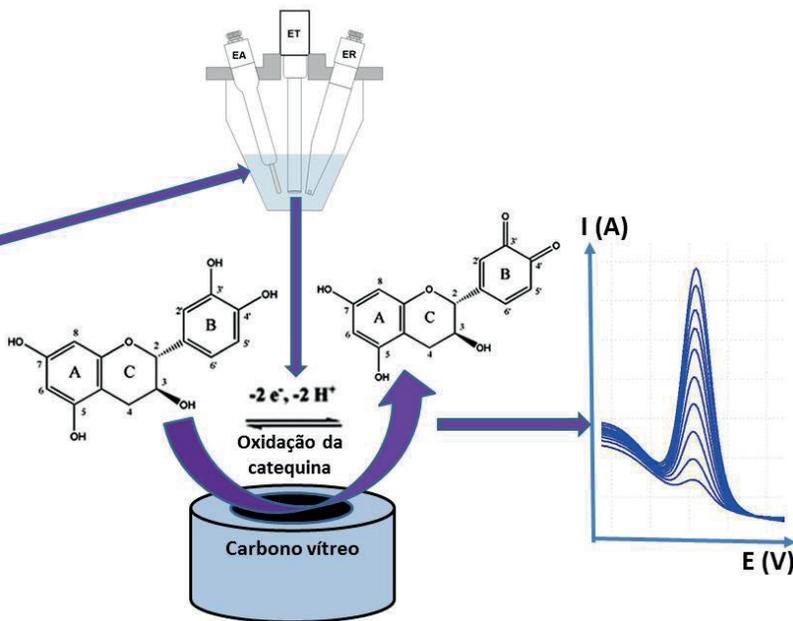


## Otimização e validação de técnica voltamétrica para a detecção e quantificação de compostos fenólicos de interesse agrícola: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e estilbenos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
366**

**Otimização e validação de técnica  
voltamétrica para a detecção  
e quantificação de compostos  
fenólicos de interesse agrícola:  
ácidos fenólicos, flavonoides,  
taninos e estilbenos**

*Gabriella Magarelli  
Rosana Santos Cavalcante  
Clarissa Silva Pires de Castro*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Parque Estação Biológica  
PqEB, Av. W5 Norte (final)  
70970-717 , Brasília, DF  
Fone: +55 (61) 3448-4700  
Fax: +55 (61) 3340-3624  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Wagner Alexandre Lucena*

Secretária-Executiva  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Membros  
*Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanches; Sérgio Eustáquio de Noronha*

Supervisão editorial  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Revisão de texto  
*Gabriella Magarelli*

Normalização bibliográfica  
*Rosameres Rocha Galvão - ( CRB-1/2122)*

Tratamento das ilustrações  
*Adilson Werneck*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Adilson Werneck*

Ilustração da capa  
*Gabriella Magarelli*

**1ª edição**  
1ª impressão (ano: tiragem)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Magarelli, G.

Otimização e validação de técnica voltamétrica para a detecção e quantificação de compostos fenólicos de interesse agrícola: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e estilbenos / Gabriella Magarelli, Rosana Santos Cavalcante, Clarissa Silva Pires de Castro. - Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

43 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 366).

1. Voltametria 2. Validação de métodos I. Magarelli, G. II. Cavalcante, R. S. III. Castro, C. S. P. de IV. Série.

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	6
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	16
Conclusão.....	31
Agradecimentos.....	32
Referência Bibliográfica.....	32



# Otimização e validação de técnica voltamétrica para a detecção e quantificação de compostos fenólicos de interesse agrícola: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e estilbenos

Gabriella Magarelli <sup>1</sup>

Rosana Santos Cavalcante<sup>2</sup>

Clarissa Silva Pires de Castro<sup>3</sup>

**Resumo** – A técnica de Voltametria de Pulso Diferencial e eletrodo de carbono vítreo foi otimizada e validada para a detecção e quantificação dos ácidos fenólicos: protocatequínico, vanílico, ferrúlico, 4-hidroxibenzoico, salicílico; dos flavonoides: quercetina, campferol, naringenina, miricetina, hesperetina, delphinidina, cianidina e catequina; de taninos e derivados: ácido tânico e ácido elágico; do estilbeno: resveratrol. Os melhores parâmetros eletroquímicos e de análise foram: célula eletroquímica formada por eletrodos de carbono vítreo (trabalho, Ag/AgCl (referência e platina (auxiliar; amplitude de pulso de 50 mV, velocidade de varredura de 50 mVs<sup>-1</sup>, tampão fosfato com pHs na faixa de 3,0 – 7,8 . Os parâmetros de validação ou figuras de mérito apresentaram como resultados: limite de quantificação (LQ e detecção (LD variando de  $2,5 \times 10^{-7}$  a  $1,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> e de  $1,5 \times 10^{-8}$  a  $5,3 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente; linearidade entre as correntes de oxidação e as concentrações dos compostos fenólicos na faixa de  $2,5 \times 10^{-7}$  a  $6,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>,  $r > 0,99$ ; precisão intra-dia com desvio padrão relativo (DPR < 15% e precisão inter-dia com DPR < 20%. A Voltametria é uma técnica eletroanalítica que representa uma ótima alternativa para a detecção e quantificação de compostos fenólicos, pois além das vantagens analíticas, possui custo mais reduzido, fornece informações quanto ao poder redutor in vitro e gera menos resíduo.

**Termos para indexação:** Voltametria, validação de métodos, poder redutor, potencial de oxidação.

<sup>1</sup> Química, doutora em Ciências, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>2</sup> Ciências Naturais, mestre em Tecnologia Química e Biológica, colaboradora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>3</sup> Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Sede, Brasília, DF.

## Optimization and validation of voltammetric technique for the detection and quantification of phenolic compounds of agricultural interest: phenolic acids, flavonoids, tannins and stilbenes

**Abstract** – The Differential Pulse Voltammetry and glassy carbon electrode technique was optimized and validated for the detection and quantification of phenolic acids: protocatechuic, vanillic, ferulic, 4-hydroxybenzoic, salicylic; of flavonoids: quercetin, kaempferol, naringenin, myricetin, hesperetin; delphinidin, cyanidin and catechin; of tannins and derivatives: tannic acid and ellagic acid and of stilbene: resveratrol. The best electrochemical and analysis parameters were: electrochemical cell formed by glassy carbon electrodes (work, Ag / AgCl (reference and platinum (auxiliary; pulse amplitude of 50 mV, scan rate of 50 mVs<sup>-1</sup>, phosphate buffer with pHs in the range of 3.0 – 7.8. The validation parameters or figures of merit presented as results: quantitation limits (LQ and detection limits (LD ranging from 2.5 x 10<sup>-7</sup> to 1.7 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> and from 1.5 x 10<sup>-8</sup> to 5.3 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectively; linearity between oxidation currents and phenolic compounds concentrations ranging from 2.5 x 10<sup>-7</sup> to 6.0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, r > 0.99; intra-day precision with relative standard deviation (RSD < 15% and inter-day precision with RSD < 20%. Voltammetry is an electroanalytical technique that represents a great alternative for the detection and quantification of phenolic compounds, because in addition to the analytical advantages, it has a lower cost, provides information about *in vitro* reducing power and generates less waste.

**Index terms:** Voltammetry, method validation, reducing power, oxidation potential.

## Introdução

---

Cerca de 100.000 compostos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, sendo que podem ser divididos em três grupos principais: compostos fenólicos, compostos terpênicos e compostos contendo nitrogênio / enxofre (Mazid et al., 2011; Zaynab et al., 2018). Uma característica química bastante importante dos compostos fenólicos é sua

capacidade antioxidante, que se deve principalmente às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química (Leopoldini et al., 2011; Kancheva; Kasaikina, 2013; Shahidi; Zong, 2015). As moléculas dos compostos fenólicos possuem anel benzênico ou estrutura cíclica com um ou mais substituintes hidroxílicos que interagem com os radicais livres. Esta propriedade química confere aos compostos fenólicos ação direta na saúde, reduzindo riscos de doenças crônicas graves, tais como as doenças coronarianas, diabetes e câncer (Hemingway; Laks, 1992; Angelo; Jorge, 2007; Balasundrama et al., 2006; Gil; Couto, 2013; Lin, et al., 2016). Após uma pesquisa simples na base de dados SCOPUS ([www.scopus.com](http://www.scopus.com) – acessado em 17/03/2020), verificou-se que o interesse no estudo de compostos fenólicos ao longo da última década teve aumento crescente, partindo de 991 artigos científicos em 2009 para 3011 artigos em 2019, utilizando-se como palavras-chave “phenolic compounds and plants”. Essa relevância ao longo da década é resultado de pesquisas que continuamente apontam a importância destes compostos na saúde humana e animal (Jimenez-Garcia et al., 2013; Tufarelli et al., 2017; Cory et al., 2018), na defesa de plantas contra fatores bióticos (ataque de herbívoros e patógenos) (Edreva et al., 2008; Mikulic-Petkovsek et al., 2013; Fürstenberg-Hägg et al., 2013; Novelli et al., 2019; Yuan et al., 2019; Hassan et al., 2020) e fatores abióticos (radiações UV-B, estresse hídrico e deficiência de nutrientes) (Isah et al., 2019; Weidner et al., 2000), na atração de organismos benéficos para as plantas (Schijlen et al., 2004) e também na síntese verde de nanopartículas metálicas (Akhtar et al., 2013; Mohammadlou et al., 2016; Kashkouli et al., 2018; Marslin et al., 2018; Pereira et al., 2020). Os compostos fenólicos, provenientes de plantas e microorganismos atuam como agentes redutores e estabilizadores na síntese verde de nanopartículas metálicas, as quais possuem grande atividade antimicrobiana (Sharma et al., 2009; Akhtar et al., 2013). Considera-se que as nanopartículas metálicas obtidas por síntese verde são produtos de inovação sustentáveis, cujas aplicabilidades industriais (fármacos, vestuários, corantes têxteis, cosméticos, filmes protetores de alimentos, sensores, etc) ampliaram a importância econômica e industrial dos compostos fenólicos, antes restrita praticamente à fitomedicina e à nutracêutica (Schieber et al., 2001; Oksana et al., 2012; Ye; Augustin, et al., 2019, Balasundrama, et al., 2006; Carochi et al., 2014). Dados de 1998 reportaram que eram conhecidos mais de 8.000 compostos fenólicos com estruturas químicas diferentes e, conseqüentemente, com

atividades biológicas variadas (Bravo, 1998). Dentre os compostos fenólicos considerados antioxidantes naturais, destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonoides, os taninos, as ligninas, os estilbenos e as cumarinas (Soares, 2002; Leopoldini et al., 2011; Mazid et al., 2011; Kancheva.; Kasaikina, 2013). Visto a diversidade de compostos fenólicos em matrizes vegetais e sua importância, há a necessidade contínua de promover o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de realizar de forma seletiva e sensível a detecção e quantificação de compostos fenólicos. Estudos relativos ao preparo e extração das amostras são de grande importância que, juntamente com o sistema de detecção adequado, gerarão resultados confiáveis (Tsao, 2010; Eunyoung et al., 2010; Ventura et al., 2017). Os métodos frequentemente utilizados para a determinação de compostos fenólicos em amostras vegetais são os métodos espectrofotométricos e os métodos cromatográficos acoplados ou não a espectrômetros de massa (Cicco et al., 2009; Ignat et al., 2011; Khoddami et al., 2013; Da Silva et al., 2017; Lamarca et al., 2018). Os métodos voltamétricos aparecem como uma ótima alternativa e possuem uma série de vantagens, quando comparados aos métodos espectrofotométricos e cromatográficos, tais como: não são destrutivos e possuem sensibilidade elevada; podem ser adaptados ao campo por meio da utilização de equipamentos portáteis e de eletrodos portáteis; são de custo baixo e de fácil operação; geram pequenas quantidades de resíduos químicos; as amostras podem ser coloridas e podem ser utilizados tanto para a detecção e quantificação de compostos fenólicos quanto para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* (Seruga et al., 2011; Pisoschi et al., 2015; Hoyos-Arbeláez et al., 2017). A voltametria compreende um grupo de técnicas eletroanalíticas, na qual, a informação sobre a espécie química de interesse é obtida por meio de medidas de corrente de oxidação-redução em função do potencial aplicado em uma célula eletroquímica (Bard; Faulkner, 2001; Holler et al., 2009; Pacheco, et al., 2013). Para que a técnica voltamétrica possa ser aplicada, o analito deve ser eletroativo e também disponível em solução. Os compostos fenólicos possuem em sua estrutura química grupos doadores de prótons e elétrons, desta forma, são eletroativos e podem ser detectados e determinados por técnicas eletroquímicas, como a Voltametria (Filipiak et al., 2001). Os métodos voltamétricos, que utilizam técnicas de voltametria

cíclica, de pulso diferencial, de redissolução anódica e de onda quadrada, associados a diversos tipos de eletrodos de trabalho (carbono vítreo, carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e/ ou grafeno, pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono têm sido utilizados ao longo dos últimos anos para determinar compostos fenólicos e estudar a capacidade antioxidante destes compostos em extratos vegetais e em diferentes alimentos (Blasco et. al., 2004; Simic, et al., 2007; Wan et al., 2007; Maoela et al., 2009; Novak et al., 2010; Cuartero et al., 2011; Komorsky-Lovric; Novak, 2011; Magarelli et al., 2013; Silva et al., 2012; Popa; Diculescu, 2013; Jara-Palacios et al., 2014; Doménech-Carbó et al., 2015; Pisoschi et al., 2015; Abdel-Hamid; Newair, 2016; Oliveira-Neto et al., 2016; Hoyos-Arbeláe et al., 2017; Ziyatdinova et al., 2018.

Neste contexto, o objetivo deste boletim é apresentar os dados da otimização e da validação (linearidade, faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação e precisão da técnica voltamétrica, baseada em Voltametria de Pulso Diferencial e eletrodo de carbono vítreo, para a detecção e quantificação de 17 compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido ferrúlico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, hesperetina, campferol, miricetina, naringenina, quercetina, defnidina, cianidina, catequina, ácido tânico, ácido elágico e o resveratrol. Espera-se que os resultados apresentados neste boletim sejam utilizados posteriormente na determinação voltamétrica de compostos fenólicos em extratos vegetais, auxiliando pesquisas relacionadas à avaliação da capacidade antioxidante ou poder redutor in vitro de extratos de plantas e alimentos e à defesa de plantas contra fatores bióticos e abióticos.

## Material e Métodos

---

**Reagentes:** Foram utilizados padrões da marca Sigma-Aldrich, com pureza >98% de ácidos fenólicos (ácido vanílico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido ferrúlico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico), de flavonoides (hesperetina, campferol, miricetina, naringenina, cianidina,

delfinidina, catequina e quercetina), de taninos e derivados (ácido tânico e ácido elágico) e de resveratrol (estilbeno). Foram preparadas soluções estoque destes padrões com concentrações de  $1,0 \times 10^{-4}$  a  $3,3 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> utilizando o etanol (Sigma-Aldrich) e água purificada (Milli-Q), na proporção de (1:1 v/v). Em seguida, as soluções foram armazenadas em frascos escuros e levados ao freezer (-20°C) para evitar a fotodegradação. Tampões fosfato, com faixa de pH de 3,0 à 7,8, utilizados como eletrólito-suporte, foram preparados utilizando fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), todos da marca Sigma-Aldrich. O eletrodo de trabalho de carbono vítreo foi limpo utilizando alumina (óxido de alumínio) com granulometria <10 µm (Sigma-Aldrich). Para a lavagem da vidraria e frascos diversos foi utilizado ácido nítrico (Quimex) 20 % (v/v).

**Aparato instrumental:** Para as medidas voltamétricas foi utilizado o potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Metrohm®) acoplado a uma célula eletroquímica composta pelos eletrodos: carbono vítreo ( $\Phi = 2\text{mm}$ ) (eletrodo de trabalho), Ag/AgCl (KCl 3 molL<sup>-1</sup>) (eletrodo de referência) e platina (eletrodo auxiliar). Os eletrodos também eram da marca Metrohm. O software do equipamento foi o NOVA, versão 1.8. Para a limpeza do eletrodo foi utilizado o ultrassom da marca Cristófoli Biossegurança, com potência de 170 W e frequência de 60 Hz. Para os ajustes de pH dos tampões foi usado o pHmetro da marca Lucadema (LUCA-210). Para agitação da solução na célula eletroquímica foi utilizado o agitador magnético da marca Gostirrer (MS-H-Pro). A água utilizada para as soluções e lavagens foi purificada pelo sistema de purificação de água da marca Millipore. Para as medidas experimentais, foram utilizadas pipetas da marca Gilson, com suas calibrações em dia, e a balança analítica da marca Shimadzu com verificação intermediária realizada.

**Procedimento experimental:** A célula eletroquímica foi montada conectando-se os eletrodos de trabalho de carbono vítreo, de referência de Ag/AgCl e o de platina, ao potenciostato por meio dos conectores elétricos próprios do equipamento. Antes do início de cada medida voltamétrica, o eletrodo de carbono vítreo foi polido em suspensão de alumina por 2 minutos

sob um disco de feltro, lavado com água ultrapura e colocado no ultrassom por 5 minutos em meio a acetona e por mais 5 minutos em meio a etanol. Por fim, os eletrodos foram lavados novamente com água ultrapura. Após esta etapa de limpeza, foi realizado o tratamento eletroquímico do eletrodo aplicando-se 10 ciclos de varredura em potenciais de -1,5 a 1.5 V a  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , em tampão fosfato, pH 7,0. Na otimização da técnica de voltametria de pulso diferencial, os parâmetros eletroquímicos e experimentais relacionados ao pH, velocidade de varredura ( $v$ ) e amplitude de pulso ( $u$ ) foram estudados de modo a se obter para cada composto fenólico o melhor sinal voltamétrico, isto é, um perfil com pico(s) de sinal(is) de corrente de oxidação elevado(s) e sem interferentes. As etapas do procedimento adotado nas otimizações envolveram: a) a adição de 10 mL do eletrólito suporte (tampão fosfato  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) à célula eletroquímica e obtenção do voltamograma referente ao branco; b) a adição de um volume ( $\mu\text{L}$ ) da solução padrão do composto fenólico na célula eletroquímica contendo o tampão; c) a agitação da solução por 1 min utilizando um agitador magnético e posterior repouso por 5 segundos (tempo de equilíbrio); d) a obtenção do voltamograma do composto fenólico. Os estudos de otimização da técnica voltamétrica foram realizados a partir de soluções contendo somente um padrão do composto fenólico, por vez, não sendo, portanto, uma solução com padrões combinados. Os parâmetros eletroquímicos e de análise adotados nas otimizações estão descritos na tabela 1:

Tabela 1. Parâmetros eletroquímicos e condições experimentais utilizados nos estudos de otimização do pH, da velocidade de varredura e da amplitude de pulso:

Parâmetros	Estudo do pH	Estudo da velocidade de varredura	Estudo da amplitude de pulso
Técnica utilizada	Voltametria de pulso diferencial		
Amplitude de pulso (mV)	50	50	10, 25, 50, 100
Velocidade de varredura (mV s <sup>-1</sup> )	50	10, 25, 50, 100	50
Potencial inicial (V)	0,0 - 0,2	0,0 - 0,2	0,0 - 0,2
Potencial final (V)	0,8 - 1,2	0,8 - 1,2	0,8 - 1,2
Eletrólito suporte	Tampão fosfato pH 3, 4, 5, 6 e 7	Tampão fosfato pH 3	Tampão fosfato pH 3
Volume do composto fenólico adicionado (concentração do estoque de $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,3 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> )	25 - 200 µL	25 - 200 µL	25 - 200 µL

A demonstração de que os métodos voltamétricos conduzem a resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido foi realizada por meio de um processo conhecido como validação (ABNT, 2017; Inmetro, 2016). A validação da técnica voltamétrica de detecção e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada por meio da obtenção de seis parâmetros de validação ou das figuras analíticas de mérito (linearidade, faixa linear, limites de detecção e quantificação, repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia), seguindo, o documento orientador da Divisão de Acreditação de Laboratórios do INMETRO (Inmetro, 2016). Todos os parâmetros de validação descritos no documento orientador do Inmetro seguem publicações internacionais, listados em sua seção “documentos

de referência". Os resultados dos parâmetros de validação apresentados neste boletim foram calculados a partir de experimentos com os padrões dos compostos fenólicos nas melhores condições de análise. Não foi objetivo deste boletim apresentar dados de detecção e quantificação em amostras reais, desta forma o efeito matriz sobre o sinal dos compostos fenólicos não foi apresentado aqui. A seletividade do método voltamétrico se refere neste trabalho somente aos diferentes potenciais de oxidação obtidos nas melhores condições para os compostos fenólicos, que corresponde a um parâmetro de identificação do composto. Os detalhes dos procedimentos adotados na validação da técnica voltamétrica para a detecção e quantificação de compostos fenólicos, utilizando padrões puros, estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Procedimentos para obtenção dos parâmetros de validação da técnica voltamétrica de detecção e quantificação de compostos fenólicos.

Parâmetro	Procedimento
<b>Linearidade</b>	A linearidade de um método é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração da espécie química de interesse na amostra. Para a determinação da linearidade do método voltamétrico, foram construídas curvas analíticas. Para isto, foram feitas adições fixas e sequenciais de volumes de padrões de compostos fenólicos com concentrações definidas na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato. Para cada adição do padrão, foram feitas as medidas eletroquímicas de acordo com as condições de análise previamente otimizadas. Uma curva de corrente de oxidação versus concentração do composto fenólico com no mínimo 6 pontos foi construída. As medidas de corrente para cada concentração foram feitas em triplicata e valores aberrantes foram eliminados utilizando o teste estatístico de Grubbs. Avaliou-se a linearidade do método aplicando-se o teste de Cochran (95% de confiança). No resultado deste teste, quando $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$ , o método era considerado linear. Aplicou-se a regressão linear e calculou-se o coeficiente de correlação (r). Um valor de coeficiente > 0,90 foi requerido para uma correlação aceitável.
<b>Faixa linear</b>	A faixa linear foi determinada por meio da curva analítica de cada composto fenólico, identificando-se os limites inferior e superior de concentração dentro da resposta linear.

<p><b>Limite de detecção (LD)</b></p>	<p>O LD representa a menor quantidade da espécie química de interesse que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada com um valor exato. Experimentalmente, o LD foi determinado por meio da medida da menor corrente de oxidação mensurável, após adição de um volume de padrão de composto fenólico na célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato. Foram realizadas, no mínimo, sete repetições desta medida utilizando os parâmetros eletroquímicos e de análise previamente otimizados para cada composto fenólico. Para o cálculo do LD, utilizou-se a equação:</p> $LD = 0 + t(n-1, 1-\alpha).s$ <p>sendo:</p> <p>t = distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra (mínimo n= 7) e do grau de confiança (adotou-se 95%) e, s = desvio-padrão dos valores das menores correntes de oxidação medidas, após adição do composto fenólico na célula eletroquímica. Para a obtenção do LD em termos de concentração, construiu-se uma curva analítica de sete pontos com concentrações do composto fenólico próximas ao limite inferior (menor concentração) da faixa linear anteriormente estabelecida. Por meio da equação da reta, converteu-se o valor do LD para concentração do composto fenólico em mol L<sup>-1</sup>.</p>
<p><b>Limite de quantificação (LQ)</b></p>	<p>Limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico é a menor quantidade da espécie química de interesse na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Experimentalmente, o LQ foi estabelecido como a concentração do primeiro ponto da curva analítica de cada composto fenólico.</p>
<p><b>Repetibilidade (precisão intra-dia)</b></p>	<p>A condição de repetibilidade de medição é a condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas durante um curto período de tempo. A repetibilidade do método voltamétrico foi obtida realizando-se sete medidas voltamétricas independentes do composto fenólico, em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) ao longo da faixa linear, todas realizadas no mesmo dia e pelo mesmo operador. Os parâmetros eletroquímicos e de análise foram aqueles anteriormente otimizados. Por fim, calculou-se o desvio padrão relativo (DPR %) dos picos de corrente de oxidação obtidos em cada concentração. Um valor de DPR &lt; 15% foi requerido para uma precisão satisfatória.</p>

<b>Precisão intermediária (precisão-inter-dia)</b>	A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada em condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas utilizando analistas diferentes ou diferentes equipamentos ou diferentes tempos. A precisão do método voltamétrico foi obtida realizando-se 3 medidas voltamétricas independentes do composto fenólico, em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) ao longo da faixa linear, todas realizadas em três dias diferentes e pelo mesmo operador. Os parâmetros eletroquímicos e de análise foram aqueles anteriormente otimizados. Por fim, calculou-se o desvio padrão relativo (DPR %) dos picos de corrente de oxidação obtidos em cada concentração. Um valor de DPR < 20% foi requerido para uma precisão satisfatória.
--	--

A vidraria utilizada nos experimentos foi submetida à lavagem com água potável e sabão, seguida por lavagem com água destilada, imersão em solução  $\text{HNO}_3$  20% por 12 horas e imersão em água ultrapura por mais 12 horas. A secagem foi feita em temperatura ambiente. Os resíduos dos compostos fenólicos, dos ácidos e dos solventes foram descartados em reservatórios apropriados e inseridos no programa de gerenciamento de resíduos da unidade.

Os dados obtidos dos experimentos de otimização e validação da técnica voltamétrica foram registrados em ata e em planilhas do Microsoft Office Excel (versão 2010). Os voltamogramas foram construídos a partir do software NOVA 1.8, próprio para operação do analisador voltamétrico. Testes estatísticos específicos, como o teste de Grubbs, usado para descartar valores aberrantes e o teste de Crochan, para testar a linearidade, foram realizados seguindo referências bibliográficas indicadas no documento Inmetro (2016). Os cálculos de média, desvio padrão e desvio padrão relativo dos conjuntos de dados foram efetuados utilizando o software Excel (versão 2010). A regressão linear e a equação da reta das curvas analíticas também foram obtidas por meio do software Excel (versão 2010).

## Resultados e Discussão

---

A característica química marcante dos compostos fenólicos, que explica fortemente seus benefícios à saúde, à defesa química de plantas e atuação na síntese verde de nanopartículas metálicas é a sua atividade antioxidante. Esta característica explica-se pelo forte poder redutor, isto é, na capacidade que estes compostos possuem de doar elétron e/ou prótons para uma espécie com potencial redutor menor, como um radical livre. Todos os compostos fenólicos estudados apresentam em suas estruturas químicas, um ou mais grupos hidroxila (OH), eletroativos, ligados em posições variadas ao anel aromático. O mecanismo de oxidação envolve basicamente a desprotonação dos grupos OH, a transferência de 1 ou 2 elétrons mais a liberação de 1 ou 2 H<sup>+</sup> e formação de uma quinona. Os compostos fenólicos ainda, por conjugação, podem estabilizar o radical fenoxil formado (Kilmartin et al., 2001; Sousa et al., 2004; Simic et al., 2007) (Figura 1). Nos ácidos fenólicos, grupos específicos ligados ao anel aromático podem aumentar ou diminuir a capacidade do composto fenólico de estabilizar radicais livres. Neste contexto, o que pode determinar o aumento da capacidade antioxidante será o número de hidroxilas ligadas ao anel e ainda a presença do grupo (–CH=CH–COOH) na estrutura, pois há possibilidade de conjugação da dupla ligação com as duplas ligações do anel. Desta forma, os derivados do ácido hidroxicinâmico, como o ácido ferrúlico, possuem melhor atividade antioxidante que os derivados do ácido hidroxibenzoico aqui estudados (vanílico, siríngico, salicílico, protocatequínico, 4-hidroxibenzoico). Dentre os derivados dos ácidos hidroxibenzoicos, sabe-se também que a metoxilação de hidroxila(s) ligada(s) ao anel fenólico, como no ácido, siríngico e vanílico, resultam no decréscimo da capacidade antioxidante (Rice-Evans et al., 1996).

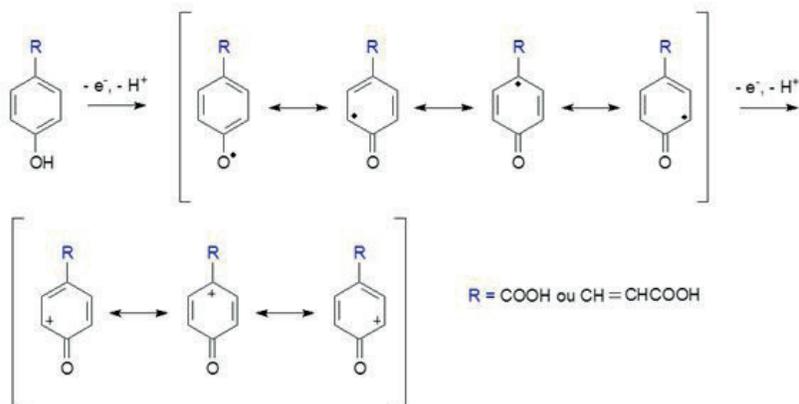


Figura 1: Mecanismo de oxidação de um ácido fenólico. R=COOH (ácido fenólico derivado do ácido hidroxibenzoico), R=CH=CHCOOH (ácido fenólico derivado do ácido hidroxicinâmico) (SIMIE et al., 2007).

Uma das vantagens das técnicas voltamétricas é a capacidade de se determinar o potencial de oxidação dos compostos fenólicos e relacioná-lo com sua capacidade antioxidante ou poder redutor. Na literatura, resultados demonstraram uma boa correlação entre os baixos potenciais de oxidação ( $E_{pa}$  entre 0,2 a 0,45 V dos compostos fenólicos e uma maior capacidade antioxidante, quando outros testes envolvendo sequestro de radicais livres foram aplicados (Sousa et al., 2004; Plaza et al., 2014. No nosso trabalho, como pode ser visto na tabela 3, nas melhores condições eletroquímicas e de análise, todos os ácidos fenólicos estudados expressaram picos de corrente de oxidação em potenciais na faixa de 0,2 a 0,4 V, e em pHs na faixa de 3,0 a 4,0, o que demonstra que os ácidos fenólicos estudados podem apresentar boa atividade antioxidante *in vitro* e em meio ácido.

Em relação aos compostos fenólicos da classe dos flavonoides, os compostos estudados expressaram picos de corrente de oxidação mais intensos em potenciais na faixa de 0,3 - 0,4 V, e em pHs na faixa de 3,0 a 5,0 (Tabela 3. A atividade antioxidante dos flavonoides depende de vários fatores, sendo que, a substituição de átomos de hidrogênio no anel B por hidroxilas, desempenha o papel mais importante. A deslocalização eletrônica entre o anel B e o resto da molécula permite uma boa estabilização do radical formado e contribui assim para o aumento da atividade antioxidante da molécula (Figura 2. O nível de oxidação no anel C define classes distintas

de flavonoides: antocianidinas, flavanois, flavanonas, flavonois, entre outros (Gil; Couto, 2013). No nosso trabalho, foram estudados flavonois (campferol, miricetina e quercetina), flavanois (catequina), antocianidinas (cianidina e delphinidina) e flavanonas (naringenina e hesperetina).

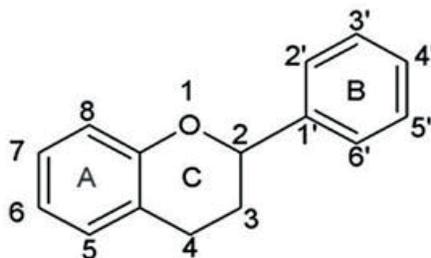


Figura 2: Estrutura básica de um flavonoide (Panche et al., 2016)

O ácido tânico é um composto fenólico da classe dos taninos hidrolisáveis, que compreendem principalmente os galotaninos e os elagitaninos, onde a D-glicose, que é a unidade estrutural básica, possui grupos hidroxilas esterificados pelos ácidos gálico e ácido hexahidroxidifenólico, respectivamente. O ácido tânico é um galotanino, cuja hidrólise resulta em unidades de ácido gálico. A hidrólise dos elagitaninos resulta na liberação do ácido hexahidroxidifenólico que espontaneamente desidrata formando sua dilactona estável, o ácido elágico (Battestin et al., 2004). A oxidação de taninos hidrolisáveis ocorre via desprotonação dos grupamentos hidroxilas das unidades de ácidos fenólicos existentes na estrutura. Neste trabalho, o ácido tânico e o ácido elágico apresentaram perfis voltamétricos com picos de corrente de oxidação mais intensos em potenciais da ordem de 0,2-0,3V, e em pHs de 3,0 e 7,8, respectivamente (Tabela 3). A figura 3 mostra o mecanismo de oxidação do ácido tânico, que resulta da desprotonação das unidades de ácido gálico (Ahmad, 2014).

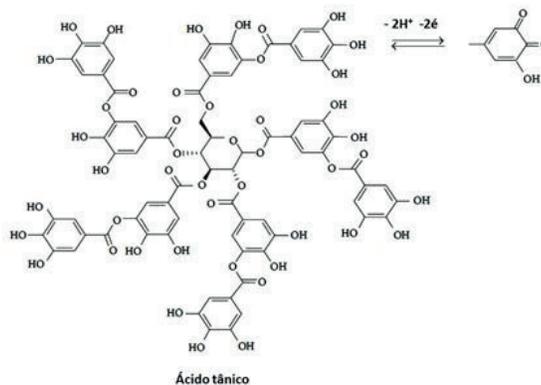


Figura 3: Mecanismo de oxidação do ácido tânico (Ahmad, 2014).

Ainda dentre os compostos estudados, o resveratrol, inserido na classe dos estilbenos, apresenta dois anéis benzênicos, um portando duas hidroxilas e outro apenas uma, caracterizando um polifenol (Figura 4). A presença de uma ligação dupla entre os anéis aromáticos estende a deslocalização eletrônica, com possibilidade de isomeria *cis* e *trans*. Nas condições experimentais e eletroquímicas otimizadas no nosso trabalho, o pico de corrente de oxidação em  $E_{pa} = 0,3$  V, em pH = 5,0 (Tabela 3), corresponde à oxidação do grupo hidroxila na posição 4' do anel aromático do resveratrol (Zhang, et al., 2007).

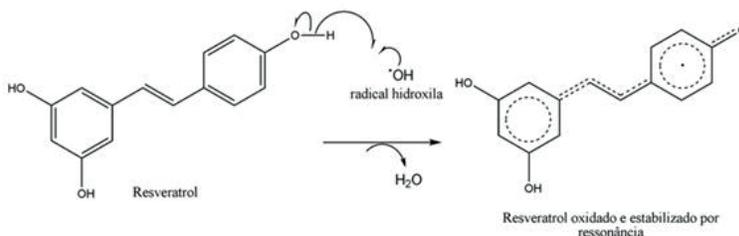


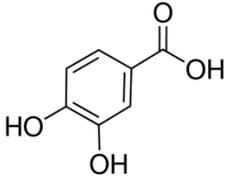
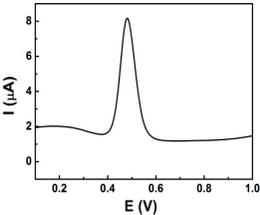
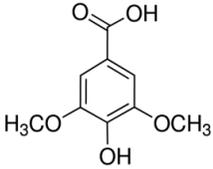
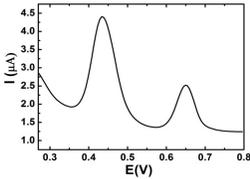
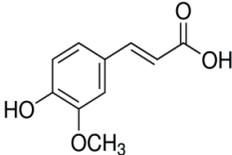
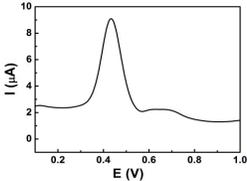
Figura 4: Mecanismo de oxidação do resveratrol e estabilização do radical fenoxila (SBQ, 2020)

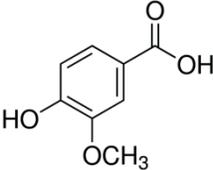
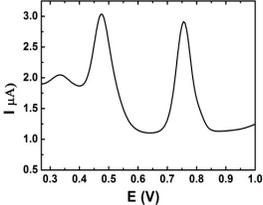
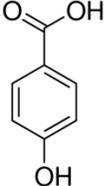
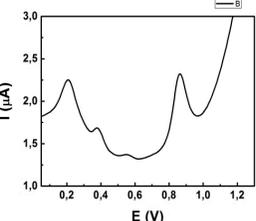
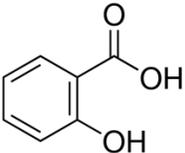
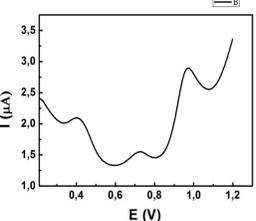
Para todos os compostos fenólicos estudados, os parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial, referentes à amplitude de pulso e a velocidade de varredura apresentaram como melhores valores 50 mV e 50 mVs<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 3). Valores de amplitude de pulso, acima de 50 mV, resultaram em um aumento do pico de corrente de oxidação, no entanto, com conseqüente alargamento da base. Os valores da velocidade de varredura acima de 50 mVs<sup>-1</sup> provocaram uma diminuição do pico de corrente de oxidação dos compostos fenólicos, devido ao comportamento cinético de reação do eletrodo, no qual altas velocidades de varredura reduziram a taxa de transferência de elétrons entre o eletrodo e o composto fenólico.

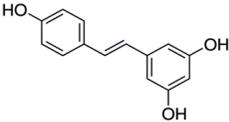
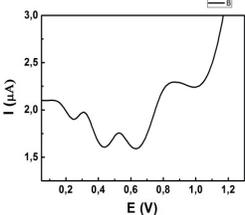
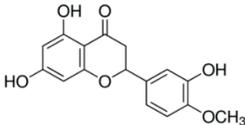
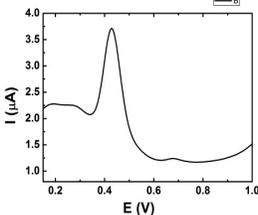
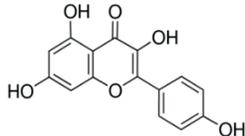
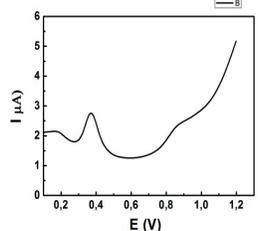
Uma característica importante dos métodos voltamétricos que deve ser mencionada, é sua limitação quanto à detecção seletiva dos compostos fenólicos. Como pode ser observado na tabela 3, vários compostos fenólicos apresentaram picos de corrente de oxidação sensíveis no mesmo potencial. Desta forma, estas informações deverão ser levadas em conta em uma determinação qualitativa de compostos fenólicos numa amostra de planta, nos quais vários compostos estarão presentes. Entretanto, muito do que se faz é pesquisar preliminarmente a composição da amostra na literatura para tentar de antemão conhecer os compostos alvos e os possíveis interferentes.

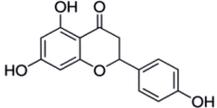
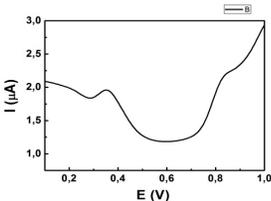
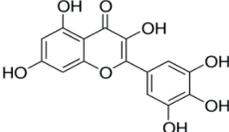
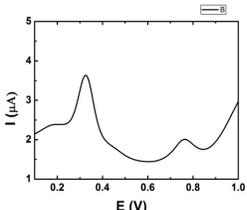
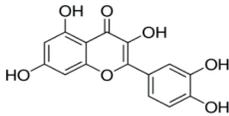
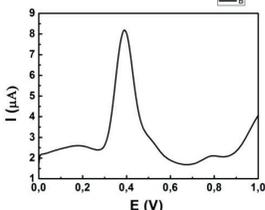
Outros procedimentos adotados em métodos voltamétricos para aumentar a seletividade é o uso de análises quimiométricas ou a modificação da superfície de eletrodos (Zhang et al., 2010; Ziyatdinova et al., 2014). Já numa determinação quantitativa, deve-se adotar um padrão de quantificação cuja resposta seja sensível e desprovida de interferentes. Desta forma, na Voltametria, os resultados das análises quantitativas muitas vezes resultam em concentrações em termos de compostos fenólicos totais.

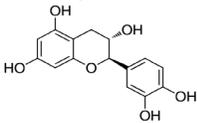
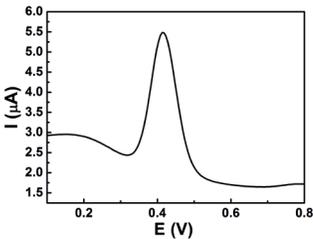
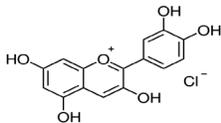
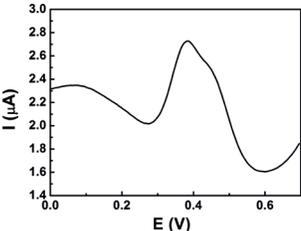
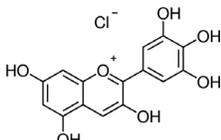
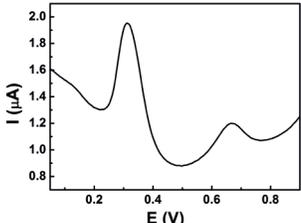
Tabela 3: Estruturas e perfis voltamétricos dos compostos fenólicos estudados, diante das melhores condições eletroquímicas e de análise obtidas.

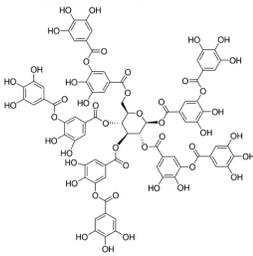
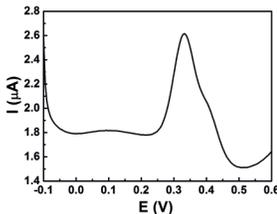
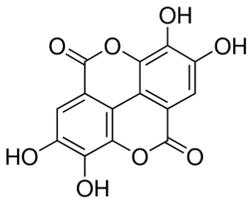
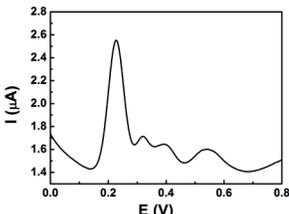
Composto fenólico Estrutura Química	Melhores condições eletroquímicas e de análise encontradas	Perfil voltamétrico
<p>Ácido protocatequínico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3 Amplitude de pulso= 50 mV Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup> E<sub>pa</sub> = 0,48 V</p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 µL do ácido protocatequínico 3,3 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Ácido siríngico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3 Amplitude de pulso= 50 mV Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup> E<sub>pa1</sub> = 0,44 V E<sub>pa2</sub> = 0,65 V</p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 µL de ácido siríngico 1,0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Ácido ferrúlico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3 Amplitude de pulso= 50 mV Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup> E<sub>pa1</sub> = 0,41 V E<sub>pa2</sub> = 0,75 V</p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 µL do ácido ferrúlico 1,0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> em 10 mL de tampão fosfato</p>

<p>Ácido vanílico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,48 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,75 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 µL do ácido vanílico <math>1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Ácido 4-hidroxibenzoico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 4          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,21 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,38 \text{ V}</math>  <math>E_{pa3} = 0,86 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 µL do ácido 4-hidroxibenzoico <math>1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Ácido salicílico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3          Amplitude de pulso = 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,39 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,73 \text{ V}</math>  <math>E_{pa3} = 0,97 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 µL do ácido salicílico <math>2,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>

<p>Resveratrol</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 5          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,30 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,52 \text{ V}</math>  <math>E_{pa3} = 0,79 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 <math>\mu\text{L}</math> do resveratrol <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Hesperetina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,43 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 <math>\mu\text{L}</math> da hesperetina <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Campferol</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 5          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,37 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,86 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de Pulso Diferencial de 200 <math>\mu\text{L}</math> de campferol <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>

<p>Naringenina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 4          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,36 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,82 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 <math>\mu\text{L}</math> da naringenina <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Miricetina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 4          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,32 \text{ V}</math>  <math>E_{pa3} = 0,76 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 <math>\mu\text{L}</math> da miricetina <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Quercetina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,39 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,78 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 200 <math>\mu\text{L}</math> da quercetina <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>

<p>Catequina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3,0          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,41 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 50 μL da catequina <math>1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Cianidina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 4,0          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,38 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 25 μL de cianidina <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Delfindina</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 5,0          Amplitude de pulso= 50 mV          Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup>  <math>E_{pa1} = 0,32 \text{ V}</math>  <math>E_{pa2} = 0,68 \text{ V}</math></p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 50 μL de delfindina <math>1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}</math> em 10 mL de tampão fosfato</p>

<p>Ácido tânico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 3,0 Amplitude de pulso= 50 mV Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup> E<sub>pa1</sub> = 0,33V</p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 35 μL de ácido tânico 1,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em 10 mL de tampão fosfato</p>
<p>Ácido elágico</p> 	<p>Eletrólito suporte: Tampão fosfato pH = 7,8 Amplitude de pulso= 50 mV Velocidade de varredura = 50 mVs<sup>-1</sup> E<sub>pa1</sub> = 0,22 V E<sub>pa2</sub> = 0,54 V</p>	 <p>Voltamograma de pulso diferencial de 55 μL de ácido elágico 1,0 × 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> em 10 mL de tampão fosfato</p>

Fonte das estruturas: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/>> acessado em 02 de maio de 2020. E<sub>pa</sub> = Potencial de pico anódico. Nos voltamogramas E (V)= potencial de oxidação em volts. I (μA) = corrente de oxidação em microampére.

Após a etapa de otimização dos parâmetros voltmétricos de análise e obtenção dos melhores perfis voltamétricos dos compostos fenólicos, partiu-se para o processo de obtenção dos parâmetros de validação. Os parâmetros de validação, determinados para cada composto fenólico, demonstraram a eficiência da técnica de voltametria de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo na detecção e quantificação de compostos fenólicos.

A técnica voltamétrica de detecção e quantificação de compostos fenólicos apresentou resposta linear entre as correntes de oxidação (I<sub>a</sub>) e as concentrações dos compostos, nas faixas de concentração estudadas. Esta

relação linear é baseada nas equações derivadas da teoria da polarografia/voltametria (Bard; Faulkner, 2001). O teste estatístico de Crochan demonstrou que há homogeneidade das variâncias dos resíduos ao longo das curvas analíticas, o que confirma a linearidade dos métodos voltamétricos. As equações das retas que relacionam matematicamente ( $I_a$ ) e as concentrações dos compostos fenólicos apresentaram coeficientes de correlação acima de 0,99. Os limites de quantificação (LQ) e os limites de detecção (LD) foram considerados baixos e variaram de  $2,5 \times 10^{-7}$  a  $1,7 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> e de  $1,5 \times 10^{-8}$  a  $5,3 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados dos parâmetros de validação calculados para a técnica voltamétrica de detecção e quantificação de compostos fenólicos.

Composto fenólico/Potencial de pico	Equação da curva [composto fenólico(mol L <sup>-1</sup> )]	Faixa linear (mol L <sup>-1</sup> )	Teste de Crochan/ Coeficiente de correlação	Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )	Limite de quantificação (mol L <sup>-1</sup> )
<b>Ácido protocatequínico</b> $E_{pa} = 0,48V$	$I(A) = 0,1348$ [ac. 3,4 dihidrox.] – $2 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-7} -$ $9,5 \times 10^{-6}$	$C_{calc}$ (0,2717) < $C_{tab}$ (0,4775) ( $\alpha=0,05$ ; k = 9, n=3) r = 0,9914	$2,4 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-7}$
<b>Ácido ferúlico</b> $E_{pa} = 0,41V$	$I(A) = 0,0498$ [ac. ferulico] – $1 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-6} -$ $1,7 \times 10^{-5}$	$C_{calc}$ (0,5401) < $C_{tab}$ (0,5612) ( $\alpha=0,05$ ; k = 7, n=3) r = 0,9988	$4,3 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
<b>Ácido salicílico</b> $E_{pa} = 0,39V$	$I(A) = 0,0875$ [ac. salicílico] - $4 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-6} -$ $7,0 \times 10^{-6}$	$C_{calc}$ (0,3434) < $C_{tab}$ (0,5612) ( $\alpha=0,05$ ; k = 7, n=3) r=0,9927	$5,4 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
<b>Ácido vanílico</b> $E_{pa} = 0,48V$	$I(A) = 0,1549$ [ac. vanílico] + $2 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-7} -$ $6,5 \times 10^{-6}$	$C_{calc}$ (0,4909) < $C_{tab}$ (0,6161) ( $\alpha=0,05$ ; k = 6, n=3) r=0,9965	$6,5 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-7}$

<b>Ácido siríngico</b> $E_{pa} = 0,44V$	$I(A) = 0,0614$ [ac. siríngico] – $2 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-6}$ – $7,0 \times 10^{-6}$	$C_{calc}$ (0,4095) < $C_{tab}$ (0,5612) ( $\alpha=0,05$ ; $k = 7$ , $n=3$ ) $r=0,9985$	$4,4 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
<b>Resveratrol</b> $E_{pa} = 0,30 V$	$I(A) = 0,078$ [resveratrol]+ $2 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$ – $7,0 \times 10^{-6}$	$C_{calc}$ (0,4918) < $C_{tab}$ (0,5612) ( $\alpha=0,05$ ; $k = 7$ , $n=3$ ) $r=0,9929$	$3,3 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
<b>Ácido 4-hidroxibenzoico</b> $E_{pa} = 0,21V$	$I(A) = 0,0656$ [ácido 4-hidroxibenzoico]+ $1 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$ – $6,0 \times 10^{-5}$	$C_{calc}$ (0,3035) < $C_{tab}$ (0,6161) ( $\alpha=0,05$ ; $k = 6$ , $n=3$ ) $r=0,9940$	$5,3 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$
<b>Quercetina</b> $E_{pa} = 0,39V$	$I(A) = 0,0363$ [quercetina] – $1 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-6}$ – $2,0 \times 10^{-5}$	$C_{calc}$ (0,3976) < $C_{tab}$ (0,5232) ( $\alpha=0,05$ ; $k = 7$ , $n=3$ ) $r=0,9926$	$1,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$
<b>Hesperetina</b> $E_{pa} = 0,43V$	$I(A) = 0,0475$ [hesperetina] - $9 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$	$C_{calc}$ (0,5883) < $C_{tab}$ (0,6161) ( $\alpha=0,05$ ; $k = 6$ , $n=3$ ) $r=0,9931$	$1,7 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$

$E_{pa}$  = Potencial de pico anódico (de oxidação),  $C_{tab}$  = Coeficiente de Crochan tabelado (95% de confiança),  $C_{cal}$  = Coeficiente de Crochan calculado,  $n$  = número de repetições para cada nível de concentração,  $k$  = número de níveis de concentração.

O Limite de detecção (LD) é considerado um bom parâmetro de comparação de métodos, pois mensura uma das mais importantes figuras de mérito do método analítico. Quanto menor este valor, maior é o poder do método em detectar o composto alvo. Os métodos baseados em cromatografia são bastante seletivos e possuem baixos limites de detecção. Os limites de detecção do método voltamétrico obtidos neste trabalho são compatíveis com

os limites obtidos por métodos baseados em cromatografia líquida (HPLC) com detecções UV, com arranjo de diodos (DAD) e eletroquímica (ED) (Tabela 5). Em relação à comparação com outros métodos eletroquímicos, a utilização de eletrodos de carbono vítreo modificados pode levar a um desempenho melhor quanto ao LD. Isto pode ser verificado nos trabalhos de Wan et al. (2007); Abdel-Hamid et al. (2019) e Bharathi et al. (2018), que utilizaram eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono (CNT), grafeno (GPH) e nanopartículas de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) para determinar taninos e ácidos fenólicos. Apesar deste melhor desempenho, nosso trabalho apresentou um método voltamétrico com custo mais baixo e um menor tempo de análise, pois não foram adotadas etapas extras de modificação do eletrodo de trabalho. Desta forma, menos reagentes foram utilizados e as análises foram mais ágeis. No trabalho de Jardim et al. (2013), um método voltamétrico que utiliza o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) para a determinação do ácido vanílico apresenta um LD maior do que o obtido no nosso trabalho.

Tabela 5: Dados da literatura que mostram limites de detecção (LD) alcançados por métodos que utilizaram técnicas cromatográficas com diferentes detectores e técnicas eletroquímicas na análise de compostos fenólicos.

Composto(s) fenólico(s)	Técnica utilizada	LD (mol L <sup>-1</sup> )	Referência
Ácido protocatequínico	HPLC-DAD-ED	$3,0 \times 10^{-5}$	Plaza et al., 2014
Ácido siríngico Ácido vanílico Ácido ferrúlico	HPLC-DAD-ED	$2,4 \times 10^{-7}$ $2,3 \times 10^{-7}$ $1,4 \times 10^{-6}$	Lamarca et al. (2018)
Ácido -4 hidroxibenzoico	HPLC-DAD	$7,2 \times 10^{-6}$	Dhanani et al. (2015a)
Ácido salicílico	GC-MS	$1,7 \times 10^{-6}$	Huang et al. (2015)
Quercetina Resveratrol	HPLC-DAD	$1,1 \times 10^{-6}$ $9,6 \times 10^{-7}$	Da Silva et al. (2017)
Campferol	HPLC- DAD	$2,1 \times 10^{-7}$	Natividade et al., 2013

Naringenina	HPLC-DAD	$3,8 \times 10^{-7}$	Gupta et al. (2012)
Catequina	HPLC-UV	$4,1 \times 10^{-8}$	Gottumukkala et al. (2014)
Ácido elágico	HPLC-DAD	$1,6 \times 10^{-6}$	Dhanani et al. (2015b)
Ácido vanílico	ASV-BDD	$1,6 \times 10^{-7}$	Yardim et al. (2013)
Ácido protocatequínico	SWV – CG + GPH	$1,0 \times 10^{-7}$	Abdel-Hamid et al. (2019)
Ácido ferrúlico	SWV – GC + rGO-TiO <sub>2</sub>	$1,0 \times 10^{-8}$	Bharathi et al. (2018)
Catequina	DPV-GC + CNT + PEDOTM	$1,3 \times 10^{-8}$	Yao et al. (2015)
Ácido tânico	DPV-GC + CNT	$8,0 \times 10^{-9}$	Wan et al. (2007)

HPLC-DAD-ED: Cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e amperométrica, HPLC-DAD: Cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos, GC-MS: Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas, HPLC-UV: Cromatografia líquida com detecção por espectrofotometria no ultravioleta/visível, ASV-BDD: Voltametria de redissolução anódica e eletrodo de diamante dopado com boro, SWV – CG + GPH: Voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno, SWV – GC + rGO-TiO<sub>2</sub>: Voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de óxido de titânio, DPV-GC + CNT + PEDOTM: Voltametria de pulso diferencial com eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e poli(3,4- etilenodioxitiofeno hidroximetilado).

Em relação à precisão do método voltamétrico, observou-se que tanto a repetibilidade (precisão intra-dia) quanto à precisão intermediária (precisão inter-dia) apresentaram valores satisfatórios com desvio padrão relativo < que 15% para a repetibilidade e < que 20% para a precisão intermediária (Tabela 6). Ambos os resultados de precisão, estão de acordo com os critérios de aceitação analíticos, quando se trabalha com concentrações de analito na faixa de ppb (partes por bilhão) a ppm (partes por milhão) (Inmetro, 2016).  
Tabela 6: Resultados dos estudos de precisão da técnica voltamétrica de detecção e quantificação de compostos fenólicos.

Composto fenólico	Repetibilidade DPR (%)	Precisão intermediária DPR (%)
Ácido protocatequínico	5,9 – 7,3	4,8 - 15
Ácido ferrúlico	4,4 – 6,5	4,9 – 9,5
Ácido salicílico	1,9 – 4,4	6,9 - 13
Ácido vanílico	1,7 – 5,8	1,8 - 10
Ácido siríngico	1,9 – 4,0	1,0 – 3,7
Ácido tânico	4,1 – 9,9	4,0 - 16
Ácido elágico	3,4 – 4,2	3,0 - 19
Resveratrol	3,4 - 7,0	5,4 – 15
Ácido 4-hidroxibenzoico	2,8 – 7,2	1,7 – 3,0
Quercetina	2,8 – 7,1	6,5 - 15
Hesperetina	4,7 – 7,3	7,3 - 15
Campferol	1,0 – 5,0	4,7 – 8,5
Naringenina	1,5 – 4,1	1,0 – 4,0
Miricetina	1,3 – 5,4	4,0 – 9,5
Catequina	3,0 – 12	10 - 17
Cianidina	5,0 - 11	7,0 - 14
Delfinidina	7,1 - 13	3,0 - 15

## Conclusão

---

1. Os resultados da análise dos padrões de compostos fenólicos mostram que a técnica voltamétrica de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo pode ser utilizada na detecção e quantificação de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e estilbenos.

2. Devido à semelhança dos potenciais de oxidação de vários compostos fenólicos, verificada durante a obtenção dos perfis voltamétricos, a técnica voltamétrica de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo pode

ser aplicada na determinação simultânea de alguns compostos fenólicos de classes diferentes ou na quantificação de compostos fenólicos totais em amostras reais.

3. Os resultados das figuras analíticas de mérito ou parâmetros de validação da técnica voltamétrica de pulso diferencial e eletrodo de carbono vítreo obtidos das análises dos padrões de compostos fenólicos mostram que a técnica possui boa precisão, baixos limites de quantificação e detecção e faixa linear que permite a quantificação em amostras reais.

4. Antes da aplicação da técnica voltamétrica para a detecção e quantificação de compostos fenólicos em amostras reais, estudos de efeito matriz para verificação de interferentes terão que ser conduzidos.

## Agradecimentos

---

À Embrapa, pelo suporte financeiro (Projetos: 03.12.03.013.00.00 e 21.14.03.001.03.0) e ao CNPq pela bolsa de Iniciação científica (PIBIC) dada à Rosana Santos Cavalcante, no período de ocorrência da pesquisa.

Agradecemos também aos estagiários, Renata Dantas Machado, Caroline Matos Ribeiro e Vítor Akira Arake Shiratori pela obtenção de parte dos dados, que foram inseridos neste boletim.

## Referência Bibliográfica

---

ABDEL-HAMID, R.; NEWAIR, E. F. Voltammetric determination of polyphenolic content in pomegranate juice using a poly(gallic acid)/multiwalled carbon nanotube modified electrode. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 7, p. 1104-1112, 2016.

ABDEL-HAMID, R.; BAKR, A.; NEWAIR, E. F.; GARCIA, F. Simultaneous voltammetric determination of gallic and protocatechuic acids in mango juice using a reduced graphene oxide-based electrochemical sensor. **Beverages**, v. 5, n. 1, 17, 2019.

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:2017**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2017. 32 p.

AHMAD, T. Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, article ID 954206, 2014.

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y.-S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591-602, 2013.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

BALASUNDRAMA, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2001.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BHARATHI, T. D.; ANANDH, S. P.; RANGARAJAN, M. Differential pulse voltammetric detection of ferulic acid using rGO-TiO<sub>2</sub> electrodes. In: IEEE India Council International Conference, 15., 2018, Coimbatore, India. **Indicon 2018**. IEEE, 2018. DOI: 10.1109/INDICON45594.2018.8986994.

BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 1, p. 71-81, 2004.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolismo, and nutritional significance. **Nutrition Review**, v. 56, p. 317-333, 1998.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 377- 399, 2014.

CICCO, N.; LANORTE, M. T.; PARAGGI, M.; VIGGIANO, M.; LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 107-110, 2009.

CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTEI, J. The role of polyphenols in human health and food systems: a mini-review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, article 87, 2018.

CUARTERO, M.; ORTUÑO, J. A.; TRUCHADO, P.; GARCÍA, M. S.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ALBERO, M. I. Voltammetric behaviour and square wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 549-554, 2011.

DA SILVA, L. F.; GUERRA, C. C.; CZERMAINSKI, A. B. C.; FERRARI, L.; BERGOLD, A. M. Validation of a chromatographic method to routine analysis of trans-resveratrol and quercetin in red wines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 335-343, 2017.

DHANANI, T.; SHAH, S.; KUMAR, S. A validated high performance liquid chromatography method for determination of three bioactive compounds, p-hydroxybenzoic acid, negundoside and agnuside in vitex species. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 321-331, 2015a.

DHANANI, T.; SHAH, S.; KUMAR, S. A validated high-performance liquid chromatography method for determination of tannin-related marker constituents gallic acid, corilagin, chebulagic acid, ellagic acid and chebulinic acid in four *Terminalia* species from India. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 4, p. 625-632, 2015b.

DOMÉNECH-CARBÓ, A.; CEBRIÁN, T. G.; LOPES, S. A.; MORAES, M. M.; MASSUO, J. K.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Electrochemical ecology: VIMP monitoring of plant defense against external stressors. **RSC Advances**, v. 5, p. 61006-61011, 2015.

EDREVA, A.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T.; DAGNON, S.; GÜREL, A. L.; GESHEVA, A. E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**, v. 34, n. 1-2, p. 67-78, 2008.

EUNYOUNG, H.; KIM, G. H. Comparison of extraction conditions for phenolic, flavonoid content and determination of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* var. *Acuta*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1353-1359, 2010.

FILIPIAK, M. Electrochemical analysis of polyphenolic compounds. **Analytical Sciences**, v. 17, suppl. i1667, 2001.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 10242-10297, 2013.

GIL, E. D.; COUTO, R. O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 542-558, 2013.

GOTTUMUKKALA, R. V. S. S.; NADIMPALLI, N.; SUKALA, K.; SUBBARAJU, G. V. Determination of catechin and epicatechin content in chocolates by high-performance liquid chromatography. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, article ID 628196, 2014.

GUDEJ, J.; TOMCZYK, M. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L.* species. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 1114-1119, 2004.

GUPTA, V.; SRIVASTAVA, M.; MAURYA, R.; PALIWAL, S. K.; DWIVEDI, A. K. HPLC method development for naringenin and its glucoside in rat serum and their bioavailability studies. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, v. S14, 2012.

HASSAN, O.; CHANG, T.; HOSSAIN, A. Changes in the secondary compounds of persimmon leaves as a defense against circular leaf spot caused by *Plurivorosphaerella nawae*. **PLoS One**, v. 15, n. 3, 2020.

HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (Ed.). Plant polyphenols: synthesis, properties, significance. New York: Plenum: Springer US, 1992. (Basic Life Sciences, 59). p. 1053.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HOYOS-ARBELÁEZ, J.; VÁZQUEZ, M.; CALDERÓN, J. C. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: a review. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1371-1381, 2017.

HUANG, Z.-H.; WANG, Z.-L.; SHI, B.-L.; WEI, D.; CHEN, J.-X.; WANG, S.-L.; GAO, B.-J. Simultaneous determination of salicylic acid, jasmonic acid, methyl salicylate, and methyl jasmonate from *Ulmus pumila* leaves by GC-MS. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, article ID 698630, 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

JARA-PALACIOS, M.; HERNANZ, D.; ESCUDERO-GILETE, M.L.; HEREDIA, F. J. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. **Food Research International**. v.66, p. 150–157, 2014.

JIMENEZ-GARCIA, S. N.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G.; MIRANDA-LOPEZ, R.; FERREGRINO-PEREZ, A. A.; TORRES-PACHECO, I.; VAZQUEZ-CRUZ, M. A. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and geno-mics. **Food Research International**, v. 54, n.1, p.1195–1207, 2013.

INMETRO. **DOQ-CGECRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2016. Revisão 5. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2020.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, n. 39, 2019.

KANCHEVA, V. D.; KASAIKINA, O. T. Bio-antioxidants - a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 37, p. 4784-4805, 2013.

KASHKOULI, S.; JAMZAD, M.; NOURI, A. Total phenolic and flavonoids contents, radical scavenging activity and green synthesis of silver nanoparticles by *Laurus nobilis* L. leaves aqueous extract. **Journal of Medicinal Plants and By-Products**, v. 1, p. 25-32, 2018.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KILMARTIN, P. A.; ZOU, H.; WATERHOUSE, A. L.; A cyclic voltammetry method for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1957-1965, 2001.

KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; NOVAK, I. Determination of ellagic acid in strawberries, raspberries and blackberries by square-wave voltammetry. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 4638-4647, 2011.

LAMARCA, R. S.; MATOS, R. C.; MATOS, M. A. C. Determination of phenolic acids in palm oil samples by HPLC-UV-AD using homemade flow cell. **Analytical Methods**, v. 10, p. 4535-4542, 2018.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCAN, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W.; WU, H.; CHEN, S. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 2, p. 1374, 2016.

MAGARELLI, G.; DA SILVA, J. G.; SOUSA FILHO, I. A. D.; LOPES, I. S. D.; DE SOUZA, J. R.; HOFFMANN, L. V.; DE CASTRO, C. S. P. Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 23-28, 2013.

MAOELA, M. S.; AROTIBA, O. A.; BAKER, P. G. L.; MABUSELA, W. T.; JAHED, N.; SONGA, E. A.; IWUOHA, E. I. Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, p. 1497-1510, 2009.

MARSLIN, G.; SIRAM, K.; MAQBOOL, Q.; SELVAKESAVAN, R. K.; KRUSZKA, D.; KACHLICKI, P.; FRANKLIN, G. Secondary metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. **Materials**, v. 11, p. 940, 2018.

MAZID, M.; KHAN, T.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, p. 232-249, 2011.

MIKULIC-PETKOVSEK, M.; SCHMITZER, V.; SLATNAR, A.; WEBER, N.; VEBERIC, R.; STAMPAR, F.; MUNDA, A.; KORON, D. Alteration of the content of primary and secondary metabolites in strawberry fruit by *Colletotrichum nymphae* infection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 61, p. 5987-5995, 2013.

MOHAMMADLOU, M.; MAGHSOUDI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H. A review on green silver nanoparticles based on plants: synthesis, potential applications and eco-friendly approach. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 446-463, 2016.

NATIVIDADE, M. M. P.; CORRÊA, L. C.; SOUZA DE, S. V. C.; PEREIRA, G. E.; LIMA, L. C. O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, v.110, p.665-674, 2013.

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

NOVELLI, S.; GISMONDI, A.; DI MARCO, G.; CANUTI, L.; NANNI, V.; CANINI, A. Plant defense factors involved in *Olea europaea* resistance against *Xylella fastidiosa* infection. **Journal of Plant Research**, v. 132, p. 439-45, 2019.

OKSANA, S.; MARIAN, B.; MAHENDRA, R.; HONGBO, S. Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 13, p. 2526-2539, 2012.

OLIVEIRA-NETO, J. R.; REZENDE, S. G.; REIS, C. F.; BENJAMIN, S. R.; ROCHA, M. L.; GIL, E. S. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. **Food Chemistry**, v. 190, n. 7, p. 506, 2016.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PALACIOS, J. M.-J.; HERNANZ, D.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J. Antioxidant potential of white grape pomaces: phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. **Food Research International**, v. 66, p. 150-157, 2014.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1-15, 2016.

PEREIRA, T. M.; POLEZ, V. L. P.; SOUSA, M. H.; SILVA, L. P. Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 34, p. 100224, 2020.

PISOSCHI, A. M.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G.; Electrochemical methods for total antioxidant capacity and its main contributors determination: a review. **Open Chemistry**, v. 13, p. 824–856, 2015.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 1, article 1000106, 2011.

PLAZA, M.; KARIUKI, J.; TURNER, C. Quantification of individual phenolic compounds' contribution to antioxidant capacity in apple: a novel analytical tool based on liquid chromatography with diode array, electrochemical, and charged aerosol detection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.62, n.2, p.409-418, 2014.

POPA, O. M.; DICULESCU, V. C. Electrochemical behaviour of isoflavones genistein and biochanin A at a glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 5, p. 1201-1208, 2013.

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

SBQ. Sociedade Brasileira de Química. **Resveratrol**. Disponível em: <<http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.140>>. Acesso em: 26 maio 2020.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recente developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 401-41, 2001.

SCHIJLEN, E. G.; RIC DE VOS, C. H.; VAN TUNEN, A. J.; BOVY, A. G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2631-2648, 2004.

ŠERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1208-1216, 2011.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SHARMA, V.; YNGARD, R.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.

SILVA, J. G.; SILVA, M. R. L.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZADE, J. R.; VAZ, C. M. P.; CASTRO, C. S. P. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of rutin in soybean cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2012.

SIMIC, A; MANOJLOVIC, D; SEGAN, D; TODOROVIC, M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. **Molecules**, v. 12, p. 2327-2340, 2007.

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

SOUSA, W. R.; ROCHA, C.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, V. B.; Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. **Journal of Food Composition and Analysis, Jena**, v. 17, p. 619-633, 2004.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

TUFARELLI, V.; CASALINO, E.; D'ALESSANDRO, A. G.; LAUDADIO, V. Dietary phenolic compounds: biochemistry, metabolism and significance in animal and human health. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 10, p. 905-913, 2017.

VENTURA, S. P. M.; SILVA, F. A.; QUENTAL, M. V.; MONDAL, D.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6984-7052, 2017.

WAN, H.; ZOU, Q.; YAN, R.; ZHAO, F.; ZENG, B. Electrochemistry and voltammetric determination of tannic acid on a single-wall carbon nanotube-coated glassy carbon electrode. **Microchimica Acta**, v. 159, p. 109-115, 2007.

WEIDNER, S.; AMAROWICZ, R.; KARAMAC' B, M.; FRTCZEKA, E. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 595-602, 2000.

YAO, Y.; ZHANG, L.; WEN, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H.; HU, D.; XU, J.; DUAN, X. Voltammetric determination of catechin using single-walled carbon nanotubes/poly(hydroxymethylated-3,4-ethylenedioxythiophene) composite modified electrode. **Ionics**, v. 21, n. 10, p. 2927-2936, 2015.

YARDIM, Y.; GÜLCAN, M.; SŞENTÜRK, Z. Determination of vanillin in commercial food product by adsorptive stripping voltammetry using a boron-doped diamond electrode. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1821-1827, 2013.

YE, J.-H.; AUGUSTIN, M.-A. Nano- and micro-particles for delivery of catechins: physical and biological performance. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1563-1579, 2019.

YUAN, S.; LI, W.; LI, Q.; WANG, L.; CAO, J.; JIANG, W. Defense responses, induced by p-Coumaric acid and methyl p-coumarate, of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit against black spot rot caused by *Alternaria alternata*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 67, p. 2801-2810, 2019.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; ABBAS, S.; SHARIF, Y.; UMAIR, M.; HAMMAD ZAFAR, M.; BAHADAR, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.

ZHANG, H.; XU, L.; ZHENG, J. Anodic voltammetric behavior of resveratrol and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine. **Talanta**, v. 71, p. 19-24, 2007.

ZHANG, H.; ZHAO, J.; LIU, H.; LIU, R.; WANG, H.; LIU, J. Electrochemical determination of diphenols and their mixtures at the multiwall carbon nanotubes/poly (3-methylthiophene) modified glassy carbon electrode. **Microchimica Acta**, v. 169, p. 277-282, 2010.

ZIYATDINOVA, G. K.; SAVELIEV, A. A.; EVTUGYN, G. A.; BUDNIKOV, H. C. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants with chemometric approaches. **Electrochimica Acta**, v. 137, n. 10, p. 114-120, 2014.

ZIYATDINOVA, G.; KOZLOVA, E.; BUDNIKOV, H. Poly(gallic acid)/MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 821, p. 73, 2018.



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL