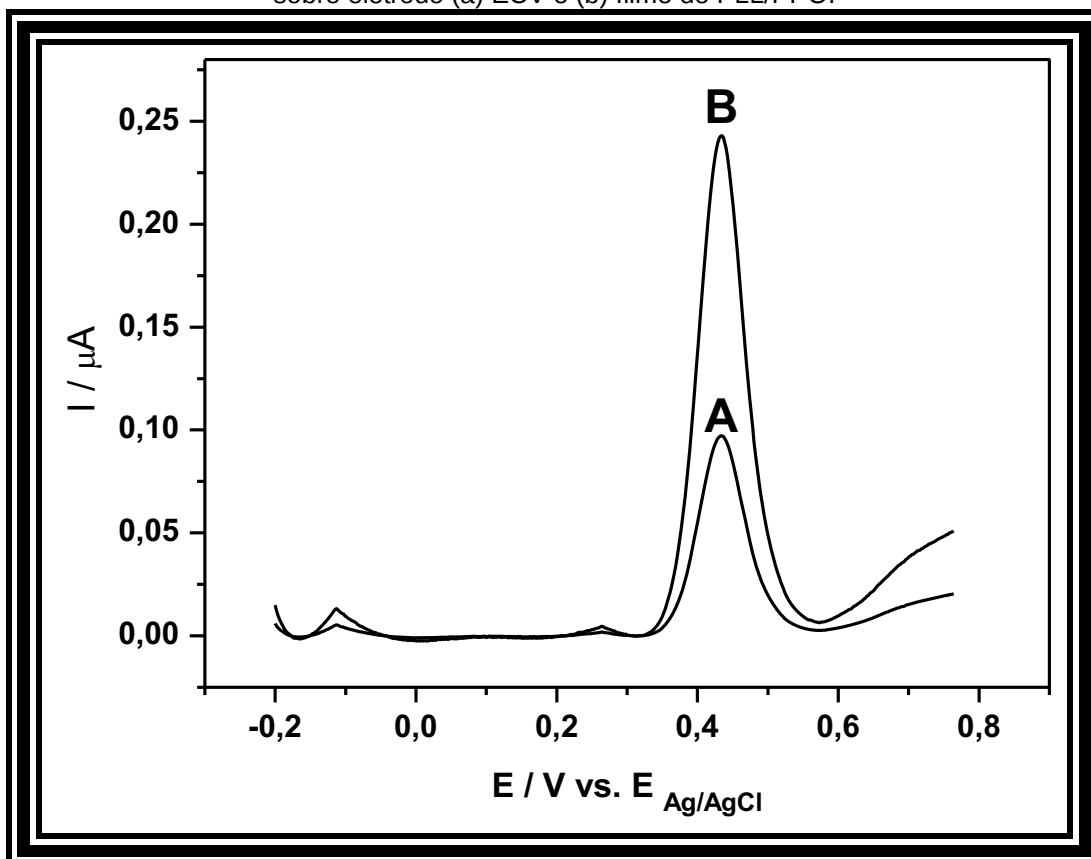


Figura 43 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de catequina sobre eletrodo (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO.

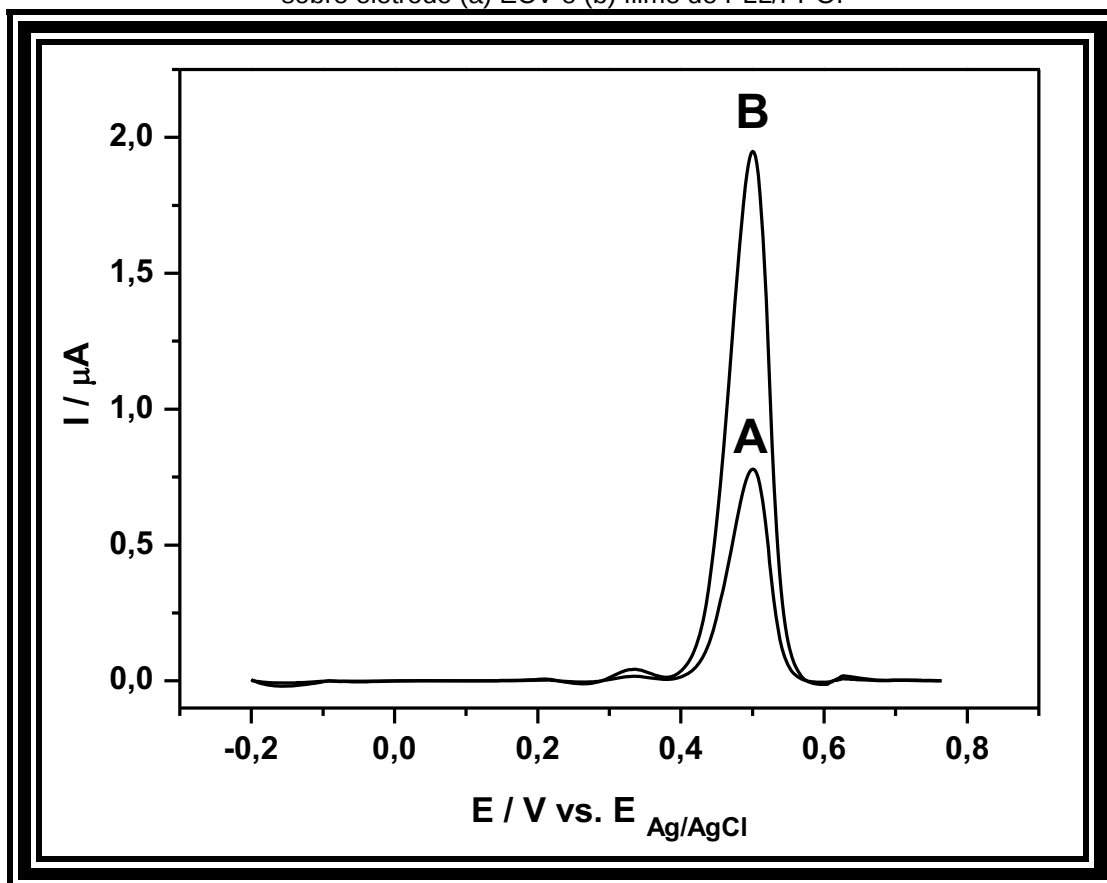


Figura 44- Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina sobre eletrodo (a) ECV e (b) filme de PLL/PPO.

Tabela 2 - Parâmetros voltamétricos comparativos entre eletrodo de carbono vítreo e modificado por filme PLL/PPO.

Analito	ECV		PLL/PPO	
	E_{pa} / V	$I_{pa} / \mu\text{A}$	E_{pa} / V	$I_{pa} / \mu\text{A}$
AA	0,418	0,03	0,418	0,08
AC	0,462	0,09	0,462	0,22
ACI	0,464	0,06	0,464	0,155
AG	0,475	0,22	0,475	0,543
CT	0,434	0,098	0,434	0,242
R	0,501	0,387	0,501	0,776

AA = ácido ascórbico, AC = ácido caféico, ACI = ácido clorogênico, AG = ácido gálico, CT = catequina e R = rutina. E_{pa} = potencial de pico anódico e I_{pa} = corrente de pico anódica.

Observando-se os resultados apresentados na Tabela 2, é possível notar que todos os padrões descritos são pré-concentrados na superfície do eletrodo modificado, o que pode ser observado pelo aumento da corrente de pico, considerando que a QT é oxidada no filme de PLL/PPO em potenciais de +0,48 V vs. $E_{\text{Ag/AgCl}}$ os compostos de ácido gálico, ácido caféico e ácido clorogênico poderiam interferir na medida. Estes resultados confirmam a hipótese de que, provavelmente, o eletrodo pré-concentra o antioxidante pela interação R-NH_3^+ de PLL e o grupo R-OH presente em composto.

A seguir, investigou-se a influência desses compostos na determinação de QT no chá verde mais especificamente pelo monitoramento da oxidação de chá verde em solução hidro-etanólica (pH 2,0) sobre eletrodo de carbono vítreo com filme de PLL/PPO na ausência e na presença de adições sucessivas dos diversos antioxidantes no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os analitos escolhidos foram AA, AC, ACI, AG, CT e R respectivamente, cujos voltamogramas correspondentes são apresentados nas Figuras 45 a 50.

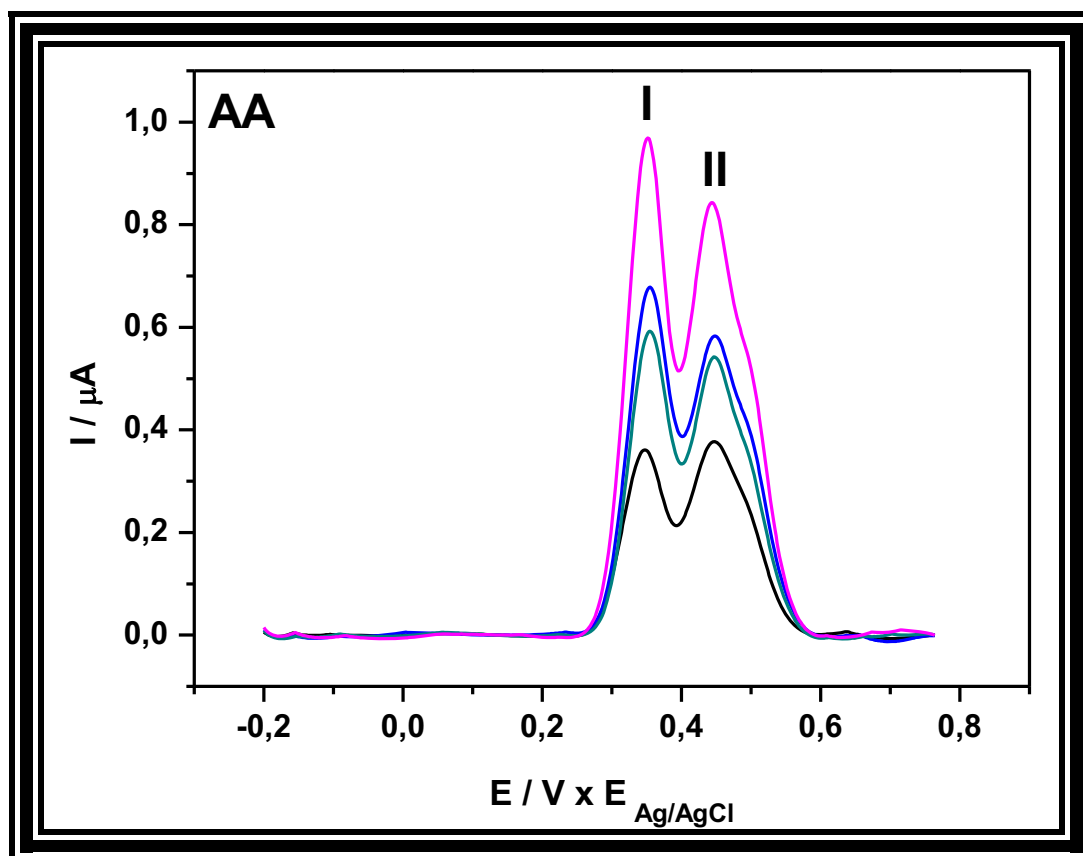


Figura 45 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação de chá verde na presença de ácido ascórbico no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu mol L^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO.

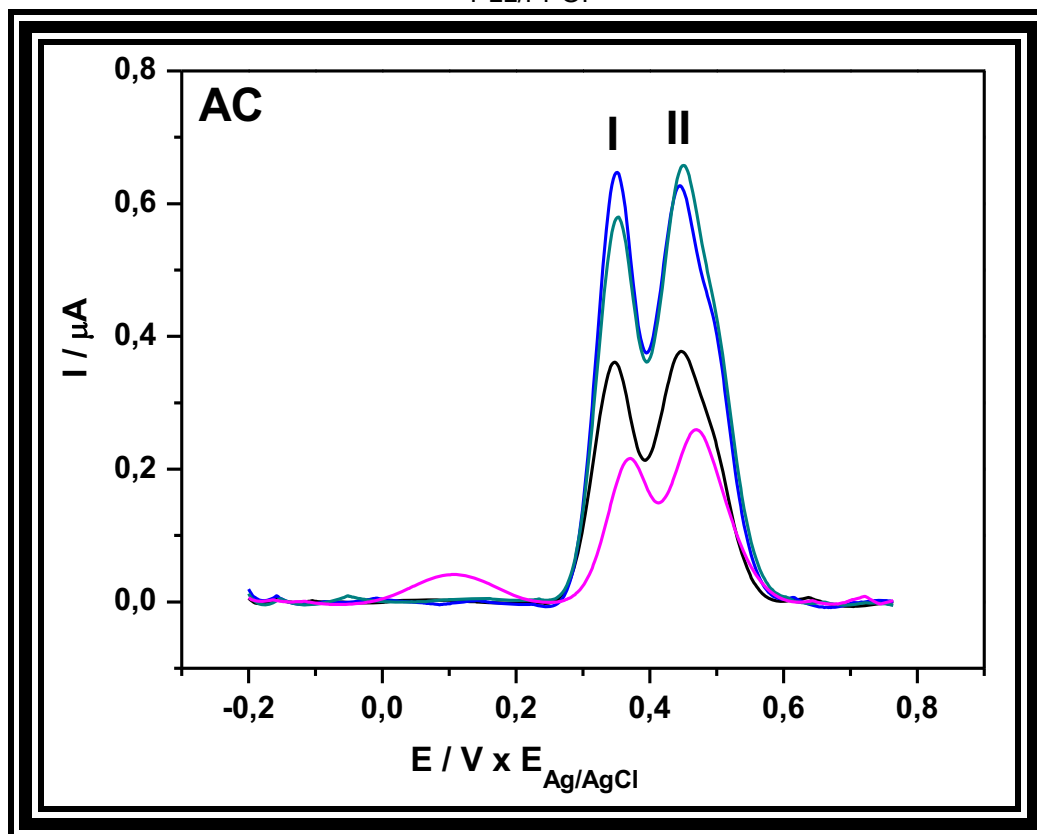


Figura 46 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de ácido caféico no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu mol L^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO.

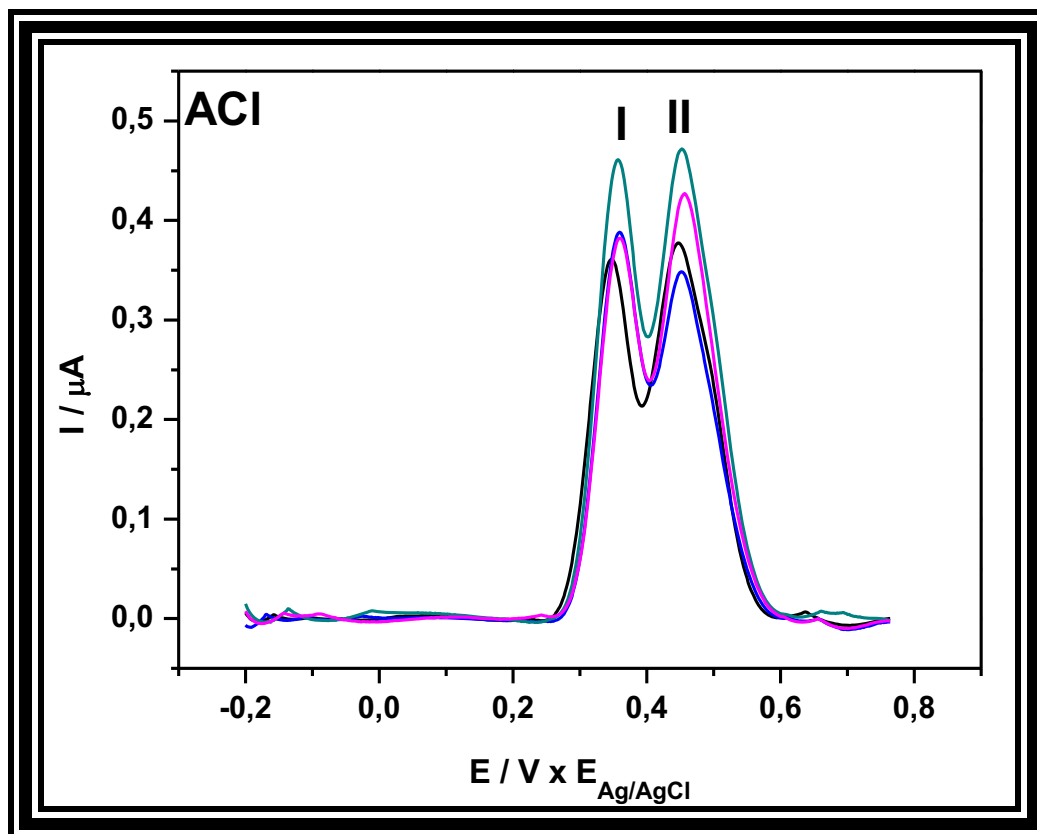


Figura 47 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de ácido clorogênico no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO.

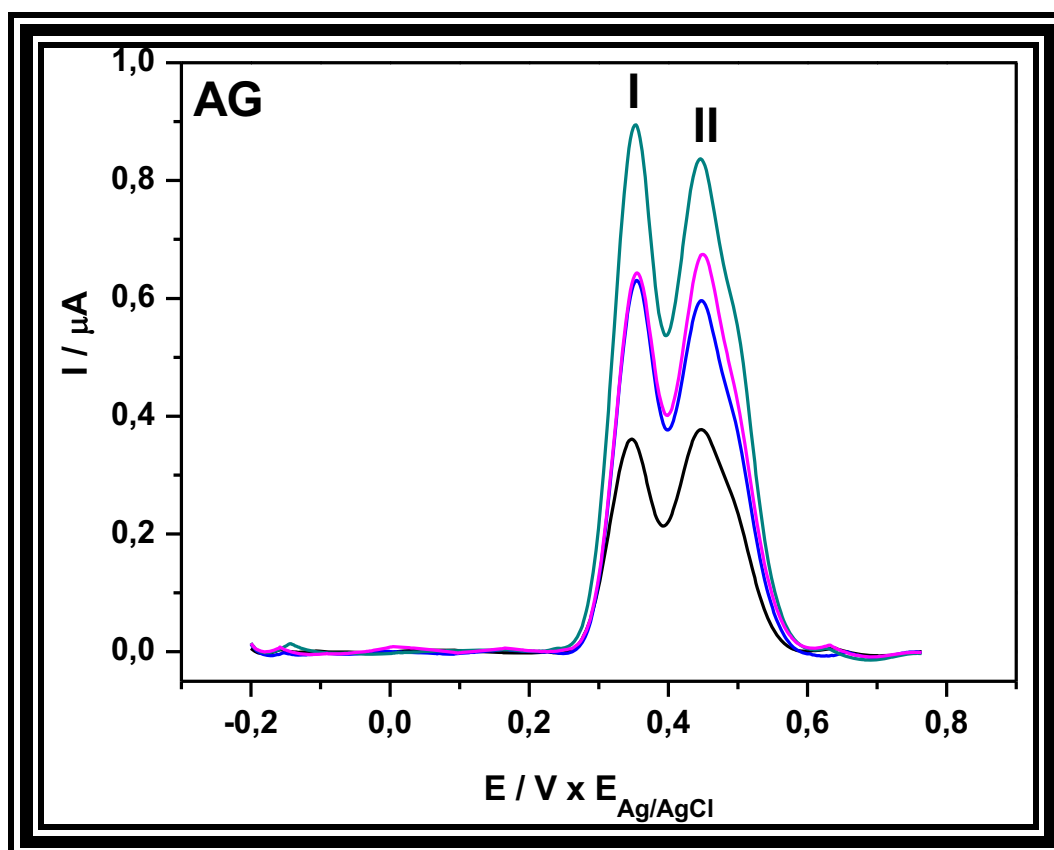


Figura 48- Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de ácido gálico no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO.

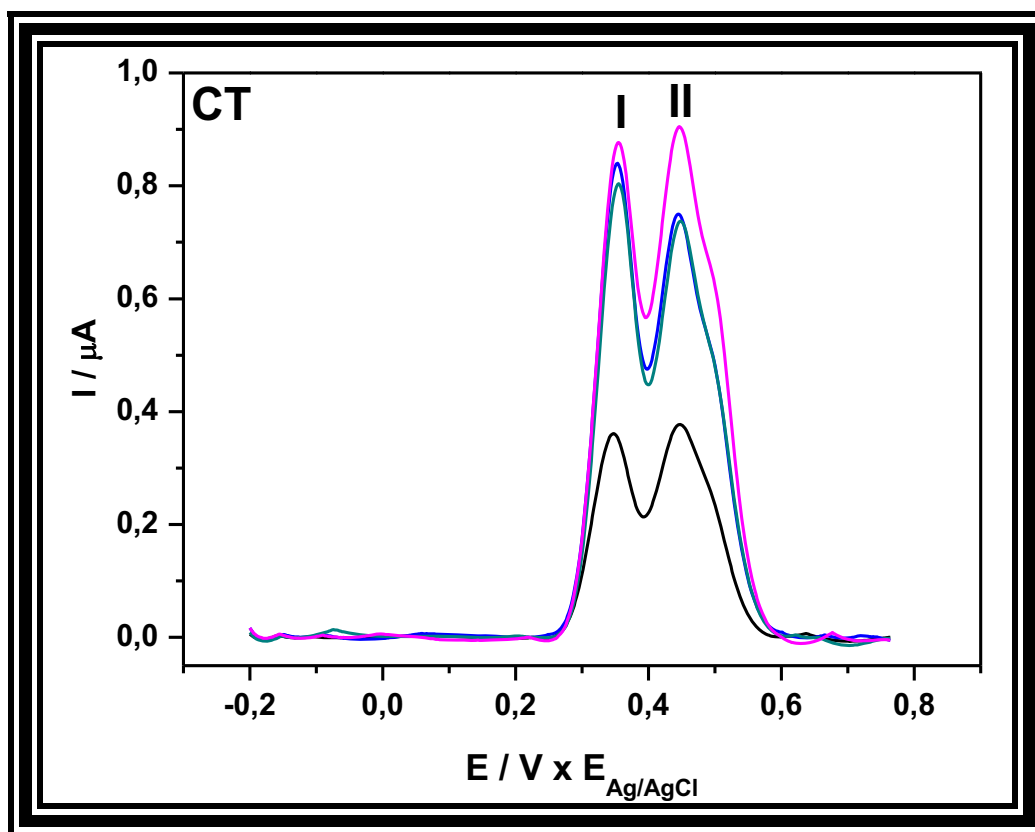


Figura 49 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de catequina no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO.

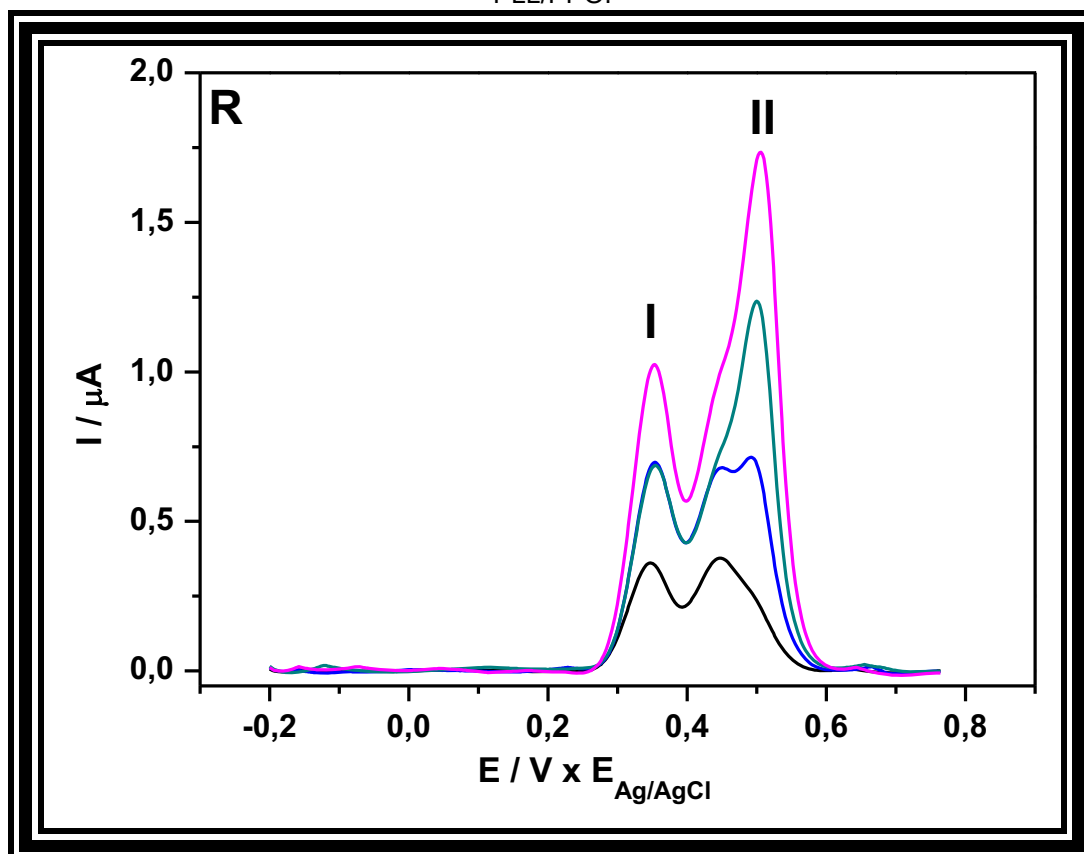


Figura 50 - Voltamogramas de onda quadrada para oxidação de chá verde na presença de rutina no intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre eletrodo modificado por PLL/PPO.

Como verificado para QT, a oxidação do chá verde apresenta os picos I e II em $E_{pa} = 0,39$ V e $E_{pa} = 0,48$ V respectivamente, que aumentam em função da adição de soluções padrões de AA, AC, ACI, AG, CT e RT, conforme pode ser observado em cada figura respectiva.

Os resultados podem ser explicados se considerarmos que os componentes antioxidantes endógenos do chá verde são oxidados em duas etapas de oxidação conforme evidência o Esquema 2. Embora em solução aquosa, este processo de duas etapas ocorra em uma única etapa na qual alguns compostos endógenos estabilizam temporariamente o radical semi-quinona formado. Assim, observam-se duas ondas em potenciais bastante próximos.

Deste modo, os resultados obtidos são indicativos de que todos os derivados fenólicos e o ácido ascórbico podem ser determinados com o eletrodo modificado por filme de PLL/PPO onde a única alternativa seria usá-lo como uma boa ferramenta para determinação de atividade antioxidante total na amostra de chá verde.

Para comprovar que a resposta eletroquímica não é apenas um efeito da técnica, realizou-se, a seguir, um estudo espectrofotométrico registrando os espectros na região do UV para amostras do chá verde antes e após adição de AA (Figura 51), AC (Figura 52), ACI (Figura 53), AG (Figura 54), CT (Figura 55), QT (Figura 56) e R (Figura 57), para acompanhar se há algum sinergismo entre os compostos passíveis de serem detectados pela modificação das bandas dos mesmos.

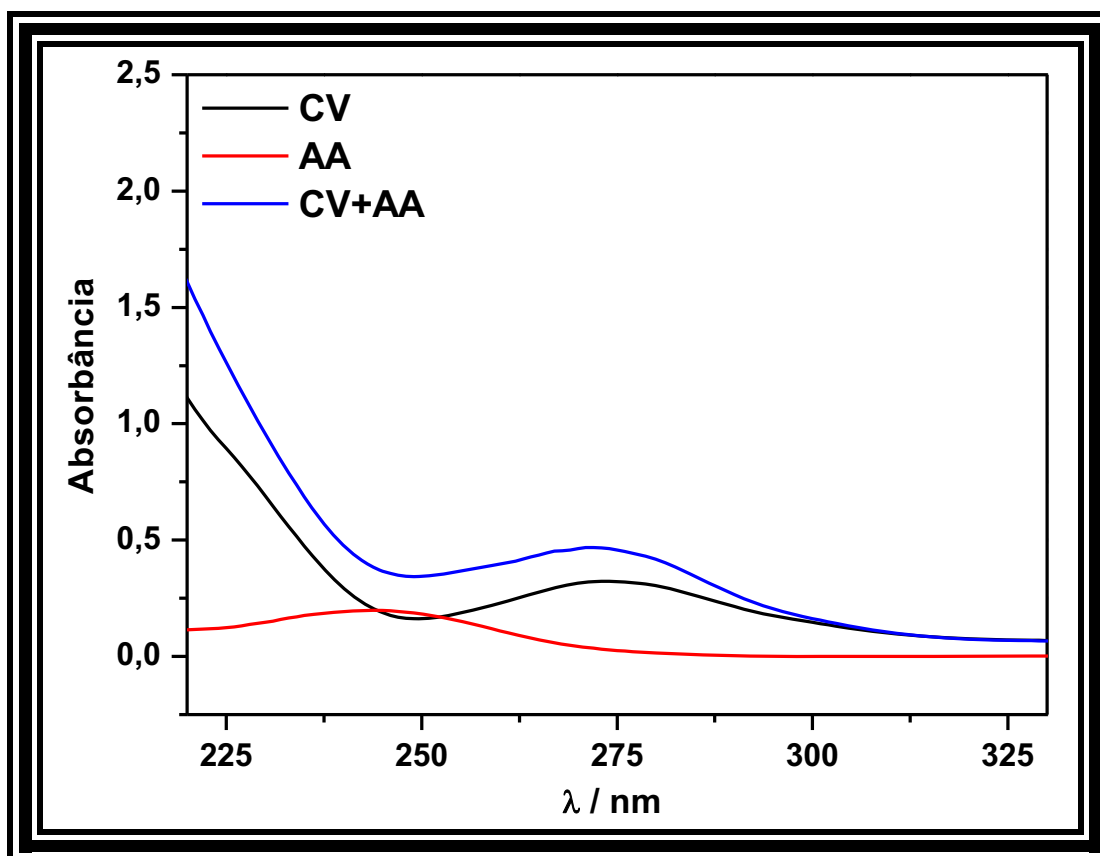


Figura 51 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ de ácido ascórbico, em solução hidro-etanólica pH 2,0.

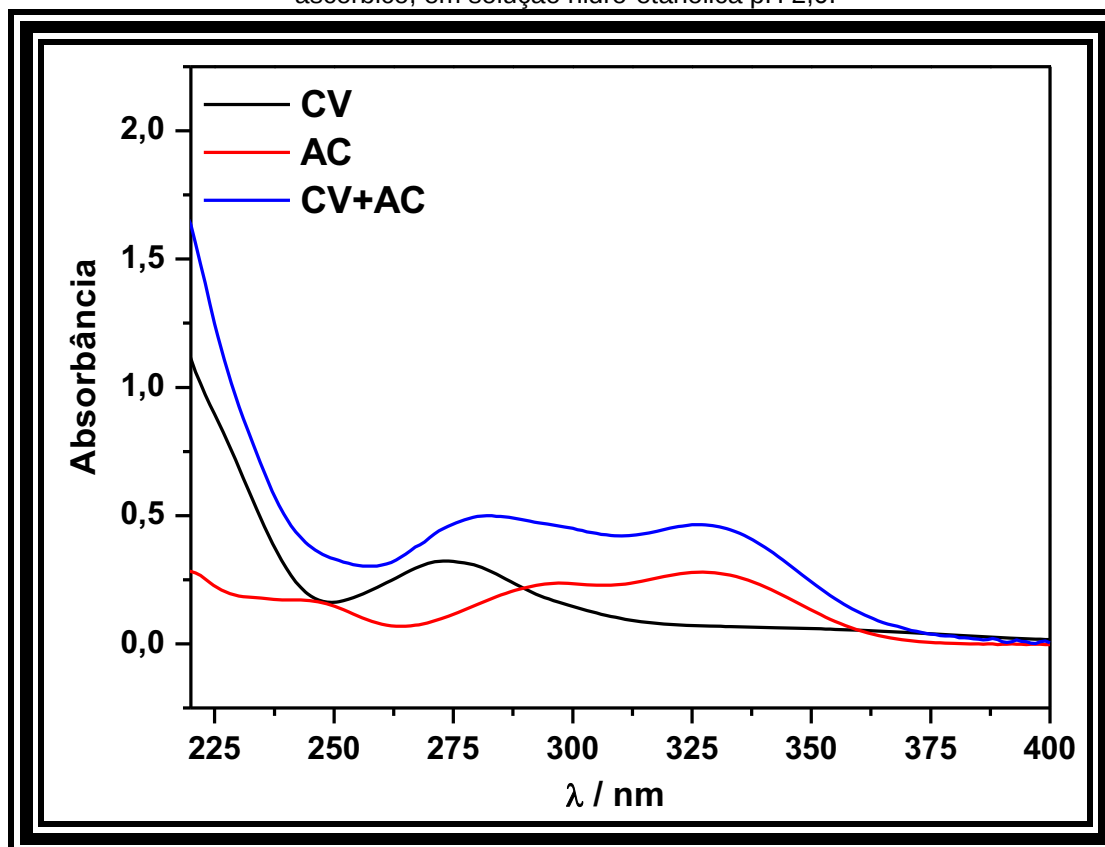


Figura 52 - Espectros de absorção de 10 μL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido caféico em solução hidro-etanólica pH 2,0.

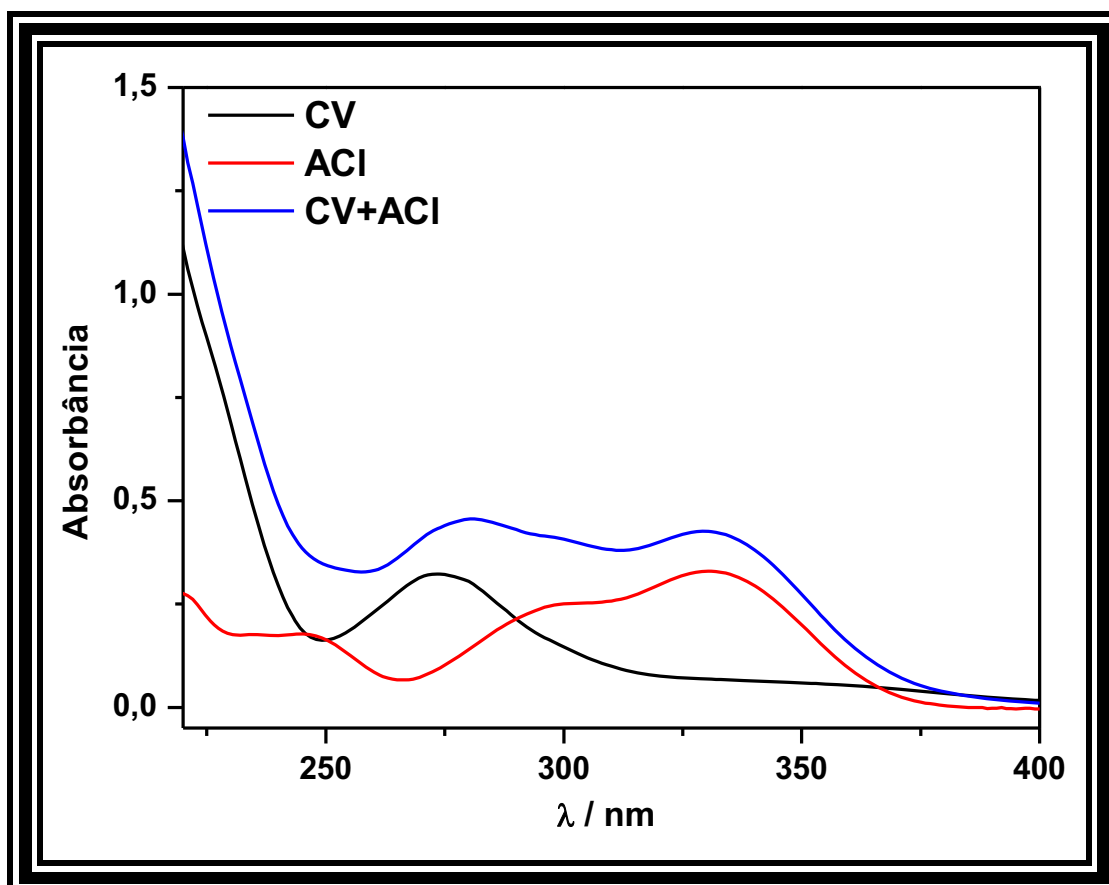


Figura 53 - Espectros de absorção de 10 µL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido clorogênico em solução hidro-etanólica pH 2,0.

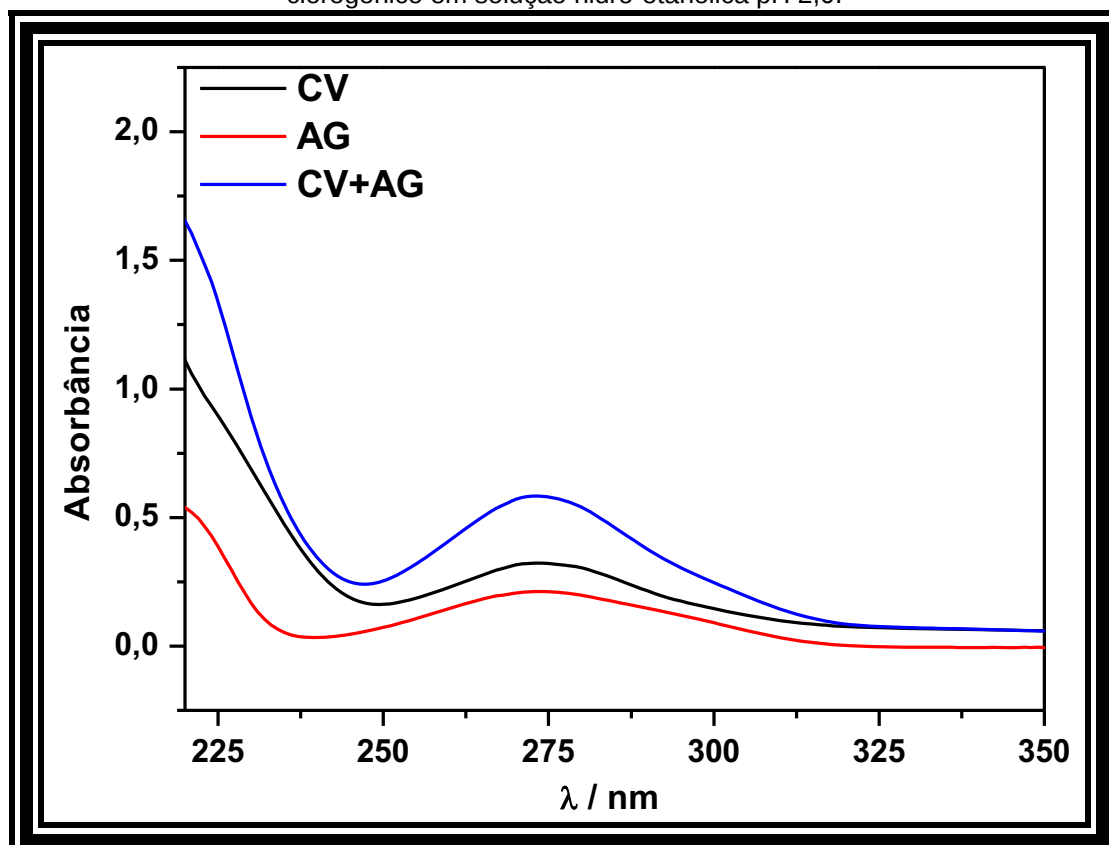


Figura 54- Espectros de absorção de 10 µL chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de ácido gálico em solução hidro-etanólica pH 2,0.

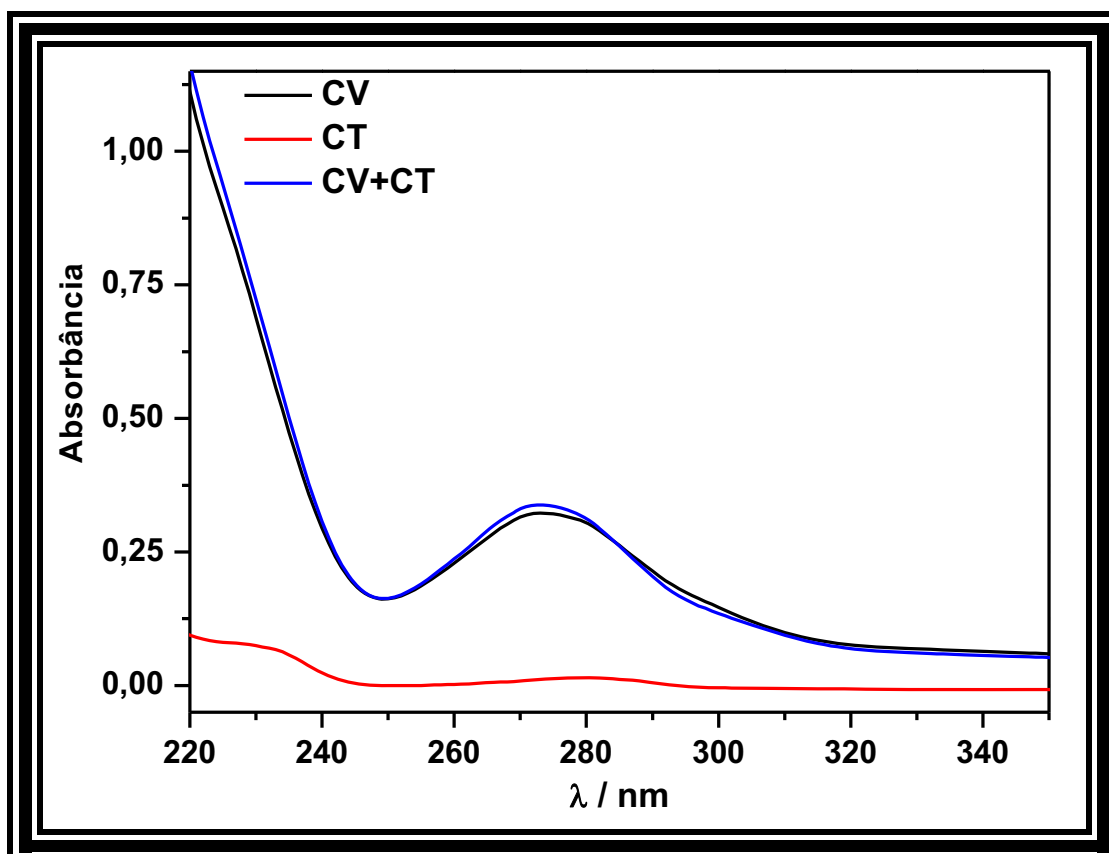


Figura 55 - Espectros de absorção de 10 μ L chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} de catequina em solução hidro-etanólica pH 2,0.

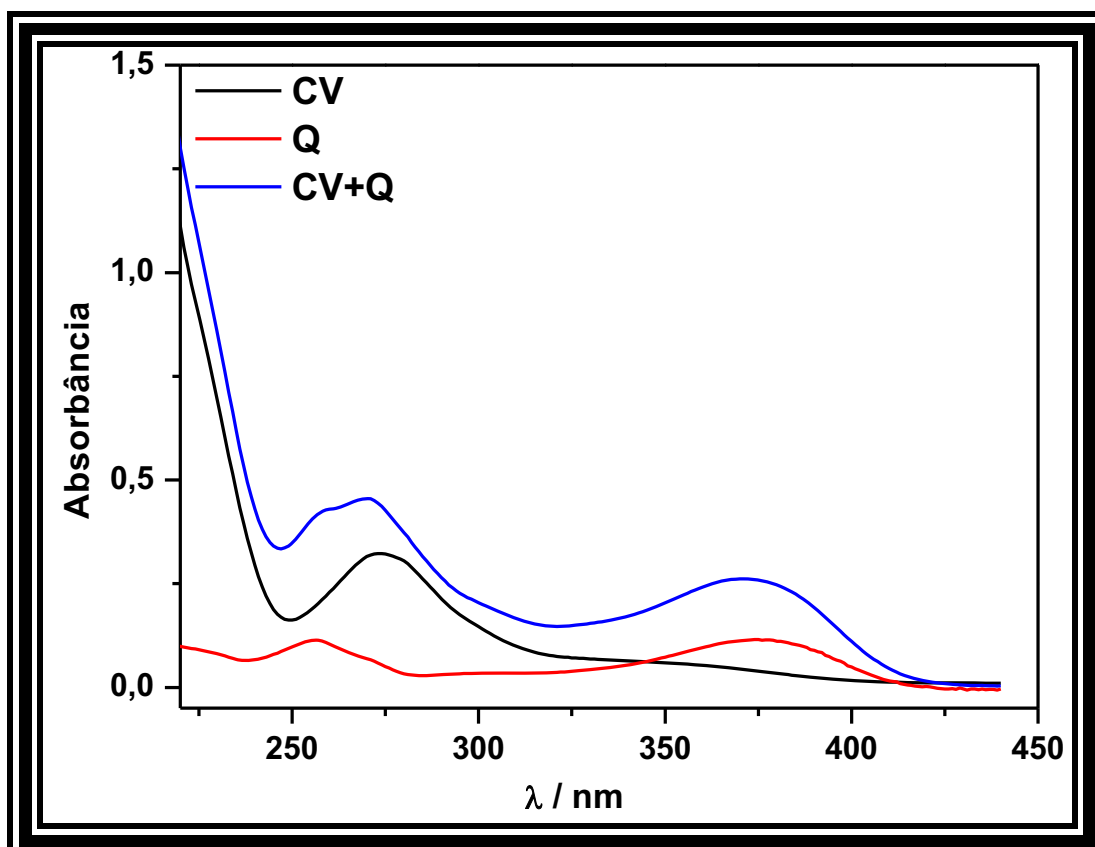


Figura 56 - Espectros de absorção de 10 μ L chá verde e adição de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} de quercetina em solução hidro-etanólica pH 2,0.

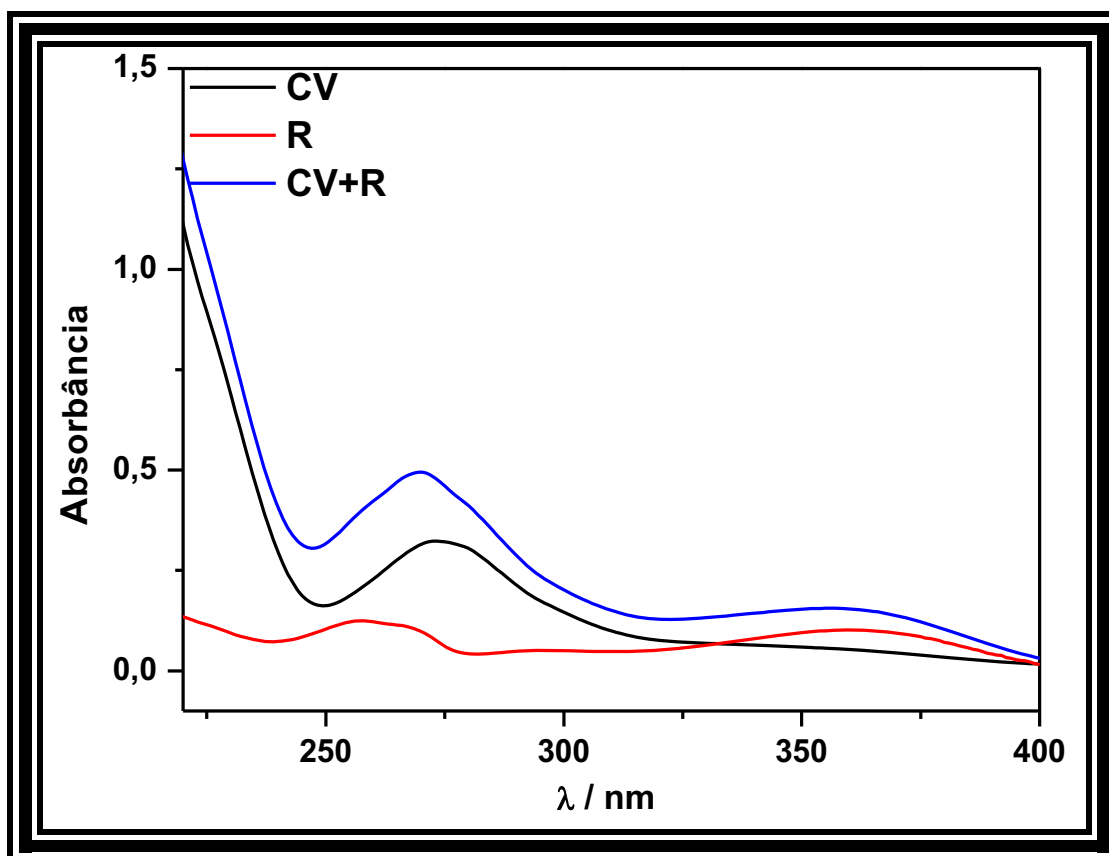


Figura 57 - Espectros de absorção de 10 μl chá verde adição de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução hidro-etanólica pH 2,0.

Os espectros para cada analito foram obtidos com bandas de absorção bem definidas: CV ($\lambda = 274 \text{ nm}$), AA ($\lambda = 244 \text{ nm}$), AC ($\lambda = 297 \text{ e } 328 \text{ nm}$), ACl ($\lambda = 246 \text{ e } 328 \text{ nm}$), AG ($\lambda = 274 \text{ nm}$), CT ($\lambda = 231 \text{ e } 280 \text{ nm}$), QT ($\lambda = 256 \text{ e } 375 \text{ nm}$) e R ($\lambda = 199, 258, 295 \text{ e } 361 \text{ nm}$). A análise dos espectros do chá verde, após as adições dos analitos, mostra que as bandas de absorção do chá verde nas regiões de 274 nm aumentam conforme a adição de AA, AG e CT, não sendo observada mais nenhuma banda adicional. Para a QT e R, ocorre o surgimento de uma terceira banda de absorção em $\lambda_{QT} = 360 \text{ nm}$ e $\lambda_R = 374 \text{ nm}$, respectivamente, evidenciando assim sua ocorrência no chá.

Nos espectros das adições de AC e ACl na presença de CV, observa-se um aumento na intensidade das bandas e o surgimento de uma terceira banda ao redor de 330 nm. Além disso, nota-se um aumento de intensidade e deslocamento da banda do chá em função das adições desses analitos, indicando uma possível interação com os compostos presentes no chá verde.

Portanto, as substâncias rutina, ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico e ácido ascórbico são interferentes, mostrando que o método proposto utilizando o eletrodo modificado por filme de PLL/PPO não exibe seletividade na

determinação de QT em solução de chá verde e poderia ser um método para avaliação de antioxidante total na amostra.

4.2.10 - Comparação do método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação da quercetina em chá verde

Os métodos analíticos empregados para a quantificação de flavonóides são bastante diversificados, embora os métodos cromatográficos, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tenha merecido destaque. Quanto à identificação dos compostos, é muito comum utilizar a detecção por arranjo de diodos (DAD) onde é possível registrar espectros de absorção na região do UV-vis concomitantemente ao tempo de retenção da amostra.

Nesta etapa do trabalho, foi realizado o estudo cromatográfico para alguns dos compostos antioxidantes usados como padrões neste estudo, tais como: AA, AC, ACL, AG, CT, QT e R. Neste estudo, utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector DAD visando separar e quantificar estes compostos bem como avaliar qualquer mudança no perfil cromatográfico em misturas contendo estes analitos. Para isto, utilizou-se procedimento adaptado de Spáčil *et. al* (2008). Um sistema de eluição gradiente possibilitou melhor resposta utilizando como fase móvel ácido fórmico/água 0,1% (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) nas seguintes proporções: 5-50% (v/v) (9 min), 50-70% (v/v) (15 min) 70-5% (v/v) (18 min). O fluxo foi de 1 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 20 µL. A identificação dos componentes foi realizada através dos tempos de retenção obtidos e espectros de UV-vis usados na identificação individual de cada padrão injetado.

A Figura 58 apresenta um cromatograma típico obtido para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em metanol, de ácido ascórbico (AA), ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACL), ácido gálico (AG), catequina (CT), rutina (R) e quercetina (QT), nas condições pré-otimizadas.

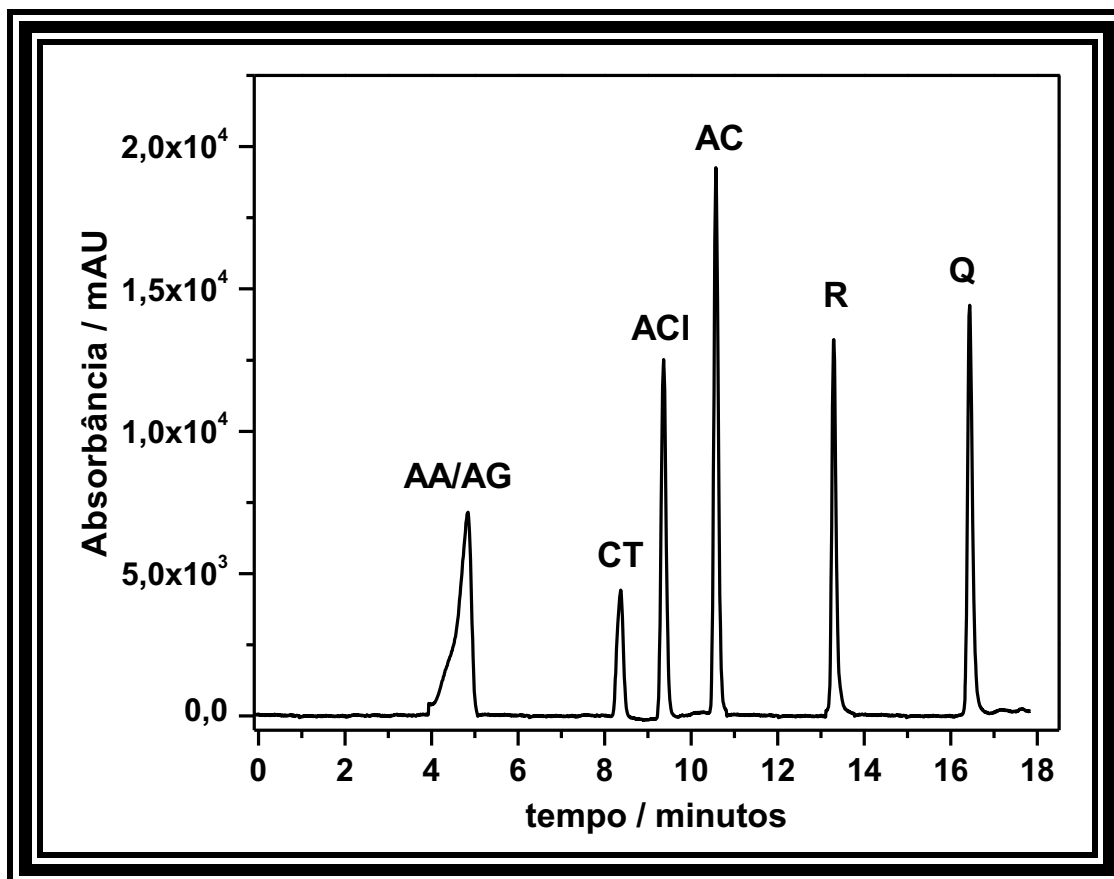


Figura 58 - Cromatograma correspondente à injeção de 20 μL do padrão de AA, AC, ACI, AG, CT, QT e R na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280\text{nm}$.

A Figura 58 apresenta 6 picos distintos em tempos de retenção de 5,0 minutos (AA/AG), 8,4 minutos (CT), 9,3 minutos (ACI), 10,6 minutos (AC), 13,3 minutos (RT) e a 16,05 minutos (QT). A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção e dos perfis dos espectros de absorção obtidos para os padrões isolados, apresentados na Figura 59 a 65. É possível observar uma boa separação para todos os compostos, com exceção de AA e AG que co-eluem em tempo muito próximos, não permitindo uma separação satisfatória, como pode ser verificado nos respectivos cromatogramas e espectros de cada padrão individual obtido para amostras de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol.

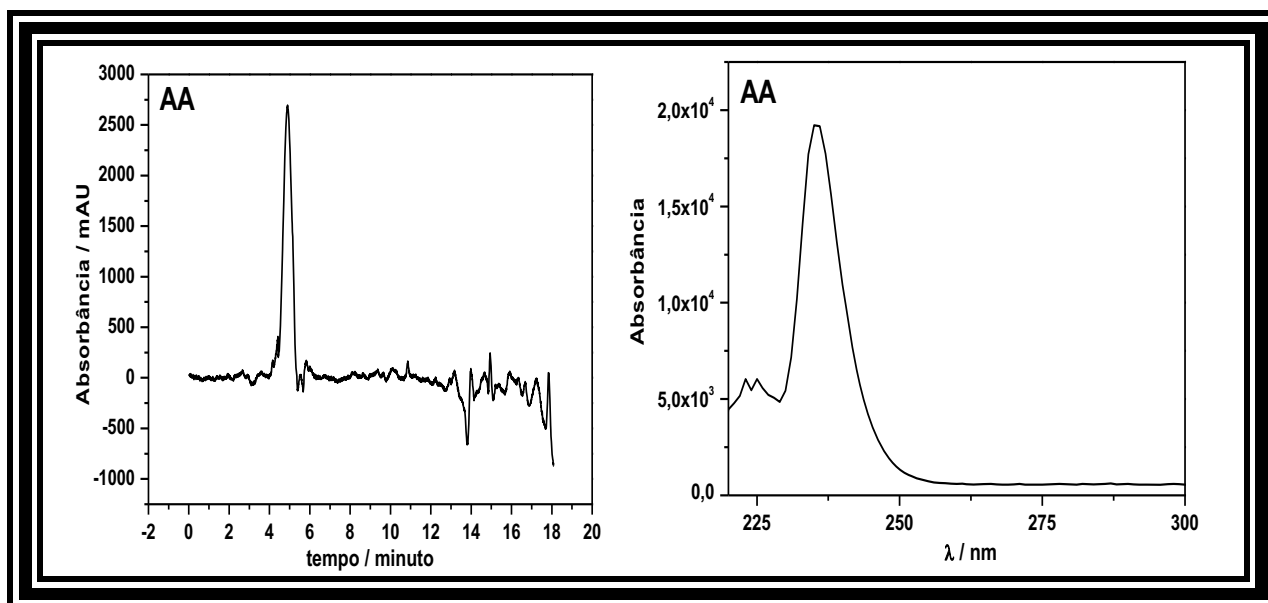


Figura 59 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de AA na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. $\lambda_{inicial}$ = 190 nm e λ_{final} = 800 nm.

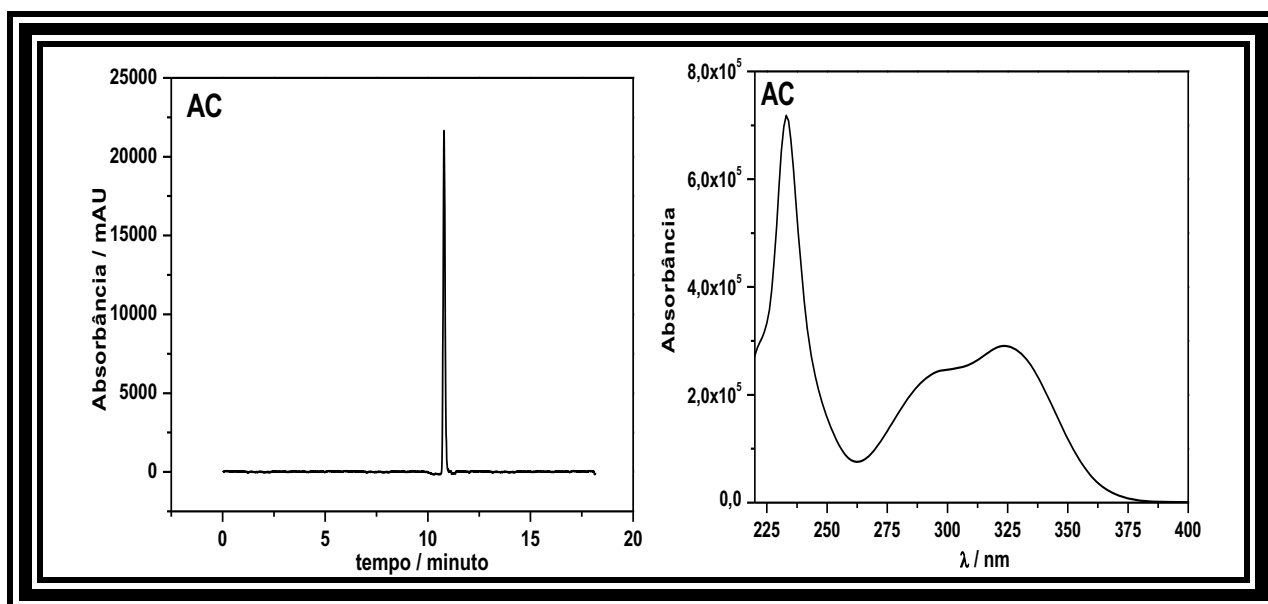


Figura 60 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de AC na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C, λ = 280nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. $\lambda_{inicial}$ = 190nm e λ_{final} = 800 nm.

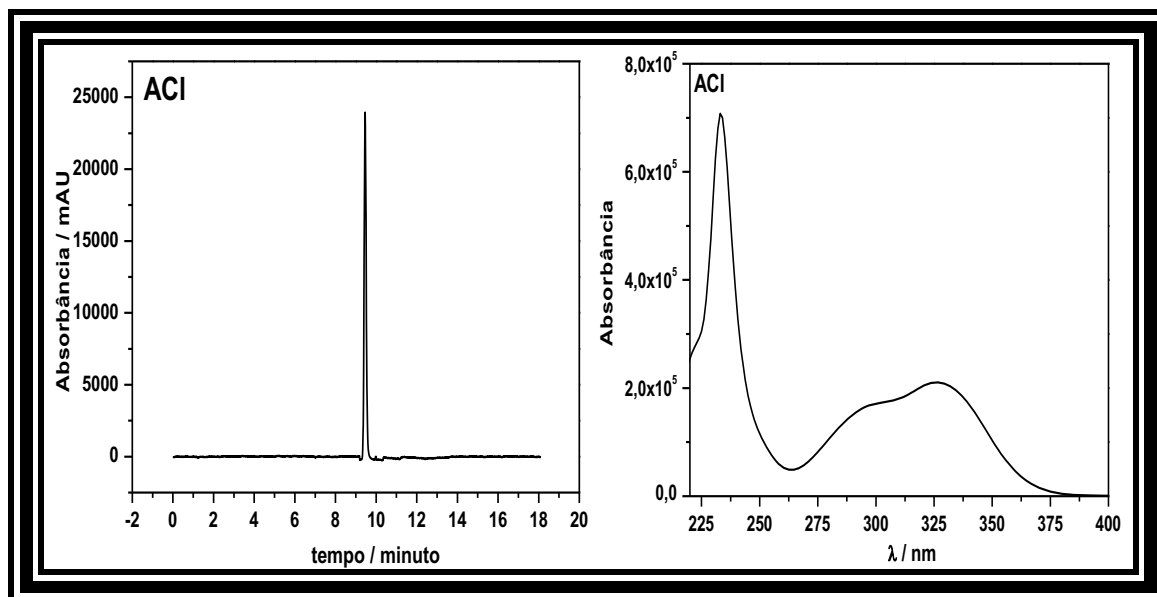


Figura 61 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de ACI na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min $^{-1}$, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190 nm e λ_{final} = 800 nm.

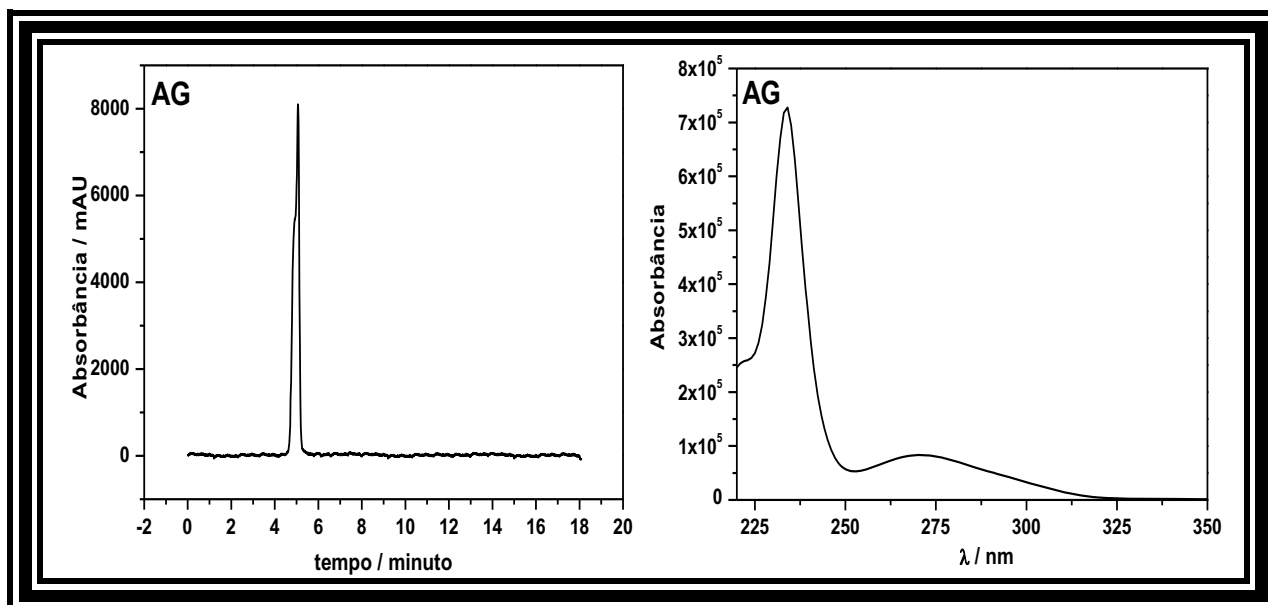


Figura 62 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de AG na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min $^{-1}$, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190nm e λ_{final} = 800 nm.

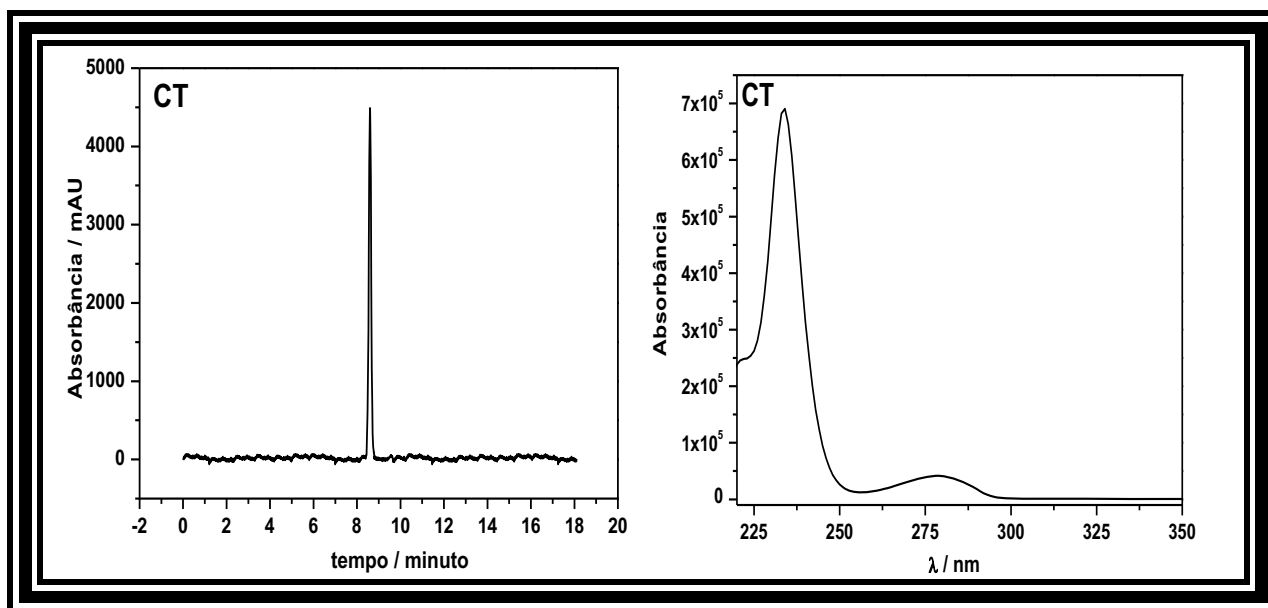


Figura 63 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de CT na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min $^{-1}$, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190nm e λ_{final} = 800 nm.

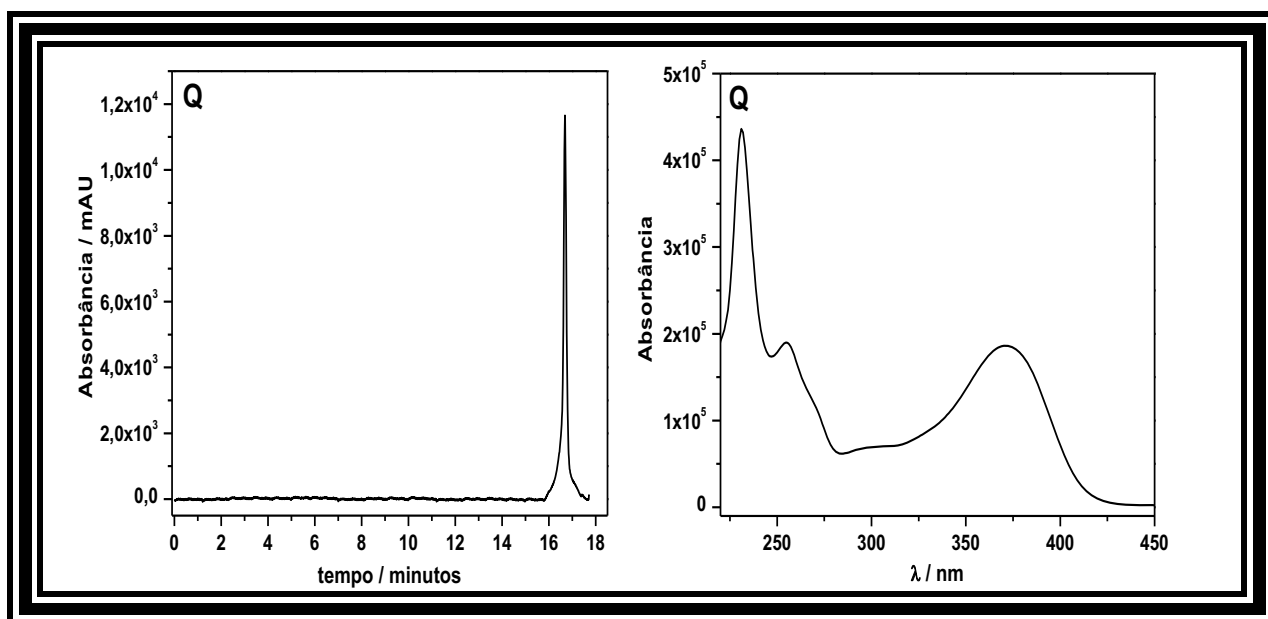


Figura 64 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de QT na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min $^{-1}$, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190nm e λ_{final} = 800 nm.

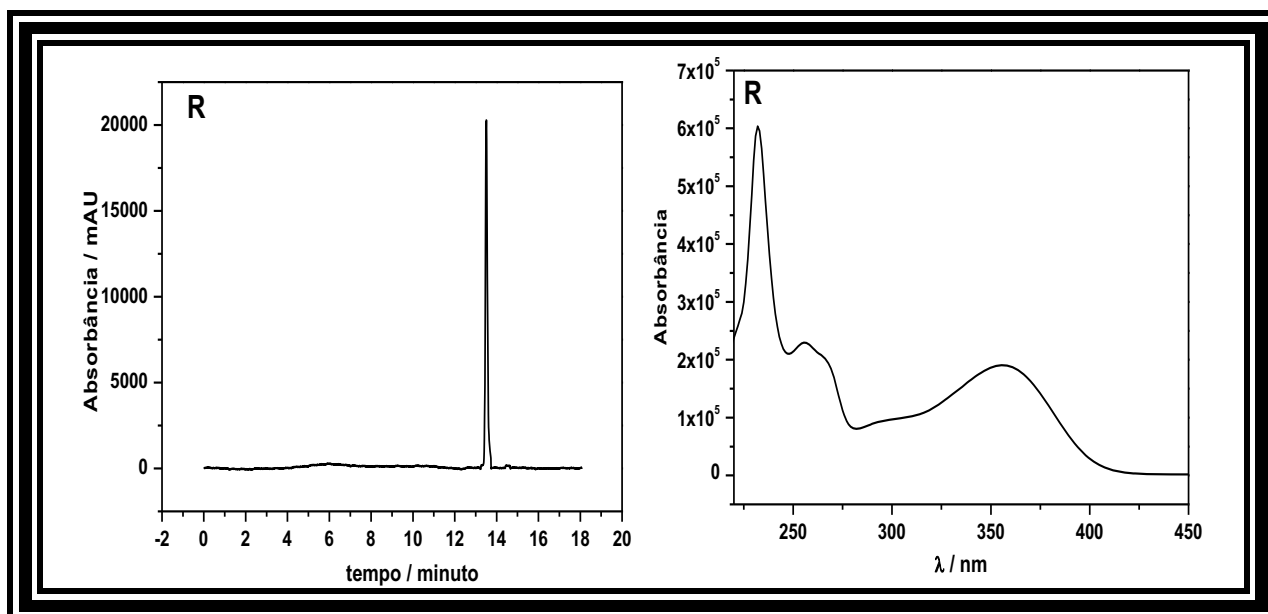


Figura 65 - (A) Cromatograma correspondente à injeção de 20 μ L do padrão de R na concentração a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ solubilizada em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min $^{-1}$, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280nm. (B) Espectro de absorvância na região de UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para cada analito. λ_{inicial} = 190nm e λ_{final} = 800 nm.

O espectro UV-vis registrado para o Ácido ascórbico, correspondente ao tempo de retenção do padrão como mostra a Figura 59, exibe um máximo de absorvância em comprimento de onda de 236 nm. Para o ácido caféico (Figura 60), assim como o ácido clorogênico (Figura 61), há a presença de três picos de absorção máxima (λ = 236, 293 e 326 nm para AC e λ = 232, 295 e 326 nm para ACI), respectivamente.

A Figura 62, também, apresenta o tempo de retenção do ácido gálico no qual exibe dois picos de absorvância máxima em comprimentos de ondas de (λ =234 e 273nm) próximos aos valores apresentados para as absorvâncias de catequina (λ = 234 e 277nm) observados na Figura 63. O cromatograma e o espectro correspondente ao tempo de retenção do padrão de QT são mostrados na Figura 64, exibindo máximos de absorvância em comprimentos de ondas de 230, 260, 300 e 370 nm, o que coincide com o descrito por Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006. Os espectros de UV-vis correspondente a rutina (Figura 65) exibem máximos de absorvância em comprimentos de ondas de 234, 255, 300 e 356 nm, o que coincide com o descrito por Malagutti *et al.* (2006).

4.2.11 - Avaliação do método proposto para determinação de quercetina e amostras de chá verde com CLAE/DAD

A determinação de QT em chá verde foi efetuada usando o método de CLAE/DAD com o intuito de testar a eficiência da metodologia proposta desenvolvida para este fim usando eletrodo modificado por PLL/PPO.

Para isto, construiu-se uma curva analítica para QT em concentrações entre $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em metanol, usando a respectiva área dos picos. Os respectivos cromatogramas são apresentados na Figura 66, e a curva analítica correspondente exibida na Figura 67.

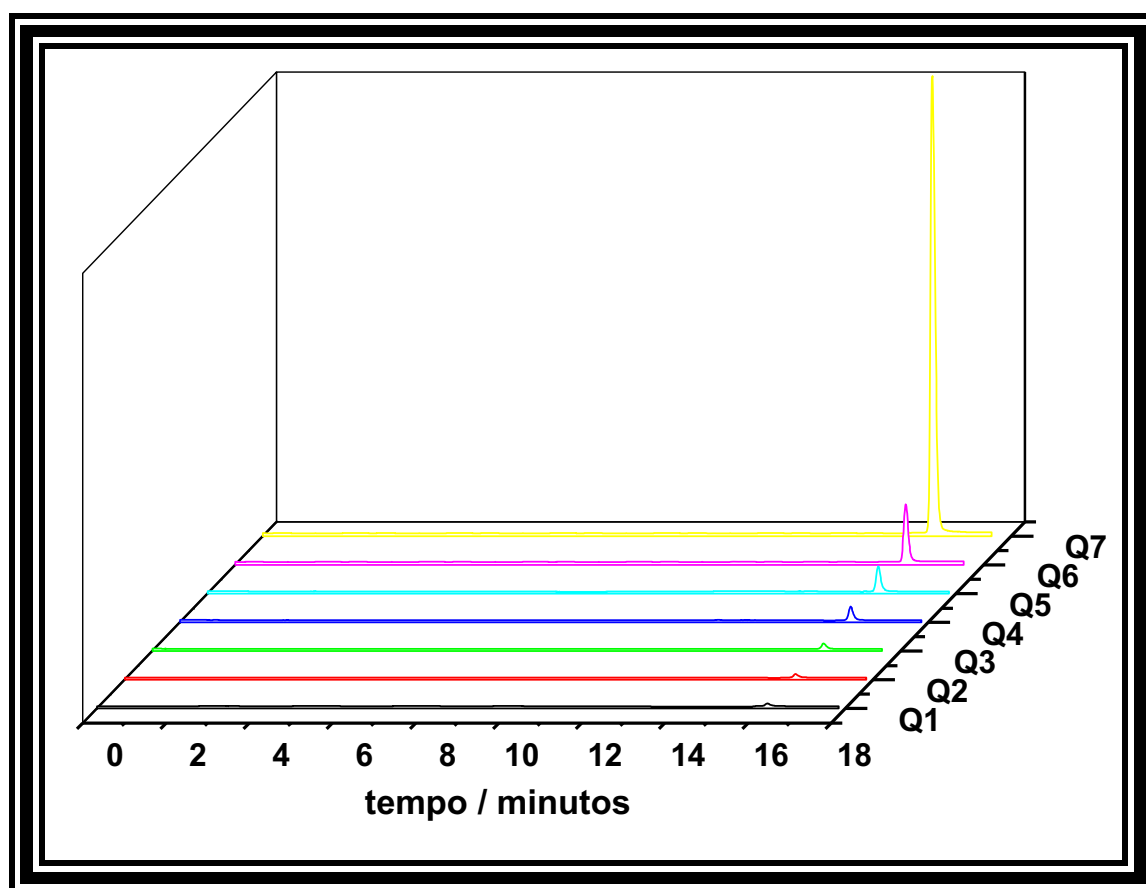


Figura 66 - Cromatogramas CLAE/DAD correspondentes à injeção de 20 μ L do padrão de quercetina nas concentrações de 1) QT₁ = $1,0 \times 10^{-6}$, 2) QT₂ = $5,0 \times 10^{-6}$, 3) QT₃ = $1,0 \times 10^{-5}$, 4) QT₄ = $5,0 \times 10^{-5}$, 5) QT₅ = $1,0 \times 10^{-4}$, 6) QT₆ = $5,0 \times 10^{-4}$ e 7) QT₇ = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm.

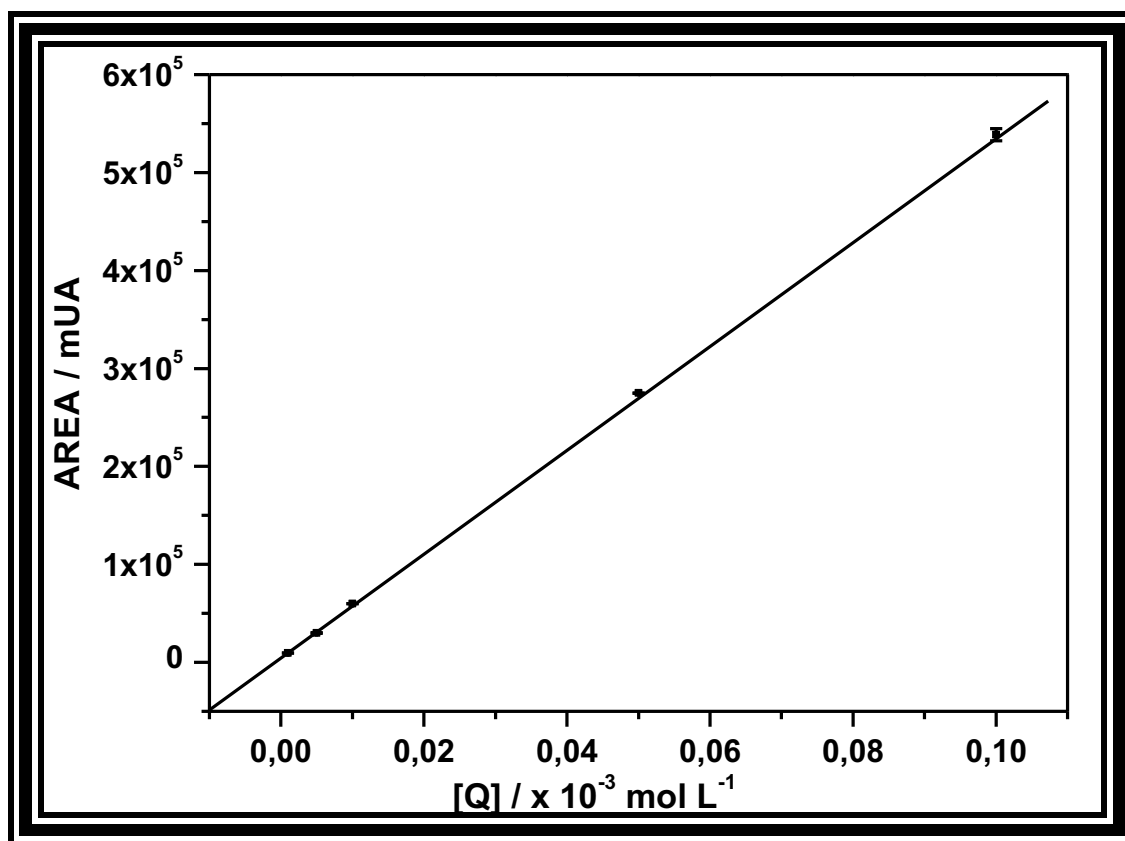


Figura 67 - Curva analítica obtida no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de QT em metanol. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna = 40°C, λ = 280 nm.

A relação entre área de pico e concentração de QT em metanol é linear no intervalo de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, cuja respectiva curva analítica é $\text{Área} = 50032 + 4,84 \times 10^9 \cdot \text{QT}$ ($r = 0,9996$). O limite de detecção ($3 \times SD / b$) e limite de quantificação ($10 \times SD / b$) foi calculado e os respectivos valores encontrados foram $3,9 \pm 0,32 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $1,3 \pm 0,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. Estes resultados indicam que a QT pode ser determinada usando os métodos cromatográficos CLAE/DAD em ampla faixa de concentração e a baixos níveis.

A seguir, registraram-se os cromatogramas para extratos da amostra de chá verde da marca Mate Leão em metanol, preparado conforme a parte experimental, visando identificar e quantificar a QT em sua composição. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 68 e a curva do método de adição de padrão é mostrada na Figura 69.

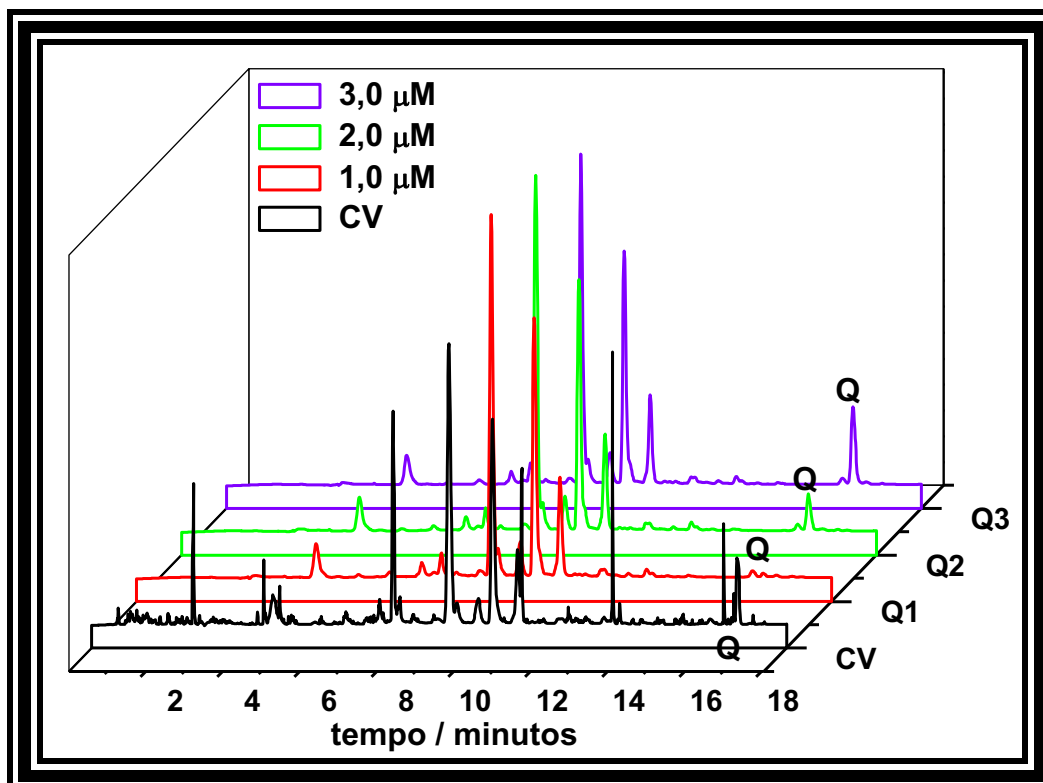


Figura 68 - Cromatogramas CLAE/DAD correspondentes à injeção de 20 μL da solução de chá verde em metanol e respectivas adições do padrão de QT na concentração de: 1) $QT_1 = 1,0 \times 10^{-6}$, 2) $QT_2 = 2,0 \times 10^{-6}$ e 3) $QT_3 = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$.

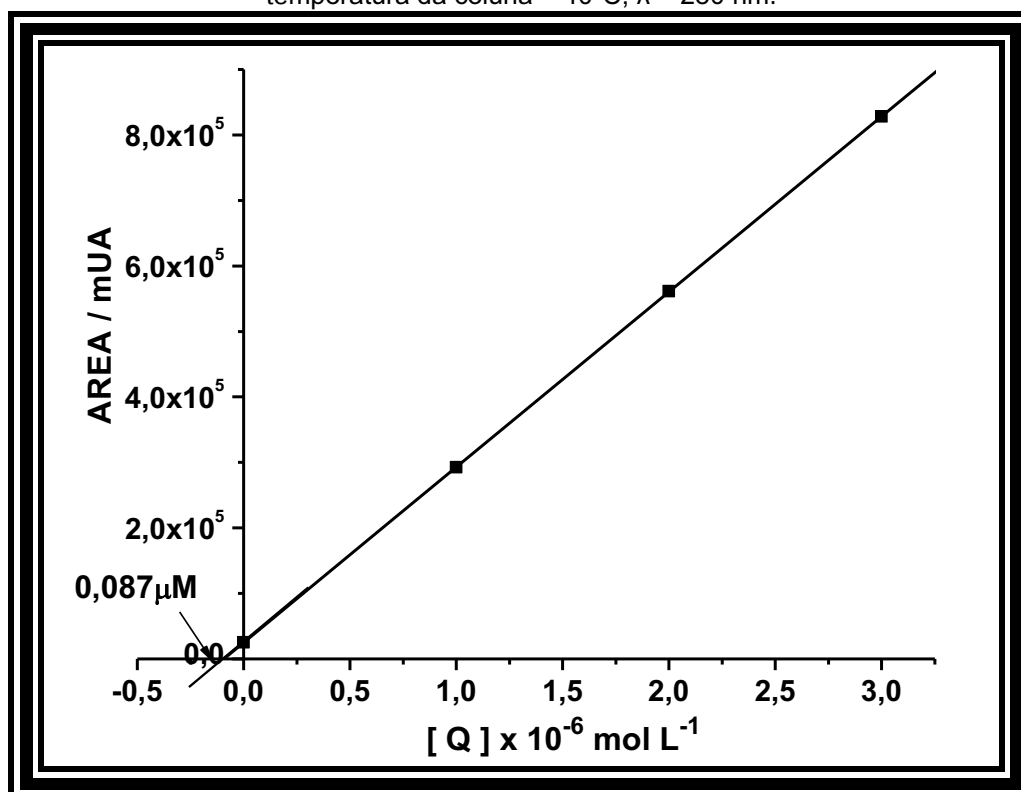


Figura 69 - Gráfico da Área vs. Concentração de padrão adicionado em chá verde nas concentrações de: 1) $QT_1 = 1,0 \times 10^{-6}$, 2) $QT_2 = 2,0 \times 10^{-6}$ e 3) $QT_3 = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.). Fluxo 1 mL min^{-1} , temperatura da coluna = 40°C , $\lambda = 280 \text{ nm}$.

O perfil cromatográfico obtidos para amostras da solução de chá verde em metanol por CLAE/DAD mostra uma amostra de grande complexidade com vários picos em diferentes tempos de retenção (Figura 69). No entanto, é possível observar um pico bem definido conforme identificado na Figura 70 em tempo de retenção de 16,05 minutos, o qual foi confirmado pelo espectro UV-vis registrado neste tempo de retenção e comparado ao do flavonóide.

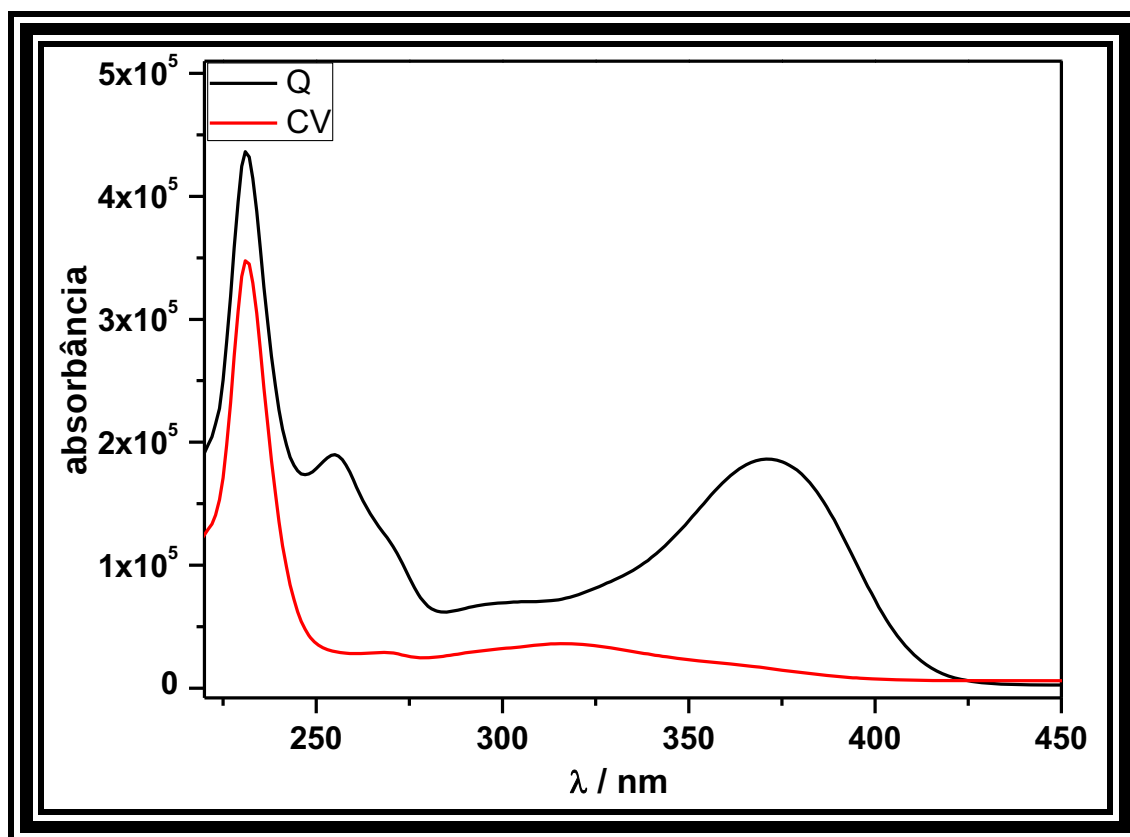


Figura 70 - Sobreposição de espectros de absorção na região o UV-vis obtidos por detecção de arranjo de diodos para a amostra de chá verde e do padrão QT na concentração $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Fase móvel: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) metanol com rampa de 5-50% de B (9 min.), 50-70% B (15 min.) 70-5% B (18 min.), fluxo 1 mL min^{-1} .

A Tabela 3 compara os respectivos valores de QT na amostra de chá verde obtidos segundo o método de eletrodo modificado por filme de PLL/PPO e o método cromatográfico CLAE/DAD.

Tabela 3- Determinação de quercetina em chá verde empregando o método proposto usando eletrodo modificado por PLL/PPO e CLAE/DAD.

Método	QT / mol L^{-1}	Q / mg / g
CLAE	$8,7 \pm 0,90 \times 10^{-8}$	$7,36 \pm 0,76$
PLL/PPO	$7,8 \pm 0,95 \times 10^{-8}$	$6,60 \pm 0,8$

n = 3, nível de confiança de 95%

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t-Student. Como o t_{exp} obtido é menor do que o $t_{\text{calculado}}$ pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de QT pelo método proposto e por CLAE não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

Os resultados obtidos indicam que o método proposto para determinação de QT em chá verde utilizando eletrodo modificado PLL/PPO é adequado, visto que a concentração encontrada foi de $7,8 \pm 0,95 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e a obtida pelo método CLAE/DAD foi $8,7 \pm 0,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (concordantes com a literatura MATSUBARA E AMAYA, 2006), mostrando, assim, que o método proposto pode ser empregado para análise de antioxidantes, usando como molécula modelo a quercetina.

4.3 - Oxidação voltamétrica de catequina

A Figura 71 mostra a oxidação voltamétrica de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de catequina (CT) sobre eletrodo de carbono em solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0.

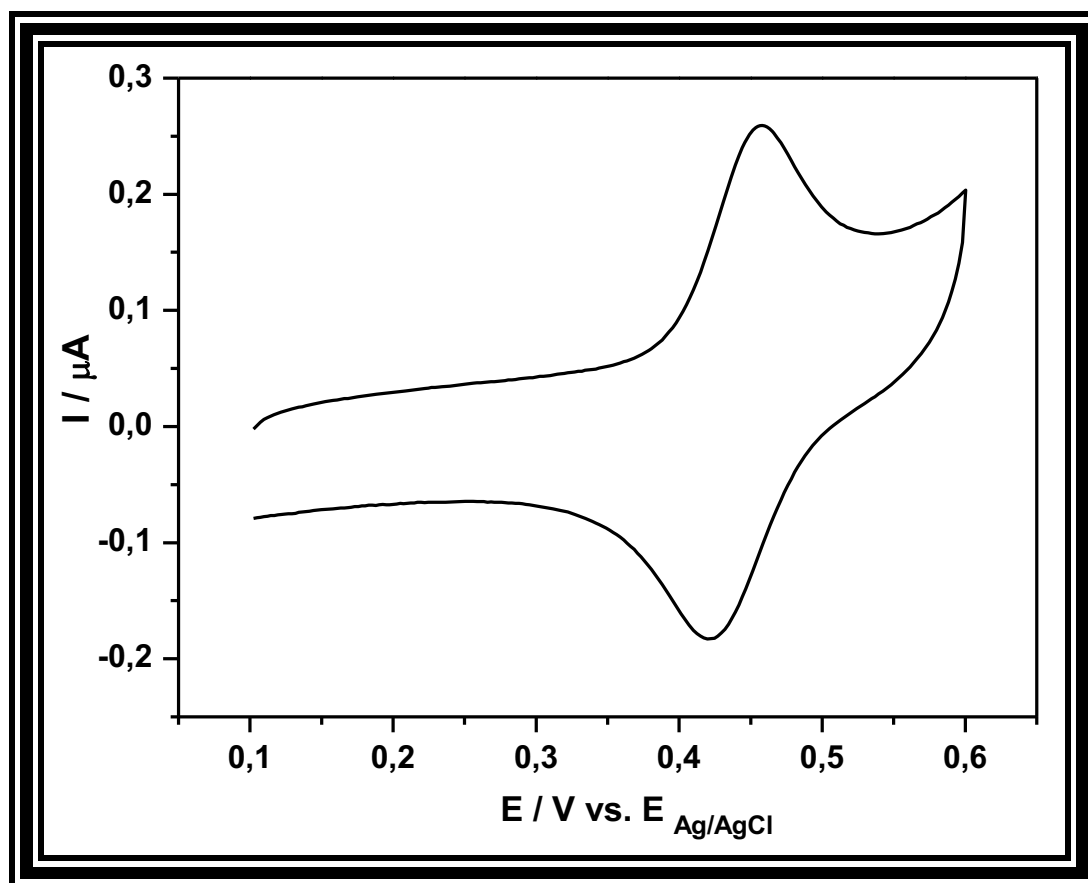
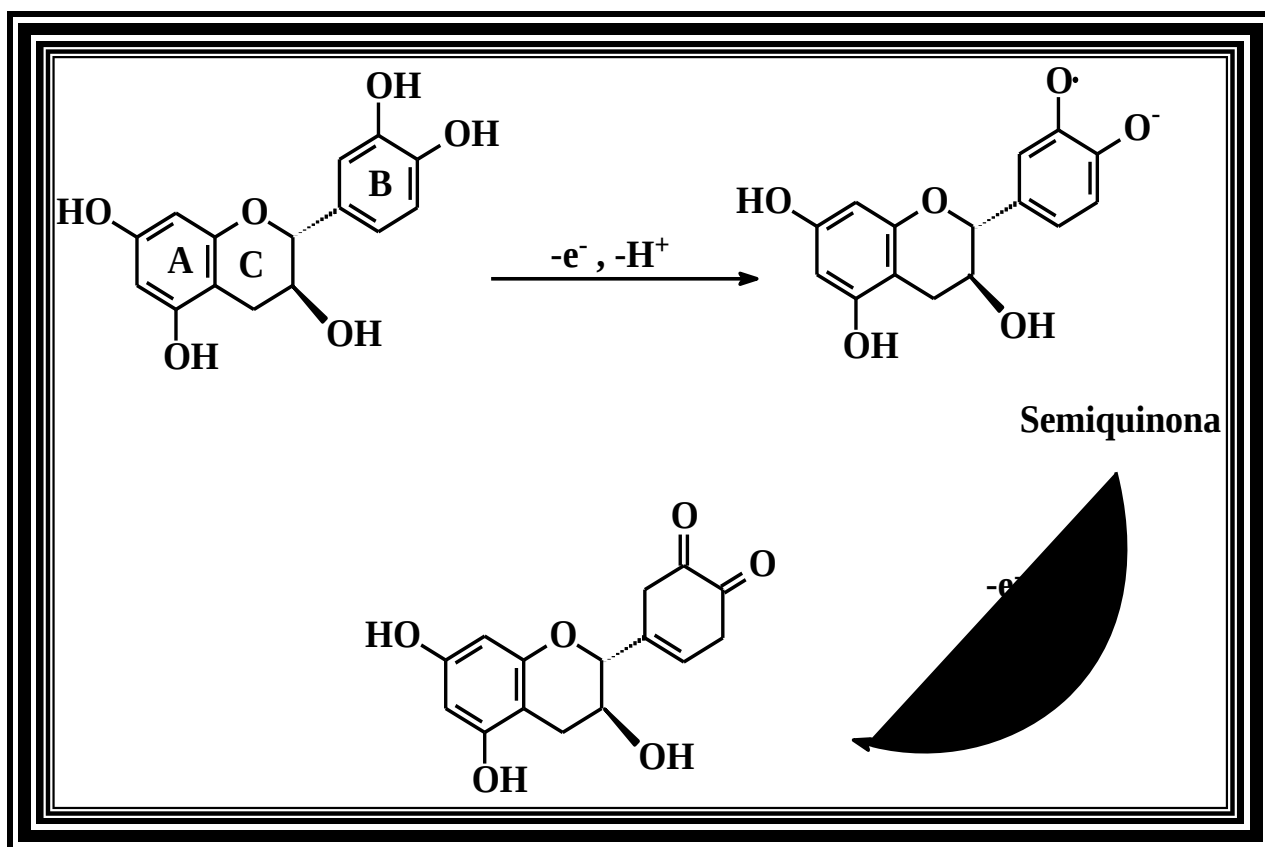


Figura 71 - Voltamograma cíclico correspondente à oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R (pH 4,0) sobre eletrodo de carbono vítreo. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$

A primeira etapa de oxidação (Figura 71) mostra um pico anódico bem definido em $E_{pa} = +0,46 \text{ V}$ e um pico catódico na varredura reversa em $E_{pc} = +0,42 \text{ V}$ separados por $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0,04 \text{ V}$. Os valores de i_{pa}/i_{pc} é igual a 1 (50 mVs^{-1}) sugerindo características de processo eletródico reversível envolvendo 2 elétrons (BARD, 2001). De acordo com a literatura (JANEIRO e BRETT, 2004), este pico corresponde à oxidação do grupo catecol, 3,4-dihidroxila do anel B como mostra o Esquema 3.



Esquema 3 - Esquema de oxidação da catequina (Janeiro e Brett, 2004)

4.3.1 - Oxidação voltamétrica de CT sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de PLL/PPO.

Os eletrodos de carbono vítreo, recobertos por deposição de 0,5 μL de PPO, preparados conforme a procedimento experimental, apresentou a formação de uma fina camada na superfície do eletrodo, visível a olho nu. Após a adição de uma alíquota de 10 μL de PLL sobre esse filme, evaporou-se o solvente em estufa a 80°C por 10 minutos. Após esse tempo, o eletrodo modificado foi lavado com água milli- Q. O eletrodo modificado foi transferido para uma célula eletroquímica contendo $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de catequina em tampão B-R pH 4,0. A incorporação de CT nos filmes de PLL/PPO foi monitorada por imersão durante o período de 10 minutos, sob agitação constante. Completado esse período, o eletrodo foi lavado com água destilada e transferido para uma solução de eletrólito de suporte com valores de pH 4,0 e submetido à varredura de potencial.

Na Figura 72, podemos observar a oxidação voltamétrica de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ da catequina em pH 4,0 sobre eletrodo de carbono vítreo antes (curva A) e após a modificação do eletrodo com filme de PLL/PPO.

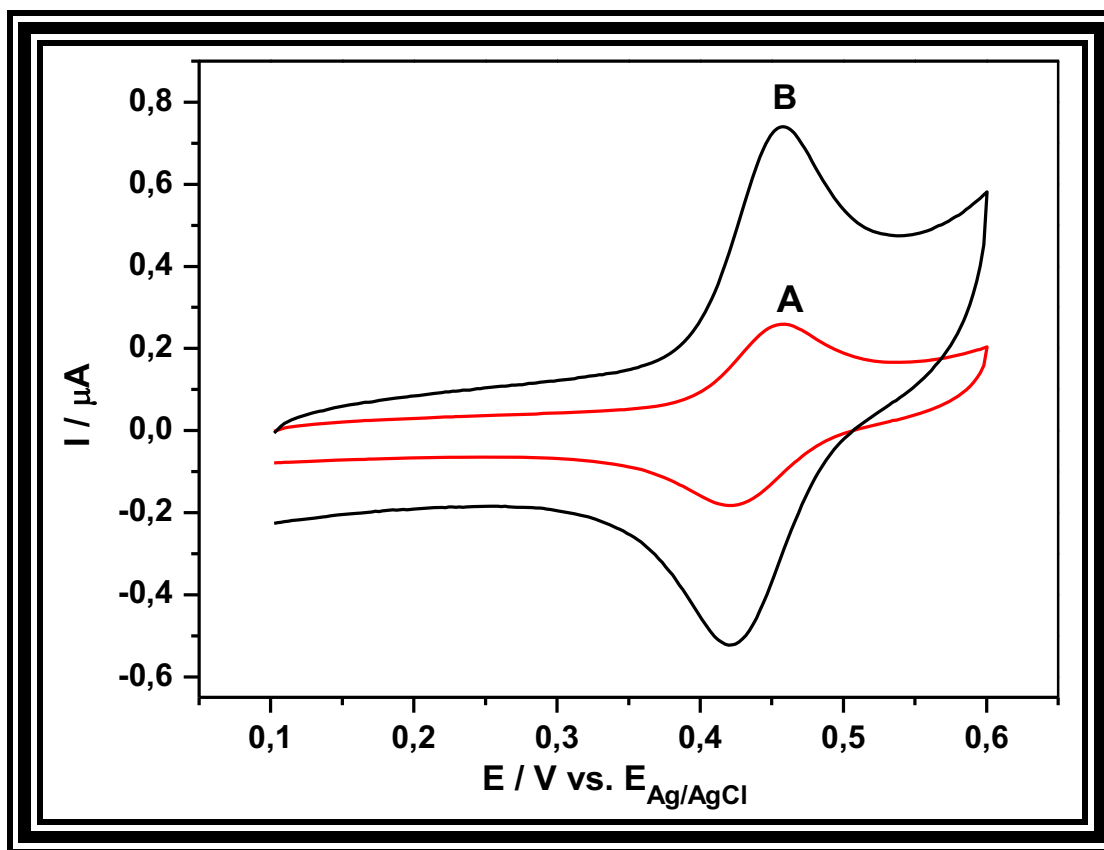


Figura 72 - Voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em B-R 4,0. Curvas: (a) ECV e (b) recoberto por filme de PLL/PPO. $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

A análise da Figura 72 (curva B) mostra que CT é incorporada ao filme de PLL/PPO e a onda voltamétrica apresenta características semelhantes às aquelas observadas em eletrodo sem modificação (curva A). Valores encontrados para ΔE (0,04 mV) e I_{pa}/I_{pc} (1,0) obtidos indicam que o processo eletródico é reversível (BARD, 2001) e concordante com aqueles obtidos sobre eletrodo de carbono vítreo (JANEIRO e BRETT, 2004, KILMARTIN, 2001). Há um significativo aumento na intensidade de corrente obtido no eletrodo modificado por PLL/PPO, mostrando que provavelmente o poli-aminoácido pode estar pré-concentrando o flavonóide sobre a superfície do eletrodo ou o processo eletródico está sendo favorecido na presença do filme.

4.3.2 - Tempo de pré – concentração da catequina sobre eletrodo modificado com filme de PLL/PPO

O efeito do tempo de pré-concentração do filme de PLL/PPO foi avaliado utilizando-se eletrodo recoberto por filme de PLL/PPO, submetido à imersão em

célula eletroquímica contendo $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em intervalos de tempo de 0 a 15 minutos de incorporação. A Figura 73 mostra os voltamogramas registrados.

A análise da Figura 73 mostra que ambas as correntes de pico anódica e catódica de CT aumentam com o tempo de acúmulo no intervalo estudado, sugerindo que filmes de PLL/PPO podem ser uma excelente alternativa para pré-concentração desse antioxidante. A seguir os respectivos valores de corrente de pico anódica foram colocados em gráfico em função do tempo de acúmulo é ilustrado na Figura 74. Relações lineares de corrente pico vs. tempo de acúmulo foram obtidas no intervalo de 0 a 10 minutos, dado pela equação: $i_{pa} (\mu\text{A}) = 0,05 + 0,05t (\text{min})$, com o coeficiente de correlação (R) de 0,989.

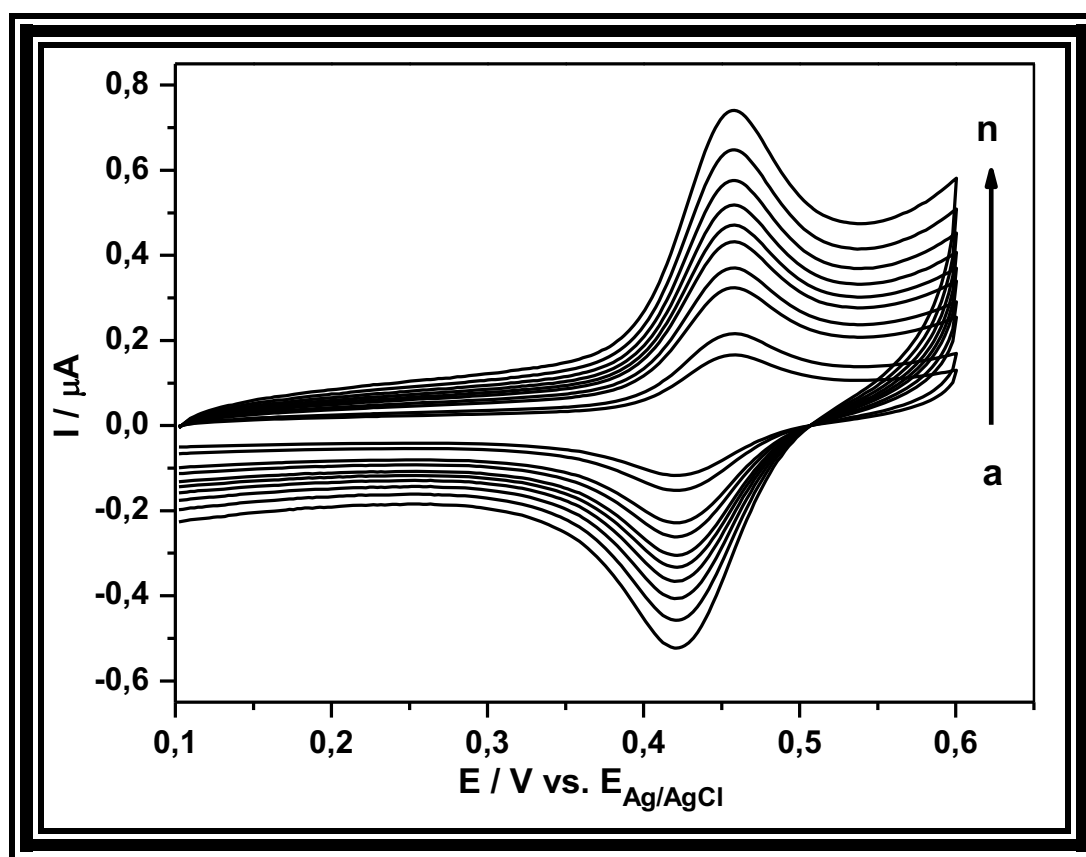


Figura 73 - Efeito do tempo de acúmulo sobre voltamogramas cíclicos correspondentes à oxidação $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em pH 4,0 sobre eletrodo modificado por filme de PLL/PPO.

A análise dos dados mostra que a CT é incorporada no filme polimérico no intervalo de 0 a 10 minutos e o comportamento oxidativo ocorre de forma semelhante àquele obtido sobre eletrodo de carbono vítreo. A corrente de pico obtida para o eletrodo modificado é duplicada em relação ao eletrodo sem

modificador. Tempo de acúmulo de 10 minutos foi adotado nas medidas posteriores como o tempo ótimo para pré-concentração do flavonóide.

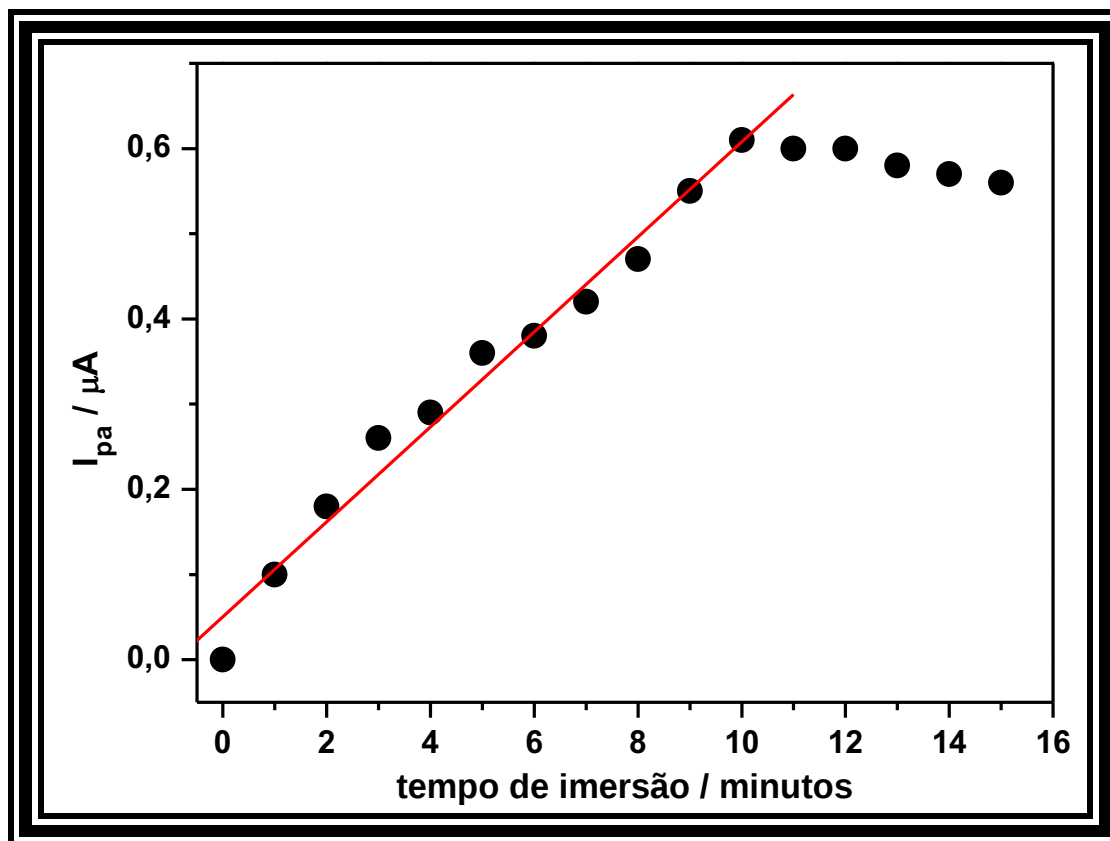


Figura 74 - Influência do tempo de imersão do eletrodo modificado com PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R pH 4,0.

A capacidade de retenção da CT nos filmes de PLL/PPO sobre eletrodo de carbono vítreo foi avaliada testando-se vários voltamogramas cíclicos, registrados sucessivamente para o mesmo filme previamente carregado com CT através de acúmulo de 10 minutos e transferidos para solução tampão B-R (pH 4,0). Os valores de corrente de pico mostraram-se praticamente constante, conforme apresentado na Figura 75. Os respectivos valores de corrente de pico anódica foram colocados em gráficos vs. número de ciclos (Figura 76) e é possível observar que o sinal voltamétrico apresenta apenas um desvio padrão relativo de 4,5% entre as medidas. Indicando que o filme retém a CT no filme de forma reversível e poderia ser uma excelente ferramenta analítica para análise desse flavonol em amostras complexas.

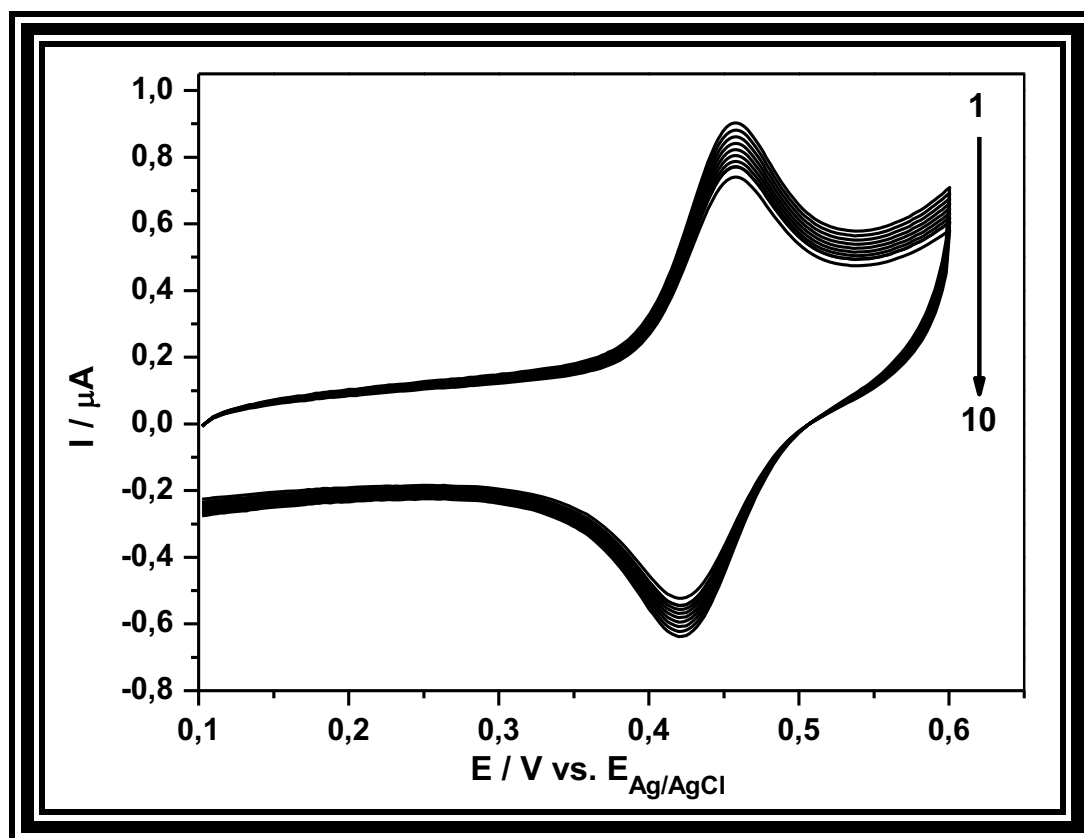


Figura 75 - Voltamogramas cíclicos com varreduras sucessivos de potencial, (10 ciclos) realizados para eletrodo modificado PLL/PPO carregados com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em tampão B-R pH 4,0. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

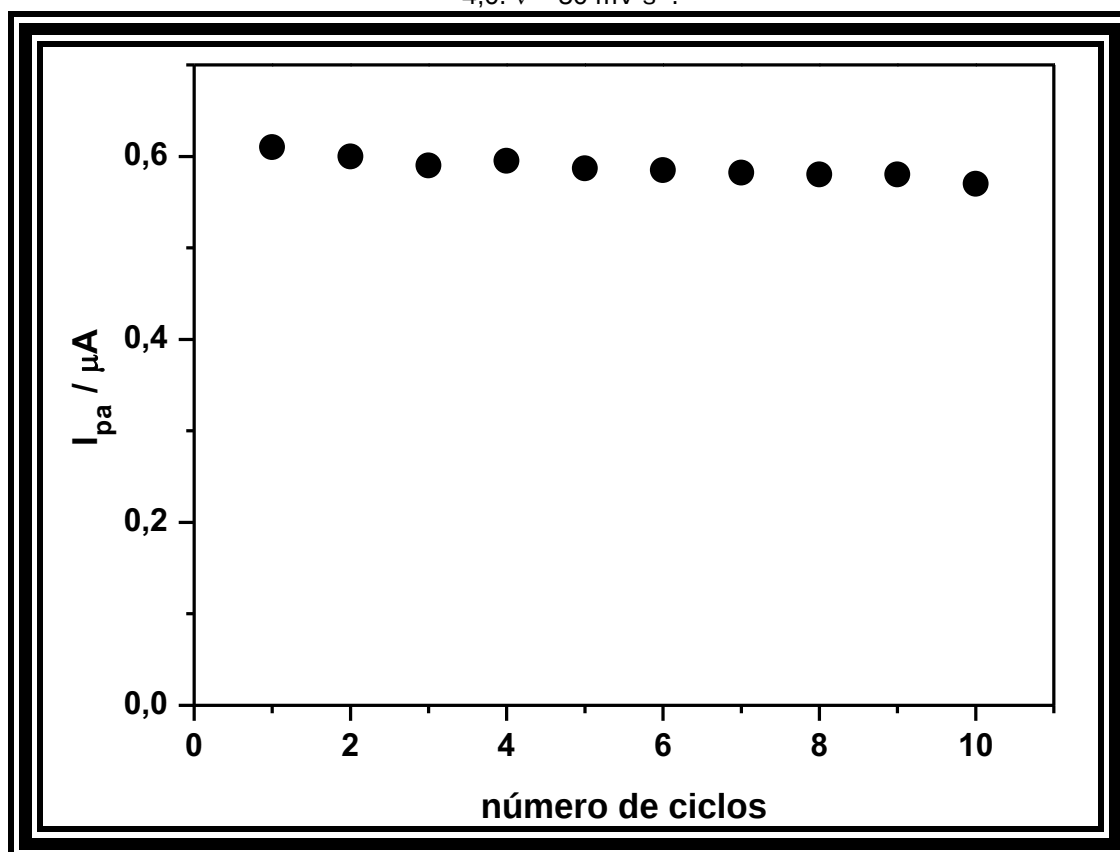


Figura 76 - Efeito da variação do número de ciclos vs. I_{pa} para o eletrodo modificado por filmes de PLL/PPO carregado com $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em solução tampão B-R pH 4,0.

4.3.3 - Efeito do pH sobre os parâmetros voltamétricos

O efeito do pH sobre o potencial de pico e corrente de pico obtidos dos voltamogramas cíclicos registrados para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em tampão B-R intervalo de pH 2,0 - 10,0 sobre eletrodos de carbono vítreo antes (curva A) e depois do recobrimento com filmes de PLL (curva B) são mostrados na Figura 77 e 78, respectivamente.

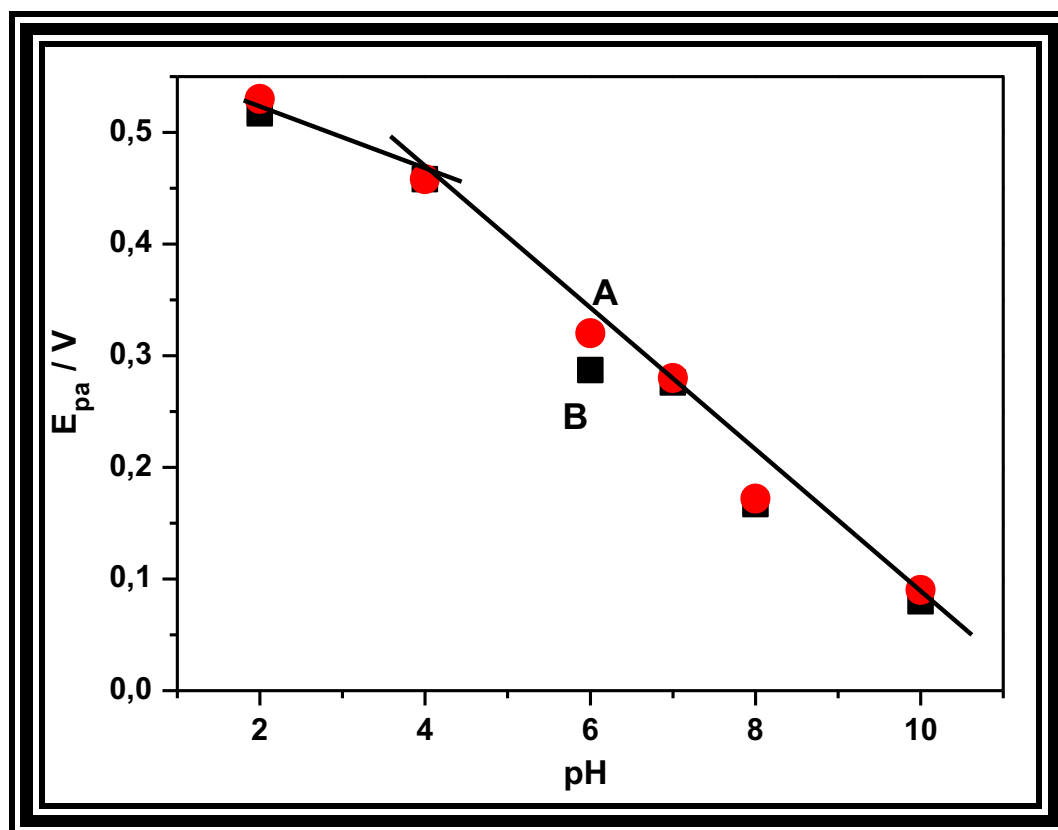


Figura 77 - Efeito do pH sobre potencial de oxidação de CT $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodo (A) modificado com filme de PLL/PPO. (B) ECV. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

A Figura 77 mostra que os valores de E_{pa} obtidos dos voltamogramas cíclicos correspondentes a oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT sobre filmes de PLL/PPO (curva A) deslocam-se para valores menos positivos de potencial no intervalo de $2,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$. O mesmo comportamento foi observado sobre o eletrodo não modificado (curva B). A relação entre E_{pa} vs. pH segue uma relação linear nesse intervalo segundo as equações:

$$E_{pa} \text{ (V)} = 0,664 + (-0,0570) \text{ pH} \quad (\text{curva A}) \quad (\text{eq. 1})$$

$$E_{pa} \text{ (V)} = 0,652 + (-0,0575) \text{ pH} \quad (\text{curva B}) \quad (\text{eq. 2})$$

A relação linear entre E_{pa} vs. pH, com inclinação de 57 mV por unidade de pH, tanto para eletrodo de carbono vítreo como para eletrodo recoberto com filme de PLL/PPO, sugere que o processo eletródico envolve participação de prótons (BARD, 2001). No entanto, em valores de $pH \geq 10,0$, não se observa a oxidação da catequina, provavelmente devido à desprotonação do grupo fenólico da CT e subsequente repulsão do filme que também está carregado negativamente. O comportamento de oxidação semelhante em ambos os eletrodos indica que filmes de PLL/PPO não promove alteração do mecanismo eletródico.

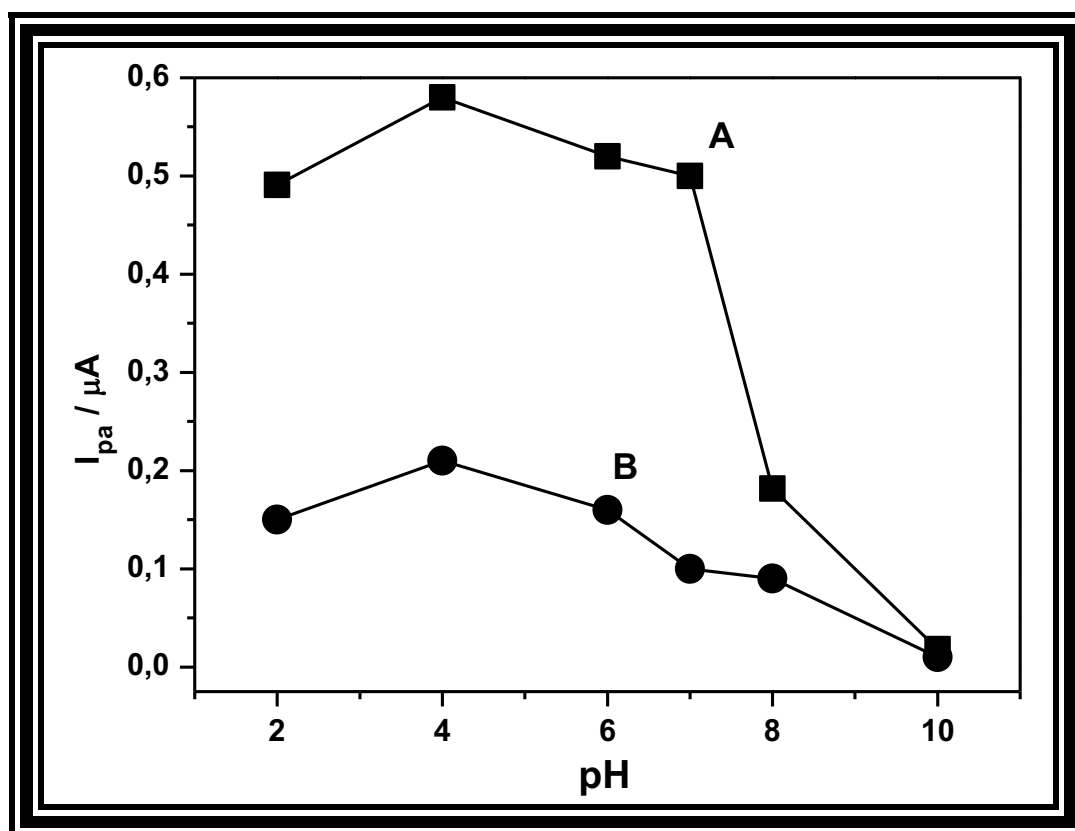


Figura 78 - Efeito do pH na corrente de pico para solução $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT obtida para (A) eletrodo modificado com filme de PLL/PPO. (B) ECV. $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

A análise da corrente de pico anódica vs. pH é mostrado na Figura 78 onde máximos valores de corrente são obtidos em $pH < 7,0$ para o eletrodo modificado. Em meio alcalino a corrente diminui acentuadamente, indicando que há interação entre o filme protonado ($pK_{a_{PLL}} = 10,7$ (ANSON, 1983) e a catequina, que apresenta-se desprotonada em pH neutro e alcalino. No eletrodo convencional e modificado a corrente máxima ocorre em pH ao redor de 4,0.

Deste modo, analisando-se estes resultados, pode-se concluir que o potencial e a corrente de pico apresentam comportamentos semelhantes sobre o

eletrodo de carbono vítreo convencional e no modificado por filmes de PLL/PPO, embora haja um significativo aumento da corrente de pico. Estes resultados sugerem que o marcante aumento da corrente de pico pode ser devido à interação entre grupos fenólicos do antioxidante e os grupos amino do poliaminoácido e não puramente eletrostático uma vez que máxima de corrente ocorre em pH 4,0

4.3.4 - Influência da velocidade de varredura de potencial na oxidação da catequina

O efeito da variação da velocidade de varredura de potencial (v) sobre o processo de oxidação de CT sobre filmes de PLL/PPO foi investigado no intervalo de $v = 10$ a 100 mVs^{-1} , usando soluções de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em tampão B-R pH 4,0 (Figura 79). Os voltamogramas cíclicos obtidos para soluções de CT sobre o eletrodo modificado foram intercalados com lavagens do eletrodo e remoção para a solução tampão B-R pH 4,0

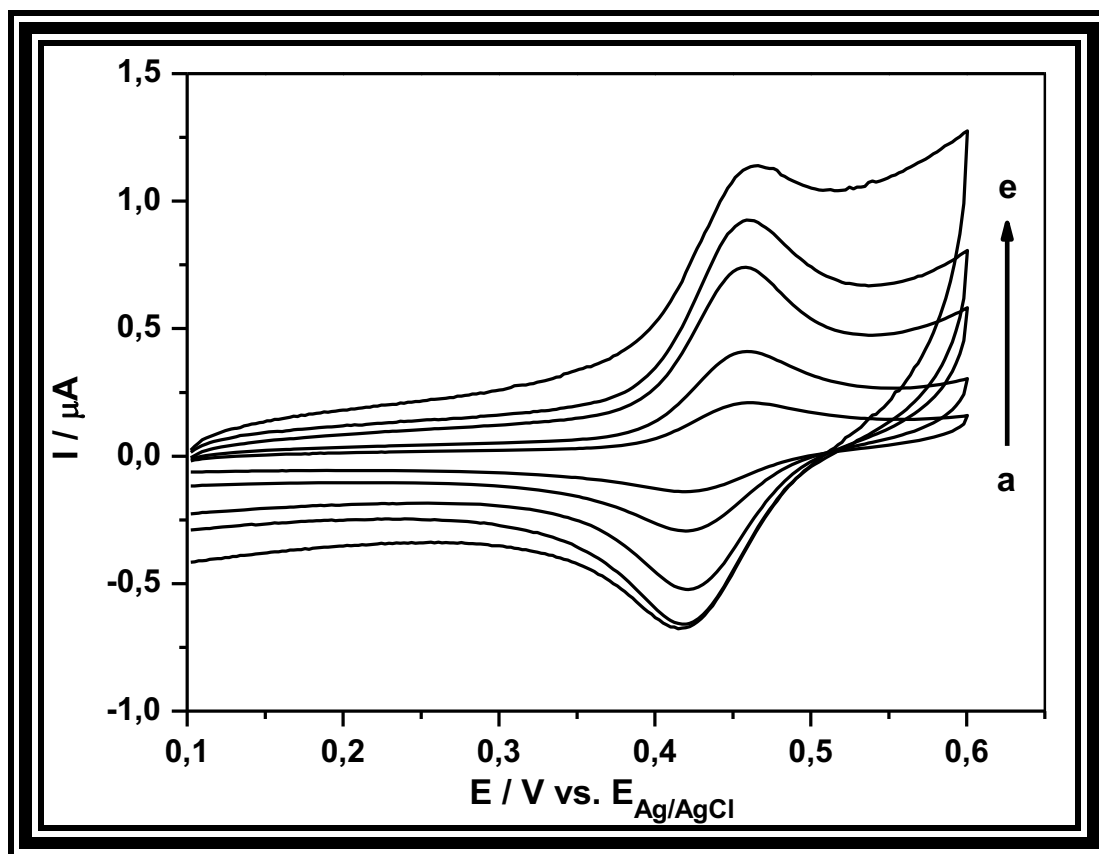


Figura 79 - Voltamogramas cíclicos para oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CT em pH 4,0 sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por filme de PLL/PPO.

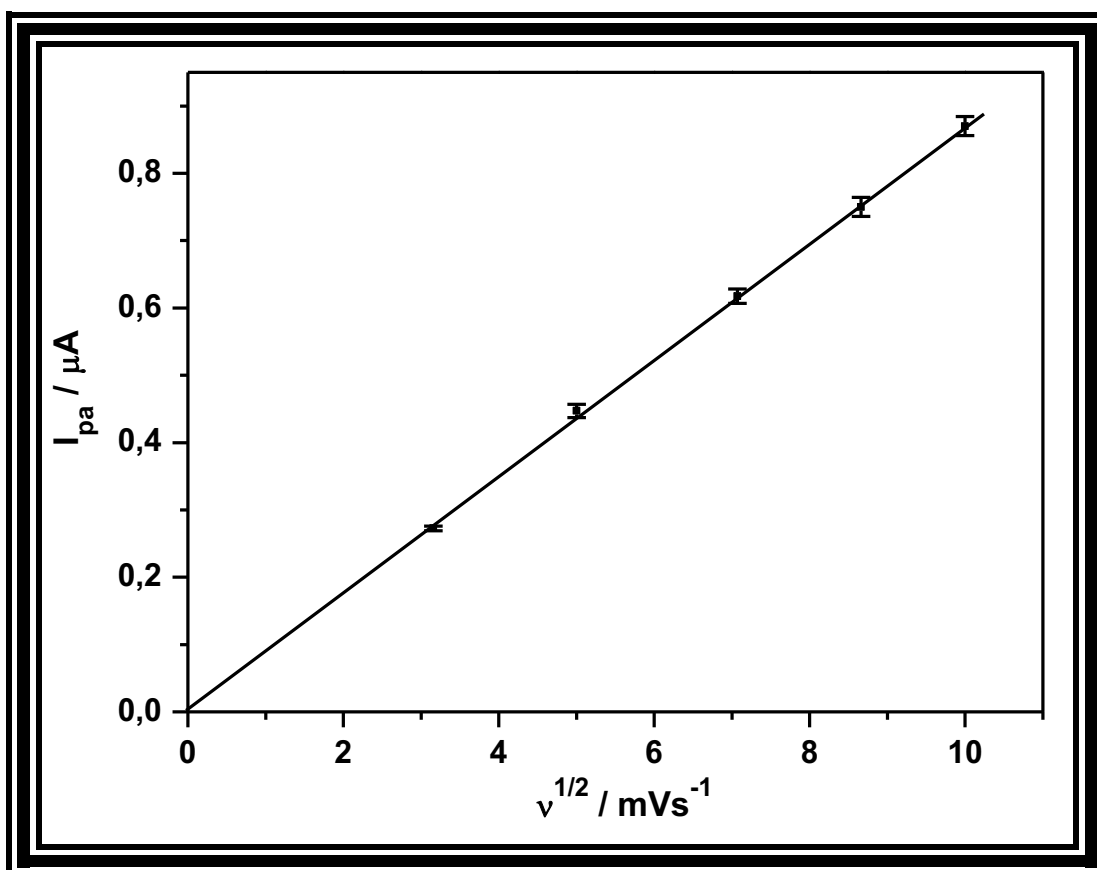


Figura 80 - Gráfico de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ em solução de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ solução tampão B-R pH 4,0 sobre eletrodo modificado.

Verifica-se nos voltamogramas que a corrente de pico anódica aumenta gradativamente com o aumento velocidade de varredura, porém observa-se um aumento significativo da corrente capacitiva.

A Figura 80 apresenta o gráfico de corrente anódica vs. $v^{1/2}$, Obteve-se uma linearidade em todo intervalo de velocidade de varredura investigado, segundo a equação $I_{pa} (\mu\text{A}) = -0,044 + 0,087 v^{1/2}$ com $R = 0,992$. Este resultado indica que o processo de oxidação da CT ocorre através do filme de PLL/PPO, sugerindo um processo controlado por difusão através do filme.

4.3.5 - Curva analítica para determinação da catequina

Investigou-se a seguir a potencialidade da técnica de voltametria de pulso diferencial, como método de varredura para determinação de CT utilizando-se filmes de PLL/PPO com o intuito de ampliar a sensibilidade do método analítico. A comparação entre os voltamogramas de pulso diferencial para oxidação de $1,0 \times$

10^{-6} mol L⁻¹ de CT em solução tampão B-R pH 4,0 sobre eletrodo de carbono vítreo sem (curva A) e com modificação (curva B) do eletrodo por filmes de PLL/PPO é mostrada na Figura 81.

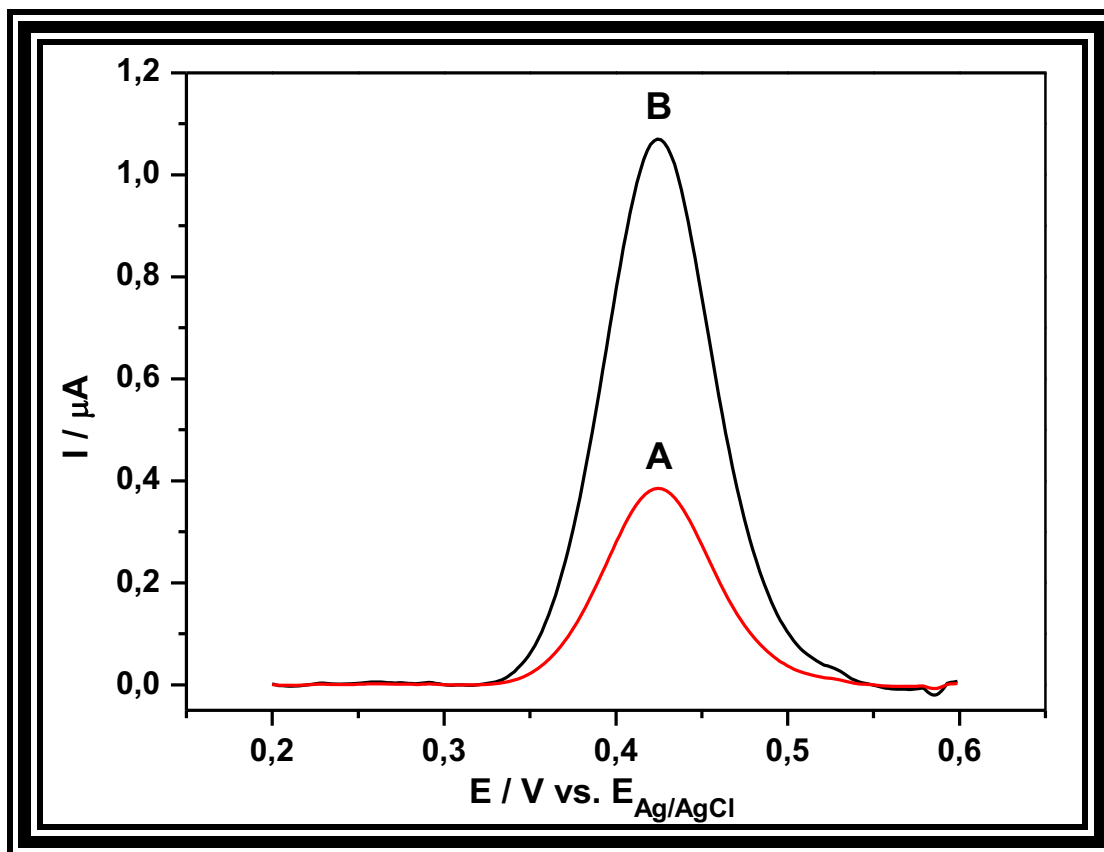


Figura 81 - Voltamogramas de pulso diferencial obtido sobre (A) ECV e (B) PLL/PPO para oxidação de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de CT em solução tampão B-R pH 4,0 com tempo de acúmulo de 10 minutos.

A análise da Figura 81 (curva B) indica claramente que o filme promove o aumento da corrente de oxidação de CT, mas não apresenta um ganho significativo da corrente de pico em relação ao método de voltametria cíclica. No entanto, o método foi adotado para construção da curva analítica devido à menor contribuição da corrente capacitiva.

Utilizando-se as melhores condições experimentais definidas para técnica de pulso diferencial ($\nu = 5$ mVs⁻¹, amplitude de 50mV, incremento de potencial = 2 mV⁻¹) construiu-se uma curva de calibração para determinação de CT em B-R pH 4,0 no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A curva analítica foi construída sem a lavagem do eletrodo modificado com PLL/PPO entre as medidas. O analito foi adicionado diretamente na célula eletroquímica, após cada adição o eletrodo foi submetido à pré-acúmulo durante 10 minutos, sob

agitação. As respectivas curvas voltamétricas são mostradas na Figura 82 e a respectiva curva analítica com média de triplicata das medidas é apresentada na Figura 83.

A Figura 82 mostra que os voltamogramas cíclicos obtidos para oxidação de CT apresentam aumento de intensidade no intervalo de concentração entre $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O gráfico de i_{pa} vs. concentração de CT (Figura 83) apresentou relação linear no intervalo de $1,0 \times 10^{-8}$ a $7,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Nesta região, a linearidade é expressa pela equação $i_{pa} (\mu A) = 5,97 \times 10^{-9} + 1,18 \text{ CT (mol L}^{-1})$. Em concentrações mais elevadas, observa-se um patamar na corrente de pico indicativo de saturação dos sítios ativos disponíveis no polímero. O limite de detecção foi estimado estatisticamente em $6,2 \pm 0,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ através da relação sinal ruído (HARRIS, 2005).

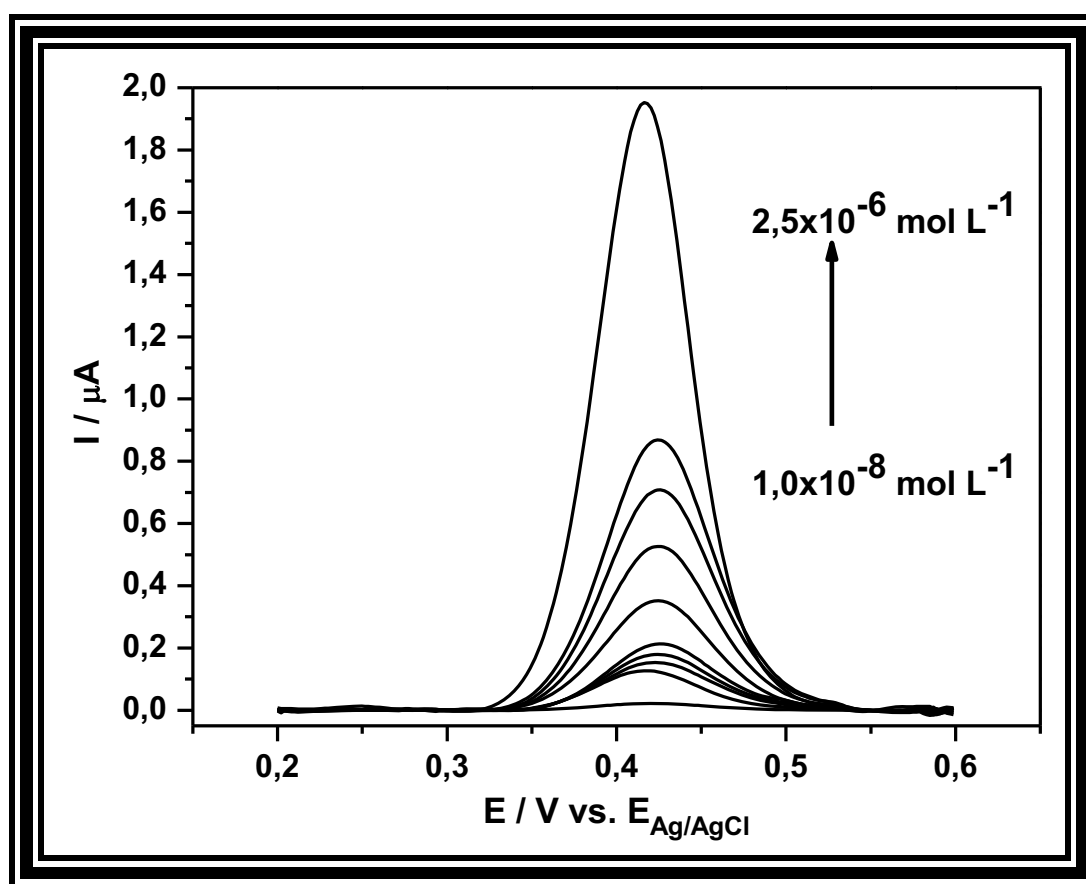


Figura 82 - Voltamogramas de pulso diferencial obtido para oxidação de CT em tampão B-R pH 4,0 sobre eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO.

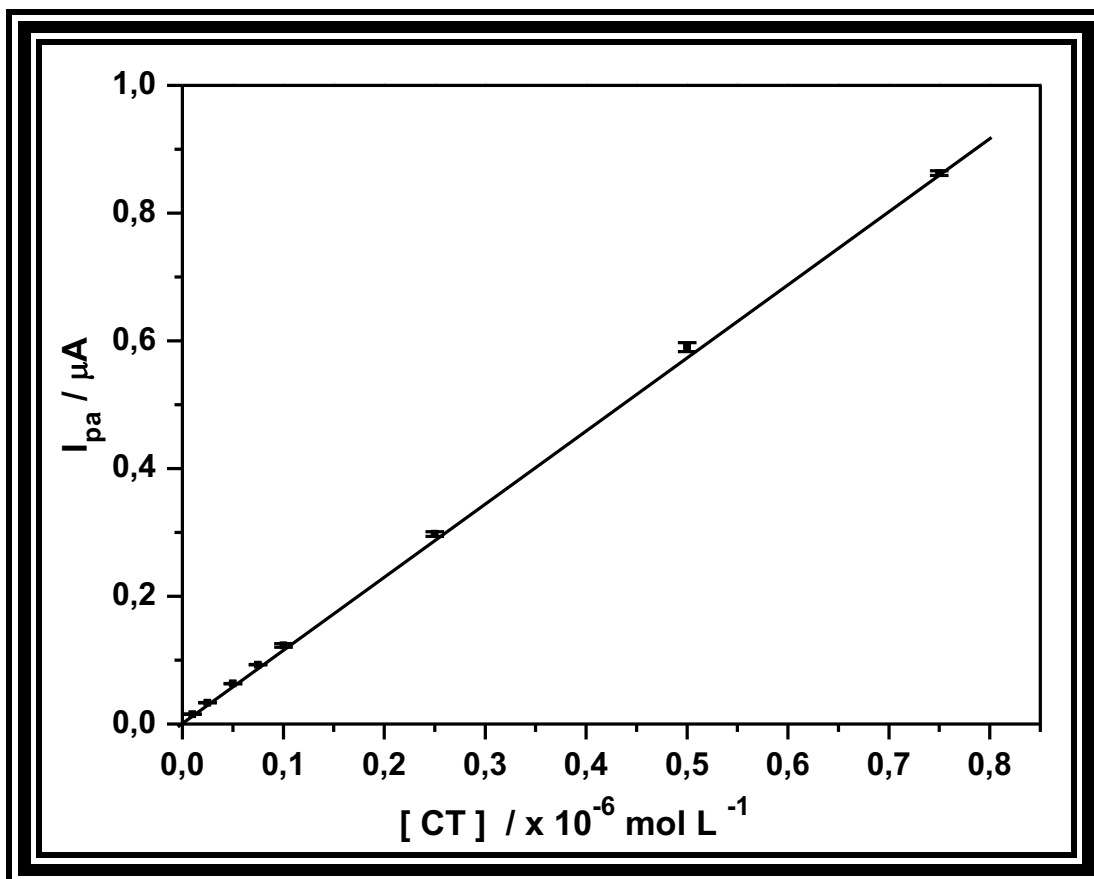


Figura 83 - Curva analítica obtida para oxidação de CT imobilizado em eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes de PLL/PPO.

4.3.6 - Aplicação do método em amostra de extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa*

A possibilidade de aplicação analítica dos eletrodos modificados com PLL para determinação de CT em plantas medicinais foi testada através da análise de uma amostra de extrato obtido segundo as especificações dadas na parte experimental. O eletrodo modificado com PLL/PPO foi imerso na solução do extrato durante 10 minutos e as curvas registradas antes e após a adição padrão (Bond, 1980, Skoog, 1997, Harris, 2001 e Baccan, 1979) de CT.

Transferiu-se para a célula eletroquímica uma solução contendo 50 mg de extrato bruto etanólico (EBEtOH) em 10,0 mL de solução tampão B-R pH 4,0. O eletrodo modificado com PLL/PPO foi imerso nesta solução durante 10 minutos sob agitação. Após esta etapa de acúmulo, os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados. A Figura 84 registra esse comportamento onde se observa um único pico anódico, bem definido, em potencial de 0,41 V.

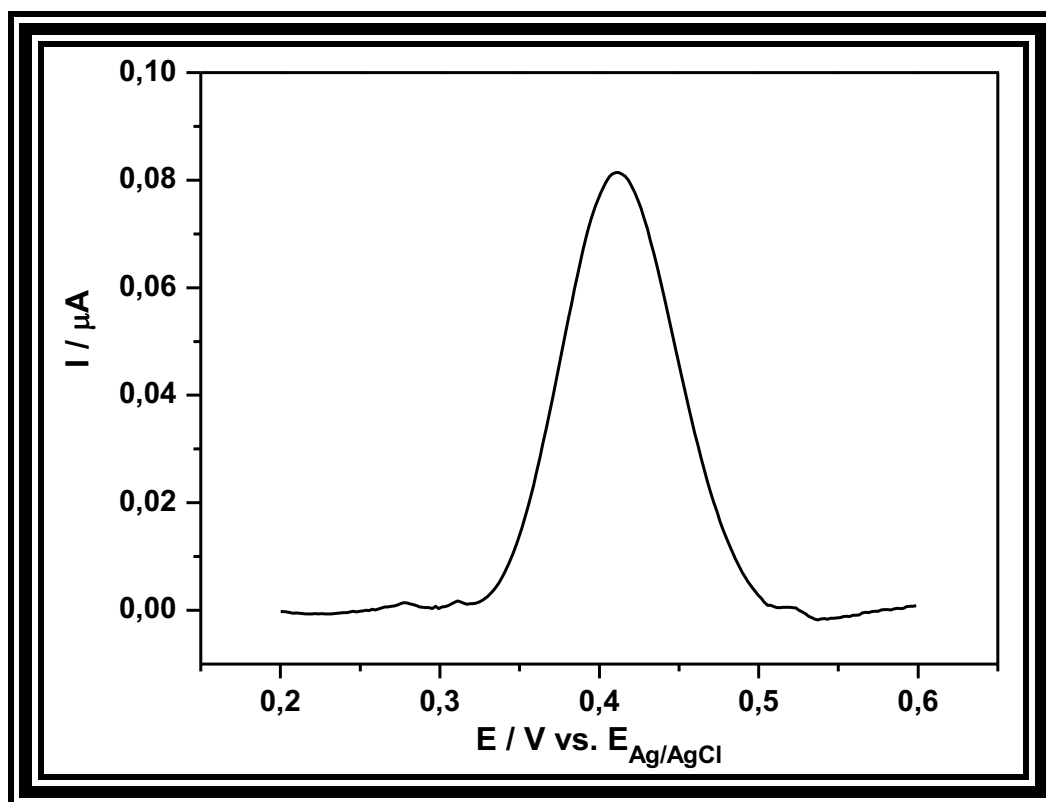


Figura 84 - Voltamograma de pulso diferencial para 0,05g de EB_{EtOH} de *Vatairea macrocarpa* sobre eletrodo de carbono vítreo modificado por PLL/PPO em solução B-R pH 4,0.

O procedimento experimental (método de adição de padrão) foi repetido após três adições de solução padrão de CT à solução contendo o extrato e os respectivos voltamogramas são apresentados na Figura 85. A corrente aumenta linearmente com a concentração do padrão de CT (Figura 86). Os resultados obtidos evidenciam a presença de CT no extrato, ou outros antioxidantes com grupos catecóis, conforme observado previamente para a quercetina.

A curva obtida (Figura 86) apresenta uma relação linear de i_{pa} vs. CT segundo a equação: $i_{pa} (\mu A) = 8,5 \times 10^{-9} \times 2,05 \text{ CT (mol L}^{-1}\text{)}$, $R = 0,995$. Um desvio padrão relativo de 0,03 ($n = 3$) foi obtido na repetição da análise de CT (Baccan, 1979) nestas condições. Os resultados obtidos pela extrapolação da reta correspondente mostram que no extrato há $3,90 \pm 0,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ de CT para três repetições. Esta concentração corresponde a 22,6 mg de CT por grama de EB_{EtOH} de *Vatairea macrocarpa*. Estes resultados mostram que a CT poderia ser analisada sem etapa de pré-extração em concentrações compatíveis com os níveis de detecção de métodos cromatográficos para quantificação de CT em extratos de plantas medicinais, utilizando-se o sensor voltamétrico baseado no recobrimento do eletrodo de carbono vítreo por filme de PLL/PPO.

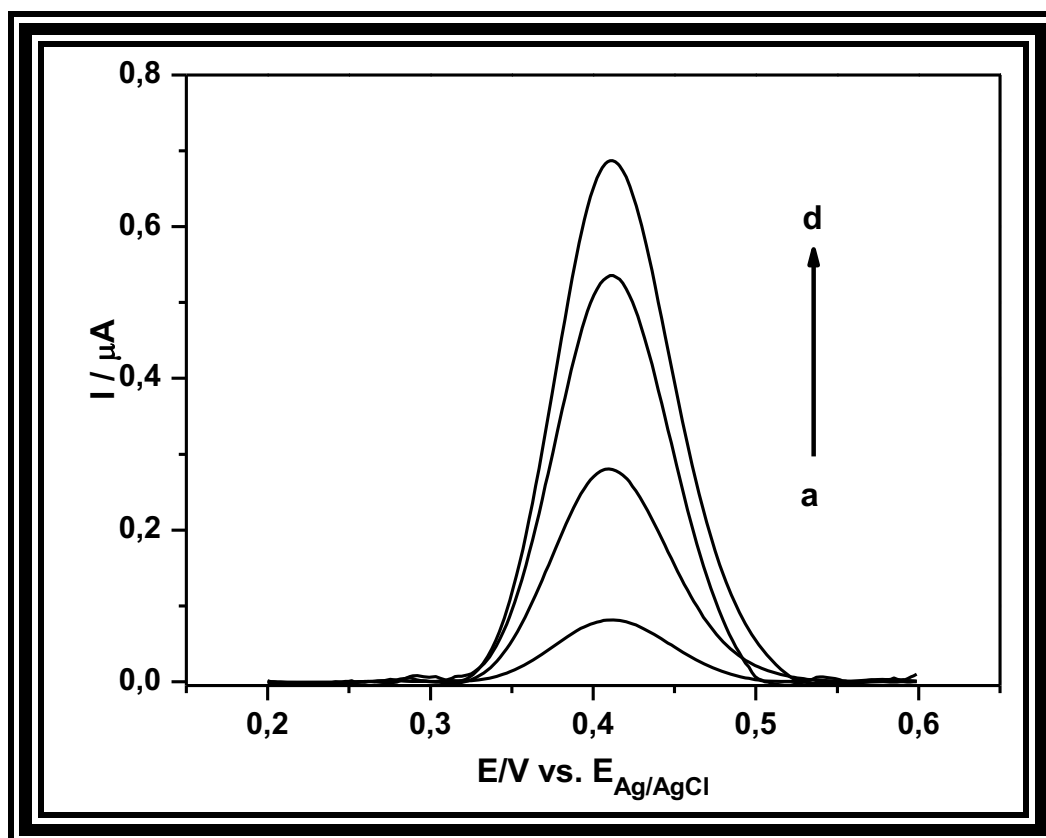


Figura 85 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para oxidação de CT na concentração de de: 1) $1,0 \times 10^{-6}$, 2) $2,0 \times 10^{-6}$ e 3) $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em EB_{Et}OH de *Vatairea macrocarpa* por filmes de PLL/PPO carregados durante 10 minutos em solução tampão B-R pH 4,0.

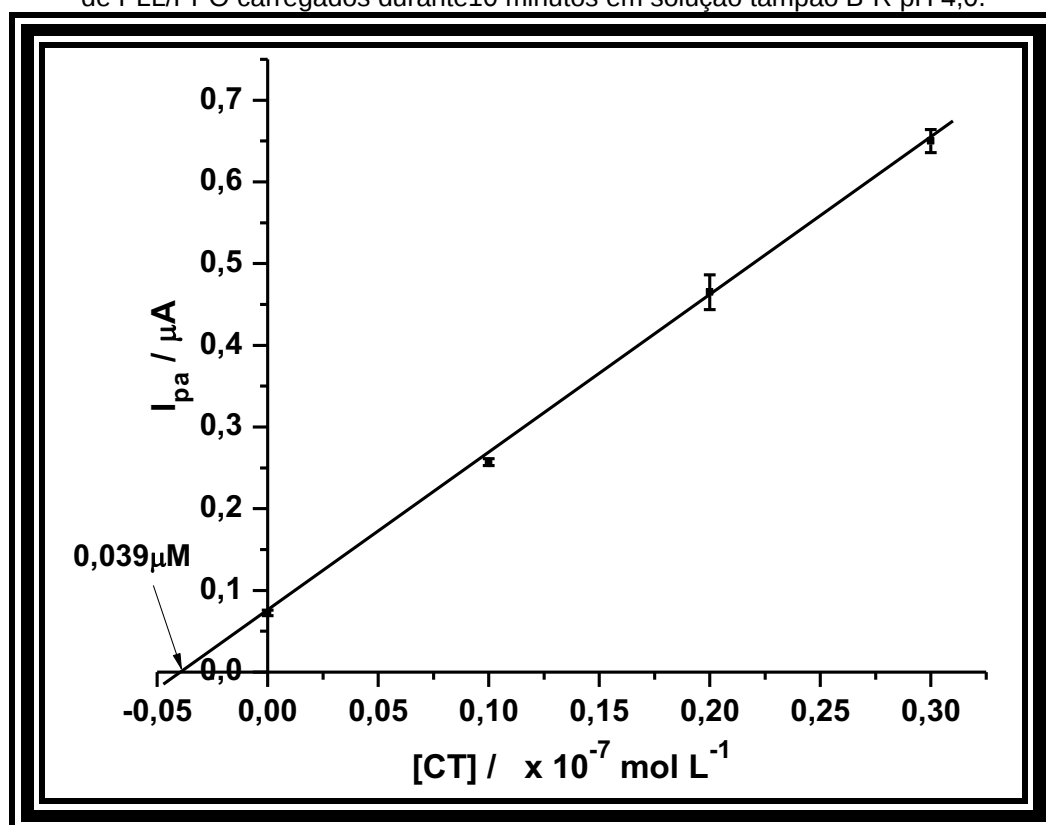


Figura 86 - Gráfico de I_{pa} vs. Concentração para oxidação de CT em EB_{Et}OH *Vatairea macrocarpa* por filmes de PLL/PPO carregados durante 10 minutos em solução tampão B-R pH 4,0

4.3.7 - Comparação do método proposto por espectrofotometria para determinação da catequina em extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa*

A validação da metodologia proposta foi testada determinando a CT em EB_{EtOH} da *Vatairea macrocarpa*, segundo método espectrofotométrico na região de UV-vis. (JURD e GEISSMAN, 1956).

A catequina apresenta três picos de absorção nos comprimentos de onda de 203, 230 e 280nm conforme mostra os espectros de absorção da Figura 87. A curva analítica obtida para CT ($\lambda = 280$ nm) em diferentes concentrações em solução tampão B-R (pH 4,0) é apresentada na Figura 88.

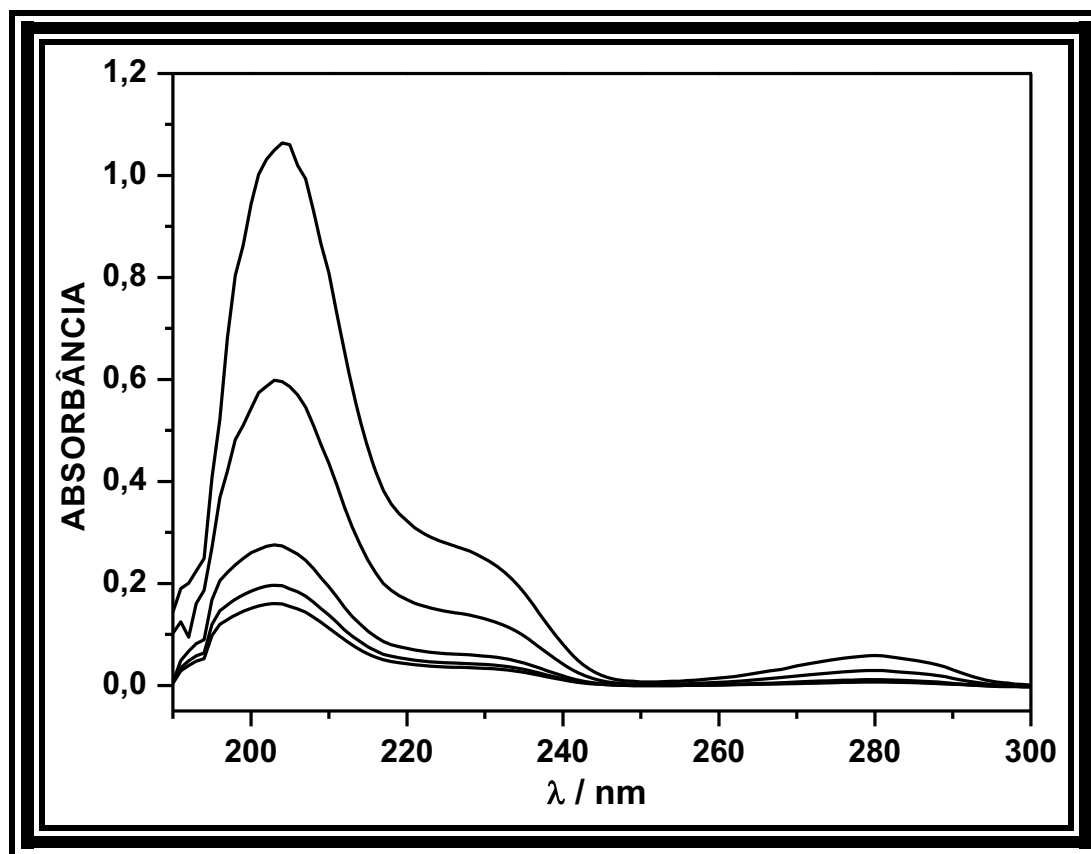


Figura 87 - Espectros de absorbância de CT em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0 variando-se a concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

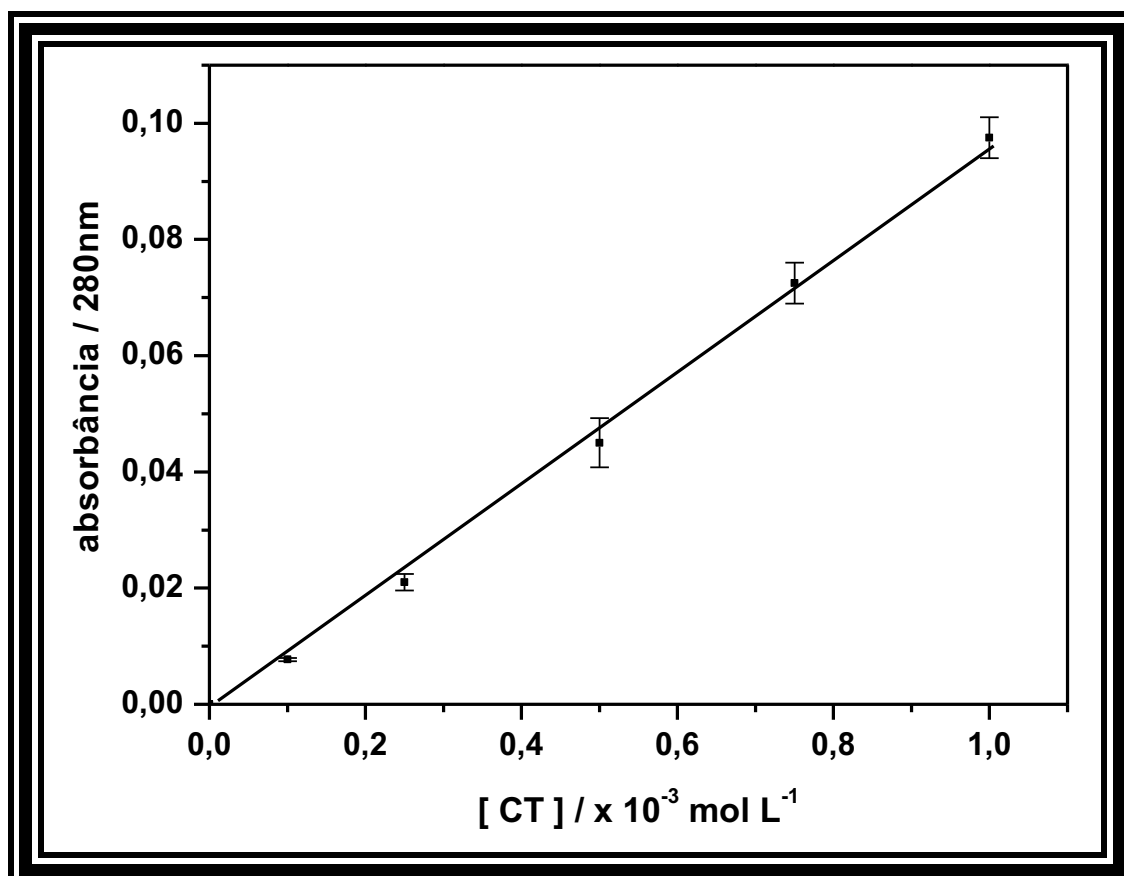


Figura 88 - Curva analítica obtida através dos espectros de absorção de CT em solução tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ pH 4,0.

Pode-se verificar pela Figura 88 que a relação existente entre a absorvância e a concentração de CT é linear no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,997, segundo a equação de $A = \epsilon bC = 953,41 C$, onde A absorvância (280 nm), ϵ = absortividade molar, b = caminho óptico e C = concentração em mol L⁻¹.

A aplicação do método espectrofotométrico na determinação de CT em EBEtOH de *Vatairea macrocarpa* foi realizada em triplicata utilizando-se o método de adição de padrão e os resultados são apresentados na Figura 89.

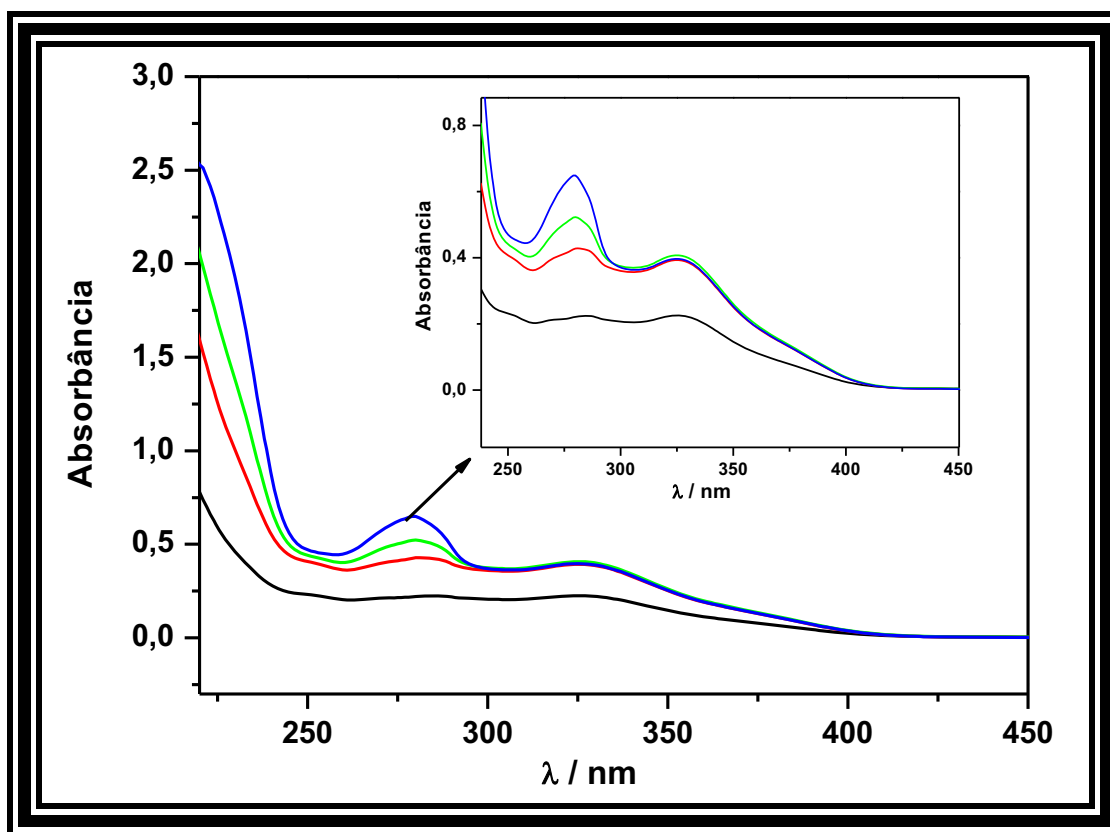


Figura 89- Espectros de absorvância de EB_{EtOH} de Vatairea macrocarpa em solução tampão B-R 0,04mol L⁻¹ pH 4,0 e adições de 1,0 x 10⁻⁵, 2,0 x 10⁻⁵ e 3,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ do padrão de CT.

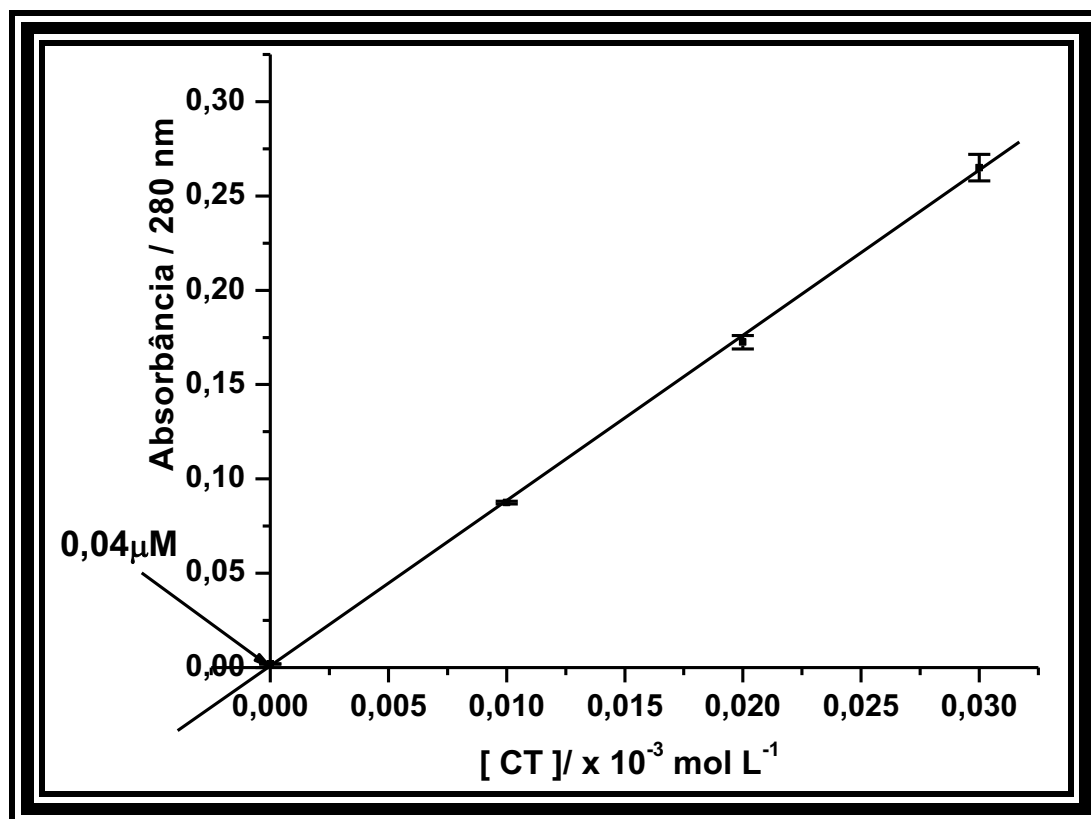


Figura 90 - Gráfico da Absorbância vs. Concentração para espectros de absorvância de EB_{EtOH} de Vatairea macrocarpa e CT em solução tampão B-R 0,04mol L⁻¹ pH 4,0 e adições de 1,0 x 10⁻⁵, 2,0 x 10⁻⁵ e 3,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ do padrão de CT.

O resultados obtidos (Figura 90) reportam a equação da reta correspondente: $A(280\text{nm}) = \epsilon bC = 0,336 + 0,336 \times 10^7 C \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$, $R = 0,99$. O valor de concentração obtido por extrapolação da reta foi de $4,0 \pm 0,25 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de catequina por grama de extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* é de 23,2 mg. Portanto, os resultados obtidos indicam que há uma coerência entre o método proposto e o método espectrofotométrico para a determinação de catequina em extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa*. Para fim de se obter uma precisão analítica aceitável, foi realizado a distribuição *t-Student*, trabalhando com um limite de confiança de 95% ($p = 0,05$) onde t é 4,3 para 2 graus de liberdade. Os dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Determinação de catequina em extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* empregando o método proposto e o espectrofotométrico.

Método	mol L ⁻¹	mg/g
Espectrofotometria	$4,0 \pm 0,25 \times 10^{-8}$	23,2
Proposto	$3,9 \pm 0,9 \times 10^{-8}$	22,4

$n = 3$, nível de confiança de 95%

Comparando os valores apresentados nesta tabela, pode-se observar que o método proposto, para o intervalo de confiança 95%, não são significativamente diferentes.

Podemos concluir, através da análise dos resultados obtidos, que a determinação de CT em extrato bruto etanólico de *Vatairea macrocarpa* para o método proposto, utilizando o PLL/PPO como modificador, mostrou-se mais sensível ($3,9 \pm 0,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) quando comparado ao método espectrofotométrico ($4,0 \pm 0,25 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.) sugerindo que o método analítico proposto pode ser empregado na análise de antioxidantes em extratos bruto de plantas medicinais.

5 - CONCLUSÃO

De acordo o presente trabalho é possível concluir que os eletrodos de carbono vítreo podem ser modificados com filmes híbridos de siloxano polipropilenoglicol (PPO) obtidos pelo método sol-gel que demonstraram resultados satisfatórios como agente ancorante de PLL. Os melhores resultados foram obtidos pela adição de 0,5 μL de PPO e 10 μL de PLL 1,0% à superfície do eletrodo seguida de secagem a temperatura de 80°C. Subsequentemente o eletrodo foi submetido á incorporação em solução de quercetina por agitação constante por 10 minutos em solução hidro-etanólica (pH 2,0). Este método de modificação da superfície eletródica mostrou-se muito útil para aplicações analíticas focadas em pré-concentração e retenção.

A aplicabilidade dos eletrodos modificados por filmes de PLL/PPO foi testada com o objetivo de desenvolver um sensor voltamétrico para quercetina e catequina como modelos de antioxidantes presentes em plantas e os resultados obtidos quando comparados a cromatografia líquida de alta eficiência para quercetina e espectrofotométrica para a catequina foram concordantes com a nível de confiança de 95%.

Deste modo, é possível concluir que o desenvolvimento do eletrodo modificado por filme de PLL/PPO pode ser uma alternativa viável para determinar as espécies antioxidantes em amostras complexas. Com a utilização da mistura PLL/PPO, foi possível verificar que o eletrodo modificado, pré-concentra os antioxidantes pela reação entre os grupos amino livres do PLL e grupo hidroxila do antioxidante, melhorando a resposta voltamétrica com relação aos eletrodos não modificados. O poliaminoácido PLL provavelmente encontra-se apenas aprisionado na matriz do PPO e revelou-se uma boa opção para retenção irreversível do antioxidante, o que oferece uma excelente alternativa para a determinação voltamétrica de antioxidantes em matrizes complexas, pois pode ser pré-concentrado e transferido para sistemas contendo apenas o eletrólito de suporte o que minimiza efeitos de matriz na amostra.

REFERÊNCIA

ABDULLAH, J. et al. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. **Sensors and Actuators B**, v. 114, n. 2, p. 604-609, 2006.

ABRUNA, H. D. Coordination chemistry in two dimensions: chemically modified electrodes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 86, p. 135-189, 1986.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

ANSON, F. C.; SAVEANT, J. M.; SHIGEHARA, K. Kinetics of mediated electrochemical reactions at electrodes coated with redox polymer-films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 145, n. 2, p. 423-430, 1983a.

ANSON, F. C.; SAVEANT, J. M.; SHIGEHARA, K. New model for the interior of poly-electrolyte coatings on electrode surfaces - mechanisms of charge transport through protonated poly(l-lysine) films containing Fe-III(EDTA)- and Fe-II(EDTA)²⁻ as counterions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 5, p. 1096-1106, 1983b.

BABEL, S.; KURNIAWAN, T. A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 97, n. 1-3, p. 219-243, 2003.

BACCAN, N. **Química analítica quantitativa elementar**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1979. 324 p.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of "antioxidant power": the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERG, R. V. D. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 511-517, 1999.

BICKETSTAFF, G. Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology, Humanae Press, New Jersey, 1997.

BITSCH, R. P. Pflanzenphenole und ihre gesundheitliche Wirkung. **Naturwissenschaftliche Rundschau**, v. 49, n. 2, p. 47-51, 1996.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 103-118.

BOCCHI, C. et al. Comparative investigation of UV, electrochemical and particle beam mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of benzoic and cinnamic acids and of their corresponding phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 753, n. 2, p. 157-170, 1996.

BOND, A. M. **Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry**. 1st. ed. Marcel Dekker Inc: New York, U.S.A. 1980.

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

BRIVIBA, K.; et al. Selective para-hydroxylation of phenol and aniline by singlet molecular oxygen. **Chemical Research in Toxicology**. v. 6, n. 4, p. 548-553, 1993

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 401-418, 2000.

CAMPBELL, C. J. et al. Influence of thickness on catalytic efficiency of cobalt corrin-polyion scaffolds on electrodes in microemulsions. **Langmuir**, v. 17, n. 11, p. 3447-3453, 2001.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CELESTE, M.; et al. Thermometric titration of polyhydric phenols - application to the determination of the tannin content of wines. **Analyst**. v. 118, n. 7, p. 895-898, 1993

CHAKER, J. A. et al. Drying study of siloxane-PPG nanocomposites. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 19, n. 1-3, p. 137-144, 2000.

CHEVION, S.; ROBERTS, M. A.; CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 6, p. 860-870. 2000.

CHRISTOFERSEN, M. J.; CARDWELL, T. J. Determination of total phenols in waters and wastewaters using flow injection with electrochemical detection; an alternative to the standard colorimetric procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 323, n. 1-3, p. 39-46, 1996.

CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.

DAHMOUCHE, K. et al. Small-angle X-ray scattering study of sol-gel-derived siloxane-PEG and siloxane-PPG hybrid materials. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 24, p. 4937-4942, 1999.

DALLUGE, J. J. et al. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 793, n. 2, p. 265-274, 1998.

DAVIDSON, B.; FASMAN, G. D. The conformational transitions of uncharged poly-L-lysine. **Biochemistry**, v. 6, n. 6, p. 1616-1629, 1967.

DRESSLER, V. L.; MACHADO E. L.; MARTINS, A. F. Spectrophotometric determination of tannin in tanning effluent with a flow-injection system. **Analyst**, v. 120, n. 4, p. 1185-1188, 1995.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, n. 1, p. 119-127, 2001.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 1095 p.

FERREIRA, V. S.; ZANONI, M. V. B.; FOGG, A. G. Cathodic stripping voltammetric determination of ceftazidime with reactive accumulation at a poly-L-lysine modified hanging mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 384, n. 2, p. 159-166, 1999.

FOGG, A. G.; et al. Improving the performance of screen-printer carbon and polished platinum and glassy carbon voltammetric electrodes by modification with poly-L-lysine. **Analytical Proceedings**, v. 32, n. 6, p. 209-212, 1995.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 8900-894, 1995.

GHICA, M. E.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation of rutin. **Electroanalysis**, v. 17, n. 4, p. 313-318, 2005.

GIILL, I.; BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane and hibryd sol-gel polymers: na efficient and generic approach. **Journal American Chemical Society**, v. 120, n. 34, p. 8587-8598, 1998.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUTTERRIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 129-135, 1990.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. Free radical and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-261, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology & medicine**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1985. 527 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 129-135, 1989.

HARRIS, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 7ª ed., Rio de Janeiro: LTC Editora 2008. 880p

HENDRICKSON, H. P.; KAUFMAN, A. D.; LUNTE C. E. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 3, p. 325-3334, 1994.

HERRMANN, K. P. Pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als. **Antioxidantien Gordian**, v. 93, n. 7-8, p. 108-111, 1994.

HILLMAN, A. R. Polymer modified electrodes: preparation and characterization. In: LINFORD, R. G. (Ed.). **Electrochemical science and technology of polymers**. London: Elsevier, 1987. v. 1, p. 103-292.

HOTTA, H. et al. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1526, n. 2, p.159-167, 2001.

HOTTA, H.; et al. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, n. 1, p. 123-132, 2002.

HUTCHINGS, J. B. Chemistry of food colour. In: _____. **Food colour and appearance**. London: Blackie Academic, 1994. p. 420-457.

IMMANENI, A.; McHUGH, A. J. Flow-induced conformational changes and phase behavior of aqueous poly-L-lysine solutions. **Biopolymers**, v. 45, n. 3, p. 239-246, 1998.

JACKSON, R. Chemical Constituents Of Grapes. In: **Wine Science: Principles And Applications**. London: Academic Press, 1994. p.178-219.

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

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. de A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n.12, p. 1395-1401, 1956.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KARAVICOKÁ, J.; SIMKO, P. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1-2, p. 271-281, 2000.

KILMARTIN, P. A. Electrochemical detection of natural antioxidants: principles and protocols. **Antioxidants & Redox Signalling**, v. 3, p. 941-955, 2001.

KILMARTIN, P. A.; HSU, C. F. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 501-512, 2003.

KIM, D.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 231-326, 2003.

KOHEN, R. et al. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 6, p. 871-879, 2000.

KOVAC, V.; PEKIC, B. Proanthocyanidols from grape and wine. **Contemporary Agriculture**, v. 39, n. 4, p. 5-17, 1991.

LAPARRA, J.; MICHAUD, J.; MASQUELIER, J. Action of oligomeric procyanidins on vitamin C deficient guinea pig. **Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux**, v. 118, n. 1-2, p. 7-13, 1979.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAUS, R. et al. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 187-190, 2004.

MAGALHAES, J. M. C. S.; MACHADO, A. A. S. C. Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes. **Talanta**, v. 47, n. 1, p. 183-191, 1998.

MALAGUTTI, A. R. et al. Determination of rutin in green tea infusions using square-wave voltammetry with a rigid carbon-polyurethane composite electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 10, p. 1028-1034, 2006.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-47, 2004.

MANNINO, S. et. al. A new method for the evaluation of the “antioxidant power” of wines. **Electroanalysis**, v. 10, n. 14, p. 908-912, 1998.

MASUKAWA, Y. et al. Determination of green tea catechins in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal Chromatograph B**, v. 834, n. 1-2, p. 26-34, 2006.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380-385, 2006a.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 401-407, 2006b.

]

MELLO, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P.; KUBOTA, L. T. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 96, n. 3, p. 636-645, 2003.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. **Journal of chromatography A**, v. 897, n. 1-2, p. 177-184, 2000

MIZUTANI, F. et al. Enzyme ultra-thin layer electrode prepared by the co-adsorption of poly-L-lysine and glucose oxidase onto a mercaptopionic acid modified gold surface. **Chemical Letters**, n. 4, p. 251-252, 1996.

MIZUTANI, F. et al. Glucose oxidase/polyion complex-bilayer membrane for elimination of electroactive interferences in amperometric glucose sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 364, n. 1-3, p. 173-179, 1998.

MIZUTANI, F.; YABUKI, S.; HIRATA, Y. Amperometric biosensors using poly-L-lysine/poly(styrenesulfonate) membrane with immobilized enzymes. **Denki Kagaku**, v. 63, n. 12, p. 1100-1105, 1995b.

MIZUTANI, F.; YABUKI, S.; HIRATA, Y. Amperometric L-lactate-sensing electrode based on a polyion complex layer containing lactate oxidase - application to serum and milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 314, n. 3, p. 233-239, 1995a.

MOSKVIN, A. L. et al. Extraction-chromatographic preconcentration with chromatomembrane separation of extract from aqueous phase for luminescence determination of oil products and phenols in natural water by flow injection analysis. **Talanta**, v. 50, n. 1, p. 113-120, 1999.

MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. In: BARD, A. J. (Ed.). **Electroanalytical chemistry of advances**. New York: Marcel Dekker, 1984, v. 13, p. 191-351.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, A. R. Chemically modified electrodes molecular design for electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 379A-390A, 1987.

NAGAOKA, H.; TOYOSHIMA, S.; TAKEDA, K. Spectrofluorometric determination of catechins with 1,2-diphenylethylenediamine. **Analytical Sciences**, v. 18, n. 8, p. 951-954, 2002

NAIK, G. H. et al. Antioxidant activity and phytochemical analysis of the aous extract of Terminalia chebula. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 206-207, 2002.

NEILL, S. O.; et al Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. **Plant, Cell & Environment**. v. 25, n. 4, p. 539-547, 2002.

NEMATOLLAHI, D.; MALAKZADEH, M. Electrochemical oxidation of quercetin in the presence of benzenesulfinic acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 547, n. 2, p. 191-195, 2003.

OLIVEIRA, H. C. et al. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 515-519, 2008.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

OSMAN, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: an insight into quercetin oxidation mechanism. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 861-867, 2008.

PEREIRA, F. C. et al. Determination of iodide and idoxuridine at a glutaraldehyde-cross-linked poly-L-lysine modified glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 4, p. 1309-1316, 2005.

PEREIRA, F. C. et al. Modification of glassy carbon electrodes with a poly-L-lysine/glutaraldehyde film. **Electroanalysis**, v. 16, n. 17, p. 1439-1443, 2004.

PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical reduction of nitroprusside on a glassy carbon electrode modified by poly-L-lysine films. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 1, p. 63-70, 2008.

PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B. Voltammetric sensor for sodium nitroprusside determination in biological fluids using films of poly-L-lysine. **Electroanalysis**, v. 19, n. 9, p. 993-998, 2007.

PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; FOGG, A. G. Regeneration of poly-L-lysine modified carbon electrodes in the accumulation and cathodic stripping voltammetric determination of the cromoglycate anion. **Talanta**, v. 60, n. 5, p. 1023-1032, 2003.

PEREIRA, G. C. R. **Estudo químico e farmacológico de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke**. 2008. 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2008.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIRZAD, R. et al. Differential-pulse cathodic stripping voltammetric determination of nedocromil sodium at an unmodified and at a poly-L-lysine modified electrode. **Analyst**, v. 119, p. 2439-2442, 1994a.

PIRZAD, R. et al. Differential-pulse cathodic stripping voltammetric determination of sodium nitroprusside at a hanging mercury drop electrode aided by copper (II) and poly-L-lysine modification. **Analyst**, v. 119, n. 5, p. 963-968, 1994b.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11-12, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.10, p. 4290-4302, 2005.

RICCIARDI, C. S. et al. Immobilization of streptavidin in sol-gel films: application on the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, p. 637-643, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. et al. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.
RICE-EVANS, C., MILLER, N., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Methods for assessing the authenticity of orange juice - a review. **Analyst**, v. 120, n. 1, p. 1-28, 1995.

SANO M. *et al.* Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analyst**, v. 126, n. 6, p. 816 - 820, 2000.

SANTOS, D. P. *et al.* Application of a glassy carbon electrode modified with poly(glutamic acid) in caffeic acid determination. **Microchimica Acta**, v. 151, n. 1-2, p. 127-134, 2005.

SIMÕES, C. M. O. (Org.). *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2003. 1102 p.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Ed. UFRGS, 2003.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. Thomson Learning, 2005. 1100p.

SLUIS, A. A. *et al.* Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**: v.49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.

SOARES, M. *et al.* Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de Uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, W. R. *et al.* Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 5, p. 619-633, 2004.

SPÁČIL, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. **Talanta**. v. 76, n. 1, p. 189–199, 2008.

SUNDQUIST, A. R.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Singlet oxygen quenching by carotenoids. **Methods in Enzymology**, v. 234, p. 384-388, 1994.

TAGLIAVINI, S. A. et al. Polysiloxane–poly(propylene oxide) hybrid discs as solid phase in anti-HCV detection using a recombinant core protein. **Talanta**, v. 75, n. 2, p. 461-465, 2008.

TEIXEIRA, E. H. et. al. *In vitro* inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 111-116, 2006.

TIMBOLA, A. K. et al. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 139-148, 2006.

TOYODA, M. et al. Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2561-2564, 1997.

UGO, P.; MORETTO, L. M. Ion-exchange voltammetry at polymer-coated electrode: principles and analytical prospects. **Electroanalysis**, v. 12, n. 7, p. 1105-1113, 1995.

van ACKER S. A., KOYMANS LM, BAST A. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity, **Free Radical Biology and Medicine** v. 15, n. 3, p. 311-328, 1993.

VELIOGLU, Y. S.; et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998

VIANA, E. R. C.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical reduction and determination of cibacron blue F3GA at poly-l-lysine modified glassy carbon electrode. **Dyes and Pigments**, v. 71, n. 2, p. 145-152, 2006.

WANG, H.; HALLIWELL, K.; YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 115-121, 2000.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HALLIWELL, K. HPLC. Determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 307-312, 2003.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HALLIWELL, K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 4-5, p. 152-160, 2000.

WANG, J. Modified electrodes for electrochemical sensors. **Electroanalysis**, v. 3, n. 4-5, p. 255-259, 1991.

WANG, S.Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000

WARRINER, K. et al. Modified microelectrode interfaces for in-line electrochemical monitoring of ethanol in fermentation processes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 84, n. 2-3, p. 200-207, 2002.

ZARE, H. R.; NAMAZIAN, M.; NASIRIZADEH, N. Electrochemical behavior of quercetin: experimental and theoretical studies. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 584, n. 2, p. 77-83, 2005.

ZIELINSKA, D.; NAGELS, L. J.; PISKULA, M. K. Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, n. 1-2, p. 22-31, 2008.