

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JESSICA SANTOS GOMES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO POR
VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL PARA DETERMINAÇÃO DE
FLAVAN-3-OL EM FITOTERÁPICOS

UBERLÂNDIA – MG

2021

JESSICA SANTOS GOMES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO POR
VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL PARA DETERMINAÇÃO DE
FLAVAN-3-OL EM FITOTERÁPICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa

UBERLÂNDIA – MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G633d
2021 Gomes, Jessica Santos, 1997-
Desenvolvimento de método eletroanalítico por voltametria de pulso diferencial para determinação de Flavan-3-ol em fitoterápicos [recurso eletrônico] / Jessica Santos Gomes. - 2021.

Orientadora: Raquel M. F. de Sousa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5602>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. I. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 52

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047

JESSICA SANTOS GOMES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO POR
VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL PARA DETERMINAÇÃO DE
FLAVAN-3-OL EM FITOTERÁPICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa

Uberlândia, 26 de agosto de 2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Raquel M. F. de Sousa
(Orientadora – UFU)

Profa. Dra. Carla de Moura Martins
(Examinadora – Instituto Federal Goiano)

Prof. Dr. Thiago Faria Tormin
(Examinador – Fundação Presidente Antônio Carlos)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 327, PPGQUI				
Data:	Vinte e seis de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	15:00	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula do Discente:	11912QMI013				
Nome do Discente:	Jessica Santos Gomes				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de método eletroanalítico por voltametria de pulso diferencial de flavan-3-ol em Fitoterápicos				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de métodos de análises de metabólitos secundários de produtos naturais				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Google Meet, link <https://meet.google.com/yvw-kyfy-ibj>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Thiago Faria Tormin, da Fundação Presidente Antônio Carlos; Carla de Moura Martins, do Instituto Federal Goiano e Raquel Maria Ferreira de Sousa, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla de Moura Martins, Usuário Externo**, em 27/08/2021, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Faria Tormin, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3005121** e o código CRC **C426BB2E**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir concluir este trabalho.

A minha orientadora professora Dra. Raquel M. F. de Sousa pela oportunidade de trabalhar no projeto, a orientação, os ensinamentos, confiança e carinho. Obrigada por acreditar em mim e por todo o incentivo.

Ao professor Dr. Rodrigo A. A. Munoz por todo o auxílio que recebi antes e durante o mestrado.

Aos demais professores do NuPPEM (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) do Instituto de Química da UFU, obrigada pelos ensinamentos e contribuições em sala de aula e no laboratório.

Aos colegas do NuPPEM, alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, pelas conversas, companheirismo e auxílio ao longo desta etapa.

Ao pessoal do GrISA por toda ajuda, conversa e companheirismo.

Aos meus amigos Viotti, Eduardo e Geovanna. Obrigada por todo apoio e risadas mesmo que estivéssemos a algumas centenas de quilômetros distantes.

Aos meus afilhados Gabriela e Pedro e meu amigo Alan. Obrigada pela amizade, o apoio e o carinho.

À minha mãe e ao meu pai deixo um agradecimento especial, por todas as lições e suporte. Obrigada pelo amparo e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Aos meus irmãos Wemerson e Thiago pelo companheirismo.

Ao meu namorado Jean por todo carinho, amor, compreensão e paciência em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado, me apoiar e por todo incentivo.

Ao Instituto de Química e ao programa de Pós Graduação em Química da UFU por permitir a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (Código de Financiamento 001) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e aqueles que estiveram presente nesta minha caminhada, o meu sincero agradecimento.

GOMES, J. S. *Desenvolvimento de método eletroanalítico por voltametria de pulso diferencial para determinação de flavan-3-ol em fitoterápicos*. 2021. 112 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG.

RESUMO

Os metabólitos especializados são produzidos pelas plantas que, além de serem importantes em sua interação com o ambiente, também podem possuir atividades biológicas diversas. Os fitoterápicos são um exemplo de produtos que são produzidos a partir de matéria prima vegetal e são utilizados como medicamento. O controle de qualidade é um dos grandes problemas dos fitoterápicos, já que existem vários fatores que podem alterar a qualidade do material vegetal, como a concentração de compostos bioativos. Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos de baixo custo, portáteis e rápidos que auxiliem em seu controle de qualidade se torna interessante. Este trabalho visou o desenvolvimento de um método eletroanalítico, por voltametria de pulso diferencial (VPD), para a quantificação de flavan-3-ols em fitoterápicos com auxílio de complexação metálica. A quelação de flavonoides com AlCl_3 permite diferenciar algumas classes flavonoides da classe de flavan-3-ol. O método desenvolvido apresentou bons resultados de recuperação ($95,9 \pm 1\%$), linearidade ($R^2 = 0,9978$), precisão, seletividade e baixos limites de detecção ($2,09 \mu\text{mol L}^{-1}$) e quantificação ($6,95 \mu\text{mol L}^{-1}$). Em seguida, a quantificação de flavan-3-ol em fitoterápicos (CV1-5) foi realizada, o que indicou concentrações de equivalente de catequina de 1,23 a 470,43 mg por grama de fitoterápico, enquanto o método comparativo que determina o teor de fenóis totais apresentou concentrações de equivalente de ácido gálico de 17,89 a 513,83 mg por grama de fitoterápico. Entretanto, comparando os fitoterápicos CV3 e CV4, CV3 apresentou menor teor de flavan-3-ol, porém o seu teor de fenóis totais é maior. Assim, o teor de fenóis totais se mostra ineficiente no uso do monitoramento do teor de flavan-3-ol. A análise por espectrometria de massas dos medicamentos de chá verde identificou a presença da classe de flavan-3-ol, comprovando a presença desses compostos nas amostras. O resultado indica que o método desenvolvido é mais seletivo para determinada classe de flavonoides e é promissor para o uso no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos que apresenta flavan-3-ols como compostos bioativos.

Palavras-chave: *Flavan-3-ol, voltametria de pulso diferencial, controle de qualidade.*

GOMES, J. S. *Development of electroanalytical method by differential pulse voltammetry for determination of flavan-3-ol in herbal medicines*. 2021. 112 p. M. Sc. Dissertation, Federal University of Uberlândia, Uberlândia – MG.

ABSTRACT

Specialized metabolites are produced by plants that, in addition to being important in their interaction with the environment, can also have different biological activities. Herbal medicines are an example of products that are produced from vegetable raw material and are used as medicine. Quality control is one of the major problems of herbal medicines, as several factors can change the quality of vegetal material, such as the concentration of bioactive compounds. Thus, the development of low-cost, portable, and fast analytical methods that assist in quality control becomes interesting. This work aimed to develop an electroanalytical method, using differential pulse voltammetry (DPV), for the quantification of flavan-3-ols in herbal medicines with the aid of metallic complexation. Chelation of flavonoids with AlCl_3 allows us to differentiate some flavonoid classes from the class of flavan-3-ol. The proposed quantification presented good results of recovery ($95.9 \pm 1\%$), linearity ($R^2 = 0.9978$), precision, selectivity, and low limits of detection ($2.09 \mu\text{mol L}^{-1}$), and quantification ($6.95 \mu\text{mol L}^{-1}$). Then, the quantification of flavan-3-ol in herbal medicines (CV1-5) was performed, which indicated concentrations of catechin equivalent of 1.23 to 470.43 mg per gram of herbal medicine, while the comparative method that determines the total phenol content presented concentrations of gallic acid equivalent from 17.89 to 513.83 mg per gram of herbal medicine. However, comparing the herbal medicines CV3 and CV4, CV3 had lower flavan-3-ol content, but its total phenol content is higher. Thus, the content of total phenols proves to be inefficient in the use of monitoring the content of flavan-3-ol. The analysis by mass spectrometry of green tea medicines identified the presence of the flavan-3-ol class, proving the presence of these compounds in the samples. The result indicates that the developed method is more selective for a certain class of flavonoids and is promising for use in the quality control of herbal medicines that present flavan-3-ols as bioactive compounds.

Keywords: Flavan-3-ol, differential pulse voltammetry, quality control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fórmulas estruturais de algumas moléculas de fármacos isoladas de espécies vegetais..... 15
- Figura 2. Quantidade relativa e origem de fármacos de pequenas moléculas aprovados por órgãos internacionais reguladores de medicamentos entre 1981 e 2019..... 19
- Figura 3. Correlação entre o metabolismo central e biossíntese dos metabólitos especializados..... 23
- Figura 4. Fórmulas estruturais de dois alcaloides com propriedades medicinais..... 25
- Figura 5. Fórmulas estruturais de alguns terpenos..... 27
- Figura 6. Fórmulas estruturais de alguns compostos fenólicos com esqueleto C_6-C_n 29
- Figura 7. Fórmulas estruturais básicas e classificação de compostos fenólicos com esqueleto $C_6-C_n-C_6$ 30
- Figura 8. Fórmulas estruturais básicas e classificação dos flavonoides..... 31
- Figura 9. Biossíntese de flavanonas com precursores da via do chiquimato e acetato..... 32
- Figura 10. Biossíntese de outras classes de flavonoides a partir de flavanonas..... 33
- Figura 11. Fórmula estrutural da quercetina e três possíveis sítios de quelação desse flavonoide..... 35
- Figura 12. Representação do tipo de ligação formada em proantocianidinas..... 36
- Figura 13. Representação da reação de oxirredução da catequina..... 38
- Figura 14. Sinais de excitação e voltamograma típico obtido por VPD..... 39
- Figura 15. Potenciostato Dropsens μ STAT300 utilizado nas análises eletroanalíticas..... 43
- Figura 16. Imagem e esquema da célula eletroquímica convencional com o sistema de três eletrodos e uma barra magnética. 1: eletrodo de trabalho; 2: eletrodo de referência; 3: eletrodo auxiliar..... 44
- Figura 17. Preparo das soluções em triplicata em concentrações crescentes para construção da curva analítica visando à determinação do teor de fenóis totais..... 49
- Figura 18. Resposta voltamétrica, via VPD, da catequina, quercetina e rutina (5 mmol L^{-1}) livres (linha preta) e complexados com AlCl_3 (linha vermelha), utilizando as soluções eletrolíticas suporte: (a) H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), (b) LiCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e (c) tampão acetato (pH 4,8). Condições VPD: 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude)..... 52
- Figura 19. Representação estrutural da catequina e indicação dos grupos relacionados aos sinais observados nos voltamogramas de pulso diferencial, devido as suas reações de oxidação..... 54

Figura 20. Representação estrutural da (a) quercetina e (b) rutina.....	54
Figura 21. Espectros UV-Vis das soluções preparadas em metanol de catequina, quercetina e rutina ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$) livres (linha vermelha) e complexadas com AlCl_3 (linha azul).....	57
Figura 22. Representação da estrutura básica de flavonoides que apresentam o sistema cinamoil e benzoil e respectivas bandas de absorção que aparecem no espectro UV-Vis.....	58
Figura 23. (a) Resposta voltamétrica da mistura de catequina, quercetina e rutina ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) (linha vermelha) e mistura + AlCl_3 (linha azul), utilizando a solução eletrolítica suporte: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), com condições de VPD: 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude). (b) Espectros UV-Vis da solução preparada em metanol de mistura de flavonoides e da mistura complexada com AlCl_3	59
Figura 24. Respostas voltamétricas da mistura de flavonoides e mistura após adição do padrão de catequina, ambas as soluções complexadas com AlCl_3 , em concentrações crescentes de 10 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva analítica de adição de padrão, para determinação da recuperação e linearidade do método. Condições da VPD: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).....	60
Figura 25. Respostas voltamétricas da catequina complexada com AlCl_3 , em concentrações crescentes de 10 a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva analítica para determinação do limite de detecção e quantificação. Condições da VPD: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).....	61
Figura 26. Representação estrutural das moléculas pertencentes à classe dos flavan-3-ols encontrados no chá verde.....	64
Figura 27. Resposta voltamétrica, via VPD, da catequina e epigallocatequina (5 mmol L^{-1}) livres (linha preta) e complexados com AlCl_3 (linha vermelha), utilizando a solução eletrolítica suporte: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), com condições de VPD: 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).....	65
Figura 28. Respostas voltamétricas da amostra de <i>G. biloba</i> complexada com AlCl_3 . Condições da VPD: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).....	66
Figura 29. Respostas voltamétricas das amostras de fitoterápicos: (a) Fitoscar; (b) CV1, (c) CV2; (d) CV3; (e) CV4; (f) CV5, complexadas com AlCl_3 . Condições da VPD: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).....	67

Figura 30. Curva analítica obtida por espectrofotometria no UV-Vis dada em absorbância em 760 nm <i>versus</i> concentração de ácido gálico com valores crescentes de 0 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtenção do teor de fenóis totais.....	69
Figura 31. Cromatogramas de íons totais obtidos via CLAE-ESI-EM para amostras de medicamentos tradicionais fitoterápicos de chá verde. CV: Chá verde.....	74
Figura 32. Proposta de fragmentação de flavan-3-ols.....	78
Figura 33. Proposta de fragmentação de flavan-3-ols que apresentam o grupo galato.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lista das principais classes de alcaloides biossintetizados pelas plantas.....	24
Tabela 2.	Lista da classificação dos terpenos de acordo com a quantidade de unidades de isopreno na molécula.....	26
Tabela 3.	Lista de classificação dos compostos fenólicos de acordo com a disposição estrutural dos carbonos.....	28
Tabela 4.	Especificações das substâncias utilizadas no preparo das soluções utilizadas nos experimentos realizados neste trabalho.....	42
Tabela 5.	Parâmetros para a técnica de pulso diferencial (VPD).....	44
Tabela 6.	Dados da extração por método tradicional dos fitoterápicos utilizando o metanol como solvente.....	48
Tabela 7.	Concentrações das soluções preparadas com o extrato de fitoterápico após análise prévia da intensidade de seus picos de oxidação.....	48
Tabela 8.	Informações a respeito da concentração das soluções preparadas após análise prévia da absorvância do extrato para cálculo dentro da faixa linear.....	50
Tabela 9.	Valores dos potenciais de oxidação da catequina e mistura catequina + $AlCl_3$, utilizando a técnica de VPD, em diferentes soluções eletrolíticas suporte.....	53
Tabela 10.	Valores dos potenciais de oxidação da quercetina e quercetina + $AlCl_3$, utilizando a técnica de VPD, em diferentes soluções eletrolíticas suporte.....	55
Tabela 11.	Valores dos potenciais de oxidação da rutina e rutina + $AlCl_3$, utilizando a técnica de VPD, em diferentes soluções eletrolíticas suporte.....	56
Tabela 12.	Desempenho analítico da quantificação de catequina em comparação com outros métodos relatados na literatura.....	63
Tabela 13.	Concentração em equivalente de catequina em mg por g de fitoterápico.....	68
Tabela 14.	Concentração em equivalente de ácido gálico em mg por g de fitoterápico.....	70
Tabela 15.	Dados da literatura de compostos encontrados no chá verde em termos de espectrometria de massas realizadas no modo negativo. C, Catequina; EC, Epicatequina; GC, Galocatequina; EGC, Epigalocatequina; CG, Catequina-galato; ECG, Epicatequina-galato; GCG, Galocatequina-galato; EGCG, Epigalocatequina-galato; K, canferol e Q; Quercetina.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	(+)-Catequina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coefficiente de variação
DFR	Dihidroflavonol 4-reductase
EC	(-)-Epicatequina
ECG	(-)-Epicatequina-galato
EGC	(-)-Epigallocatequina
EGCG	(-)-Epigallocatequina-galato
EM	Espectrometria de massas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLS	Flavonol sintase
FNS	Flavona sintase
GC	(-)-Galocatequina
GCG	(-)-Galocatequina-galato
IFS	Isoflavona sintase
LAR	Leucoantocianidina reductase
LD	Limite de detecção
LDOX	Leucoantocianidina dioxigenase
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
N	Isolado de produto natural
NB	Fitoterápicos
ND	Derivação semissintética de produto natural
NM	Imitam os produtos naturais
NuPPeN	Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais
OMS	Organização mundial da saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Totalmente sintético

S*	Sintético e o grupo farmacóforo é um produto natural
SUS	Sistema único de saúde
UFGT	UDP-glicose flavonoide-3-O-glicosídeo transferase
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.2.1 <i>Plantas medicinais e fitoterápicos</i>	17
1.2.2 <i>Metabolismo especializado</i>	21
1.2.3 <i>Flavonoides</i>	30
1.2.4 <i>Análises de compostos fenólicos e flavonoides</i>	36
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	41
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	41
3.3 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-Vis.....	42
3.4 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL.....	43
3.4.1 <i>Perfil voltamétrico de flavonoides</i>	44
3.4.2 <i>Parâmetros de validação analítica</i>	45
3.4.2.1 <i>Ensaio de recuperação e linearidade</i>	45
3.4.2.2 <i>Limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação</i>	46
3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVAN-3-OL NOS FITOTERÁPICOS	47
3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NOS FITOTERÁPICOS	49
3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM/EM)	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 PERFIL VOLTAMÉTRICO EM DIFERENTES ELETRÓLITOS DE SUPORTE E ESPECTROFOTOMÉTRICO DE FLAVONOIDES.....	51
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	60
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NOS FITOTERÁPICOS	69
4.5 PERFIS QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS DE CHÁ VERDE	72
5. CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE	100

1. INTRODUÇÃO

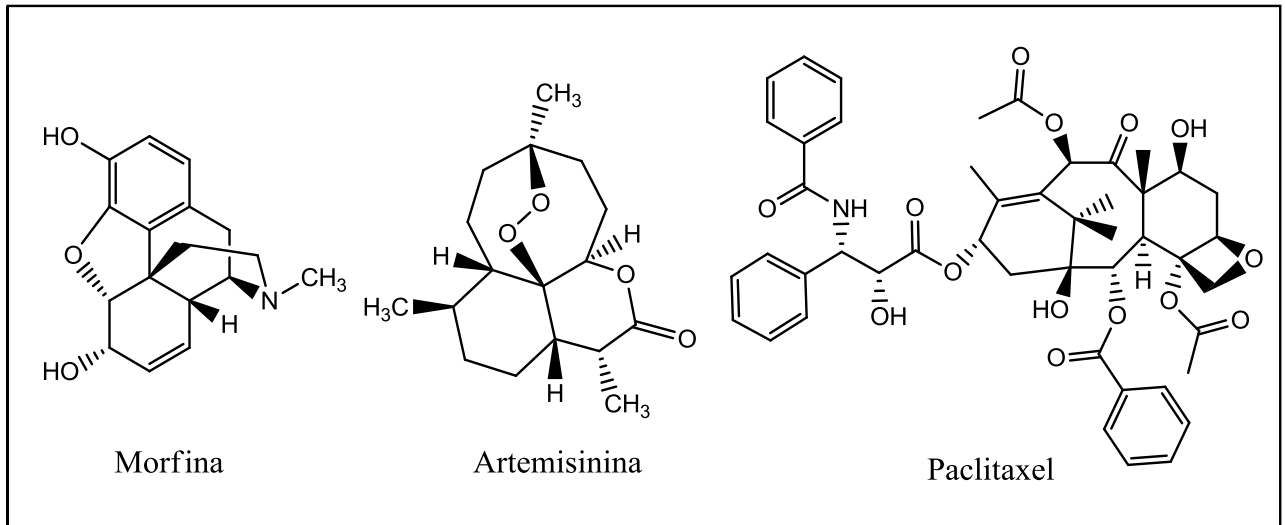
1.1 JUSTIFICATIVA

A química dos produtos naturais é uma ciência, no âmbito da química orgânica, que estuda os compostos que são produzidos por organismos vivos. Esta ciência tornou-se de grande importância na inspiração para o desenvolvimento de diversos produtos, com vista no estudo de compostos que apresentam bioatividade. O estudo de alguns compostos, que possuem propriedades terapêuticas e são provenientes de materiais vegetais, basearam-se inicialmente no conhecimento empírico do uso de plantas medicinais por diversas culturas que tinham o propósito de tratarem as suas enfermidades (YUAN et al., 2016).

Os produtos naturais (PNs) são produzidos pelo metabolismo especializado das plantas e são caracterizados por compostos como taninos, saponinas, fenólicos, alcaloides, flavonoides, terpenos, entre outros. Esses compostos, além de possuírem um grande valor agregado, revolucionaram a indústria de fármacos. Com o isolamento e identificação dessas moléculas, foi possível avaliar as suas propriedades, o mecanismo de ação e toxicidade. Essas análises apresentaram um grande avanço após o desenvolvimento de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, ademais o uso de técnicas hifenadas (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; MATSUURA et al., 2018).

Na Figura 1, estão representados alguns PNs bioativos que foram isolados de plantas e são utilizados como medicamentos. A morfina é um fármaco de grande relevância que foi descoberto e isolado pela primeira vez em 1804 de uma planta da espécie *Papaver somniferum*. Este composto é um alcaloide conhecido por possuir ação analgésica poderosa (DEVEREAUX; MERCER; CUNNINGHAM, 2018). O paclitaxel, também chamado de taxol, foi originalmente isolado de uma planta da espécie *Taxus brevifolia* e é um fármaco anticâncer aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (SECA; PINTO, 2018). A molécula artemisinina foi isolada da espécie *Artemisia annua* em 1967 e é um dos fármacos mais potentes utilizados contra a malária devido à sua eficiência e rápida ação (KARRI; SHARMA; KAUR, 2019).

Figura 1. Fórmulas estruturais de algumas moléculas de fármacos isoladas de espécies vegetais.



Fonte: A autora

A biodiversidade do planeta auxilia na descoberta de diferentes classes de metabólitos especializados em sua imensa pluralidade. O Brasil, com sua grande extensão territorial, é um país que detém uma das maiores biodiversidades do mundo, já que é composto por diferentes biomas, tal como Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal e possuem cerca de 15% de todas as espécies vivas. Entretanto, apesar da vasta gama de espécies, ainda existem poucos produtos gerados considerando a proporção dessa diversidade. Os investimentos em pesquisas nesta área apontam grandes potenciais farmacêuticos e econômicos (DUTRA et al., 2016; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

A erva baleeira, nome popular da *Cordia verbenacea*, é um exemplo de planta medicinal nativa do Brasil a qual é encontrada no litoral dentro da Mata Atlântica e, dentre os seus efeitos terapêuticos, destacam-se a ação anti-inflamatória e analgésica. O óleo essencial da erva baleeira deu origem ao fitoterápico brasileiro com nome comercial Acheflan®, no qual é utilizado topicamente para tratar quadros inflamatórios (DA SILVA et al., 2019).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos de fontes vegetais, que possuem efeitos farmacológicos diversos devido às substâncias ativas presentes e são

utilizados principalmente em países em desenvolvimento. Esses medicamentos são seguros, entretanto devido à problemas de contaminação, adulteração e coleta em período errado podem se tornar danosos ou afetarem sua ação. Logo, torna-se de suma importância o controle de qualidade na produção, armazenamento e comercialização desses produtos para assegurar maior eficiência e segurança do fitoterápico. O controle de qualidade na produção garante a identificação correta das plantas, a avaliação de contaminações, a identificação de adulteração e a apreciação da qualidade química, no qual torna-se necessário análises qualitativas e quantitativas do material (BRITO et al., 2016; CARVALHO et al., 2018).

As técnicas mais comumente utilizadas na identificação dos conjuntos de metabólitos especializados são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM). A quantificação dos metabólitos é realizada comumente através de técnicas cromatográficas que podem ser líquidas (cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE) ou gasosas (cromatografia gasosa-CG), e podem ser inclusive acopladas às técnicas de identificação mencionadas anteriormente. Além disso, para um método ser utilizado na quantificação de compostos, este deve antes passar pelo processo de validação, a qual visa garantir aquilo que se propõe, ou seja, o desempenho adequado e resultados efetivos (LEE et al., 2017; YIN et al., 2018).

A literatura traz exemplos de validação visando o auxílio no controle de qualidade utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em plantas medicinais, tal como a quantificação de 6 diferentes metabólitos da *Asarum sieboldii*, que é uma planta usada em um medicamento oriental que apresenta diversos efeitos farmacológicos (JANG; PARK; KIM, 2020) e a quantificação de 8 compostos, incluindo catequinas, em 11 diferentes fitoterápicos usados no tratamento de obesidade (DURSUNOĞLU et al., 2019).

Considerando o alto custo das técnicas cromatográficas devido à sua instrumentação, manutenção e quantidade de solventes utilizada, bem como o tempo de análise, surge um interesse em técnicas alternativas mais simples e acessíveis, tais como os métodos eletroanalíticos, os quais apresentam elevada sensibilidade, custo moderado e facilidade de portabilidade. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de flavonoides por meio da voltametria de pulso diferencial (VPD), desenvolver e validar um procedimento de

quantificação de teor de flavan-3-ol em fitoterápicos por meio dessa técnica concomitante a complexação metálica.

Alguns estudos utilizando técnicas eletroquímicas e diferentes eletrodos para a quantificação de catequina foram identificadas na literatura como a sua quantificação após a preparação de um eletrodo de trabalho de pasta de carbono modificado por eletropolimerização de azul de metileno (MANASA et al., 2017) ou o uso de um eletrodo modificado com um material híbrido (mistura de nanotubos de carbono de parede única e subftalocianina) (ŞENOCAK et al., 2019). Entretanto, o diferencial deste trabalho é demonstrar que a detecção pelos métodos eletroanalíticos é da classe de flavan-3-ol, também chamada de catequinas, e não da (+)-catequina em si; mostrar que existe a possibilidade de quantificação da classe de flavan-3-ol em amostras de fitoterápicos utilizando um eletrodo de carbono vítreo limpo (sem modificação da superfície); propor uma unidade de quantificação chamada equivalente de catequina; mostrar que a metodologia comumente utilizada para medir fenóis totais que é dada em equivalente de ácido gálico apresenta um teor muito maior do que realmente existe na amostra e não é seletiva para uma classe específica de flavonoides.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

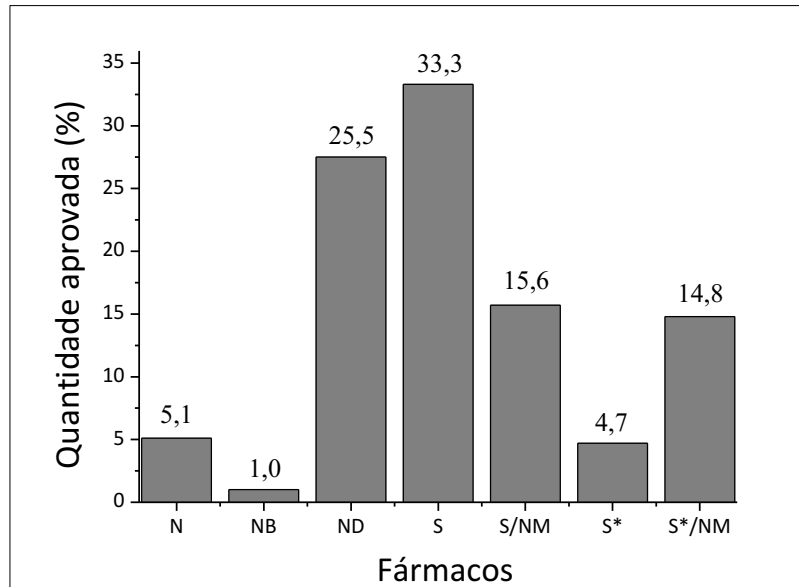
1.2.1 *Plantas medicinais e fitoterápicos*

Historicamente, os conhecimentos sobre as propriedades terapêuticas de plantas são passados por gerações e foram utilizados nas mais diversas culturas perdurando até os tempos atuais. Na Romênia, por exemplo, entre as décadas de 1860 até 1970, foram registradas um total de 153 plantas medicinais com seu uso tradicional no tratamento de doenças em crianças, das quais 15 foram avaliadas em estudos clínicos (PETRAN; DRAGOS; GILCA, 2020). No Irã, com a experiência das pessoas locais, há relatos de 249 plantas utilizadas com fins medicinais e 35 dessas plantas possuem testes com atividade biológica que incluem atividade inibidora da acetilcolinesterase, antioxidante, anticâncer, antimalárica, antibacteriana e antifúngica (BUSO et al., 2020).

Já na comunidade indígena de Totonacas, localizada no estado de Veracruz (México), foi registrado o uso de 101 plantas medicinais, que são utilizadas para tratamento de 77 doenças, incluindo distúrbios intestinais, picadas venenosas e doenças infecciosas (REIMERS et al., 2019). No Brasil, em uma cidade no litoral de São Paulo, o estudo etnobotânico indicou o uso de 82 espécies de plantas para 55 usos terapêuticos, como doenças do sistema circulatório, gastrointestinal, respiratório, entre outros (SAUINI et al., 2020). No estado do Ceará, onde a vegetação é a caatinga, o estudo etnobotânico das plantas medicinais da região indicou o uso terapêutico de cerca de 116 espécies para os mais diversos distúrbios (RIBEIRO et al., 2014).

O conhecimento empírico a respeito das propriedades medicinais de plantas permitiu o estudo científico de diversas espécies e compostos que auxiliaram no desenvolvimento de fármacos. Segundo Newman e Cragg (2020), entre 1981 e 2019, foram aprovadas por órgãos internacionais reguladores de medicamentos (por exemplo, “Food and Drug Administration” (FDA), dos Estados Unidos), uma quantidade de 1394 medicamentos de pequenas moléculas (categoria que exclui macromolécula biológica e vacinas) em que, desconsiderando os medicamentos totalmente sintéticos, cerca de 66,7% tiveram sua origem com base em produtos naturais (Figura 2). Os fitoterápicos foram os mais recentes a serem aprovados e representam hoje cerca de 1% desses fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Figura 2. Quantidade relativa e origem de fármacos de pequenas moléculas aprovados por órgãos internacionais reguladores de medicamentos entre 1981 e 2019.



Nota: N – Isolado de produto natural; NB – Fitoterápicos; ND – Derivação semissintética de produto natural; S – Totalmente sintético; NM – Imitam os produtos naturais; S* - Sintético e o grupo farmacóforo é um produto natural. Fonte: Adaptado de Newman e Cragg (2020).

Em virtude da extensa biodiversidade no Brasil e no mundo, há um grande potencial para o desenvolvimento de produtos a partir de estudos e pesquisa de espécies vegetais e PNs, em geral. Os medicamentos fitoterápicos, por exemplo, possuem uma enorme importância, principalmente em países emergentes, já que a sua pesquisa e desenvolvimento são mais acessíveis financeiramente quando comparado a medicamentos isolados e/ou sintetizados, o que torna para os consumidores uma alternativa a opções mais caras. No entanto, por serem medicamentos que contêm uma mistura complexa de compostos, em que mais de uma molécula pode ser responsável por sua ação terapêutica, devem existir certos cuidados e regulamentações (GROMEK; DRUMOND; SIMAS, 2015).

Diferente dos medicamentos convencionais, os fitoterápicos são produzidos a partir de matéria-prima vegetal que pode ter vários constituintes naturais, mas de forma semelhante aos demais medicamentos, devem apresentar propriedades curativa, paliativa ou profilática. Esses medicamentos naturais são industrializados e

manipulados e o produto final é apresentado em forma de cápsulas, comprimidos, pomadas e xaropes, podendo ter adição de excipientes. Os principais problemas relacionados à padronização da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos são: adulterações, pureza e variação da composição química, gerando tanto baixo teor de componentes ativos, reduzindo a ação terapêutica, quanto elevados teores de componentes ativos, resultando em superdosagem. Esses fatores e a falta de sistematização dos processos de produção podem diminuir a qualidade dos insumos e gerar riscos à saúde (DHAMI; MISHRA, 2015; FOROUGHİ et al., 2017). A regulamentação e o controle de qualidade têm o objetivo de viabilizar a comercialização de medicamentos fitoterápicos com segurança, qualidade e que apresente eficácia comprovada.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), desde 2002, criou uma estratégia que tinha por objetivo integrar o conhecimento, a regulamentação, supervisão em diversos países e promover o acesso para populações mais pobres da medicina tradicional e os fitoterápicos são um dos produtos citados. O programa foi atualizado posteriormente, estendendo o projeto até 2023, apoiando os estados membros a investir em seu potencial nesta área, promovendo o uso seguro de produtos regulamentados nas práticas profissionais (WHO, 2013). Em 2018, com a estratégia adotada pela OMS, já haviam 98 de um total de 194 estados membros adotando políticas nacionais sobre a medicina tradicional, 124 afirmaram que possuíam leis ou regulamentos sobre medicamentos fitoterápicos e 125 possuíam um sistema de registro desses medicamentos, sendo que a maior parte dos estados membros são da região europeia no quesito de regulamentação e registro (WHO, 2019).

O Brasil é um dos países que possui regulamentação de medicamentos fitoterápicos, os quais podem ser indicados para uso humano ou veterinário. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) regula e registra os medicamentos de uso humano e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regula os de uso veterinário (BRASIL, 2018). A partir do ano de 2006, após a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pelo Ministério da Saúde, houve um aumento significativo de programas voltados para a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2012, haviam 815 municípios com programas voltados para a fitoterapia no SUS (RIBEIRO, 2019). Os estudos científicos e essas políticas criadas permitiram

grandes avanços nessa área, sendo que, atualmente o SUS oferta à população medicamentos fitoterápicos, que constam na lista da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) de 2020, de 12 espécies vegetais, os quais são oferecidos com diferentes formas farmacêuticas (BRASIL, 2020).

Existem diversos tipos de fitoterápicos que são registrados e comercializados pelo mundo e são utilizados para diversas finalidades. O Fitoscar®, por exemplo, é um medicamento fitoterápico com ação cicatrizante e de redução de processos inflamatórios, o qual é comercializado em forma de pomada, a qual é composta pelo extrato da planta *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, uma planta tradicional brasileira conhecida popularmente como barbatimão (RICARDO et al., 2018). O Gelormytol® é obtido por uma mistura de óleos essenciais das plantas *Eucalyptus globulus*, *Citrus sinensis*, *Myrtus communis* e *Citrus limon* (66:32:1:1) que possui ação antimicrobiana, expectorante, de liberação mucociliar, anti-inflamatórias e antioxidantes e, dessa forma, é utilizado para tratamento dos sintomas da bronquite aguda e crônica e da sinusite (KOKOSKA et al., 2019). Já o Metactive® é um fitoterápico a base da planta *Camellia sinensis*, conhecida como chá verde, com ação antioxidante e atua na prevenção de doenças cardiovasculares e sua ação e atividade deve-se à presença de catequinas (flavan-3-ol), que são compostos fenólicos presentes na planta (SOSNOWSKA; PENSON; BANACH, 2017). Os PNs são os compostos responsáveis pela ação terapêutica desses medicamentos e são produzidos pelo metabolismo especializado das plantas.

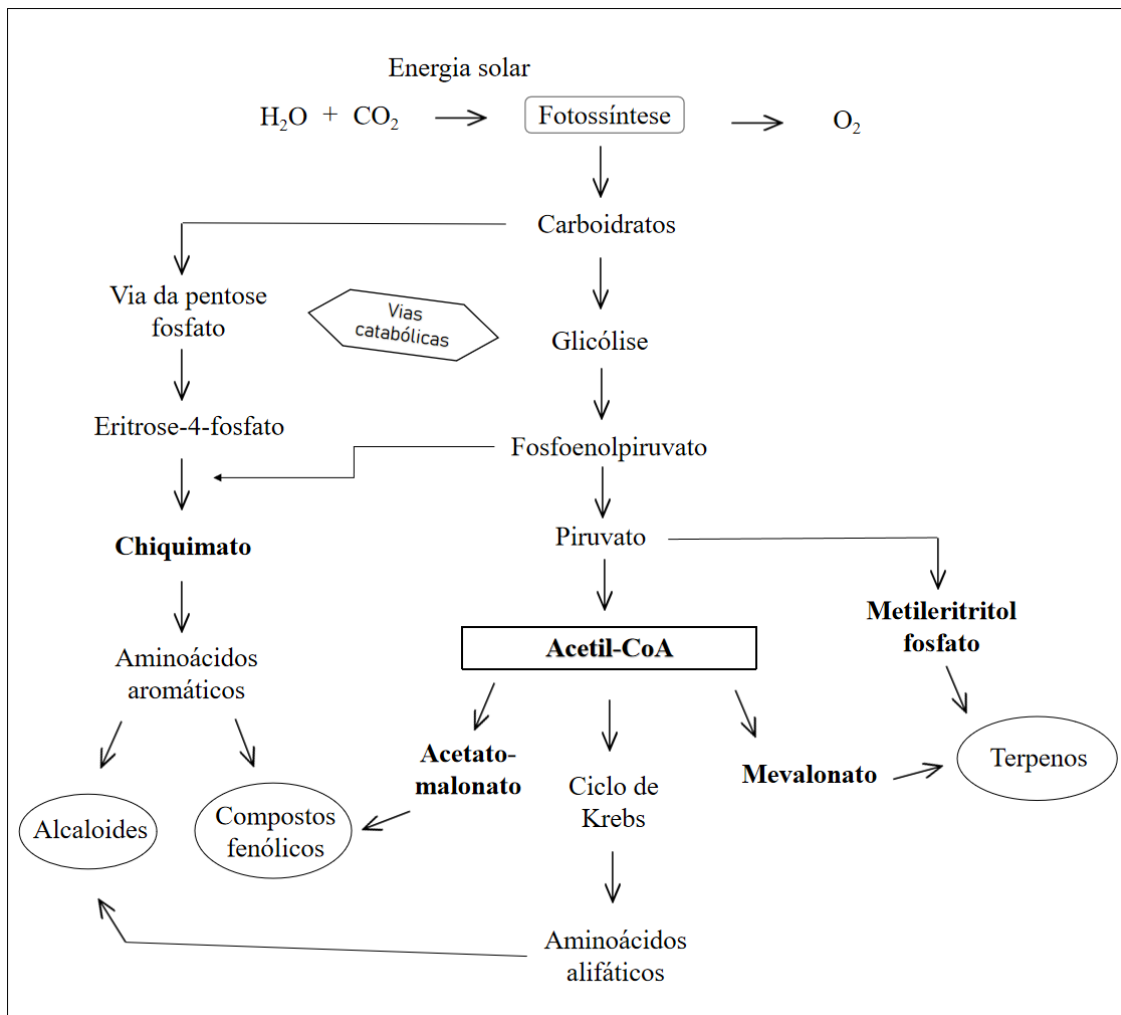
1.2.2. Metabolismo especializado

O metabolismo vegetal é dividido em central e especializado, que consiste em uma gama de processos bioquímicos que produz compostos importantes para esses organismos vivos, permitindo o seu desenvolvimento. O metabolismo central (ou primário) engloba reações fundamentais que são vitais para a sua sobrevivência, ou seja, está presente em todas as plantas e também auxiliam na síntese de precursores do metabolismo especializado (ou secundário), que são altamente diversificados e é uma manifestação das particularidades das espécies advindas da sua adaptação e interação com o ambiente (POTT; OSORIO; VALLARINO, 2019).

Os metabólitos especializados são intrínsecos às plantas e organismos como fungos e algas. Nas plantas, estes compostos desempenham papéis importantes, fornecendo características que auxiliam em sua defesa contra inimigos naturais, em sua interação interespecífica e na atração de polinizadores (GUERRIERO et al., 2018; STEVENSON, 2020). As classes de moléculas produzidas podem variar e se limitar à certas famílias, gêneros e espécies de plantas. Além disso, fatores como sazonalidade, período do dia, a fase de crescimento, temperatura, disponibilidade hídrica, quantidade de luz, biodisponibilidade de nutrientes, entre outras condições também podem afetar a abundância desses compostos (MAHAJAN; KUIRY; PAL, 2020; YANG et al., 2018).

Os principais grupos de fitoquímicos produzidos são os compostos nitrogenados (alcaloides), compostos fenólicos e os terpenos. Os compostos nitrogenados são produzidos pela via do chiquimato e por aminoácidos alifáticos oriundos do ciclo de Krebs. Os compostos fenólicos são produzidos pela via do chiquimato e do acetato-malonato (EGBUNA et al., 2018). Os terpenos são produzidos pela via do mevalonato e do metileritritol fosfato. A Figura 3 mostra as rotas metabólicas desses compostos e sua correlação com o metabolismo central das plantas, que envolve rotas responsáveis pela respiração aeróbica e a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), como a via da pentose fosfato, a glicólise e o ciclo de Krebs (CSEKE et al., 2006).

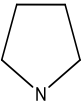
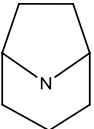
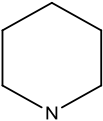
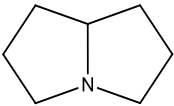
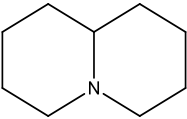
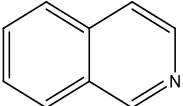
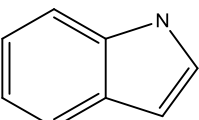
Figura 3. Correlação entre o metabolismo central e biossíntese dos metabólitos especializados.



Fonte: Adaptado de Cseke e outros (2006)

Os alcaloides são compostos predominantemente de caráter básico pois possuem pelo menos um átomo de nitrogênio. Esses compostos, na sua maioria, são originados de aminoácidos como o ácido aspártico, arginina, fenilamina, lisina, ornitina, tirosina e triptofano, mas que podem também ter origem nos terpenos, purinas e policetídeos. A variedade estrutural dos alcaloides é enorme e, essa diversidade, está intimamente ligada aos precursores biossintéticos e as suas reações. Considerando o aminoácido que origina o anel heterocíclico, os alcaloides podem ser classificados em: pirrolidina, tropano, piperidina, pirrolizidina, quinolizidina, isoquinolina e alcaloides indólicos, como mostrado na Tabela 1 (CIMMINO et al., 2017; CSEKE et al., 2006; XIA et al., 2020).

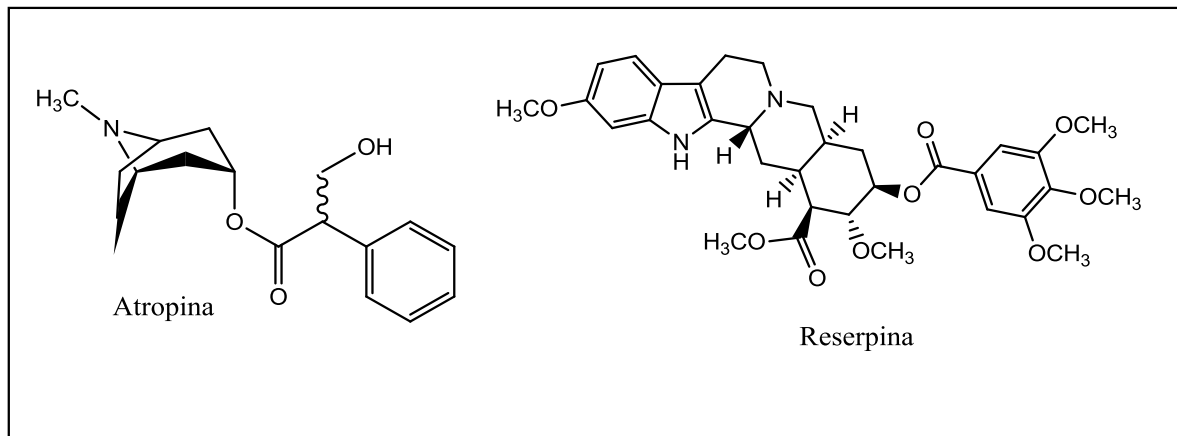
Tabela 1. Lista das principais classes de alcaloides biossintetizados pelas plantas.

Classe	Anel heterocíclico	Aminoácido precursor	Exemplos
Pirrolidina		Ácido aspártico	Nicotina, higrina
Tropano		Ornitina	Atropina, cocaína, escopolamina
Piperidina		Lisina	Coniina, cassina, espectralina, lobelina
Pirrolizidina		Ornitina	Senecionina
Quinolizidina		Lisina	Lupinina, esparteína
Isoquinolina		Tirosina	Codeína, morfina, papaverina
Indólico		Triptofano	Vimblastina, reserpina

Fonte: Adaptado de Cseke e outros (2006)

De maneira geral, os alcaloides apresentam toxicidade para os herbívoros, o que garante a defesa química das plantas contra pragas, todavia essa classe de compostos possui importantes propriedades medicinais para os humanos. A Figura 4 apresenta as fórmulas estruturais de dois alcaloides que possuem propriedades medicinais como a atropina, um medicamento anticolinérgico da classe dos tropanos, e a reserpina, um alcaloide indólico que possui efeito hipotensor. Além disso, muitos alcaloides possuem atividade sedativa, antidiabética, antibacteriana, antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antifúngica, estimulante do sistema nervoso central, entre outras (DEBNATH et al., 2018; MASI et al., 2019; RASOULI et al., 2020).

Figura 4. Fórmulas estruturais de dois alcaloides com propriedades medicinais.



Fonte: A autora

Os terpenos são compostos que apresentam unidades de isopreno (2-metilbutadieno). Esses metabólitos são oriundos da via do mevalonato e metileritritol fosfato que levam a síntese dos intermediários difosfato de isopentenila (IPP) e o seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), que se encontram em equilíbrio. Os intermediários IPP e DMAPP sofre reação de condensação originando o precursor dos monoterpenos, geranyl pirofosfato (GPP). Adicionando-se sucessivamente o IPP ao GPP por reações de condensação e com algumas outras reações e/ou rearranjos, diferentes estruturas e classes de terpenos são biossintetizadas (BERGMAN; DAVIS; PHILLIPS, 2019; EGBUNA et al., 2018). A classificação desses compostos se baseia no número de unidades de isopreno presentes na estrutura, como apresentado na Tabela 2 (ASHOUR; WINK; GERSHENZON, 2018).

Tabela 2. Lista da classificação dos terpenos de acordo com a quantidade de unidades de isopreno na molécula.

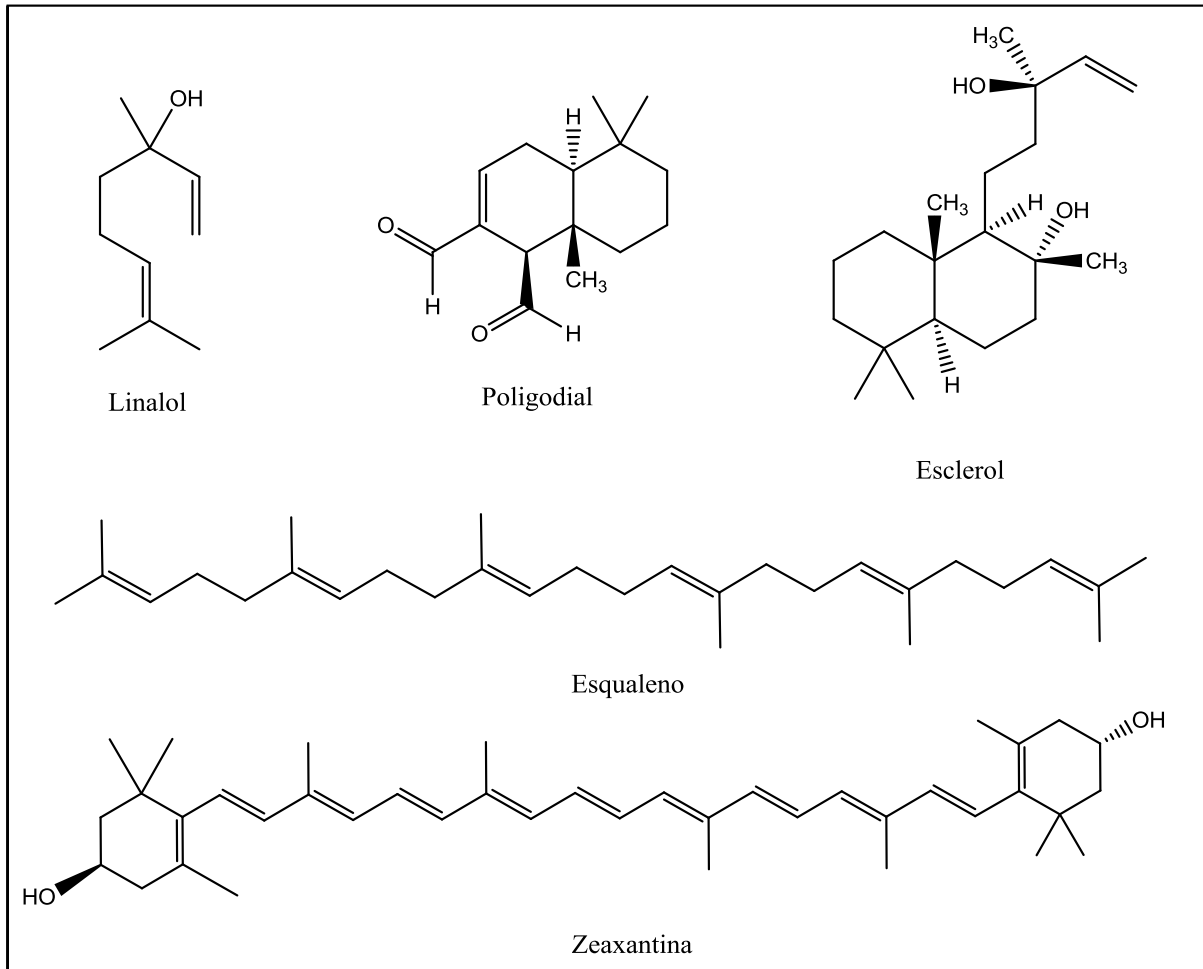
Nº de carbonos	Unidades de isoprenos	Classificação	Exemplos
5	1	Hemiterpenos	isopreno
10	2	Monoterpenos	pulegona, linalol
15	3	Sesquiterpenos	α -humuleno, poligodial
20	4	Diterpenos	paclitaxel, esclareol
30	6	Triterpenos	esqualeno, α -amirina
40	8	Tetraterpenos	β -caroteno, zeaxantina

Fonte: Adaptado de Ashour e outros (2018)

Existe uma grande diversidade de terpenos em plantas e, em geral, desempenham papéis importantes nas interações ecológicas das plantas com animais. Os monoterpenos são compostos voláteis encontrados principalmente em óleos essenciais e são conhecidos por sua fragrância, atuando na planta como atraente de polinizadores ou repelente de predadores. Os sesquiterpenos agem como mecanismo de defesa em plantas, já que muitos possuem um sabor amargo ou desagradável para alguns herbívoros. Os diterpenos são compostos envolvidos na regulação do crescimento das plantas. Os triterpenos são precursores de esteroides e os tetraterpenos são responsáveis, sobretudo, pela pigmentação das plantas. Além disso, esses compostos também possuem atividades biológicas variadas, inclusive para uso medicinal (COX-GEORGIAN et al., 2019).

Na Figura 5 estão representadas estruturas de diferentes terpenos. O linalol é um monoterpeno que apresenta atividades anti-inflamatória, anticâncer, antimicrobiana, antinoceptiva, entre outras (PEREIRA et al., 2018), o poligodial é um sesquiterpeno que possui uma potente atividade antifúngica (CARRASCO et al., 2017). O diterpeno esclareol é conhecido por sua ação anticâncer (DUAN et al., 2018), enquanto o triterpeno esqualeno possui atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (LOU-BONAFONTE et al., 2018). Já a zeaxantina, é um tetraterpeno antioxidante encontrado em diversos alimentos e apresenta diversos benefícios à saúde humana (MURILLO; HU; FERNANDEZ, 2019).

Figura 5. Fórmulas estruturais de alguns terpenos.



Fonte: A autora

Os compostos fenólicos são encontrados em praticamente todas as plantas, apresentam uma enorme variedade estrutural em que possuem grupos hidroxila (-OH) ligados ao anel aromático e são sintetizados pelas vias do chiquimato e do acetato-malonato. Esses compostos atuam como defesa das plantas, por exemplo, na proteção contra a radiação UV, e são os principais responsáveis por sua atividade antioxidante. Eles podem variar de moléculas mais simples até compostos altamente polimerizados e são categorizados de acordo com o arranjo e o número de átomos de carbono (DURAZZO et al., 2019; TSIMOGIANNIS; OREOPOULOU, 2019; VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2019), como apresentado na Tabela 3.

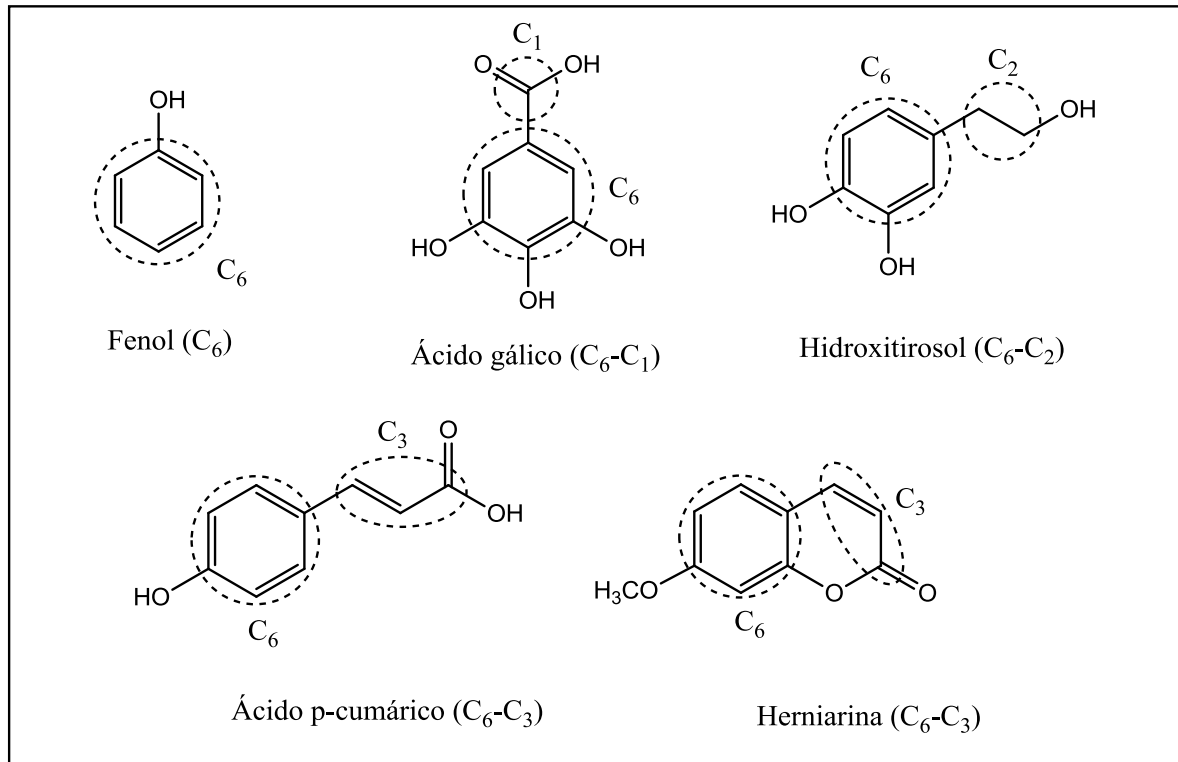
Tabela 3. Lista de classificação dos compostos fenólicos de acordo com a disposição estrutural dos carbonos.

Classe	Esqueleto
Fenóis simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzoicos	C_6-C_1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos, álcool fenetílico	C_6-C_2
Fenilpropanoides: ácido hidroxicinâmico, cumarinas	C_6-C_3
Xantonas, benzofenonas,	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: Adaptado de Vuolo e outros (2019) e Tsimogiannis e outros (2019)

A Figura 6 mostra alguns exemplos de compostos fenólicos com a estrutura dos átomos de carbono dispostos da forma C_6-C_n . Os fenóis simples (C_6) são os compostos menos comuns de serem encontrados nas plantas medicinais. O ácido gálico, um exemplo de ácido fenólico com estrutura C_6-C_1 , é encontrado em diferentes espécies vegetais e possui atividades anticâncer, antioxidante e antibacteriana. O hidroxitirosol, com esqueleto C_6-C_2 , é um potente antioxidante encontrado em azeite de oliva, enquanto o ácido *p*-cumárico, com esqueleto C_6-C_3 , possui relatos de atividade anticâncer e a herniarina, também C_6-C_3 da classe das cumarinas, possui atividade antinociceptiva (CHERIYAN SR et al., 2017; GORZYNIK-DEBICKA et al., 2018; SHAHIDI; YEO, 2018).

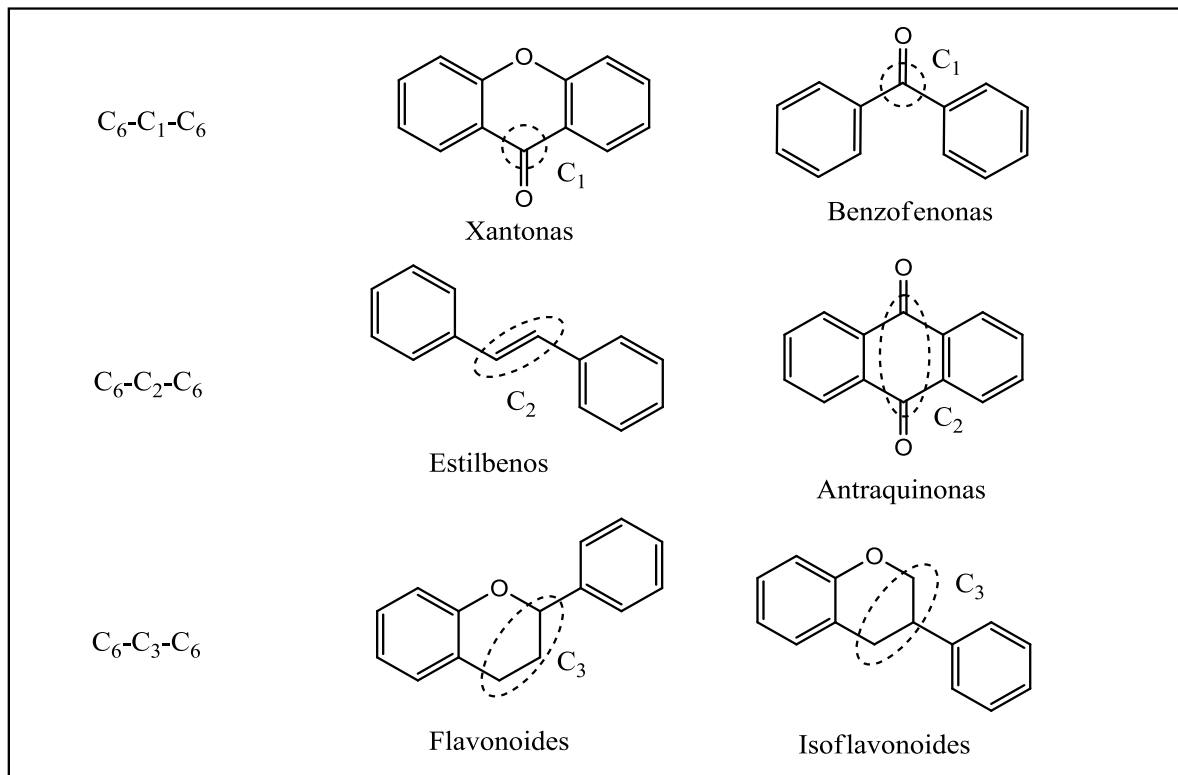
Figura 6. Fórmulas estruturais de alguns compostos fenólicos com esqueleto C_6-C_n .



Fonte: A autora

Os compostos em que os padrões das estruturas básicas estão dispostos na forma $C_6-C_n-C_6$ são, por exemplo, as xantonas, benzofenonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides e isoflavonoides, como mostrado na Figura 7. Todas essas classes possuem diversas moléculas com variadas bioatividades. Algumas xantonas e benzofenonas possuem atividades antivirais (PAILEE et al., 2018), os estilbenos, além de proteger as plantas de patógenos, possuem atividades anti-inflamatórias e anticâncer (AKINWUMI; BORDUN; ANDERSON, 2018), enquanto a classe das antraquinonas são importantes agentes anticâncer (TIKHOMIROV; SHTIL; SHCHEKOTIKHIN, 2018). Os flavonoides são abundantes, sendo o maior grupo de compostos fenólicos e amplamente distribuídos no reino vegetal, no qual serão discutidos no próximo tópico.

Figura 7. Fórmulas estruturais básicas e classificação de compostos fenólicos com esqueleto $C_6-C_n-C_6$.



Fonte: Adaptado de Tsimogiannis e outros (2019)

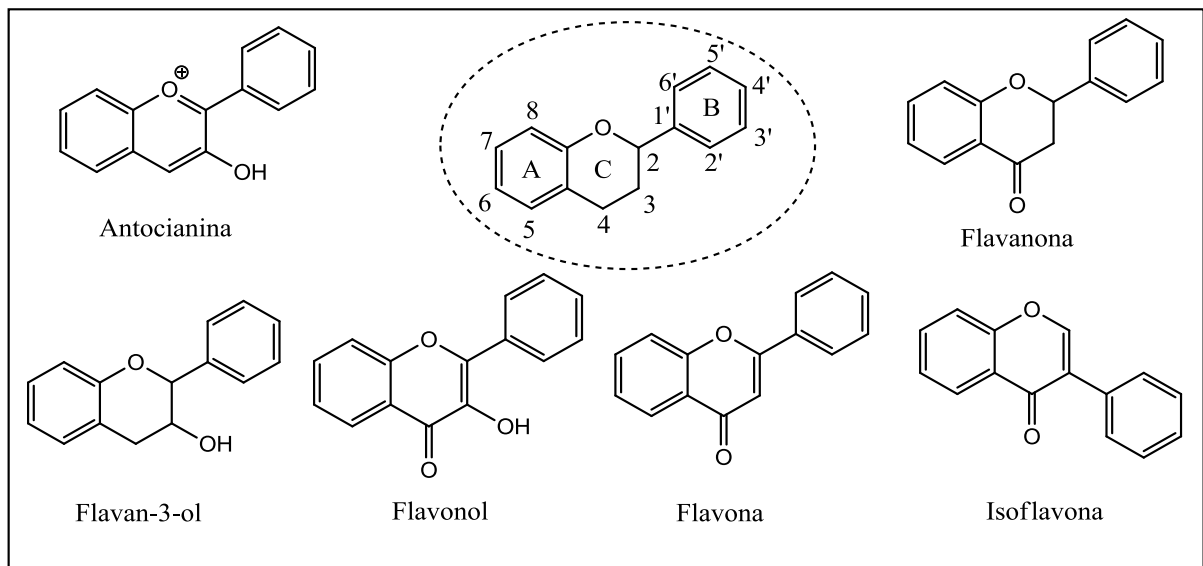
Por fim, têm-se as lignanas, comumente encontradas em plantas, são dímeros de alguns fenilpropanóides (C_6-C_3) formados por acoplamento oxidativo da cadeia lateral de duas dessas moléculas. As ligninas são, portanto, macromoléculas (polímeros de fenilpropanóides) e que são encontradas na parede celular, conferindo rigidez as plantas. Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol e apresentam, principalmente, atividade antioxidante para as plantas (SIMÕES et al., 2017).

1.2.3. Flavonoides

Os flavonoides são os mais comuns e o maior grupo de compostos fenólicos em produtos naturais. Nas plantas, são responsáveis por atrair polinizadores e dispersores de sementes, além de proteger a planta contra os raios UV. Esses

compostos apresentam 15 carbonos em sua estrutura básica e são constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) que são ligados por três carbonos que podem ou não formar um anel heterocíclico (C). Considerando os flavonoides com anel heterocíclico de 6 membros, que podem variar o seu grau de insaturação e de oxidação e a posição do anel aromático B, tem-se as principais classes de flavonoides: antocianina, flavan-3-ol, flavanona, flavonol, flavona e isoflavona (Figura 8) (WANG; LI; BI, 2018).

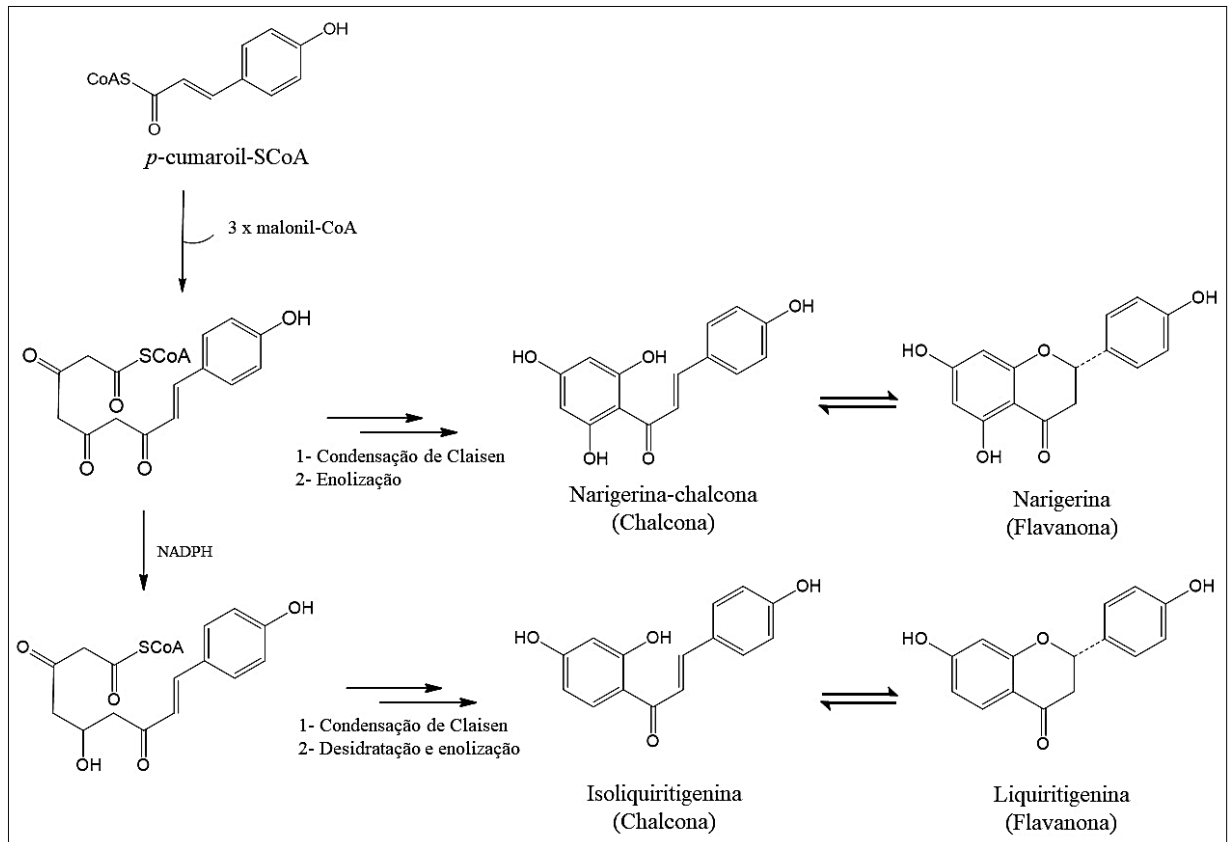
Figura 8. Fórmulas estruturais básicas e classificação dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de Wang e outros (2018)

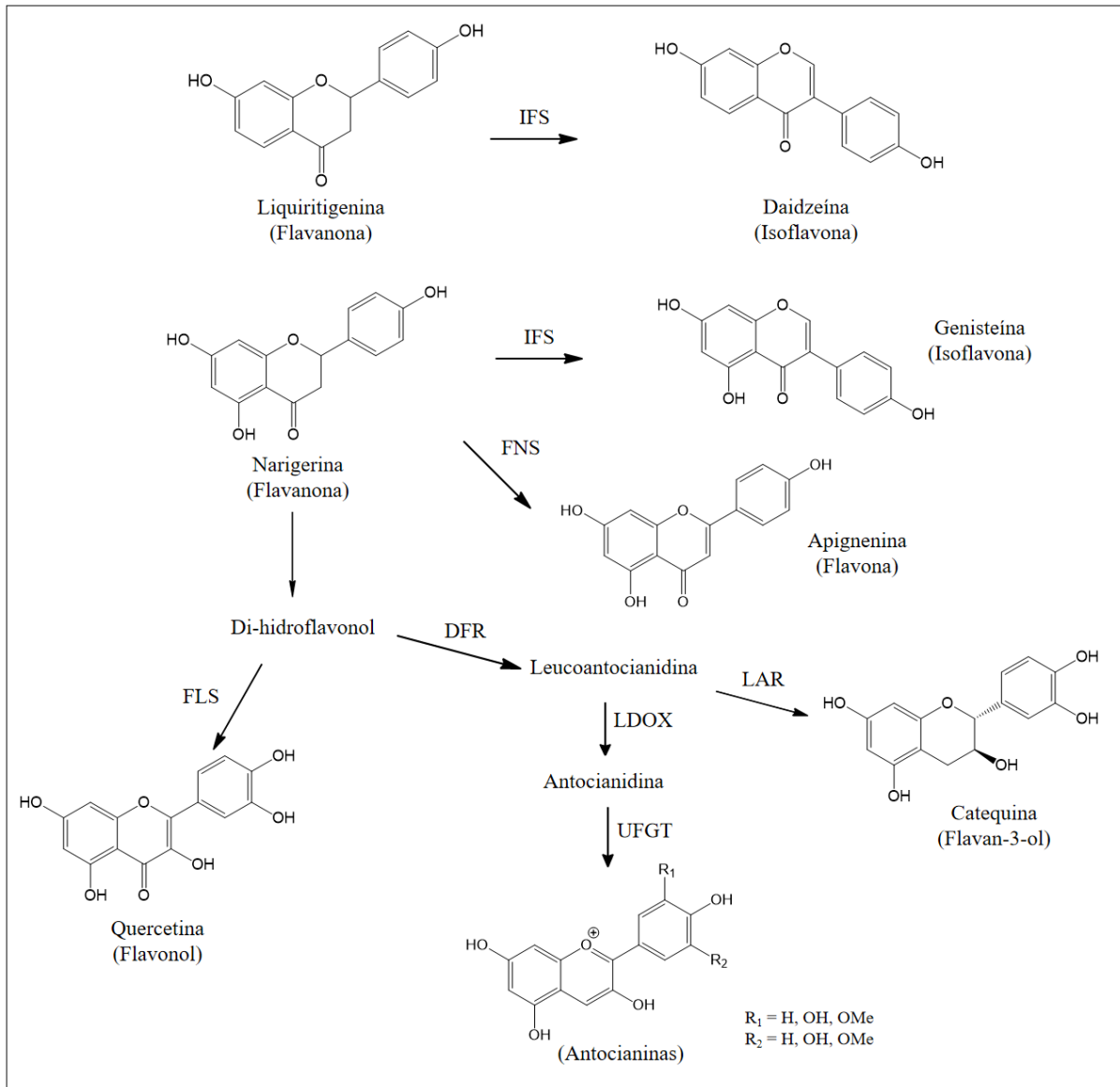
Os flavonoides são originados a partir de duas rotas biossintéticas. Na via do chiquimato é produzido o aminoácido fenilalanina que é transformado em ácido cinâmico com uma eliminação de amina, em seguida, ocorre uma hidroxilação, formando o ácido *p*-cumárico, que após ser acetilado com um acetil-CoA produz o precursor *p*-coumaroil-CoA. O *p*-coumaroil-CoA reage com três moléculas de malonil-CoA produzidas na via do acetato, e a reação de condensação é catalisada pela enzima chalcona sintase (CHS), produzindo chalconas. As chalconas são precursoras da síntese de liquiritigenina e naringenina, duas flavanonas (Figura 9) e esses produtos seguem muitas etapas enzimáticas gerando diversas outras classes de flavonoides, assim como os flavan-3-ols (Figura 10) (DEWICK, 2009; KU et al., 2020; ZHAO et al., 2020).

Figura 9. Biossíntese de flavanonas com precursores da via do chiquimato e acetato.



Fonte: Adaptado de Dewick (2009)

Figura 10. Biossíntese de outras classes de flavonoides a partir de flavanonas.



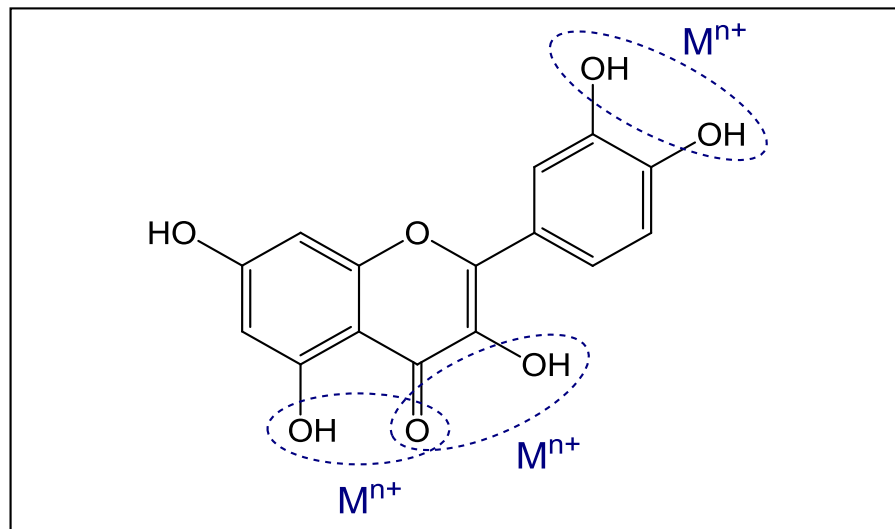
Nota: IFS – isoflavona sintase; FNS – flavona sintase; FLS – flavonol sintase; DFR – dihidroflavonol 4-reductase; LAR – leucoantocianidina reductase; LDOX – leucoantocianidina dioxigenase; UFGT – UDP-glicose flavonoide-3-O-glicosídeo transferase. Fonte: Adaptado de Ku e outros (2020).

Os flavonoides são encontrados em diversos alimentos e, no geral, são conhecidos pela sua capacidade antioxidante. Isso ocorre pois os radicais gerados nas hidroxilas dos grupos fenólicos são estabilizados devido ao seu sistema conjugado presente nos flavonoides, contribuindo para a deslocalização do elétron desemparelhado do radical. Devido a esta propriedade, o seu consumo está ligado à

prevenção de doenças causadas por estresse oxidativo (EBEGBONI; DICKENSON; SIVASUBRAMANIAM, 2019). Um exemplo seria a utilização para retardar o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como por exemplo, a quercetina (flavonol), a luteolina (flavona), a genisteína (isoflavona) e a cianidina (antocianidina) que possuem relatos de ação anti-inflamatória contra a asma, uma patologia caracterizada pela inflamação das vias aéreas, obstrução e hiperresponsividade brônquica (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). Alguns flavonoides também possuem atividades antivirais, como é o caso da naringenina (flavanona) que possui atividade contra o vírus da hepatite B (HCV) e a epigallocatequina-3-galato (flavan-3-ol) que inibe a entrada do vírus da hepatite B (HBV) nas células (NINFALI et al., 2020). Além disso, essas biomoléculas apresentam propriedades anticâncer, antibacteriana, antidiabética, antifúngicas e antimalárica (ULLAH et al., 2020).

Devido ao sistema conjugado dos anéis aromáticos, os flavonoides apresentam absorção no espectro UV-Vis com transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Em geral, esses compostos apresentam dois máximos de absorção ocorrendo um entre 240 e 285 nm (banda II, sistema benzoil) devido a presença do anel A e outro entre 300 e 400 nm (banda I, sistema cinamoil) pela presença do anel B. Os ligantes presentes na molécula e a extensão da conjugação são responsáveis pelas variações das bandas de absorção de diferentes classes e compostos (SIMÕES et al., 2017). Outra característica desses compostos é a capacidade quelante devido à presença de grupos hidroxilas e carbonila. Os flavonoides possuem até três sítios quelantes possíveis para o metal, tendo como exemplo a quercetina (Figura 11), e no caso dos flavonoides glicosilados, ainda é possível possuir outros sítios. Além disso, os espectros UV-Vis encontrados na literatura mostram que as reações de complexação provocam deslocamentos no comprimento de onda das bandas de absorção (KHATER et al., 2019).

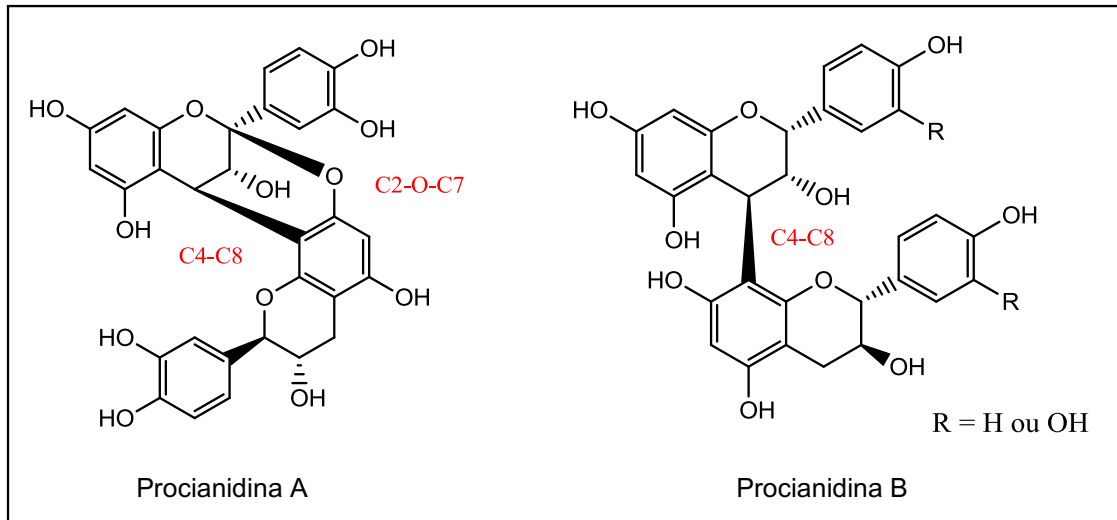
Figura 11. Fórmula estrutural da quercetina e três possíveis sítios de quelação desse flavonoide.



Fonte: A autora

Os flavan-3-óis e os flavan-3,4-dióis podem formar oligômeros ou polímeros, chamados proantocianidinas e são os produtos finais da via biossintética dos flavonoides. As proantocianidinas de epi/catequina são chamadas de procianidinas. As ligações entre os monômeros podem ocorrer entre o C4 e C8 ou entre o C4 e o C6 de flavan-3-óis ou flavan-3,4-dióis, e quando é epi/catequina classifica-se em procianidina B. As ligações entre os monômeros podem também ocorrer com uma ligação adicional entre o C2-O-C7 ou C2-O-C5 (Figura 12), que quando é epi/catequina classifica-se em procianidina A. Esses compostos são encontrados em diversas partes das plantas, inclusive em alimentos como sementes e frutas, e apresentam potenciais terapêuticos como propriedade antioxidante, cardioprotetora, neuroprotetora, antiobesidade, antidiabética, anticâncer e antimicrobiana (RAUF et al., 2019; YU et al., 2020).

Figura 12. Representação do tipo de ligação formada em proantocianidinas.



Fonte: Adaptado de YU e outros (2020)

1.2.4. Análises de compostos fenólicos e flavonoides

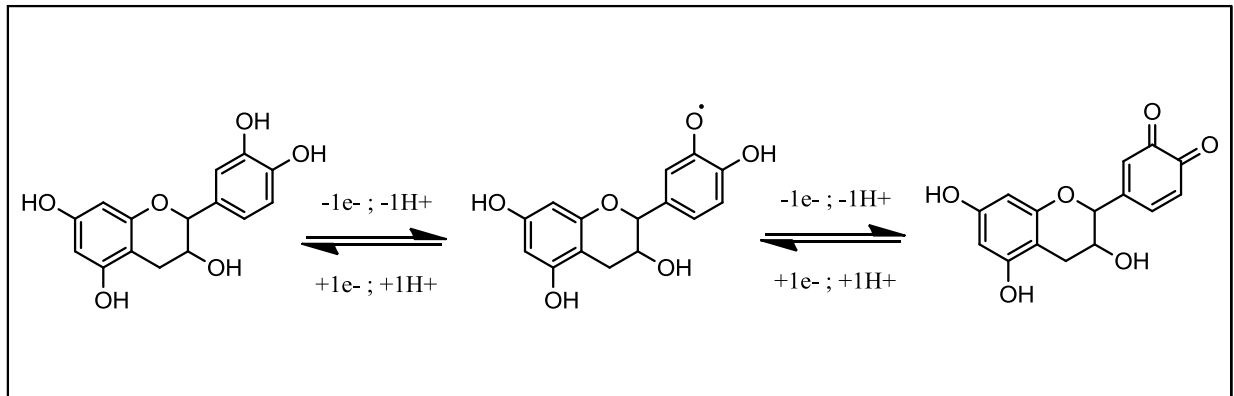
A CLAE acoplada às técnicas espectroscópicas e espectrométricas são bastante empregadas na detecção de flavonoides e são importantes em sua análise, elucidação e quantificação, porém são métodos de alto custo de manutenção, exigem elevada quantidade de solvente em grande parte dos equipamentos e exigem um maior tempo de análise pois depende de separação cromatográfica. Dessa forma, técnicas clássicas ainda são bastante empregadas nas análises preliminares devido sua facilidade e baixo custo. Uma das técnicas qualitativas clássicas mais empregadas é a cromatografia em camada delgada (CCD), na qual consiste em uma fase estacionária fixada em uma placa de suporte e uma fase móvel com uma combinação de solventes específicos dependendo da composição do extrato vegetal. O revelador mais comum é a luz ultravioleta empregada em dois diferentes comprimentos de onda (254 e 365 nm) e, após essa análise, é possível empregar reveladores químicos para a detecção de diferentes classes de moléculas. Os reveladores NP-PEG (difetilboriloxietilamina) e o cloreto de alumínio (AlCl_3), por exemplo, são específicos para a detecção de flavonoides (SAMPIETRO; BERTINI SAMPIETRO; VATTUONE, 2020).

Algumas técnicas de análise quantitativa englobam certa classe de moléculas, como por exemplo, a determinação do teor de fenóis totais. Nesta análise, os

compostos fenólicos são detectados através da reação com o reagente *Folin-Ciocalteu* (fosfomolibdato-fosfotungstato) resultando um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm. Já para a determinação do teor de flavonoides, que se baseia na complexação desses compostos com AlCl_3 , uma curva analítica é construída utilizando como padrão um flavonoide e o complexo formado é monitorado em 415 nm (POBIEGA et al., 2019). Entretanto, essa técnica não é eficiente na detecção de flavan-3-ol, pois em meio ácido ou neutro esses compostos não complexam com AlCl_3 ; em meio básico os flavan-3-ols até complexam através de uma metodologia complexa, mas as catequinas não são estáveis nesse meio, o que compromete a precisão deste método (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014). Sendo assim, essas técnicas, apesar de serem simples e importantes, não possuem tanta especificidade e trazem informações incompletas a respeito da composição química do material vegetal quando se quer determinar uma classe específica de compostos (ATOMSSA; GHOLAP, 2015).

A eletroanalítica também é utilizada em análises de compostos fenólicos, sendo possível ser empregada em sua quantificação. Além disso, abrange um conjunto de métodos e procedimentos que possuem vantagens em relação às outras técnicas, como menor custo, maior sensibilidade, resposta rápida, baixo consumo de reagentes e muitas vezes é dispensável o tratamento prévio da amostra. As técnicas eletroanalíticas fornecem dados importantes a respeito dessas moléculas eletroativas, como a propriedade redox, fornecendo informações sobre a transferência de elétrons. A Figura 13 apresenta a reação de oxirredução da catequina e, no processo de oxidação eletroquímica, é formada a sua respectiva quinona. As principais técnicas utilizadas na análise dos compostos fenólicos são a voltametria cíclica (VC), a voltametria de onda quadrada (VOQ) e a voltametria de pulso diferencial (VPD) (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020; ZHUPANOVA et al., 2020; ZIYATDINOVA; KOZLOVA; BUDNIKOV, 2018).

Figura 13. Representação da reação de oxirredução da catequina.

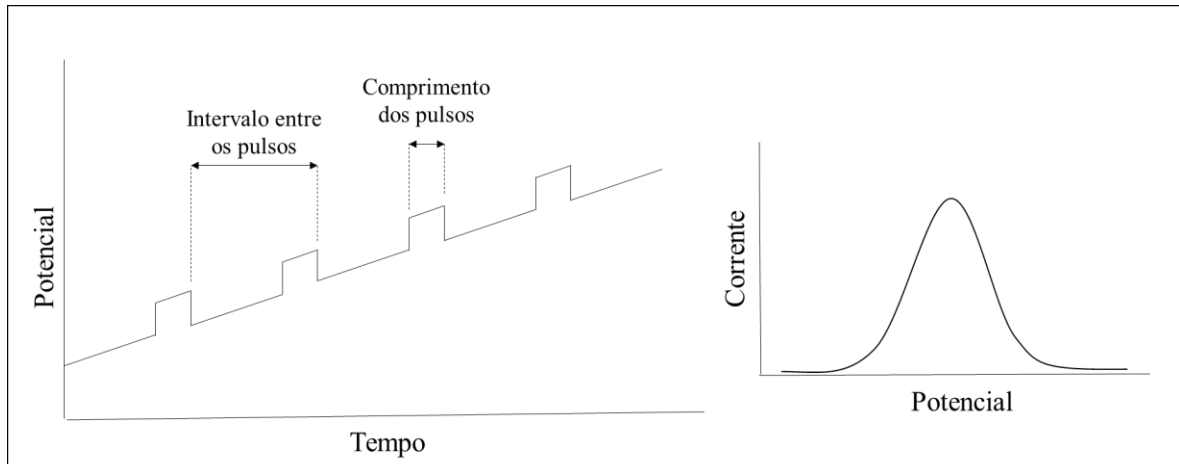


Fonte: Adaptado de Ziyatdinova e outros (2018)

Os métodos eletroanalíticos consistem no uso de uma cela eletroquímica contendo o eletrólito de suporte e eletrodos. Uma diferença de potencial é aplicada entre os eletrodos gerando uma transferência de elétrons durante o processo de oxirredução, sendo possível delinear e mensurar algumas propriedades elétricas. Na voltametria, os processos estudados ocorrem no eletrodo de trabalho, já o eletrodo de referência fornece um potencial de referência fixo e o eletrodo auxiliar assegura o sistema potenciostático. Dessa forma, na voltametria existe um potencial aplicado de forma ajustada que gera uma corrente que é medida e registrada em forma de um voltamograma. A intensidade da corrente gerada é proporcional à concentração dos compostos eletroativos presentes na amostra (SCHOLZ, 2015).

Na VPD, os pulsos de amplitude fixa são sobrepostos a uma rampa de potencial linearmente crescente. Na Figura 14, observa-se o sinal de excitação do potencial em relação ao tempo, em que a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra ao final da aplicação do pulso e o seu valor final é a diferença entre esses dois valores. O pulso aplicado possui uma pequena amplitude que pode variar de 10 a 100 mV, o comprimento do pulso geralmente tem valores entre 40 e 60 ms e o tempo de intervalo entre os pulsos varia entre 0,5 e 5 s. Os voltamogramas gerados de corrente versus potencial possui a forma da distribuição gaussiana (HOYOS-ARBELÁEZ; VÁZQUEZ; CONTRERAS-CALDERÓN, 2017; LABIB; SARGENT; KELLEY, 2016).

Figura 14. Sinais de excitação e voltamograma típico obtido por VPD.



Fonte: Adaptado de Hoyos-Arbeláez e outros (2017)

O uso da VPD permite a determinação de compostos eletroativos na faixa de concentração entre 10^{-7} e 10^{-8} mol L⁻¹. Baixos valores de concentração são possíveis de se obter, pois há a correção da corrente de fundo após a diferença das duas medidas de corrente. Dessa forma, a VPD é extremamente útil em medir níveis traços tanto de compostos orgânicos, quanto inorgânicos (SCHOLZ, 2015; WANG, 2006a). Levando em consideração que os flavonoides encontrados, por exemplo, em medicamentos fitoterápicos, são moléculas eletroativas, é possível desenvolver métodos eletroanalíticos para a análise desses compostos, visando auxiliar no controle de qualidade do material vegetal. Um exemplo prático do uso da VPD na análise de compostos orgânicos inclui a quantificação de quercetina e luteolina, dois flavonoides presentes na páprica (CHAMIZO-GONZÁLEZ; MONAGO-MARAÑA; GALEANO-DÍAZ, 2017) e a quantificação de quercetina e rutina em plantas medicinais, utilizando eletrodos modificados (ZIYATDINOVA et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar uma metodologia eletroanalítica para análise de teor de flavan-3-ol em amostras de medicamentos tradicionais fitoterápicos empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta eletroanalítica de alguns flavonoides em diferentes eletrólitos de suporte por meio da voltametria de pulso diferencial;
- Determinar o perfil voltamétrico de diferentes flavonoides via voltametria de pulso diferencial (VPD);
- Validar o método analítico para determinar o teor de flavan-3-ol em equivalente de catequina;
- Preparar extratos metanólicos dos fitoterápicos;
- Aplicar o método de quantificação desenvolvido nos extratos metanólicos de fitoterápicos;
- Determinar o teor de fenóis totais dos extratos de fitoterápicos pelo método Folin-Ciocalteu e comparar com o teor de equivalente de catequinas;
- Identificar os flavonoides presentes nos fitoterápicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada espectrometria de massas (CLAE-EM).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Balança analítica SHIMADZU modelo ATX224
- Lavadora ultra-sônica modelo USC-750 Unique
- Micropipeta Eppendorf Research plus 100-1000 µL
- Micropipeta Eppendorf Research plus 20-200 µL
- Potenciostato Dropsens µSTAT300 conectado a um microcomputador equipado com o software Dropview 8400.
- Agitador magnético com aquecimento C-MAG HS 7
- Banho de aquecimento redondo modelo 550
- Espectrofotômetro Thermo Scientific modelo GENESYS 10S UV-Vis
- Cubeta em quartzo da marca Kasvi e modelo K22-135-Q
- Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics modelo MaXis 3G com uma fonte de electrospray (ESI) e analisador quadrupolo q-TOF

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

As amostras de produto tradicional fitoterápico de chá verde (*C. sinensis*) foram obtidos por meio de diferentes farmácias de manipulação em Uberlândia, MG, Brasil: Naturallis (CV1), Farmácia Homeopática Mineira (CV2), Farmativa (CV3), Farmácia Nossa Sra. da Guia (CV4) e Exata (CV5). Também foram utilizados amostras de outros fitoterápicos, o Fitoscar® e *Ginkgo biloba*.

A Tabela 4 apresenta as especificações das substâncias utilizadas para o preparo das soluções utilizadas neste trabalho, no qual apresenta a pureza/teor, informações da empresa de onde foi adquirido e a localização do laboratório fornecedor.

Tabela 4. Especificações das substâncias utilizadas no preparo das soluções utilizadas nos experimentos realizados neste trabalho.

Substância	Pureza/ Teor	Empresa	Origem
Catequina	98,0 %	Sigma-Aldrich	Milwaukee, WI (EUA)
Quercetina	95,0 %	Sigma-Aldrich	Milwaukee, WI (EUA)
Rutina	95,0 %	Sigma-Aldrich	Milwaukee, WI (EUA)
Epigallocatequina-galato	≥95,0 %	Sigma-Aldrich	Milwaukee, WI (EUA)
Ácido gálico	99,0 %	Vetec	Duque de Caxias, RJ (Brasil)
Cloreto de alumínio	99,5 %	Vetec	Duque de Caxias, RJ (Brasil)
Acetato de sódio trihidratado	99,0 %	Vetec	Duque de Caxias, RJ (Brasil)
Cloreto de lítio	99,0 %	Acros Organics	Geel (Belgium)
Metanol	99,5 %	Vetec	Duque de Caxias, RJ (Brasil)
Ácido sulfúrico	98,0 %	Labsynth	Diadema, SP (Brasil)
Ácido acético	99,7 %	Labsynth	Diadema, SP (Brasil)
Folin-Ciocalteu	-	Dinâmica	Indaiatuba, SP (Brasil)

Fonte: A autora

3.3 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV-Vis

Para a obtenção dos espectros UV-Vis foi realizada a leitura do metanol como branco e de uma solução padrão de cada flavonoide (catequina, quercetina e rutina) com concentrações de 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada, preparadas em metanol. Utilizou-se uma cubeta em quartzo modelo K22-135-Q da marca Kasvi e um espectrofotômetro Thermo Scientific modelo GENESYS 10S UV-Vis. A varredura foi realizada de 200 a 600 nm.

3.4 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

As avaliações realizadas para o desenvolvimento e a validação da metodologia eletroanalítica foram conduzidos utilizando-se um potenciostato Dropsens μ STAT300 (Figura 15) conectado a um microcomputador equipado com o software Dropview 8400.

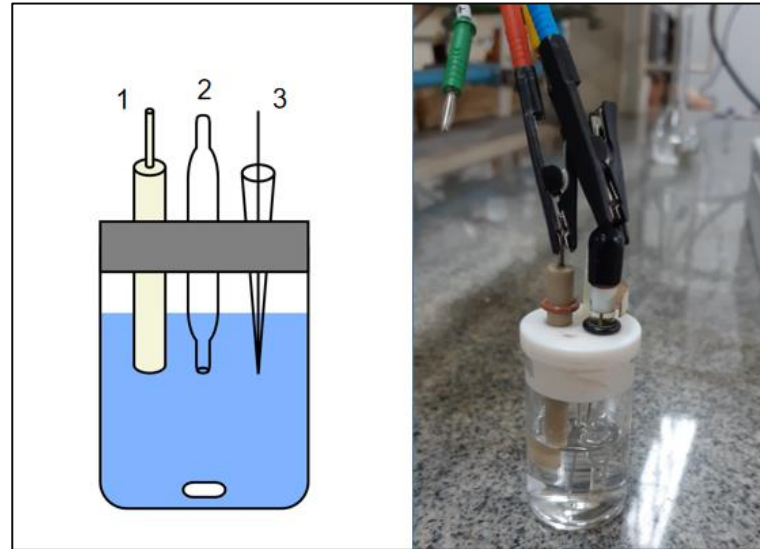
Figura 15. Potenciostato Dropsens μ STAT300 utilizado nas análises eletroanalíticas.



Fonte: A autora

A Figura 16 ilustra a célula eletroquímica utilizada nas análises, a qual possui formato cilíndrico, produzida com vidro, com dimensões de 5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro. O esquema de eletrodos é composto por três eletrodos: eletrodo de trabalho de carbono vítreo ($\varnothing = 1,5$ mm, BASi® – West Lafayette, EUA), eletrodo de referência de Ag/AgCl em solução saturada de KCl e um fio de platina foi empregado como eletrodo auxiliar. A agitação do sistema foi realizada utilizando agitador magnético (1 cm comprimento e 3 mm de diâmetro). Os parâmetros utilizados na análise encontram-se na Tabela 5.

Figura 16. Imagem e esquema da célula eletroquímica convencional com o sistema de três eletrodos e uma barra magnética. 1: eletrodo de trabalho; 2: eletrodo de referência; 3: eletrodo auxiliar.



Fonte: A autora.

Tabela 5. Parâmetros para a técnica de pulso diferencial (VPD).

Parâmetros	Valor
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	25
Degrau de potencial (mV)	6
Amplitude (mV)	60

Fonte: Adaptado de Lima et al. (2020).

O polimento da superfície do eletrodo de trabalho de carbono vítreo foi realizado por fricção mecânica utilizando uma suspensão de alumina em água sobre uma superfície de tecido aveludado umedecida.

3.4.1 Perfil voltamétrico de flavonoides

A avaliação do perfil voltamétrico dos flavonoides em diferentes soluções de eletrólitos de suporte foi realizada inicialmente com o preparo de soluções padrão em metanol: catequina, quercetina e rutina 10 mmol L^{-1} em balões volumétricos de

10 mL; cloreto de alumínio 50 mmol L^{-1} em balão de 25 mL; eletrólitos de suporte, em balões volumétricos de 100 mL, ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; cloreto de lítio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão acetato com pH 4,8.

Na célula eletroquímica adicionou-se 9 mL da solução contendo o eletrólito de suporte e realizou-se a varredura utilizando a técnica de VPD com no intervalo de potencial de oxidação de 0 a 1,6 V (medida do branco). Na sequência, foi adicionado 1 mL da solução de flavonoide, após uma diluição de 1:1 da solução padrão (10 mmol L^{-1}), agitando-se levemente a mistura e, em seguida, foram realizadas as medições voltamétricas em triplicata, limpando o eletrodo de carbono vítreo entre as medidas. Posteriormente, em um frasco com tampa, misturou-se 2 mL da solução de flavonoide (10 mmol L^{-1}) com 2 mL da solução de AlCl_3 por aproximadamente 30 min e, após a lavagem do sistema, repetiu o procedimento anterior, entretanto utilizou-se 1 mL da solução obtida pela reação para a medida voltamétrica.

3.4.2 Parâmetros de validação analítica

3.4.2.1 Ensaio de recuperação e linearidade

Os ensaios para a obtenção de parâmetros de recuperação e linearidade foi utilizado o método de adição de padrão e para simular uma solução do complexo de alumínio do extrato de fitoterápicos foram utilizados outros flavonoides comuns junto à catequina. Para as análises foram preparadas: uma solução do eletrólito de H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, metanol), uma mistura de catequina, quercetina e rutina (1 mmol L^{-1} , metanol), uma solução de catequina (10 mmol L^{-1} , metanol) e duas soluções de AlCl_3 (10 e 25 mmol L^{-1} , metanol). Tanto a solução de mistura de flavonoides, quanto a solução de catequina, foram previamente misturadas com AlCl_3 (reação de complexação) com concentrações de 10 e 25 mmol L^{-1} , respectivamente, por 20 minutos na proporção de 1:1 a temperatura ambiente.

Na célula eletroquímica adicionou-se 9 mL do eletrólito e mediu-se o branco, por meio da VPD, na faixa de potencial de 0 a 1,4 V, no qual foi escolhida considerando o perfil voltamétrico e o potencial de oxidação dos flavonoides avaliados anteriormente. Em seguida, adicionou-se 1 mL da mistura de flavonoides após a reação de complexação e foi realizada uma nova medida. As determinações

foram realizadas em triplicata, polindo o eletrodo de trabalho entre essas medidas. Na mesma célula que continha a mistura foi adicionada alíquotas de 20 μL , aumentando a concentração de catequina complexada na cela eletroquímica, na faixa entre 10 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A curva analítica foi construída com os valores da área dos picos no potencial de oxidação de 1,06 V. Após a obtenção da concentração média experimental por meio da curva analítica, utilizou-se a Equação 1 para obter-se do parâmetro de recuperação.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo “CME” a concentração média experimental e “CT” a concentração teórica.

3.4.2.2 Limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação

O método do sinal-ruído foi utilizado para determinar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), em que foram calculados por meio da Equação 2 e 3 (BRASIL, 2017; INMETRO, 2016).

$$LD = \frac{(3 \cdot \sigma_n)}{a} \quad \text{Equação 2}$$

$$LQ = \frac{(10 \cdot \sigma_n)}{a} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo “ σ ” o desvio padrão dos 10 brancos e “a” o coeficiente angular ou inclinação da curva de calibração.

Na célula eletroquímica foi adicionado 10 mL do eletrólito de suporte (H_2SO_4 ; 0,5 mol L^{-1} ; metanol) e realizou-se 10 leituras como branco por meio da VPD na faixa de potencial de 0 a 1,4 V para a obtenção do desvio padrão dessas leituras. Em seguida, acrescentou-se alíquotas de 20 a 160 μL da solução de catequina complexada com AlCl_3 , gerando concentrações após a diluição, entre 10 e

80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O procedimento foi realizado em triplicata, polindo o eletrodo de trabalho entre todas as medidas. A repetibilidade foi avaliada por meio de três repetições da concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em um mesmo dia e nas mesmas condições e a precisão intermediária foi obtida mensurando a resposta dessa mesma concentração durante três dias diferentes. O cálculo do coeficiente de variação (CV) foi realizado por meio da Equação 4.

$$CV = \frac{\sigma}{CM} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo “ σ ” o desvio padrão e “CM” a concentração média determinada.

3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVAN-3-OL NOS FITOTERÁPICOS

O preparo das amostras de fitoterápicos foi realizado utilizando-se método de extração tradicional com metanol, já que os flavonoides, em geral, são bastante solúveis na presença deste solvente. Mediu-se uma massa específica de fitoterápico (Tabela 6) e adicionou-se cerca de 3 mL de metanol para cada g do material que, em seguida, foi deixada em ultrassom por 10 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, filtrou-se a amostra com filtro PTFE (13 mm x 0,22 μm), o solvente foi removido por evaporação e obteve-se o extrato após o material ser seco. O rendimento foi calculado por meio da Equação 5.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{ex}}{m_f} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Sendo “ m_f ” a massa do fitoterápico e “ m_{ex} ” a massa do extrato seco obtido.

Tabela 6. Dados da extração por método tradicional dos fitoterápicos utilizando o metanol como solvente.

Fitoterápico	Massa de fitoterápico (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
<i>G. Biloba</i>	1,0000	0,2127	21,27
Fitoscar	1,1503	1,0297	89,52
CV1	1,5934	0,1180	7,41
CV2	1,8767	0,1702	9,07
CV3	1,8363	1,2336	67,18
CV4	1,7663	1,4305	80,99
CV5	2,0291	1,3312	65,60

Nota: CV, Chá verde. Fonte: A autora.

As quantificações de catequinas foram conduzidas de forma similar ao ensaio de recuperação. Foram preparadas uma solução do eletrólito de H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, metanol), solução do extrato metanólico (concentrações na Tabela 7), uma solução de catequina (10 mmol L^{-1} , metanol) e duas soluções de AlCl_3 (10 e 25 mmol L^{-1} , metanol). Tanto a solução de extrato, quanto a solução padrão de catequina, foram previamente misturadas com AlCl_3 (reação de complexação) com concentrações de 10 e 25 mmol L^{-1} , respectivamente, por 20 minutos na proporção de 1:1 a temperatura ambiente.

Tabela 7. Concentrações das soluções preparadas com o extrato de fitoterápico após análise prévia da intensidade de seus picos de oxidação.

Extrato de fitoterápico	Concentração (mg mL^{-1})
<i>G. Biloba</i>	2,0
Fitoscar	200,0
CV1	3,0
CV2	3,0
CV3	3,0
CV4	3,0
CV5	2,0

Nota: CV, Chá verde. Fonte: A autora.

Na célula eletroquímica, que já continha 9 mL do eletrólito de suporte (H_2SO_4 ; $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; metanol), adicionou-se 1 mL da solução do extrato metanólico após a reação de complexação nas condições citadas. Em seguida, por meio do método de adição de padrão, adicionou-se alíquotas de 20 μL do padrão de catequina complexada, aumentando a concentração de 10 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, considerando a diluição na célula. Com auxílio das curvas analíticas (área do pico *versus* concentração) obteve-se a informação do teor de flavan-3-ol em *mg* de equivalente de catequina por *g* de fitoterápico presente nas amostras.

3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NOS FITOTERÁPICOS

O teor de fenóis totais foi mensurado de acordo com o método descrito por Morais e outros (2008). Para a construção da curva analítica para a determinação do teor de fenóis totais, foram preparadas soluções em concentrações crescentes de 5 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico em metanol. Em tubos de ensaio foi adicionado, em triplicata, 0,5 mL de cada solução de ácido gálico e um branco contendo apenas metanol. Em seguida, no mesmo tubo de ensaio, adicionou-se 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10 % (v v^{-1}) e 2,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 7,5 % (m v^{-1}). Os tubos foram mantidos em banho a 50 °C por 5 minutos e posteriormente mediu-se a absorbância selecionando o comprimento de onda de 760 nm (Figura 17).

Figura 17. Preparo das soluções em triplicata em concentrações crescentes para construção da curva analítica visando à determinação do teor de fenóis totais.



Fonte: A autora

O mesmo procedimento foi empregado em sete soluções de extratos preparados em metanol de diferentes fitoterápicos (concentrações na Tabela 8) reagidos com Folin-Ciocalteu. Dessa forma, pode-se construir uma curva analítica de absorvância em função da concentração de ácido gálico, em que os resultados da avaliação do teor de fenóis totais foram expressos em *mg* de equivalente de ácido gálico por *g* de fitoterápico.

Tabela 8. Informações a respeito da concentração das soluções preparadas após análise prévia da absorvância do extrato para cálculo dentro da faixa linear.

Extrato de fitoterápico	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>G. Biloba</i>	66,7
Fitoscar	200,0
CV1	200,0
CV2	200,0
CV3	50,0
CV4	100,0
CV5	50,0

Nota: CV, Chá verde. Fonte: A autora.

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM/EM)

A análise química qualitativa das amostras de fitoterápicos foi realizada utilizando um sistema de CLAE acoplada à um detector UV e espectrometria de massas. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Phenomenex Luna – C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm) e a detecção foi feita em comprimentos de onda de 230 e 278 nm. Utilizando-se a metodologia cromatográfica proposta por Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006) a eluição em gradiente utilizando como fase móvel metanol/ácido fórmico (99,7:0,3, v v⁻¹, A) e água/ácido fórmico (99,7:0,3, v v⁻¹, B) com a composição de 90 % do solvente B por 6 min, de 90 a 70 % de 6 à 20 min e de 70 à 55 % de 20 à 40 min. Foi injetado 10 μL de amostra, utilizando uma vazão de 1 mL min^{-1} e temperatura do forno da coluna de 30 °C.

A detecção foi realizada utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução da marca Bruker Daltonics e modelo MaXis 3G com uma fonte de eletronspray (ESI) e analisador quadrupolo q-TOF. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas no CLAE. A ionização ocorreu em um capilar aquecido à 180 °C, a tensão capilar de 4,5 kV e o fluxo de gás nebulizante de 4 L min⁻¹. Os dados foram coletados como espectros no modo negativo com uma varredura de *m/z* de 200 a 2000 e, em seguida, foi realizada a espectrometria de massas sequencial (EM/EM) dos íons mais abundantes com diferentes energias de colisões. Com as massas de alta resolução e a análise dos fragmentos das moléculas foi possível identificar os compostos bioativos dos fitoterápicos. As massas de alta resolução foram comparadas com as massas exatas dos compostos e o erro em ppm foi obtido com a Equação 5.

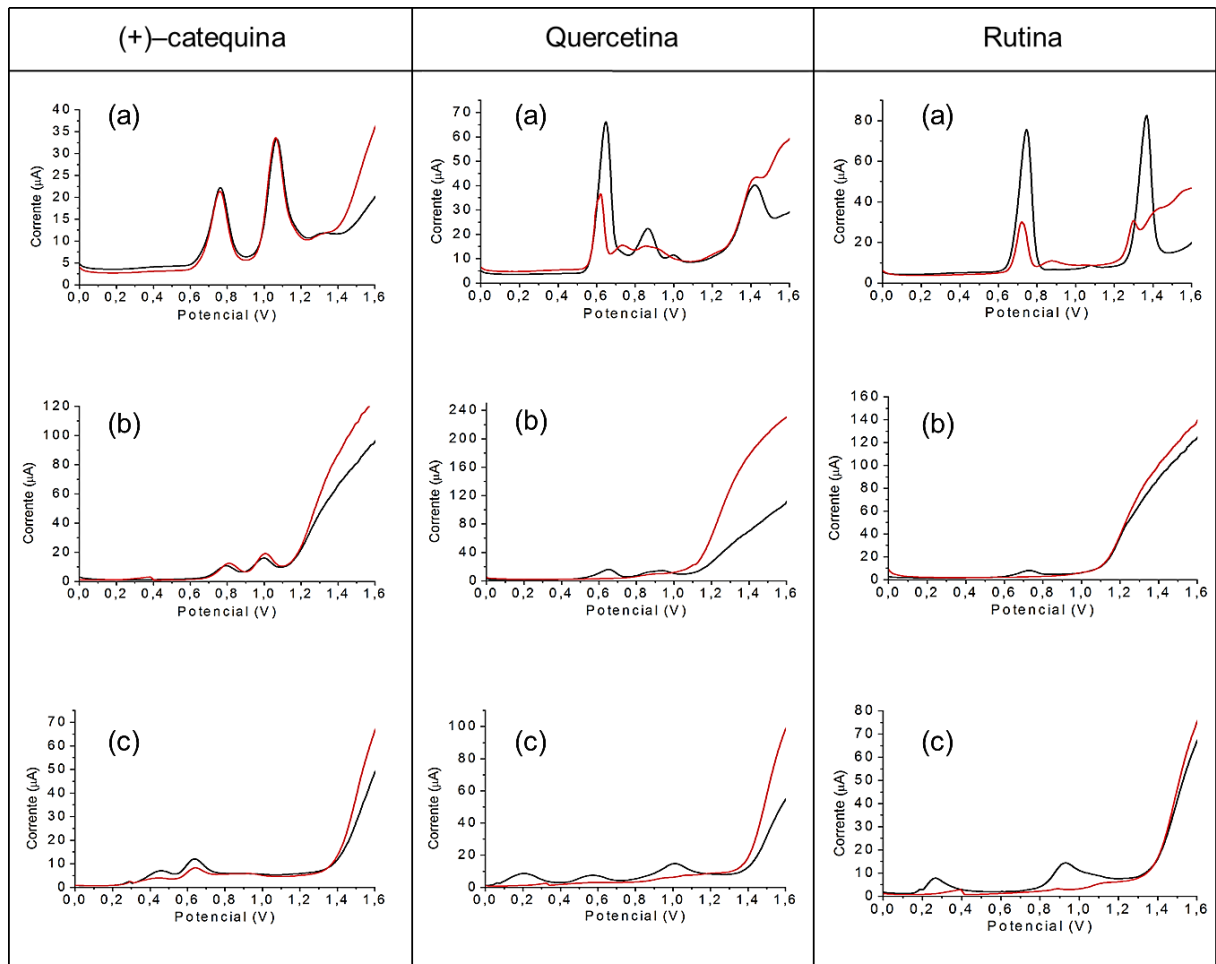
$$E_{ppm} = \left[\frac{(massa\ experimental - massa\ exata)}{massa\ exata} \right] 10^6 \quad \text{Equação 5}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PERFIL VOLTAMÉTRICO EM DIFERENTES ELETRÓLITOS DE SUPORTE E ESPECTROFOTOMÉTRICO DE FLAVONOIDES

O eletrólito de suporte é uma solução que possui uma solução eletrolítica com condutividade elétrica superior ao solvente, em que é possível utilizar sais, ácidos e bases em sua preparação. Uma alta concentração de eletrólito de suporte em relação aos íons eletroativos faz com que haja uma redução no campo elétrico e o aumento a condutividade da solução (WANG, 2006b). O comportamento voltamétrico da catequina, quercetina e rutina livres e complexados com AlCl₃ foram investigados em três tipos de soluções eletrolíticas suporte: ácido sulfúrico (0,5 mol L⁻¹; metanol), cloreto de lítio (0,5 mol L⁻¹; metanol) e tampão acetato (pH 4,8), como indicado na Figura 18.

Figura 18. Resposta voltamétrica, via VPD, da catequina, quercetina e rutina (5 mmol L^{-1}) livres (linha preta) e complexados com AlCl_3 (linha vermelha), utilizando as soluções eletrolíticas suporte: (a) H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), (b) LiCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e (c) tampão acetato (pH 4,8). Condições VPD: 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).



Fonte: A autora.

A Tabela 9 indica os valores dos potenciais de oxidação da catequina livre e complexada com AlCl_3 , obtidos dos voltamogramas indicados na Figura 18. Em uma mesma solução eletrolítica suporte, tanto o composto livre, quanto complexado, apresentaram perfis semelhantes entre eles, exceto com a utilização da solução eletrolítica suporte de tampão acetato, em que houve uma pequena diminuição da intensidade do sinal para o composto em presença de AlCl_3 . A solução de ácido sulfúrico foi selecionada para realizar os experimentos já que apresentou valores de corrente mais elevados para a catequina com sinais bem definidos nos potenciais de

oxidação em 0,76 e 1,06 V, enquanto para as demais soluções eletrolíticas suporte apresentaram um sinal de corrente inferior ou nulo e com menor definição.

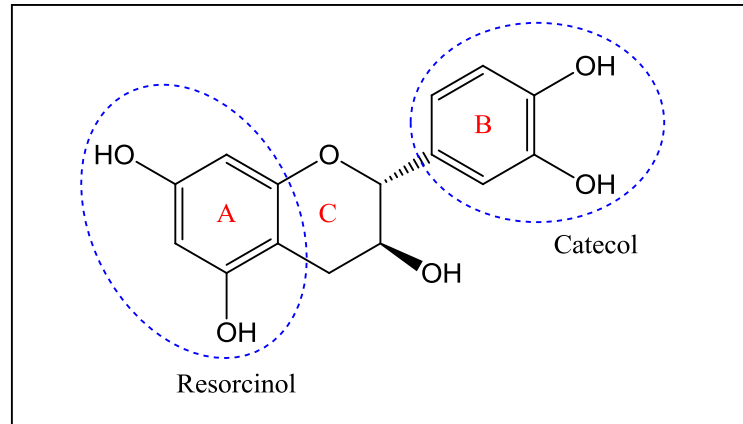
Tabela 9. Valores dos potenciais de oxidação da catequina e mistura catequina + AlCl_3 , utilizando a técnica de VPD, em diferentes soluções eletrolíticas suporte.

Solução eletrolítica suporte (0,5 mol L ⁻¹)	Potencial (V)			
	catequina		catequina + AlCl_3	
	1	2	1	2
H_2SO_4	0,74±0,02	1,06±0,00	0,76±0,00	1,06±0,00
LiCl	0,80±0,01	1,00±0,00	0,80±0,01	1,00±0,00
Tampão acetato (pH 4,8)	0,46±0,01	0,64±0,00	0,64±0,00	-

Fonte: A autora.

A reação de oxidação da catequina é dependente do pH já que a desprotonação aumenta a capacidade antioxidante devido a doação de elétrons, o que explica as diferentes resoluções e potenciais de oxidação em diferentes eletrólitos de suporte. A estrutura da catequina possui um grupo catecol (anel B) e um grupo resorcinol (anel A) e um grupo hidroxila no anel C (Figura 19). O sinal de menor potencial de oxidação está associado à oxidação do grupo catecol, no qual é uma reação reversível, e o segundo sinal que aparece em um potencial de oxidação maior está associado ao grupo resorcinol, que sofre uma reação de oxidação irreversível (JANEIRO; BRETT, 2004).

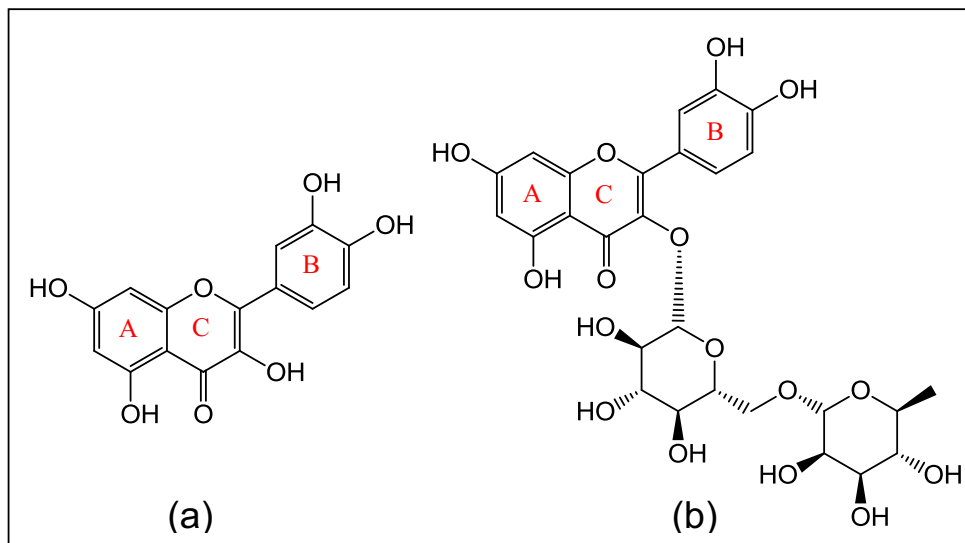
Figura 19. Representação estrutural da catequina e indicação dos grupos relacionados aos sinais observados nos voltamogramas de pulso diferencial, devido as suas reações de oxidação.



Fonte: A autora.

Além dos flavan-3-ol, também se investigou a resposta voltamétrica de outros dois flavonoides, a quercetina (Figura 20a) e a rutina (Figura 20b), nas mesmas condições e, utilizando as mesmas soluções eletrolíticas suporte.

Figura 20. Representação estrutural da (a) quercetina e (b) rutina.



Fonte: A autora

A Tabela 10 indica os valores dos potenciais de oxidação da quercetina livre e complexada com AlCl_3 obtidos dos voltamogramas indicados na Figura 18. A solução eletrolítica suporte de ácido sulfúrico demonstrou melhor resolução dos voltamogramas sendo escolhida para os demais experimentos. Nesta solução, a quercetina apresentou quatro potenciais de oxidação em 0,65; 0,86; 1,00 e 1,42 V. Após a reação de complexação é observada uma diminuição significativa na intensidade da corrente e um pequeno deslocamento de alguns sinais de oxidação para potenciais menores: 0,62; 0,73; 0,87 e 1,42 V.

Tabela 10. Valores dos potenciais de oxidação da quercetina e quercetina + AlCl_3 , utilizando a técnica de VPD, em diferentes soluções eletrolíticas suporte.

Solução eletrolítica suporte (0,5 mol L ⁻¹)	Potencial (V)							
	quercetina				quercetina + AlCl_3			
	1	2	3	4	1	2	3	4
H_2SO_4	0,65± 0,00	0,86± 0,00	1,00± 0,00	1,42± 0,00	0,62± 0,00	0,75± 0,02	0,90± 0,01	1,44± 0,01
LiCl	0,66± 0,01	0,93± 0,01	-	-	-	-	-	-
Tampão acetato (pH 4,8)	0,20± 0,00	0,58± 0,00	1,00± 0,01	-	-	-	-	-

Fonte: A autora.

A Tabela 11 indica os valores dos potenciais de oxidação da rutina livre e complexada com AlCl_3 obtidos dos voltamogramas indicados na Figura 18. Na solução eletrolítica suporte de ácido sulfúrico, a qual apresentou melhor resolução entre as utilizadas, a rutina apresentou dois potenciais de oxidação em 0,74 e 1,37 V e após a reação com o AlCl_3 há uma diminuição considerável na intensidade da corrente e deslocamento dos potenciais de oxidação: 0,72 e 1,30 V.

Tabela 11. Valores dos potenciais de oxidação da rutina e rutina + AlCl₃, utilizando a técnica de VPD, em diferentes soluções eletrolíticas suporte.

Solução eletrolítica suporte (0,5 mol L ⁻¹)	Potencial (V)			
	rutina		rutina + AlCl ₃	
	1	2	1	2
H ₂ SO ₄	0,74±0,00	1,37±0,00	0,72±0,00	1,30±0,01
LiCl	0,75±0,01	-	-	-
Tampão acetato (pH 4,8)	0,26±0,01	0,93±0,00	-	-

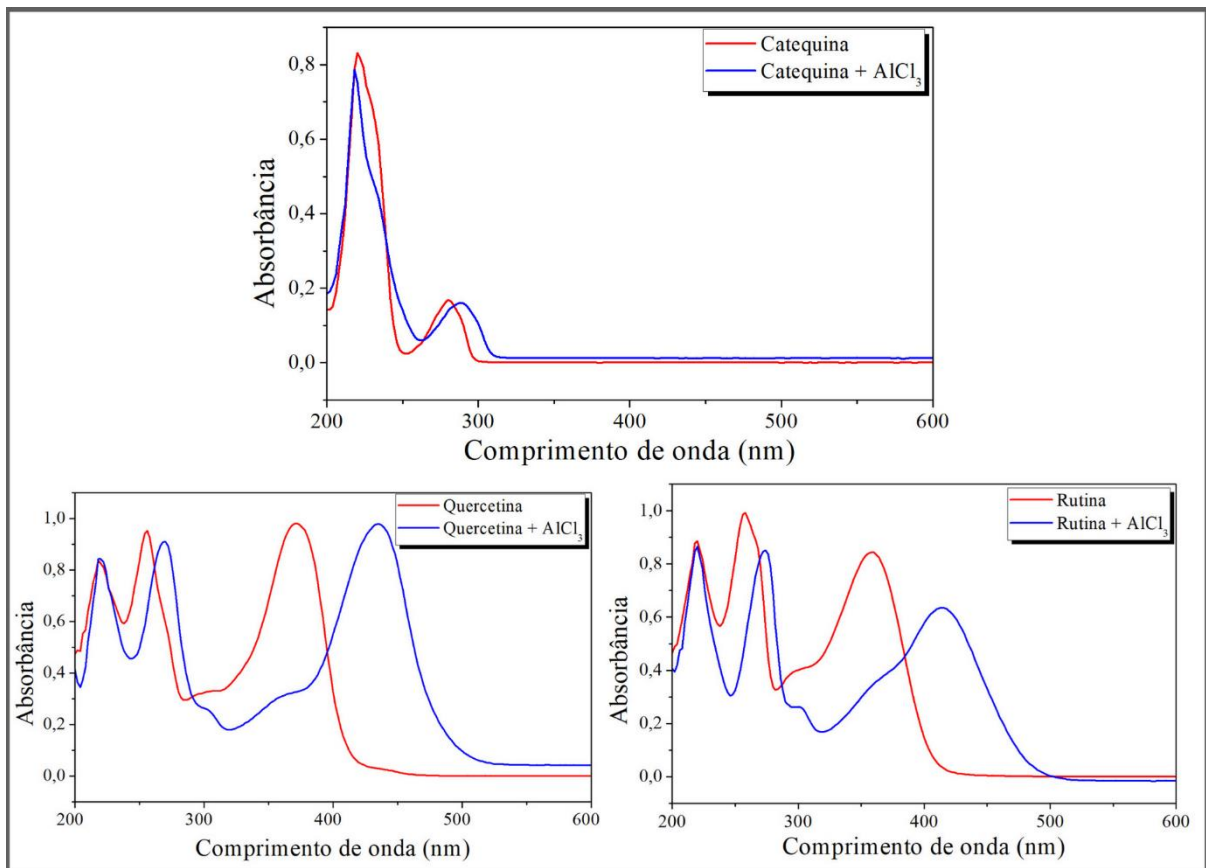
Fonte: A autora.

Tanto as reações de oxidação da quercetina, quanto a da rutina são dependentes do pH e os grupos doadores de elétrons do catecol (anel B) é o primeiro a ser oxidado em potenciais mais baixos, seguido da oxidação dos demais grupos hidroxila. Um estudo a respeito do mecanismo de oxidação da quercetina utilizando um eletrodo de carbono vítreo indicou quatro picos de oxidação, enquanto que para a rutina, nessa mesma condição, observaram-se dois picos de oxidação (BRETT; GHICA, 2003; GHICA; BRETT, 2005). Os resultados obtidos nesse estudo se assemelham e são coerentes a esse estudo. Já a diminuição da intensidade dos picos de oxidação após a quelação se deve ao fato de que o AlCl₃ reage fortemente com esses compostos e impede a sua oxidação ou afeta o potencial em que ocorre a reação.

Uma vez que os flavonoides apresentam grupos cromóforos e, portanto suscetíveis a variação do comprimento de onda de absorção com a complexação metálica, a reação de complexação desses flavonoides também foi acompanhada por meio da espectrofotometria na região do UV-Vis com uma varredura de 200 à 600 nm. A literatura indica que a catequina possui duas bandas de absorção, uma de maior intensidade em cerca de 207 nm e uma outra de menor intensidade em 280 nm (LI; WANG, 2015). A Figura 21 indica que a catequina livre apresentou uma banda mais intensa em 218 nm e outra banda menos intensa em 280 nm, já a catequina na presença do AlCl₃ apresentou uma banda mais intensa em 220 nm e a banda menos intensa em 289 nm, indicando que seus complexos são menos

estáveis nas condições utilizadas (meio ácido), já que não houve um deslocamento considerável (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014).

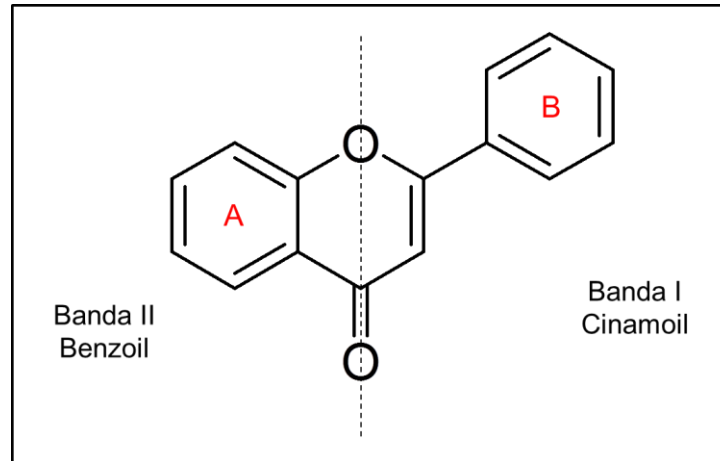
Figura 21. Espectros UV-Vis das soluções preparadas em metanol de catequina, quercetina e rutina ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$) livres (linha vermelha) e complexadas com AlCl_3 (linha azul).



Fonte: A autora.

Tanto a quercetina quanto a rutina apresentam o sistema de conjugação cinamoil e benzoil em sua estrutura, nos quais geram bandas de absorção no espectro UV-Vis em determinados comprimentos de onda. Uma banda I aparece em 300 a 400 nm e apresenta maiores comprimentos de onda devido a sua maior conjugação no sistema, enquanto uma banda II aparece na faixa de comprimento de onda de 240 a 285 nm (Figura 22) (SIMÕES et al., 2017).

Figura 22. Representação da estrutura básica de flavonoides que apresentam o sistema cinamoil e benzoil e respectivas bandas de absorção que aparecem no espectro UV-Vis



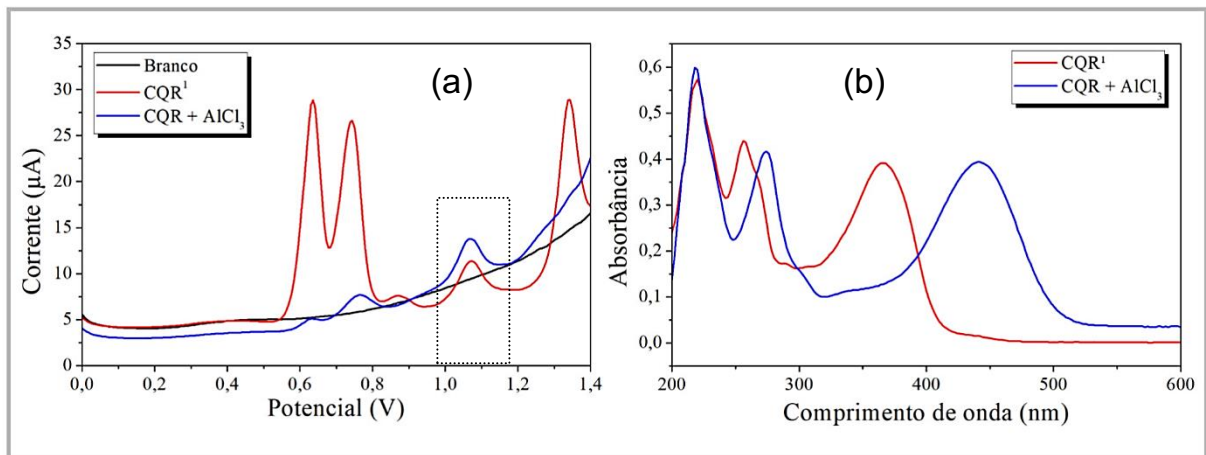
Fonte: A autora.

A quercetina livre apresentou bandas de absorção em 219, 255 e 372 nm, enquanto a quercetina complexada com AlCl_3 apresentou bandas de absorção de 219, 269 e 435 nm (Figura 21). De acordo com a literatura, a banda I da quercetina se encontra do comprimento de onda de 300 - 400 nm e a banda II se encontra na faixa de 240 - 300 nm e é possível levar à um deslocamento batocrômico quando há a quelação com metais (GHOSH et al., 2015).

Por fim, para a rutina livre foram observadas bandas de absorção em 219, 257 e 359 nm e para a rutina complexada com AlCl_3 foram observadas bandas de absorção em 219, 274 e 415 nm (Figura 21). Na literatura foi observado para a rutina o comprimento de onda da banda I em 353 nm e o da banda II em 259 nm e um deslocamento batocrômico semelhante quando há quelação com metais (IKEDA et al., 2015). Os flavonoides apresentam bandas relacionadas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e após a formação dos complexos apresentaram um deslocamento para um comprimento de onda maior principalmente na banda I (300 - 400 nm) e este desvio fornece informações a respeito do sítio de coordenação do ligante, já que indica que o metal colabora para formar um sistema de ligação π ainda mais estendido após a transferência de carga do ligante para o metal.

Após a avaliação do perfil voltamétrico e espectrofotométrico dos flavonoides de forma individualizada, realizou-se a mistura desses compostos, e novas análises e resultados foram obtidos em ambas técnicas (Figura 23).

Figura 23. (a) Resposta voltamétrica da mistura de catequina, quercetina e rutina ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) (linha vermelha) e mistura + AlCl_3 (linha azul), utilizando a solução eletrolítica suporte: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), com condições de VPD: 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude). (b) Espectros UV-Vis da solução preparada em metanol de mistura de flavonoides ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$) e da mistura complexada com AlCl_3 .



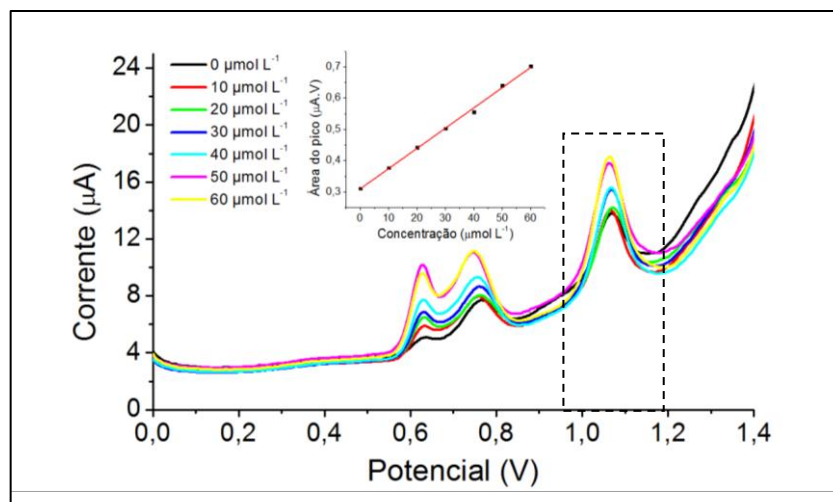
Nota: ¹CQR: Mistura de catequina, quercetina e rutina. Fonte: A autora.

Os gráficos indicam que houve a reação devido ao deslocamento batocrômico observado no espectro UV-Vis (Figura 23b). O perfil voltamétrico da mistura de flavonoides (Figura 23a) indica que é possível utilizar o pico de oxidação de $1,06 \text{ V}$ (destacado na figura) correspondente à catequina para desenvolver o método de quantificação da classe dos flavan-3-ol (chamado de catequinas), já que não sofre interferência de picos dos demais flavonoides estudados, principalmente após a reação com o AlCl_3 .

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Na Figura 24 estão representados os voltamogramas e a curva analítica utilizados para a determinação da recuperação utilizando a VPD com o método de adição de padrão e a reação de complexação com AlCl_3 . Considerando que as áreas dos picos são proporcionais à concentração do analito utilizou-se os picos indicados na figura (1,06 V) para a construção de uma curva analítica (0 - 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$), em que os valores médios foram ajustados via regressão linear no software Origin Pro 8.0. A equação da reta obtida pela regressão foi $y = 0,0065 \cdot x + 0,31$ e apresentou uma boa linearidade na faixa de trabalho com um $R^2 = 0,9978$.

Figura 24. Respostas voltamétricas da mistura de flavonoides (linha preta) e mistura após adição do padrão de catequina, ambas as soluções complexadas com AlCl_3 , em concentrações crescentes de 10 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e curva analítica de adição de padrão. Condições da VPD: H_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).



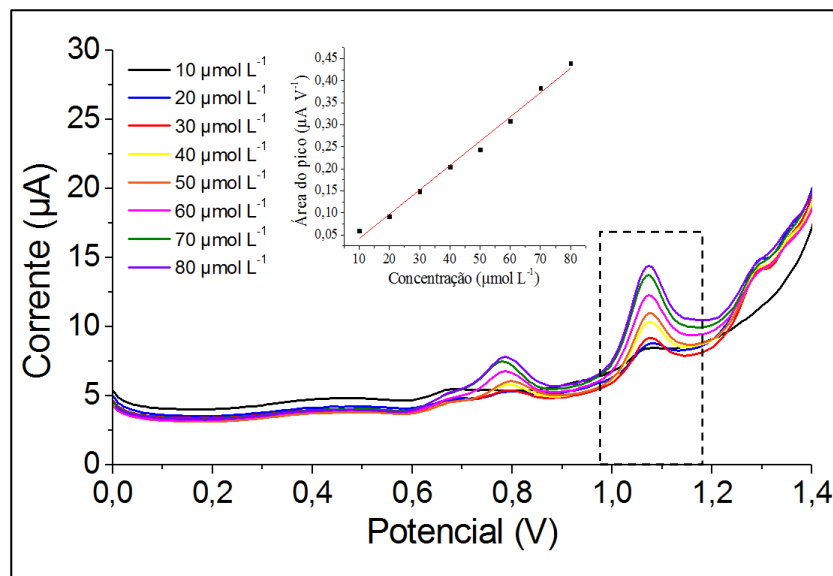
Fonte: A autora.

Utilizando a Equação 1 (página 43) a taxa de recuperação calculada foi de 95,9% com um CV da média das concentrações das repetições de 1%. A recuperação relativa é obtida pela razão do valor observado pelo valor de referência envolvendo uma curva de calibração e é desejável que seja o mais próximo de 100%. Dessa forma, o método utilizado demonstra possuir boa exatidão para análise

do analito (flavan-3-ol) (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020). O método também pode ser considerado seletivo, já que demonstra capacidade de identificar e quantificar o analito mesmo na presença de outros compostos estruturalmente semelhantes e eletroativos, presentes nas amostras de fitoterápicos (BRASIL, 2017).

Em um procedimento analítico, o LD é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada nas condições estabelecidas no ensaio, já o LQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada nas condições estabelecidas e que apresente boa exatidão e precisão. Considerando isso, com desvio padrão de 10 brancos ($\sim 0,003824$) e a inclinação da reta da curva de calibração originada da área dos picos indicados nos voltamogramas da Figura 25 ($R^2 = 0,9923$; $y = 0,0055 \cdot x - 0,0132$), foram calculados o LD e o LQ por meio da Equação 2 e 3 (página 43). O LD calculado foi de $2,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ levando em consideração a abordagem da razão sinal/ruído numa relação de 3:1, enquanto o LQ foi de $6,95 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a razão sinal/ruído de 10:1 (BRASIL, 2017; INMETRO, 2016).

Figura 25. Respostas voltamétricas da catequina complexada com AlCl_3 , em concentrações crescentes de 10 a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva analítica para determinação do limite de detecção e quantificação. Condições da VPD: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).



Fonte: A autora.

Para avaliar a precisão da metodologia proposta, ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária foram conduzidos. Os resultados foram expressos em termos de CV calculados pela Equação 4 (página 44). A repetibilidade avalia as medições em mesmas condições de análise e operação em um curto período de tempo, enquanto a precisão intermediária houve a variação de análise entre dias e períodos diferentes (INMETRO, 2016). Baixos valores de CV indicam pouca dispersão dos resultados e o valor encontrado neste trabalho foi de 1,02% indicando que há uma boa precisão. Já a avaliação da precisão intermediária realizou-se o experimento em três dias diferentes, o valor obtido de CV foi de 4,94%.

A Tabela 12 traz os dados de desempenho analítico da quantificação de catequina do método proposto neste estudo em comparação com outros métodos relatados na literatura. Os LD e LQ foram maiores quando comparado com outros métodos que utilizaram a mesma técnica de VPD, no entanto, esses métodos da literatura utilizam eletrodos modificados, os quais melhoram o desempenho de detecção e quantificação dos compostos. Visto que as amostras em que se destina a aplicação do método apresentam uma concentração de flavan-3-ol maior que o LQ obtido neste estudo, o uso de eletrodo de trabalho de carbono vítreo torna-se viável para as análises. Já quando se compara com a quantificação de catequina utilizando a técnica de CLAE, os valores LD e LQ são menores para o método desenvolvido neste estudo, mas não apresenta uma grande diferença.

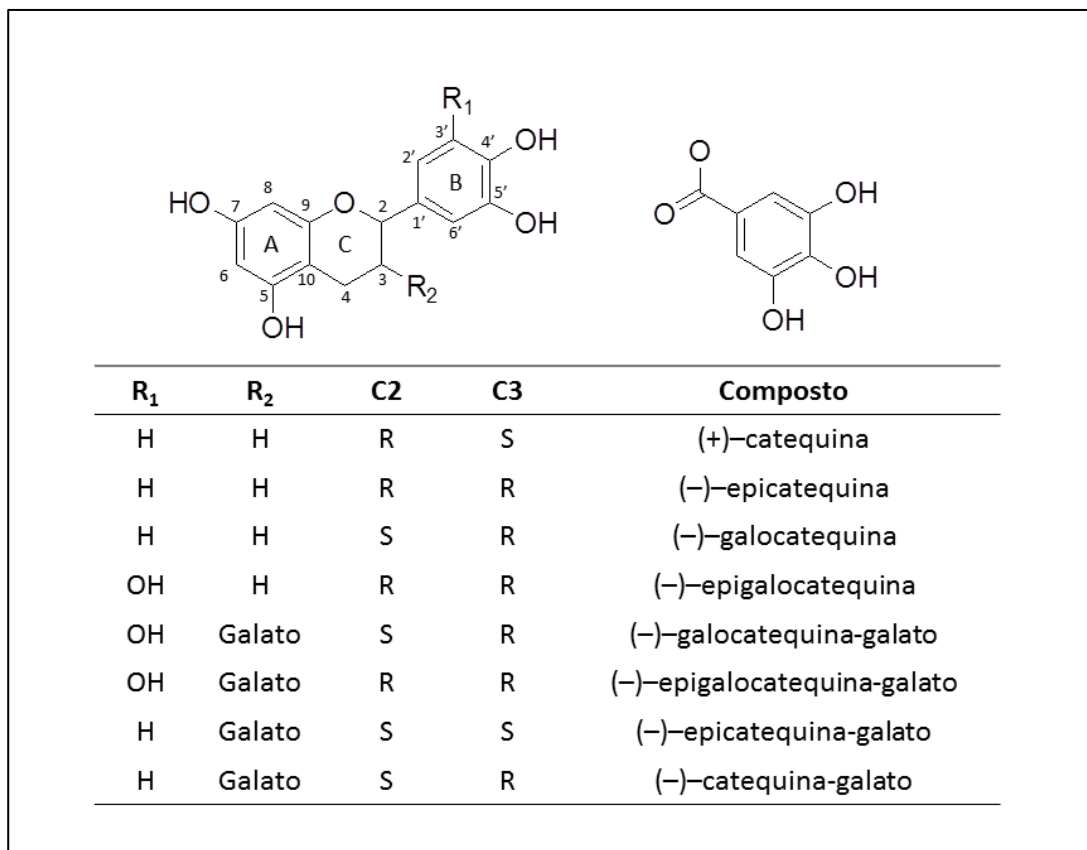
Tabela 12. Desempenho analítico da quantificação de catequina em comparação com outros métodos relatados na literatura.

Técnica	Eletrodo de trabalho	Amostra avaliada	Recuperação (%)	LD	LQ	Eletrólito	Referência
VPD	Carbono vítreo	Medicamento tradicional fototerápico à base de extrato de chá verde	95,9 ± 1	2,09 µmol L ⁻¹	6,95 µmol L ⁻¹	0,5 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄	A autora
VPD	Pasta de carbono modificado por eletropolimerização de azul de metileno	Chá verde e suco de fruta	90,5 – 105,0	4,9 nmol L ⁻¹	14 nmol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹ PBS of pH 7.0	MANASA et al. (2017)
VPD	Carbono vítreo com material híbrido (Nanotubos de carbono de parede única – subftalocianina)	Chás verdes, pretos e frutas	96,5 – 98,0	13 nmol L ⁻¹	43 nmol L ⁻¹	Tampão de Britton-Robinson pH 3	ŞENOCAK et al. (2019)
CLAE	-	Parte aérea de <i>Physalis angulata</i>	98,0	10,3 µmol L ⁻¹	34,4 µmol L ⁻¹	-	MOREIRA et al. (2018)

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVAN-3-OL (CATEQUINAS) NOS FITOTERÁPICOS

O método foi empregado em três diferentes tipos de fitoterápicos: *G. biloba*, Fitoscar® e chá verde (cinco amostras diferentes). Os fitoterápicos a base de chá verde são produzidos a partir de extrato da espécie de planta *C. sinensis* e, segundo Zhang e outros (2019), essa planta é composta por uma mistura complexa de moléculas que incluem: (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina-galato (ECG), (-)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina-galato (EGCG), (-)-epigalocatequina (EGC) e (-)-galocatequina-galato (GCG) (Figura 26), cafeína, teaflavinas, aminoácidos, quercetina, canferol e miricetina.

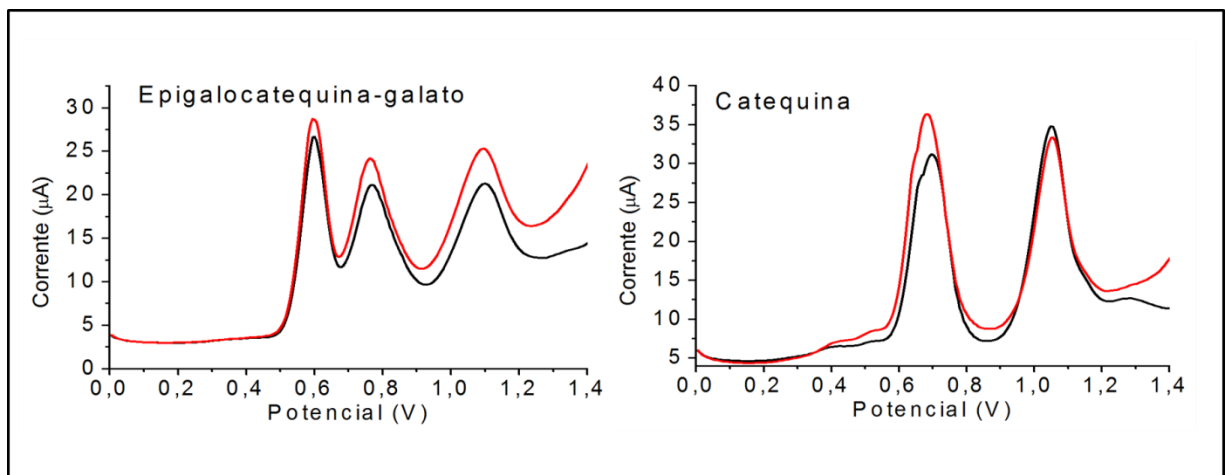
Figura 26. Representação estrutural geral das moléculas pertencentes à classe dos flavan-3-ols encontrados no chá verde.



Fonte: A autora.

Considerando a gama de compostos presentes no chá verde da classe dos flavan-3-ol, comparou-se a resposta voltamétrica das duas moléculas dessa classe: catequina e epigalocatequina-galato (Figura 27). A catequina possui um grupo catecol e uma hidroxila ligada ao carbono C3, enquanto a epigalocatequina-galato possui uma hidroxila a mais no anel B e um grupo galato ligado ao carbono C3. A epigalocatequina-galato apresentou três picos de oxidação e a catequina apresentou dois picos, em que o pico por volta de 1,06 V é comum nas duas moléculas, dessa forma, o método proposto de quantificação realizado determina o teor de flavan-3-ol.

Figura 27. Resposta voltamétrica, via VPD, da catequina e epigalocatequina (5 mmol L^{-1}) livres (linha preta) e complexados com AlCl_3 (linha vermelha), utilizando a solução eletrolítica suporte: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), com condições de VPD: 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).

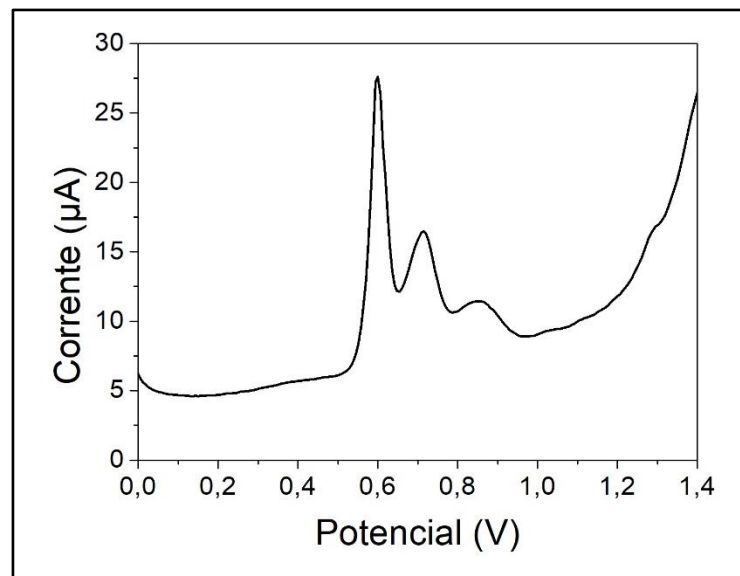


Fonte: A autora.

A composição química da *G. biloba*, segundo Oliveira e outros (2020), inclui principalmente quercetina e seus derivados, canferol e seus derivados, siringetina, entre outros compostos. Já a *S. adstringens*, planta usada na produção da pomada Fitoscar®, apresenta em sua composição (–)-galocatequina, (–)-epigalocatequina, (–)-epigalocatequina-galato, proantocianidinas, entre outros (TREVISAN et al., 2020). Sendo assim, o extrato de *G. biloba* foi utilizado como controle negativo da análise, devido à ausência de flavan-3-ol, já o extrato do fitoterápico Fitoscar® foi utilizado como controle positivo.

A Figura 28 mostra o perfil voltamétrico do fitoterápico de *G. biloba* após complexação com o AlCl_3 . O extrato apresentou três picos de oxidação entre 0,5 e 1,0 V, que indica a presença de moléculas eletroativas que se refere aos outros flavonoides de sua composição, entretanto não há indícios do pico característico de flavan-3-ols (1,06 V) o que é esperado, já que, como já mencionado, não há relatos de presença significativa dessa classe de compostos na planta utilizada como matéria-prima desse medicamento.

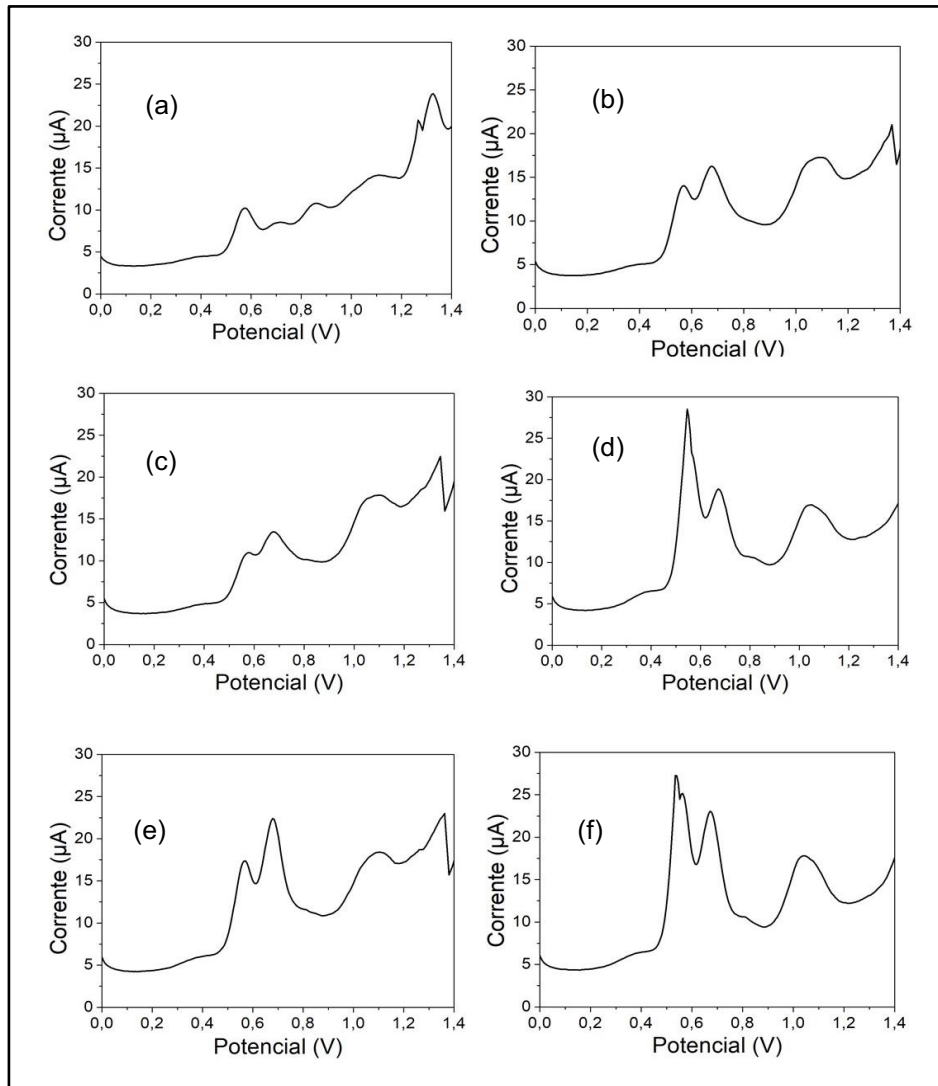
Figura 28. Respostas voltamétricas da amostra de *G. biloba* complexada com AlCl_3 . Condições da VPD: H_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).



Fonte: A autora

Já a Figura 29, mostra o perfil voltamétrico para amostras de chá verde e Fitoscar®. Essas amostras apresentam o pico de oxidação por volta de 1,06 V, característico de flavan-3-ols. O perfil voltamétrico dos fitoterápicos de mesma espécie vegetal (chá verde) apresentou aspectos semelhantes e variação apenas nas intensidades dos picos que indica que as concentrações dos compostos são diferentes entre eles.

Figura 29. Respostas voltamétricas das amostras de fitoterápicos: (a) Fitoscar; (b) CV1, (c) CV2; (d) CV3; (e) CV4; (f) CV5, complexadas com AlCl_3 . Condições da VPD: H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (solução eletrolítica suporte), 25 mV s^{-1} (velocidade de varredura), 6 mV (degrau de potencial) e 60 mV (amplitude).



Fonte: A autora.

A Tabela 13 traz informações da quantificação de catequina nos diferentes fitoterápicos utilizando o método eletroanalítico. Como esperado, o fitoterápico de *G. biloba* não foi identificada nenhuma catequina utilizando o método, mesmo que este apresente diversos outros tipos de flavonoides em sua composição. O *G. biloba* é o controle negativo da análise. A pomada Fitoscar® foi identificado uma pequena quantidade de equivalente de catequina de $1,23 \text{ mg EC g}^{-1}$. Os fitoterápicos de chá

verde apresentaram as maiores concentrações de equivalente de catequina, entretanto, apesar do fitoterápico se originar de uma mesma espécie de planta, houve uma grande variação em sua concentração nas diferentes marcas adquiridas entre 6,27 a 470,43 mg EC g⁻¹. Os resultados indicam que o método de fato se mostra eficiente na identificação de flavan-3-ol na presença de outras classes de flavonoides.

Tabela 13. Concentração em equivalente de catequina em mg por g de fitoterápico.

Fitoterápico	VPD¹ (mg EC g⁻¹)
<i>G. Biloba</i>	-
Fitoscar	1,23 ± 0,09
CV1	6,27 ± 0,11
CV2	16,55 ± 0,50
CV3	162,34 ± 3,53
CV4	223,02 ± 6,31
CV5	470,43 ± 9,76

Nota: ¹VPD, Voltametria de pulso diferencial; CV, Chá verde. Fonte: A autora.

Alguns fatores que afetam a composição da planta da espécie *C. sinensis* são a respeito dos fatores bióticos e abióticos durante o seu cultivo que podem levar à variação da produção de metabólitos secundários pelas plantas em até 50% com as mudanças na sazonalidade, estresse hídrico, geografia, radiação solar, altitude, herbivoria e micróbios, temperatura, tipo de solo e nutrientes (AHMED et al., 2019).

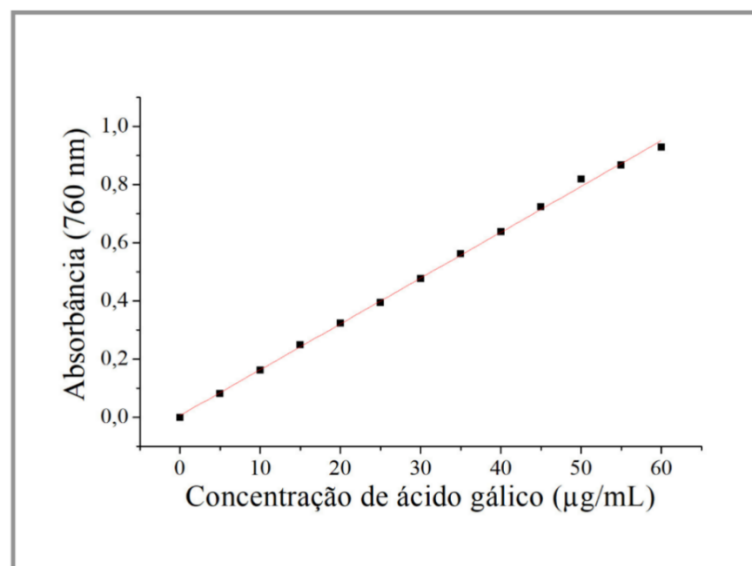
Na literatura há relato de amostras de chá verde, que por meio da análise por CL-EM, apresentaram um total de catequinas de 112,72 mg g⁻¹; em que há 4,02 mg g⁻¹ de GC; 15,48 mg g⁻¹ de EGC; 5,37 mg g⁻¹ de C; 7,25 mg g⁻¹ de EC; 54,06 mg g⁻¹ de EGCG; 9,44 mg g⁻¹ de GCG e 17,10 mg g⁻¹ de ECG (YI et al., 2015). Um outro trabalho relatou concentrações totais de catequinas variando de 5,6 a 82,0 mg g⁻¹ para chás verdes de diferentes origens (JESZKA-SKOWRON; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; FRANKOWSKI, 2018). Isto indica que é comum nas análises de diferentes materiais apresentarem variações entre amostras e torna-se importante um controle de qualidade se tratando da matéria-prima vegetal.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NOS FITOTERÁPICOS

A determinação do teor de fenóis totais é realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O reagente é uma mistura de ácido fosfomolibdico $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ e ácido fosfotúngstico $H_3[P(W_3O_{10})_4]$ que, quando está na presença de compostos fenólicos atuando como agente redutores, formando complexos de coloração azul com molibdênio-tungstênio. Dessa forma, há uma relação linear da absorbância em 760 nm e da concentração de compostos fenólicos presentes na amostra o que torna possível identificar e determinar o seu teor pelo método espectrofotométrico (OLIVEIRA et al., 2009).

Após a reação do reagente Folin-Ciocalteu com o ácido gálico mediou-se a absorbância das concentrações crescentes gerando a curva analítica (Figura 30) de absorbância *versus* concentração de ácido gálico. O gráfico foi construído com 13 pontos em que as médias foram ajustadas via regressão linear no software Origin Pro 8.0 gerando a equação da reta $y = 0,0158*x + 0,0065$ com um $R^2 = 0,9987$.

Figura 30. Curva analítica obtida por espectrofotometria no UV-Vis dada em absorbância em 760 nm *versus* concentração de ácido gálico com valores crescentes de 0 a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtenção do teor de fenóis totais.



Fonte: A autora

Após a obtenção da curva analítica mediu-se a absorvância dos extratos dos fitoterápicos e calculou-se a concentração em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de fitoterápico, considerando o rendimento da extração, como mostrado na Tabela 14. O teor de fenóis totais dos fitoterápicos variou entre 17,89 a 513,83 mg EAG g⁻¹. Assim como o teor de flavan-3-ol (grupo das catequinas), também se observa uma grande variação no teor de fenol total entre os fitoterápicos. Além disso, o teor total de fenol nem sempre segue o valor do teor de flavan-3-ol, basta comparar CV3 e CV4, mostrando que não é uma análise adequada para padronização do teor de flavan-3-ol.

Tabela 14. Concentração em equivalente de ácido gálico em mg por g de fitoterápico.

Fitoterápico	Fenóis totais (mg EAG g_{fit}⁻¹)
Ginkgo Biloba	107,88 ± 1,65
Fitoscar	89,35 ± 1,59
CV1	17,89 ± 0,34
CV2	22,30 ± 0,23
CV3	432,70 ± 4,20
CV4	295,17 ± 3,01
CV5	513,83 ± 6,67

Nota: CV, Chá verde. Fonte: A autora.

Os fitoterápicos de chá verde mesmo que provenientes de uma mesma espécie apresentaram grande variação no seu conteúdo de compostos fenólicos. Geralmente, em espécies vegetais diferentes, é esperada uma produção diferente em variedades e quantidades de metabólitos especializados atendendo à demanda de cada espécie e que mesmas espécies vegetais produzam o mesmo tipo de composto e quantidades semelhantes de metabólitos. Entretanto, a produção de compostos fenólicos pode ser afetada significativamente por fatores ambientais, tais como sazonalidade, temperatura, disponibilidade de água e fertilização (MARRANZANO et al., 2018) podendo ocorrer variações nas concentrações em uma mesma espécie de planta. Durante a preparação de fitoterápicos utilizando o extrato do material vegetal ainda é possível que não haja a padronização da produção o que pode gerar uma grande diferenciação na composição de seus compostos ativos.

Resultados obtidos na literatura indicam que extratos de *G. biloba* apresentaram quantidade de fenóis totais entre 76,0 e 59,4 mg EAG g⁻¹ (extrato seco), em que o maior teor foi registrado para o extrato metanólico (MALTAS; VURAL; YILDIZ, 2011), também há registro de valores de quantidade de fenóis totais de 78,4 a 121,7 mg EAG g⁻¹ em extratos secos, em que as maiores concentrações também foram obtidas em extratos de metanol e etanol (CUI et al., 2020), já um trabalho que incluía medicamentos, suplementos e extrato das folhas de *G. Biloba* indicou teor de fenóis totais variando de 110,93 a 184,11 mg EAG g⁻¹ (RONOWICZ; KUPCEWICZ; BUDZISZ, 2013).

Um estudo com o extrato aquoso do caule do barbatimão (*S. adstringens*), planta utilizada da produção do Fitoscar®, mostrou uma concentração de fenóis totais de 195,16 mg EAG g⁻¹ (BALDIVIA et al., 2018), enquanto um outro estudo com amostras de cascas secas comercializadas no Paraná indicou um teor de fenóis totais de 92,60 a 131,18 mg EAG g⁻¹ (NASCIMENTO et al., 2020).

O chá verde apresenta na literatura um teor de fenóis em extratos metanólicos de 2,81 a 18,32 mg EAG g⁻¹ (ANAND et al., 2015), entretanto um outro trabalho apresentou um teor de compostos fenólicos totais de 205,56 mg EAG g⁻¹ para extratos metanólicos tratados com micro-ondas e de 191,26 mg EAG g⁻¹ para o extrato aquoso (CHAN; LIM; CHEW, 2007). Já em outros estudos para extratos aquosos e etanólicos apresentaram teores de fenóis totais de 334,19 a 405,86 mg EAG g⁻¹, respectivamente (BALDEMIR et al., 2017).

Considerando os fitoterápicos que apresentam as moléculas de flavan-3-ol como princípios ativos do medicamento, o teor de fenóis totais, usualmente utilizado como parâmetro na produção desse produto, não representa o teor desses agentes ativos, mas sim de todos os compostos fenólicos. O método eletroanalítico para determinação do teor de flavan-3-ols seria mais apropriado nessas análises para garantir a quantidade adequada desses compostos, os quais apresentam propriedades medicinais, nos medicamentos e auxiliaria em seu controle de qualidade com dados mais específicos.

4.5 PERFIS QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS TRADICIONAIS FITOTERÁPICOS DE CHÁ VERDE

Os principais compostos presentes no chá verde são flavonoides, em grande parte flavan-3-ol (catequinas). A Tabela 15 apresenta alguns desses compostos comumente encontrados na planta e suas fragmentações no modo negativo como a catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, catequina-galato, epicatequina-galato, galocatequina-galato, epigalocatequina-galato, canferol e quercetina.

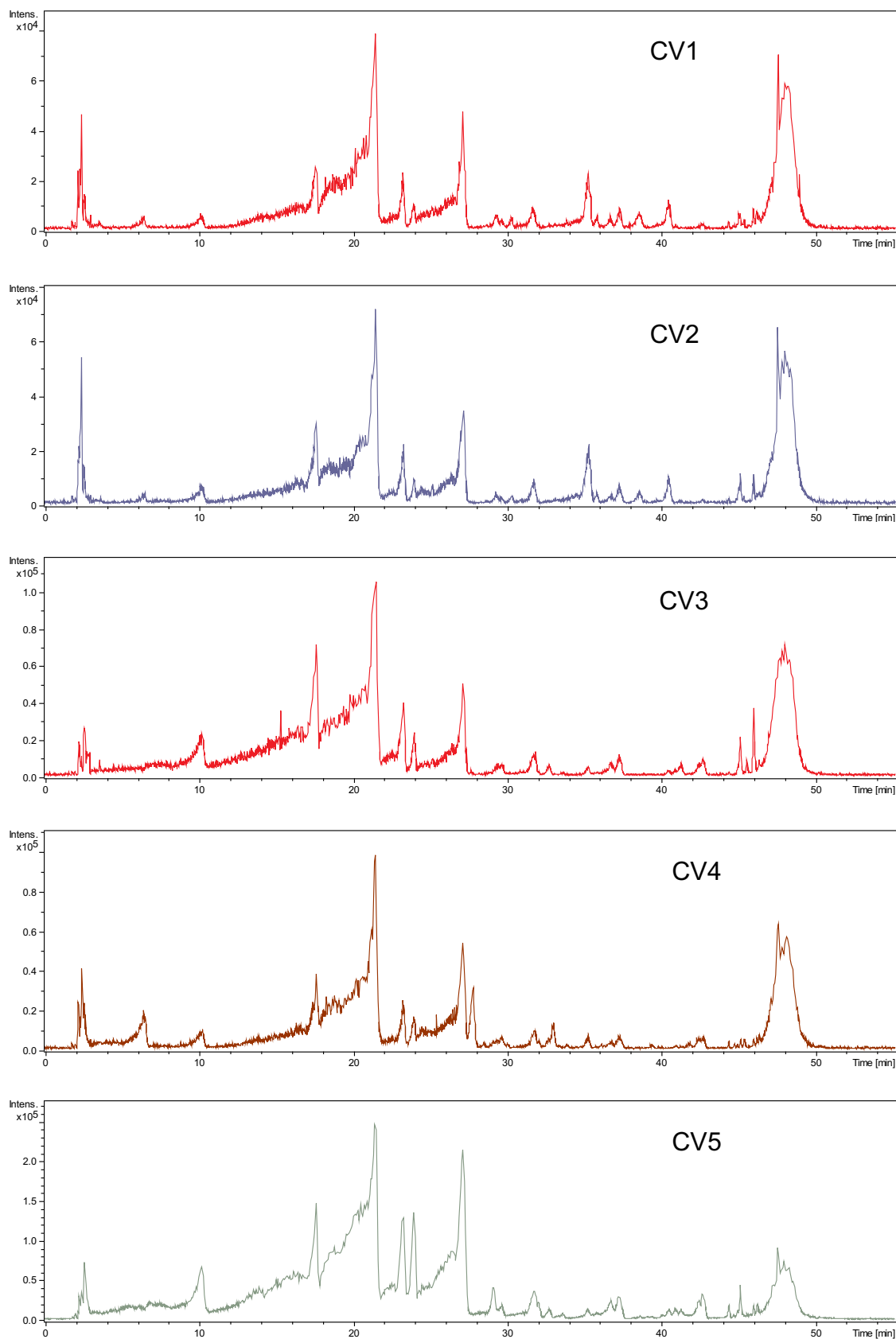
Tabela 15. Dados da literatura de compostos encontrados no chá verde em termos de espectrometria de massas realizadas no modo negativo. C, Catequina; EC, Epicatequina; GC, Galocatequina; EGC, Epigalocatequina; CG, Catequina-galato; ECG, Epicatequina-galato; GCG, Galocatequina-galato; EGCG, Epigalocatequina-galato; K, Canferol; Q; Quercetina.

Compostos	m/z [M-H] ⁻	m/z Fragmentos	Referência
C	289	245, 203, 125, 109	(ZHUANG et al., 2020)
		289, 245, 203, 179, 125, 109	(PRADIPTA; KONG; TAN, 2019)
EC	289	245, 203, 125, 109	(ZHUANG et al., 2020)
		289, 245, 203, 179, 125, 109	(PRADIPTA; KONG; TAN, 2019)
GC	305	261, 221, 219, 179	(STEWART; MULLEN; CROZIER, 2005)
		219, 167, 125	(ZHUANG et al., 2020)
EGC	305	261, 221, 219, 179	(STEWART; MULLEN; CROZIER, 2005)
		219, 167, 125	(ZHUANG et al., 2020)
CG	441	289, 169, 125	(ZHUANG et al., 2020)
ECG	441	331, 289, 271, 169, 125	(PRADIPTA; KONG; TAN, 2019)

		331, 302, 289, 203, 169, 137, 125, 109	(SPÁČIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2010)
		289, 169, 125	(ZHUANG et al., 2020)
GCG	457	305, 169, 125	(ZHUANG et al., 2020)
EGCG	457	331, 305, 169	(STEWART; MULLEN; CROZIER, 2005)
		331, 305, 287, 169, 161, 125	(SPÁČIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2010)
		331, 305, 169, 125	(PRADIPTA; KONG; TAN, 2019)
K	285	187	(CLARKE et al., 2014)
		285	(ZHUANG et al., 2020)
Q	301	179, 151	(CLARKE et al., 2014)
		179, 151	(ZHUANG et al., 2020)

Neste trabalho foram realizadas análises por CLAE-ESI-EM/EM no modo negativo dos extratos para a identificação de compostos da classe flavan-3-ol e outros possíveis compostos nos fitoterápicos de chá verde (CV1 a CV5). Os cromatogramas das análises estão mostrados na Figura 31. Os dados obtidos a partir dessas análises encontram-se no Quadro 1, com informações de tempo de retenção, a massa experimental, o erro em ppm e as fragmentações obtidas no modo negativo.

Figura 31. Cromatogramas de íons totais obtidos via CLAE-ESI-EM para amostras de medicamentos tradicionais fitoterápicos de chá verde. CV: Chá verde.



Quadro 1. Composição química dos extratos metanólicos de fitoterápicos de chá verde (CV1–5) identificados por CLAE-ESI-EM/EM no modo negativo. C, Catequina; EC, Epicatequina; GC, Galocatequina; EGC, Epigalocatequina; CG, Catequina-galato; ECG, Epicatequina-galato; GCG, Galocatequina-galato; EGCG, Epigalocatequina-galato; K, canferol; Q; Quercetina.

Compostos	Massa exata [M-H] ⁻	Amostras	Rt (min)	m/z	Erro (ppm)	m/z de Fragmentações
EGC ou GC	305,0667	CV5	10,4	305,0693	8,5	261, 243, 204, 189, 175, 167(100), 139
EGC ou GC	305,0667	CV1	17,7	305,0690	7,5	287, 272, 258, 261, 243, 237, 219, 203, 190, 177, 173, 167(100), 164, 151, 139
		CV2	17,6	305,0667	0,03	287, 245, 219, 201, 177, 165(100), 158, 139
		CV3	17,7	305,0653	4,6	287,1; 237,1; 219,1; 203,0; 167,0
		CV4	17,6	305,0670	1,0	287, 261, 245, 237, 219, 204, 191, 176, 167(100), 139
		CV5	17,5	305,0669	0,7	237, 219, 203, 177, 167(100), 149
EGCG ou GCG	457,0776	CV1	21,3	457,0786	2,2	305, 219, 169(100)
		CV2	21,4	457,0778	0,4	305, 269, 261, 219, 193, 169(100), 161
		CV3	21,5	457,0793	3,7	305, 289, 269, 221, 219, 193, 179, 169(100), 161
		CV4	21,5	457,0771	1,1	305, 219, 193, 169(100)
		CV5	21,6	457,0785	2,0	305, 219, 193, 169(100)
C ou EC	289,0717	CV1	23,3	289,0722	1,7	245, 221, 205, 203, 187(100), 173, 164, 160, 151, 141, 123
		CV2	23,3	289,0718	0,3	245, 221, 203(100), 188, 185, 175, 165, 159, 151, 145

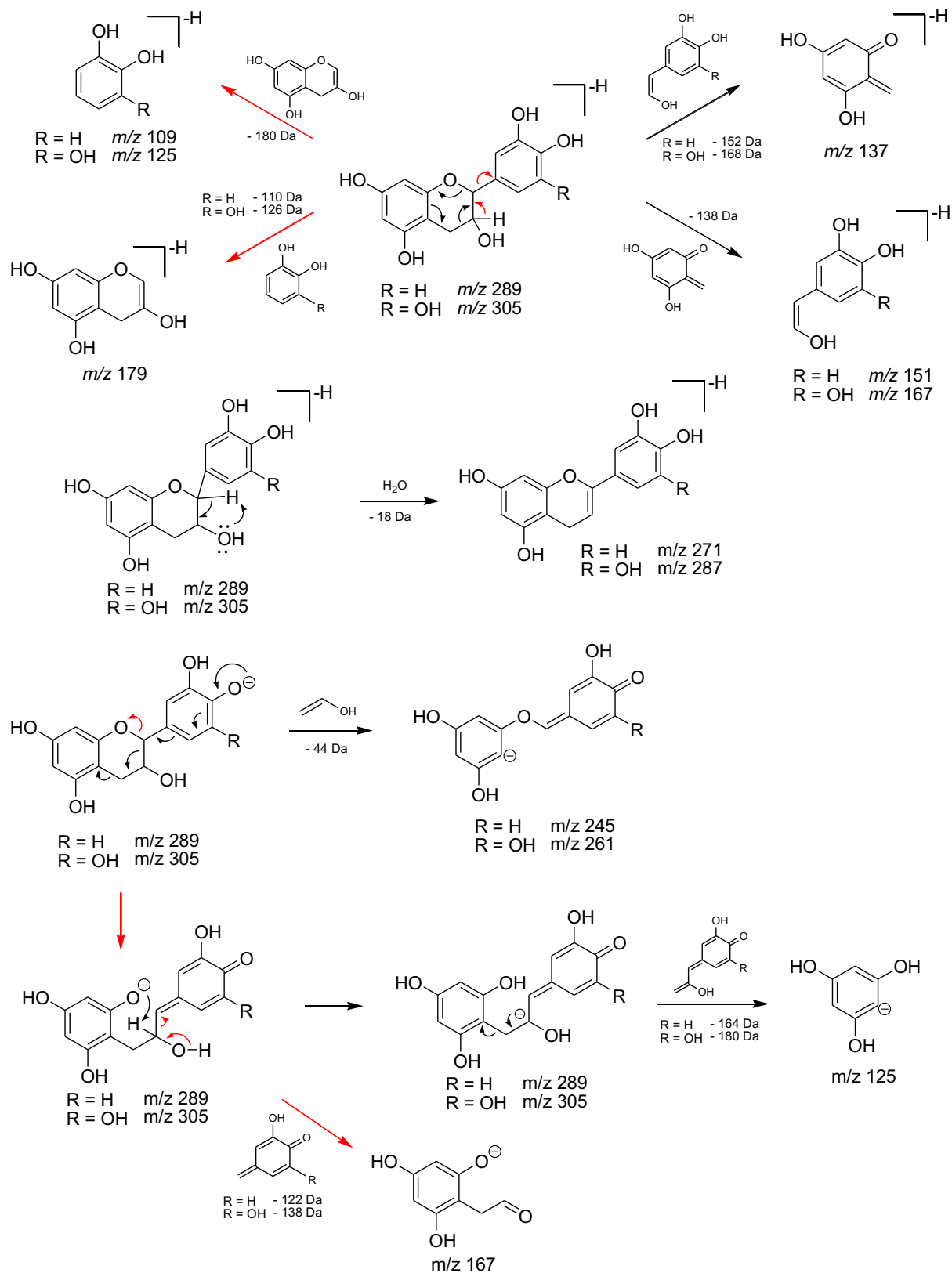
		CV3	23,3	289,0718	0,3	256, 246, 244, 221, 201, 188(100), 175, 164, 159, 149
		CV4	23,3	289,0747	10,4	273, 245, 221, 203(100), 187, 173, 164, 151, 137
		CV5	23,1	289,0718	0,3	271, 245, 221, 203(100), 188, 175, 159, 151, 145
EGCG ou GCG	457,0776	CV1	24,0	457,0784	1,8	331, 305, 276, 261, 241, 219,193,169(100),161
		CV5	24,0	457,0795	4,2	305, 219, 193, 169(100)
ECG ou CG	441,0827	CV1	27,2	441,0841	3,2	289, 245, 203,169(100)
		CV2	27,2	441,0827	0,1	289, 245, 203, 169(100)
		CV3	27,1	441,0876	11,1	289, 245, 203, 169(100)
		CV4	27,1	441,0870	9,7	289, 271, 245, 203,169(100)
		CV5	27,4	441,0840	2,9	289, 245, 203, 169(100)
Q	301,0354	CV1	45,1	301,0366	4,0	283, 273, 255, 243, 277, 217, 205, 185, 179, 171, 164, 151(100)
		CV5	45,1	301,0377	7,6	284, 273, 256, 245, 227, 211, 205, 193,178, 171, 163, 151(100)
K	285,0394	CV1	46,0	285,0414	7,0	255(100), 229, 211, 185, 187, 159, 143

Os cromatogramas referentes aos cinco extratos de fitoterápicos de chá verde apresentam certa similaridade no perfil, embora a concentração de todos os compostos seja diferente, fato que reflete em diferentes teores de flavan-3-ol observados no método eletroanalítico desenvolvido neste trabalho. As moléculas foram identificadas por meio da comparação com os dados da literatura de fragmentação de flavan-3-ols comumente encontrados em chá verde e por meio da comparação da massa obtida em alta resolução com a massa exata dos compostos. Os erros em ppm foram calculados por meio da Equação 5 (página 50).

Através do m/z dos fragmentos, alguns mecanismos de fragmentação para a classe de flavan-3-ol foram propostos, os quais reitera a presença de compostos da classe flavan-3-ol nos extratos de fitoterápicos (Figura 32 e 33). Os fragmentos m/z 245 e 261 (Figura 32), nos flavan-3-ols, podem se formar a partir de uma clivagem heterolítica com a eliminação de um enol (C, EC, GC e EGC). A perda de água em C e EC podem formar fragmentos de m/z 271 (Figura 32), enquanto essa mesma eliminação de água em GC e EGC forma fragmentos de m/z 287. Já nos flavan-3-ols que possuem um grupo galato (Figura 33) em sua estrutura, há fragmentação envolvendo o rearranjo de McLafferty, que também gera fragmentos de m/z 271 (CG e ECG) e m/z 287 (GCG e EGCG), porém com uma eliminação de um ácido gálico neutro. Neste mesmo mecanismo também pode formar fragmentos de m/z 169. A perda do grupo galato via clivagem heterolítica gera fragmentos de m/z 289 (CG e ECG) e m/z 305 (GCG e EGCG).

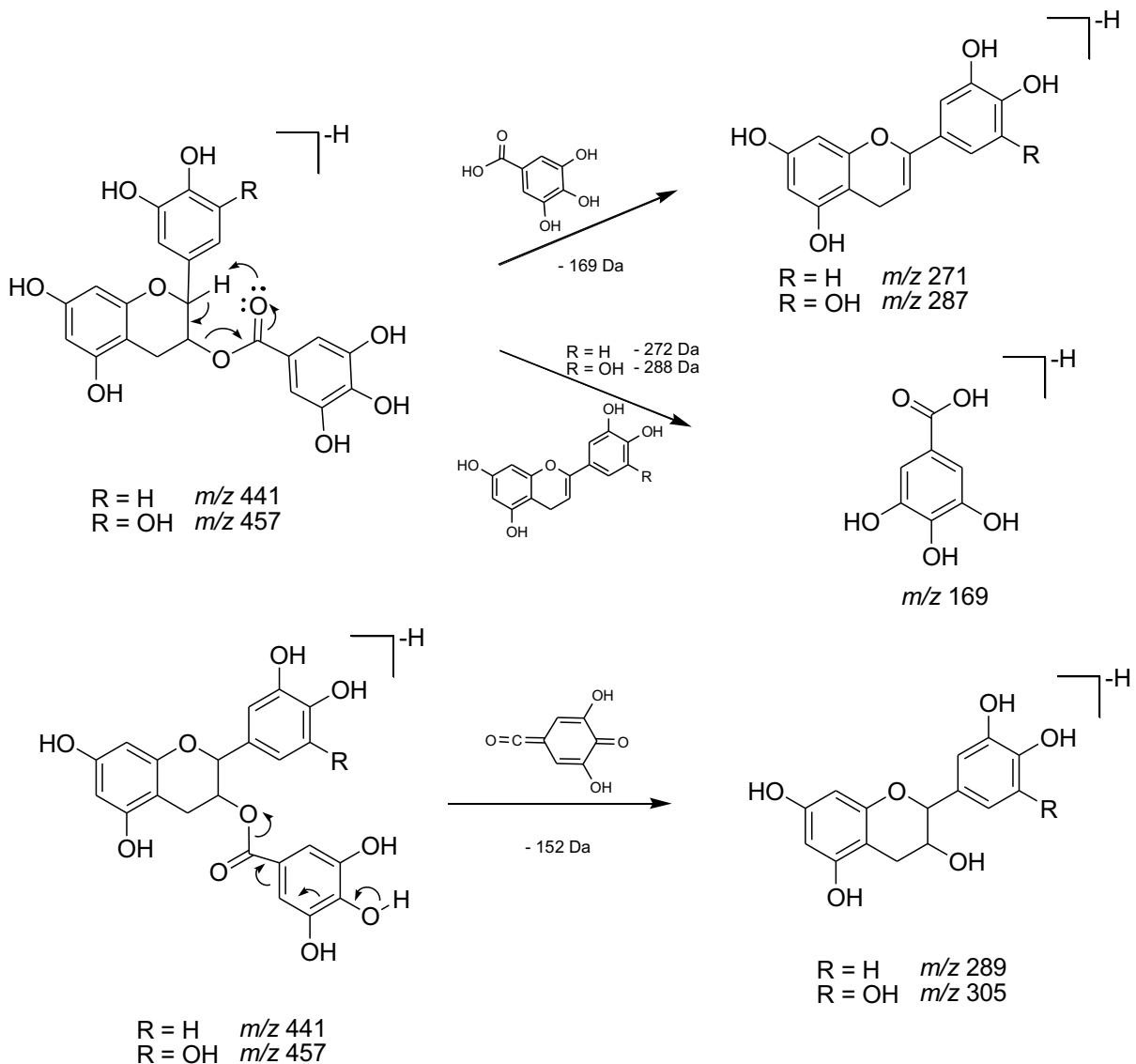
Os fragmentos de m/z 137, m/z 151 (C e EC) e m/z 167 (GC e EGC) (Figura 32), podem ser gerados a partir do mecanismo de retro Diels-Alder no anel C, enquanto a clivagem heterolítica entre os anéis B e C pode gerar fragmentos de m/z 179 (C, EC, GC e EGC), m/z 125 (GC, EGC, GCG e EGCG) e m/z 109 (C, EC, CG e ECG) (Figura 32). O fragmento de m/z 125 também aparece em outros flavan-3-ols, além dos citados anteriormente, e outra possibilidade para a sua de formação é a partir de uma clivagem heterolítica inicial em que a carga fica no oxigênio do anel C, formando um fenóxido, o qual captura o hidrogênio, transferindo a carga para outro átomo e gera uma eliminação com a formação do fragmento de m/z 125. A partir da etapa da formação de fenóxido citada anteriormente, pode ocorrer uma clivagem heterolítica distinta, em que gera o fragmento de m/z 167 (Figura 32).

Figura 32. Proposta de fragmentação de flavan-3-ols.



Fonte: Adaptado de Oliveira e outros (2018)

Figura 33. Proposta de fragmentação de flavan-3-ols que apresentam o grupo galato.



Fonte: Adaptado de Oliveira e outros (2018)

Nas moléculas de flavan-3-ols que possuem o galato em sua estrutura podem formar fragmentos de $m/z \ 305$ (GCG e EGCG) e $m/z \ 289$ (CG e ECG) após uma eliminação do grupo galoil (Figura 33).

As informações sobre composição química dos extratos de fitoterápicos de chá verde indicou a presença de diversas moléculas da classe flavan-3-ol e, em uma das amostras, indicou a presença de outros dois flavonoides, a quercetina e o canferol, que corrobora com os resultados obtidos de maiores teores de fenóis totais em relação ao método eletroquímico na quantificação de flavan-3-ol. A

epigallocatequina-galato apresenta um grupo galato e um grupo hidroxila a mais que a catequina. E, considerando que o perfil voltamétrico da epigallocatequina-galato apresenta um pico de oxidação em comum com a catequina por volta de 1,06 V, o qual foi utilizado na obtenção da curva analítica visando o desenvolvimento do método eletroanalítico, comprovou-se que o procedimento de quantificação proposto se relaciona à quantificação da classe de flavan-3-ol nessas amostras e estas se diferenciam dos demais flavonoides estudados.

5. CONCLUSÕES

Por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial foi possível diferenciar uma das classes de flavonoides, chamada de flavan-3-ol, de outros flavonoides estudados utilizando a complexação metálica com AlCl_3 . Com isto, foi desenvolvido um método eletroanalítico e prosseguiu-se com a sua validação para a quantificação desta classe visando o seu uso no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos. O método apresentou bons resultados de recuperação ($95,9 \pm 1\%$), linearidade ($R^2 = 0,9978$), precisão, seletividade e baixos limites de detecção ($2,09 \mu\text{mol L}^{-1}$) e quantificação ($6,95 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Após a validação, o método foi aplicado em extratos de fitoterápicos em que foi realizada a quantificação de flavan-3-ol e posteriormente foi realizada a determinação do teor de fenóis totais a fim de comparar os resultados. A concentração de fenóis totais foi superior ao de flavan-3-ol demonstrando que a técnica desenvolvida é seletiva para essa classe de flavonoides. As concentrações nos medicamentos tradicionais fitoterápicos foram bastante variadas, inclusive em fitoterápicos provenientes de mesma espécie vegetal, o que reforça a necessidade de desenvolvimento e uso de métodos que auxiliem no controle de qualidade do material vegetal utilizado na preparação desses medicamentos em farmácias de manipulação.

A análise CLAE-EM das amostras de extrato de medicamentos tradicionais fitoterápicos de chá verde confirmou a presença de diversas moléculas da classe de flavan-3-ol em sua composição, nas quais são responsáveis pela atividade antioxidante do extrato. As informações a respeito da composição química do

material indicou que o método eletroanalítico determinou a quantidade das moléculas dessa classe no material de estudo.

A técnica desenvolvida é indicada para amostras de medicamentos fitoterápicos ou extratos que apresente majoritariamente a classe de flavan-3-ol em sua composição, como o chá verde, que foi o foco deste estudo. Entretanto, a depender da amostra, devem-se avaliar outros tipos de moléculas que possam atuar como interferente durante a quantificação.

REFERÊNCIAS

AHMED, Selena et al. Environmental factors variably impact tea secondary metabolites in the context of climate change. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 939, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00939>.

AKINWUMI, Bolanle; BORDUN, Kimberly-Ann; ANDERSON, Hope. Biological Activities of Stilbenoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 792, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19030792>.

ANAND, Jigisha; UPADHYAYA, Bhagwati; RAWAT, Pramod; RAI, Nishant. Biochemical characterization and pharmacognostic evaluation of purified catechins in green tea (*Camellia sinensis*) cultivars of India. **3 Biotech**, v. 5, n. 3, p. 285–294, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0230-0>.

ASHOUR, Mohamed; WINK, Michael; GERSHENZON, Jonathan. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. *In: Annual Plant Reviews online*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 258–303. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0427>.

ATOMSSA, Tadelech; GHOLAP, Ashock. Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer. **Journal of Engineering and Technology Research**, v. 7, n. 1, p. 22-31, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5897/JETR.9000018>.

BALDEMIR, Ayşe; KÖSE, N. Buse; ILDIZ, Nilay; İLGÜN, Selen; YUSUFBEYOĞLU, Sadi; YILMAZ, Vedat; OCSOY, Ismail. Synthesis and characterization of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract and its major components-based nanoflowers: a new strategy to enhance antimicrobial activity. **RSC Advances**, v. 7, n. 70, p. 44303–44308, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7RA07618E>.

BALDIVIA, Débora Da Silva et al. Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2432, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19082432>.

BERGMAN, Matthew E.; DAVIS, Benjamin; PHILLIPS, Michael A. Medically useful

plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3961, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)**, 2018. Disponível em:

http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Consolidado_fitoterapicos_2018.pdf/a2f53581-43e5-47bb-8731-99d739114e10. Acesso em: Janeiro de 2021

BRASIL, Ministério da Saúde. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**, 2017.

Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: Janeiro de 2021

BRASIL, Ministério Da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2020**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde: 2020. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020.pdf>. Acesso em: Janeiro de 2021.

BRETT, Ana Maria Oliveira; GHICA, Mariana-Emilia. Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 15, n. 22, p. 1745–1750, 2003.

BRITO, Maria et al. Trade and quality control of medicinal plants in Brazil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 10, p. 32–39, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i10.12983>.

BUSO, Piergiacomo; MANFREDINI, Stefano; AHMADI-ASHTIANI, Hamid Reza; SCIABICA, Sabrina; BUZZI, Raissa; VERTUANI, Sílvia; BALDISSEROTTO, Anna. Iranian medicinal plants: From ethnomedicine to actual studies. **Medicina (Lithuania)**, v. 56, n. 3, p. 97, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicina56030097>.

CARRASCO, Héctor; ROBLES-KELLY, Christian; RUBIO, Julia; OLEA, Andrés F.;

MARTÍNEZ, Rolando; SILVA-MORENO, Evelyn. Antifungal effect of polygodial on *Botrytis cinerea*, a fungal pathogen affecting table grapes. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2251, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18112251>.

CARVALHO, Ana Cecília Bezerra; LANA, Túlio Nader; PERFEITO, João Paulo Silvério; SILVEIRA, Dâmaris. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 29–35, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.040>.

CHAMIZO-GONZÁLEZ, Francisco; MONAGO-MARAÑA, Olga; GALEANO-DÍAZ, Teresa. Determination of Quercetin and Luteolin in paprika samples by voltammetry and partial least squares calibration. **Electroanalysis**, v. 29, n. 12, p. 2757–2765, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201700403>.

CHAN, Eric Wei Chiang; LIM, Yau Yan; CHEW, Yik Ling. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. **Food chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1214–1222, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.009>.

CHERIYAN SR, Binoy Varghese; KADHIRVELU SR, Parimala; NADIPELLY JR, Jagan; SHANMUGASUNDARAM, Jaikumar; SAYELI SR, Vijaykumar; SUBRAMANIAN SR, Viswanathan. Anti-nociceptive effect of 7-methoxy coumarin from *Eupatorium Triplinerve* vahl (Asteraceae). **Pharmacognosy magazine**, v. 13, n. 49, p. 81, 2017. DOI: 10.4103/0973-1296.197650.

CHIORCEA-PAQUIM, Ana-Maria; ENACHE, Teodor Adrian; DE SOUZA GIL, Eric; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1680–1726, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12566>.

CIMMINO, Alessio; MASI, Marco; EVIDENTE, Marco; SUPERCHI, Stefano; EVIDENTE, Antonio. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. **Chirality**, v. 29, n. 9, p. 486–499, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1002/chir.22719>.

CLARKE, Kayleigh A.; DEW, Tristan P.; WATSON, Rachel E. B.; FARRAR, Mark D.; BENNETT, Susan; NICOLAOU, Anna; RHODES, Lesley E.; WILLIAMSON, Gary. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry dual extraction method for identification of green tea catechin metabolites excreted in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 972, p. 29–37, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.09.035>.

CORIA-TÉLLEZ, Ana V; MONTALVO-GÓNZALEZ, Efigenia; YAHIA, Elhadi M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, Eva N. Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of chemistry**, v. 11, n. 5, p. 662–691, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>.

COX-GEORGIAN, Destinney; RAMADOSS, Niveditha; DONA, Chathu; BASU, Chhandak. Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. *In*: JOSHEE, Nirmal; DHEKNEY, Sadanand A.; PARAJULI, Prahlad (org.). **Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy**. 1st. ed. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 333–359. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15.

CSEKE, Leland J.; KIRAKOSYAN, Ara; KAUFMAN, Peter B.; WARBER, Sara; DUKE, James A.; BRIELMANN, Harry L. **Natural Products from Plants**. 2nd. ed. : CRC Press, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420004472>.

CUI, Na; ZHANG, Liangliang; QUAN, Meiping; XU, Jianguo. Profile of the main bioactive compounds and in vitro biological activity of different solvent extracts from Ginkgo biloba exocarp. **RSC Advances**, v. 10, n. 73, p. 45105–45111, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0RA09490K>.

DA SILVA, Jessica Domingos; GOMES, Márcio Vinícius; CABRAL, Lucio Mendes; DE SOUSA, Valeria Pereira. Evaluation of the in vitro release and permeation of Cordia verbenacea DC essential oil from topical dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p. 101173, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101173>.

DEBNATH, Bikash; SINGH, Waikhom Somraj; DAS, Manik; GOSWAMI, Sanchari;

SINGH, Mahesh Kumar; MAITI, Debasish; MANNA, Kuntal. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials today chemistry**, v. 9, p. 56–72, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.001>.

DEVEREAUX, Andrea L.; MERCER, Susan L.; CUNNINGHAM, Christopher W. Dark classics in chemical neuroscience: morphine. **ACS chemical neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 2395–2407, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00150>.

DEWICK, Paul M. The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids. *In: Medicinal Natural Products*. Wiley Online Books, p. 137–186. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470742761.ch4>.

DHAMI, Namraj; MISHRA, Akkal Dev. Phytochemical variation: how to resolve the quality controversies of herbal medicinal products? **Journal of herbal medicine**, v. 5, n. 2, p. 118–127, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2015.04.002>.

DUAN, Guoqing; HOU, Su; JI, Jianjun; DENG, Bin. The study of sclareol in inhibiting proliferation of osteosarcoma cells by apoptotic induction and loss of mitochondrial membrane potential. **Cancer Biomarkers**, v. 22, n. 1, p. 29–34, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3233/cbm-170698>.

DURAZZO, Alessandra; LUCARINI, Massimo; SOUTO, Eliana B.; CICALA, Carla; CAIAZZO, Elisabetta; IZZO, Angelo A.; NOVELLINO, Ettore; SANTINI, Antonello. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221–2243, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>.

DURSUNOĞLU, Benan; YUCA, Hafize; GÖZCÜ, Sefa; YILMAZ, Bilal; GÜVENALP, Zühal. Qualitative and quantitative determination of the effective components of the plants in different herbal slimming products in Turkey by HPLC. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 825–833, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3906/kim-1711-5>.

DUTRA, Rafael C.; CAMPOS, Maria M.; SANTOS, Adair R. S.; CALIXTO, João B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4–29, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>.

EBEGBONI, Vernon J.; DICKENSON, John M.; SIVASUBRAMANIAM, Shiva D. Antioxidative effects of flavonoids and their metabolites against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in a human first trimester trophoblast cell line. **Food chemistry**, v. 272, p. 117–125, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.036>.

EGBUNA, Chukwuebuka; IFEMEJE, Jonathan Chinenye; UDEDI, Stanley Chidi; KUMAR, Shashank. **Phytochemistry**. 1st. ed. : Apple Academic Press, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780429426223>.

FOROUGH, Mohammad Hadi; AKHGARI, Maryam; JOKAR, Farzaneh; MOUSAVI, Zahra. Identification of undeclared active pharmaceutical ingredients in counterfeit herbal medicines used as opioid substitution therapy. **Australian journal of forensic sciences**, v. 49, n. 6, p. 720–729, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/00450618.2016.1273387>.

GHICA, Mariana-Emilia; BRETT, Ana Maria Oliveira. Electrochemical oxidation of rutin. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 17, n. 4, p. 313–318, 2005.

GHOSH, Nilanjan; CHAKRABORTY, Tania; MALLICK, Sougata; MANA, Supriya; SINGHA, Deepanwita; GHOSH, Balaram; ROY, Souvik. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 151, p. 807–813, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.050>.

GORZYNIK-DEBICKA, Monika; PRZYCHODZEN, Paulina; CAPPELLO, Francesco; KUBAN-JANKOWSKA, Alicja; MARINO GAMMAZZA, Antonella; KNAP, Narcyz; WOZNIAK, Michal; GORSKA-PONIKOWSKA, Magdalena. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 686, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>.

GROMEK, Kamila; DRUMOND, Nélio; SIMAS, Paula. Pharmacovigilance of herbal medicines. **International Journal of Risk and Safety in Medicine**, v. 27, n. 2, p. 55–65, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3233/JRS-150643>.

GUERRIERO, Gea et al. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips

and suggestions for biotechnologists. **Genes**, v. 9, n. 6, p. 309, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes9060309>.

HOYOS-ARBELÁEZ, Jorge; VÁZQUEZ, Mario; CONTRERAS-CALDERÓN, José. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. **Food chemistry**, v. 221, p. 1371–1381, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.017>.

IKEDA, Norma Estefania Andrades; NOVAK, Estela Maria; MARIA, Durvanei Augusto; VELOSA, Adélia Segin; PEREIRA, Regina Mara Silva. Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin–zinc(II) flavonoid -metal complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, p. 184–191, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.011>.

INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio>. Acesso: Janeiro 2021.

JANEIRO, Patricia; BRETT, Ana Maria Oliveira. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica chimica acta**, v. 518, n. 1–2, p. 109–115, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.038>.

JANG, Seol; PARK, Sun Haeng; KIM, Ho Kyoung. Simultaneous Determination of 6 Antiallergic Components in *Asarum sieboldii* Using High-Performance Liquid Chromatography. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 10, p. 1–10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X20966191>.

JESZKA-SKOWRON, Magdalena; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, Agnieszka; FRANKOWSKI, Robert. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS Determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids—A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan ngoc herbal tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 74, p. 71–81, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.003>.

KARRI, Sravani; SHARMA, Sanjay; KAUR, Ginpreet. Pharmacological and analytical aspects of artemisinin for malaria: Advances and challenges. **Asian Pacific Journal**

of **Tropical Medicine**, v. 12, n. 8, p. 339, 2019.

KHATER, Mai; RAVISHANKAR, Divyashree; GRECO, Francesca; OSBORN, Helen M. I. Metal complexes of flavonoids: their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. **Future medicinal chemistry**, v. 11, n. 21, p. 2845–2867, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0237>.

KOKOSKA, Ladislav; KLOUCEK, Pavel; LEUNER, Olga; NOVY, Pavel. Plant-derived products as antibacterial and antifungal agents in human health care. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 29, p. 5501–5541, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867325666180831144344>.

KU, Yee-Shan; NG, Ming-Sin; CHENG, Sau-Shan; LO, Annie Wing-Yi; XIAO, Zhixia; SHIN, Tai-Sun; CHUNG, Gyuhwa; LAM, Hon-Ming. Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human Consumption. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1717, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12061717>.

LABIB, Mahmoud; SARGENT, Edward H.; KELLEY, Shana O. Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. **Chemical reviews**, v. 116, n. 16, p. 9001–9090, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00220>.

LEE, Kyung-Min; JEON, Jun-Yeong; LEE, Byeong-Ju; LEE, Hwanhui; CHOI, Hyung-Kyoon. Application of metabolomics to quality control of natural product derived medicines. **Biomolecules & therapeutics**, v. 25, n. 6, p. 559, 2017. DOI: <http://doi.org/10.4062/biomolther.2016.249>.

LI, Xiangrong; WANG, Su. Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 386–395, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4NJ01344A>.

LIMA, Ana P. et al. Critical evaluation of voltammetric techniques for antioxidant capacity and activity: Presence of alumina on glassy-carbon electrodes alters the results. **Electrochimica Acta**, v. 358, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136925>.

LOU-BONAFONTE, José M. et al. Current insights into the biological action of squalene. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 15, p. 1800136, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800136>.

MAHAJAN, Mitali; KUIRY, Raju; PAL, Probir Kumar. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 100255, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100255>.

MALEKI, Soheila J.; CRESPO, Jesus F.; CABANILLAS, Beatriz. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food chemistry**, v. 299, p. 125124, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>.

MALTAS, Esra; VURAL, Hasibe Cingilli; YILDIZ, Salih. Antioxidant activity and fatty acid composition of Ginkgo biloba from Turkey. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 803–818, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00418.x>.

MANASA, G.; MASCARENHAS, Ronald J.; SATPATI, Ashis K.; D'SOUZA, Ozma J.; DHASON, A. Facile preparation of poly (methylene blue) modified carbon paste electrode for the detection and quantification of catechin. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 552–561, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.114>.

MARRANZANO, Marina; ROSA, Rosa L.; MALAGUARNERA, Mariano; PALMERI, Rosa; TESSITORI, Matilde; BARBERA, Antonio C. Polyphenols: plant sources and food industry applications. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 35, p. 4125–4130, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612824666181106091303>.

MASI, Marco. et al. Alkaloids isolated from Haemanthus humilis Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 277–281, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.036>.

MATSUBARA, Simara; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 401–407, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200024>.

MATSUURA, Hélio Nitta et al. Specialized plant metabolism characteristics and impact on target molecule biotechnological production. **Molecular biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 169–183, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1>.

MORAIS, Sérgio Antônio Lemos De; AQUINO, Francisco José Tôrres De; NASCIMENTO, Evandro Afonso Do; OLIVEIRA, Grasielle Silva De; CHANG, Roberto; SANTOS, Neide Carolina Dos; ROSA, Gabriel Marques. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 198–207, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500031>.

MOREIRA, Gisele Chagas; DE SOUZA DIAS, Fabio. Mixture design and Doehlert matrix for optimization of the ultrasonic assisted extraction of caffeic acid, rutin, catechin and trans-cinnamic acid in *Physalis angulata* L. and determination by HPLC DAD. **Microchemical Journal**, v. 141, p. 247-252, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.035>.

MURILLO, Ana Gabriela; HU, Siqi; FERNANDEZ, Maria Luz. Zeaxanthin: metabolism, properties, and antioxidant protection of eyes, heart, liver, and skin. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 390, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8090390>.

NASCIMENTO, Kauyse Matos; DA SILVA, Luciana Alves; CAVALHEIRO, Jessica Basso; MADRONA, Grasielle Scaramal; DA SILVA SCAPIM, Mônica Regina; DE CÁSSIA BERGAMASCO, Rita. Otimização das condições de extração para compostos bioativos em barbatimão (*Stryphnodendron Adstringens* (Mart.) Coville) usando metodologia de superfície de resposta. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 24882–24898, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-079>.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NINFALI, Paolino; ANTONELLI, Antonella; MAGNANI, Mauro; SCARPA, Emanuele Salvatore. Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies. **Nutrients**, v. 12,

n. 9, p. 2534, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12092534>.

OLIVEIRA, Daiane M. et. al. Antifungal and cytotoxicity activities of *Banisteriopsis argyrophylla* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 70, n. 11, p. 1541-1552, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jphp.12996>.

OLIVEIRA, Daniela; LATIMER, Cheryl; PARPOT, Pier; GILL, Chris I. R.; OLIVEIRA, Rui. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Ginkgo biloba* L. leaf extract are retained after in vitro gastrointestinal digestive conditions. **European journal of nutrition**, v. 59, n. 2, p. 465–476, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01915-8>.

OLIVEIRA, Alane Cabral De; VALENTIM, Iara Barros; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; SILVA, Cicero Alexandre; BECHARA, Etelvino José Henriques; TREVISAN, Maria Teresa Salles. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>.

PAILEE, Phanruethai et al. Anti-HIV and cytotoxic biphenyls, benzophenones and xanthenes from stems, leaves and twigs of *Garcinia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 147, p. 68–79, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.013>.

PEKAL, Anna; PYRZYNSKA, Krystyna. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>.

PEREIRA, Irina; SEVERINO, Patrícia; SANTOS, Ana C.; SILVA, Amélia M.; SOUTO, Eliana B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566–578, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001>.

PETRAN, Madalina; DRAGOS, Dorin; GILCA, Marilena. Historical ethnobotanical review of medicinal plants used to treat children diseases in Romania (1860s-1970s). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 16, n. 15, p. 1–33, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00364-6>.

POBIEGA, Katarzyna; KRAŚNIEWSKA, Karolina; DEREWIKA, Dorota;

GNIEWOSZ, Małgorzata. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 12, p. 5386–5395, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>.

POTT, Delphine M.; OSORIO, Sonia; VALLARINO, José G. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 835, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>.

PRADIPTA, Ivan; KONG, Daniel; TAN, Joash Ban Lee. Natural organic antioxidants from green tea inhibit corrosion of steel reinforcing bars embedded in mortar. **Construction and Building Materials**, v. 227, p. 117058, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117058>.

RAPOSO, Francisco; IBELLI-BIANCO, Carolina. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 115913, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>.

RASOULI, Hassan; YARANI, Reza; POCIOT, Flemming; POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, Jelena. Anti-diabetic potential of plant alkaloids: Revisiting current findings and future perspectives. **Pharmacological research**, v. 155, p. 104723, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104723>.

RAUF, Abdur; IMRAN, Muhammad; ABU-IZNEID, Tareq; PATEL, Seema; PAN, Xiandao; NAZ, Saima; SILVA, Ana Sanches; SAEED, Farhan; SULERIA, Hafiz Ansar Rasul. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108999, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999>.

REIMERS, Eduardo Alberto Lara; FERNÁNDEZ, Eloy Fernández; REIMERS, David J. Lara; CHALOUPOKOVA, Petra; DEL VALLE, Juan Manuel Zepeda Del; MILELLA, Luigi; RUSSO, Daniela. An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used in Papantla, Veracruz, Mexico. **Plants**, v. 8, n. 8, p. 246, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.3390/plants8080246>.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Therapeutic potential and use of medicinal plants in an area of the Caatinga in the state of Ceará, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 912–930, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_059.

RIBEIRO, Luis Henrique Leandro. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciencia & saude coletiva**, v. 24, n. 5, p. 1733–1742, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018245.15842017>.

RICARDO, Letícia M.; DIAS, Bianca M.; MÜGGE, Fernanda L. B.; LEITE, Viviane V.; BRANDÃO, Maria G. L. Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: The case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera* spp.(copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 319–336, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.042>.

RONOWICZ, Joanna; KUPCEWICZ, Bogumiła; BUDZISZ, Elżbieta. Chemometric analysis of antioxidant properties of herbal products containing *Ginkgo biloba* extract. **Open Life Sciences**, v. 8, n. 4, p. 374–385, 2013. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0139-8>.

SAMPIETRO, Diego Alejandro; BERTINI SAMPIETRO, Maria Sofia; VATTUONE, Marta Amelia. Efficacy of Argentinean propolis extracts on control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 12, p. 4575–4582, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10516>.

SAUINI, Thamara et al. Participatory methods on the recording of traditional knowledge about medicinal plants in Atlantic forest, Ubatuba, São Paulo, Brazil. **PLOS ONE**, v. 15, n. 5, p. e0232288, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232288>.

SCHOLZ, Fritz. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. **ChemTexts**, v.

1, n. 4, p. 17, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40828-015-0016-y>.

SECA, Ana M. L.; PINTO, Diana C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19010263>.

ŞENOCAK, Ahmet; BASOVA, Tamara; DEMIRBAS, Erhan; DURMUŞ, Mahmut. Direct and Fast Electrochemical Determination of Catechin in Tea Extracts using SWCNT-Subphthalocyanine Hybrid Material. **Electroanalysis**, v. 31, n. 9, p. 1697–1707, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201900214>.

SHAHIDI, Fereidoon; YEO, JuDong. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1573, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061573>.

SIMÕES, Cláudia; SCHENKEL, Eloir; MELLO, João; MENTZ, Lilian; PETROVICK, Pedro. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1st. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOSNOWSKA, Bozena; PENSON, Peter; BANACH, Maciej. The role of nutraceuticals in the prevention of cardiovascular disease. **Cardiovascular diagnosis and therapy**, v. 7, n. Suppl 1, p. S21, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21037/cdt.2017.03.20>.

SPÁČIL, Zdeněk; NOVÁKOVÁ, Lucie; SOLICH, Petr. Comparison of positive and negative ion detection of tea catechins using tandem mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 535–541, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.048>.

STEVENSON, Philip C. For antagonists and mutualists: the paradox of insect toxic secondary metabolites in nectar and pollen. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 3, p. 603–614, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09642-y>.

STEWART, Amanda J.; MULLEN, William; CROZIER, Alan. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. **Molecular Nutrition & Food Research**,

v. 49, n. 1, p. 52–60, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400064>.

TIKHOMIROV, Alexander S.; SHTIL, Alexander A.; SHCHEKOTIKHIN, Andrey E. Advances in the discovery of anthraquinone-based anticancer agents. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 159–183, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574892813666171206123114>.

TREVISAN, Daliah Alves Coelho et al. Antibacterial activity of Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) against *Staphylococcus aureus*: in vitro and in silico studies. **Letters in applied microbiology**, v. 71, n. 3, p. 259–271, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13317>.

TSIMOGIANNIS, Dimitrios; OREOPOULOU, Vassiliki. Classification of Phenolic Compounds in Plants. *In*: WATSON, Ronald Ross B. T. **Polyphenols in Plants** (Second Edition) (org.). **Polyphenols in Plants**. 2nd. ed. : Elsevier, 2019. p. 263–284. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8>.

ULLAH, Asad; MUNIR, Sidra; BADSHAH, Syed Lal; KHAN, Noreen; GHANI, Lubna; POULSON, Benjamin Gabriel; EMWAS, Abdul-Hamid; JAREMKO, Mariusz. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5243, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>.

VALLI, Marilia; RUSSO, Helena M.; BOLZANI, Vanderlan S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>.

VUOLO, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva; MARÓSTICA JUNIOR, Mário Roberto. Phenolic Compounds. *In*: CAMPOS, Maira Rubi Segura B. T. **Bioactive Compounds** (org.). **Bioactive Compounds**. : Elsevier, 2019. p. 33–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>.

WANG, Joseph. Controlled-Potential Techniques. *In*: **Analytical Electrochemistry**. Wiley Online Books Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. a. p. 67–114. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471790303.ch3>.

WANG, Joseph. Fundamental Concepts. *In*: **Analytical Electrochemistry**. Wiley

Online Books 3rd. ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. b. p. 1–28. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471790303.ch1>.

WANG, Tian-yang; LI, Qing; BI, Kai-shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12–23, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.

WHO. **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**. : World Health Organization, 2013. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>>. Acesso: Janeiro 2021

WHO. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. : World Health Organization, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf>>. Acesso: Janeiro 2021

XIA, JianKai; LIU, Yao; ZHOU, Yu; ZHANG, JiaYao; LI, ChunHuan; YIN, Xia; TIAN, XiangRong; ZHANG, XiuYun. Two novel alkaloids from *Corydalis curviflora* Maxim. and their insecticidal activity. **Pest management science**, v. 76, n. 7, p. 2360–2367, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.5772>.

YANG, Li; WEN, Kui-Shan; RUAN, Xiao; ZHAO, Ying-Xian; WEI, Feng; WANG, Qiang. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.

YI, Tao et al. Comparison of ten major constituents in seven types of processed tea using HPLC-DAD-MS followed by principal component and hierarchical cluster analysis. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 194–201, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.003>.

YIN, Hua; ZOU, Li; SHENG, Yunjie; BAI, Xue; LIU, Qiang; YAN, Binjun. Rapid HPLC Analytical Method Development for Herbal Medicine Formulae Based on Retention Rules Acquired from the Constituting Herbs. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 2, p. 207–214, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2116/analsci.34.207>.

YU, Dan; HUANG, Ting; TIAN, Bin; ZHAN, Jicheng. Advances in Biosynthesis and Biological Functions of Proanthocyanidins in Horticultural Plants. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1774, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9121774>.

YUAN, Haidan; MA, Qianqian; YE, Li; PIAO, Guangchun. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.

ZHANG, Liang; HO, Chi-Tang; ZHOU, Jie; SANTOS, Jânio Sousa; ARMSTRONG, Lorene; GRANATO, Daniel. Chemistry and biological activities of processed *Camellia sinensis* teas: A comprehensive review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 18, n. 5, p. 1474–1495, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12479>.

ZHAO, Chengying; WANG, Feng; LIAN, Yunhe; XIAO, Hang; ZHENG, Jinkai. Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 4, p. 566–583, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544885>.

ZHUANG, Juhua; DAI, Xinlong; ZHU, Mengqing; ZHANG, Shuxiang; DAI, Qianying; JIANG, Xiaolan; LIU, Yajun; GAO, Liping; XIA, Tao. Evaluation of astringent taste of green tea through mass spectrometry-based targeted metabolic profiling of polyphenols. **Food chemistry**, v. 305, p. 125507, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125507>.

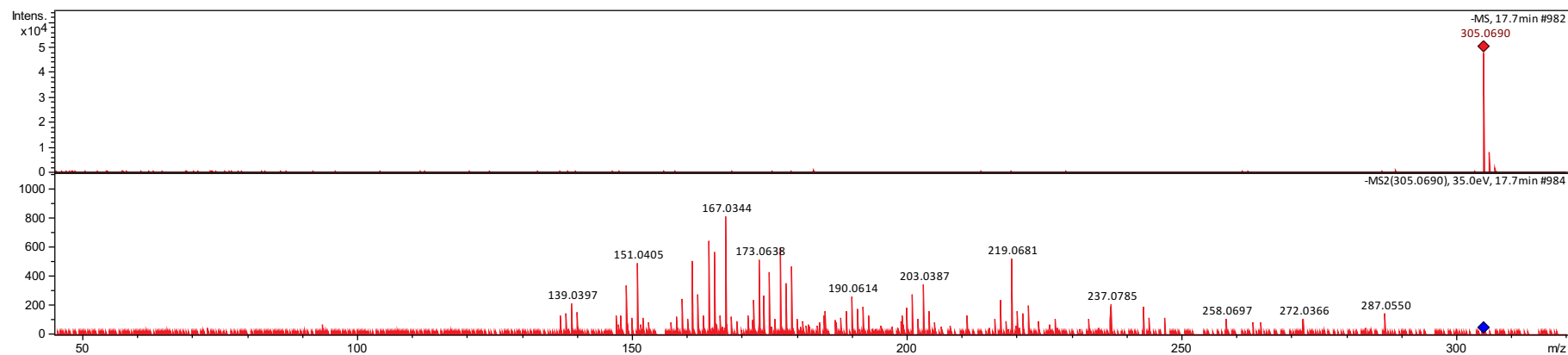
ZHUPANOVA, Anastasiya; GUSS, Ekaterina; ZIYATDINOVA, Guzel; BUDNIKOV, Herman. Simultaneous Voltammetric Determination of Flavanones Using an Electrode Based on Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes and Polyaluminon. **Analytical Letters**, v. 53, n. 13, p. 2170–2189, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1732402>.

ZIYATDINOVA, Guzel et al. Voltammetric Determination of Flavonoids in Medicinal Plant Materials Using Electrodes Modified by Cerium Dioxide Nanoparticles and Surfactants. **Journal of Analytical Chemistry**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1134/S106193481908015X>.

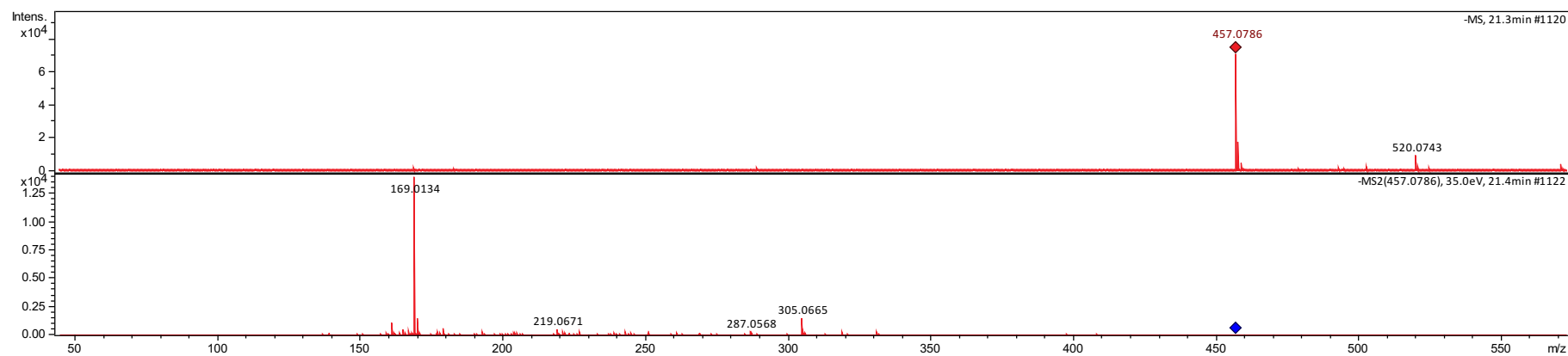
ZIYATDINOVA, Guzel; KOZLOVA, Ekaterina; BUDNIKOV, Herman. Poly (gallic acid)/MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 821, p. 73–81, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.12.071>.

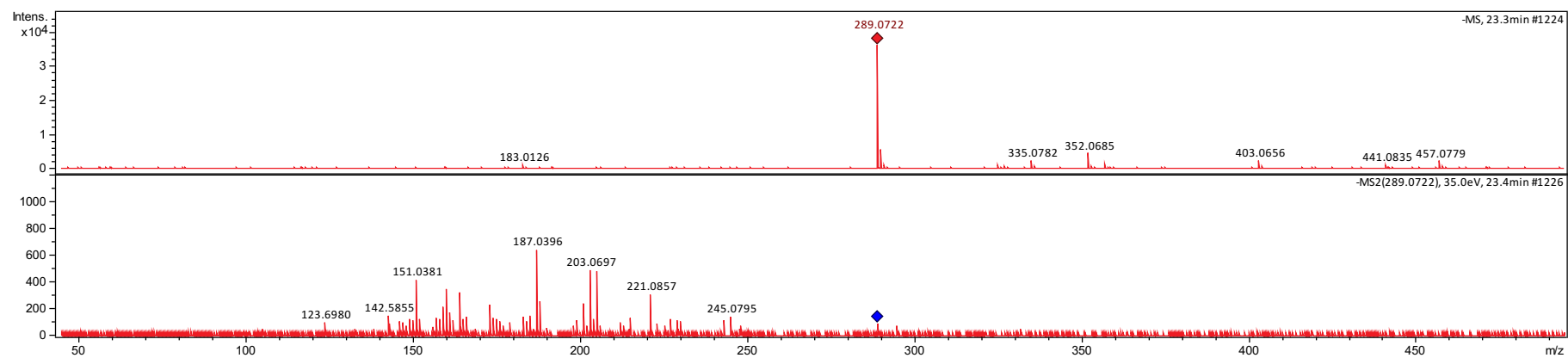
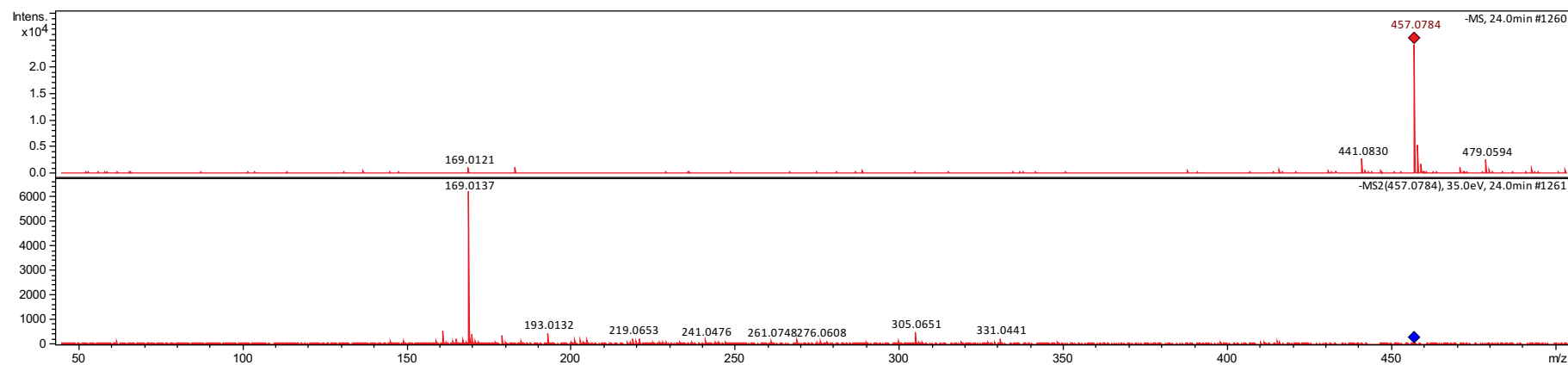
APÊNDICE
Espectros de massas dos compostos identificados nos extratos de fitoterápicos de chá verde (CV1-5)

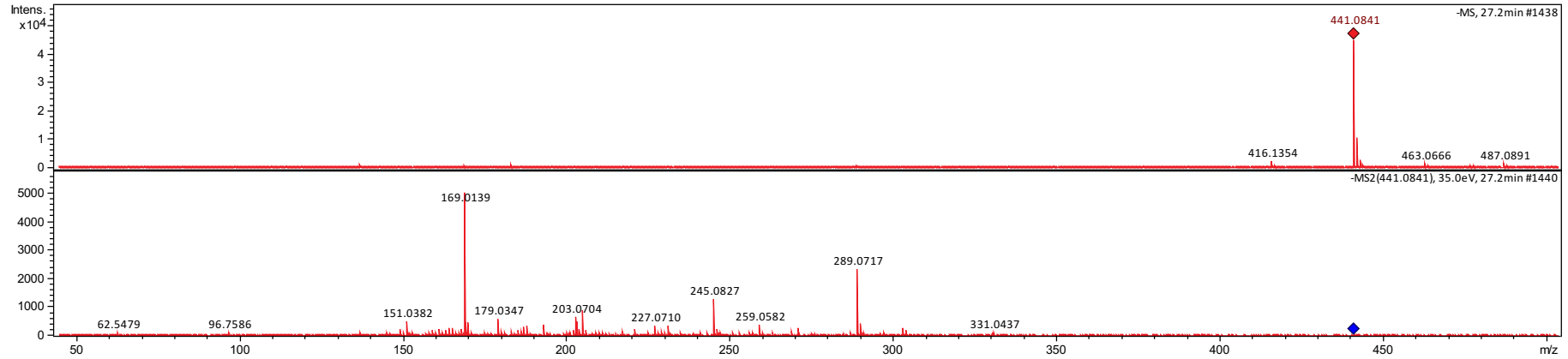
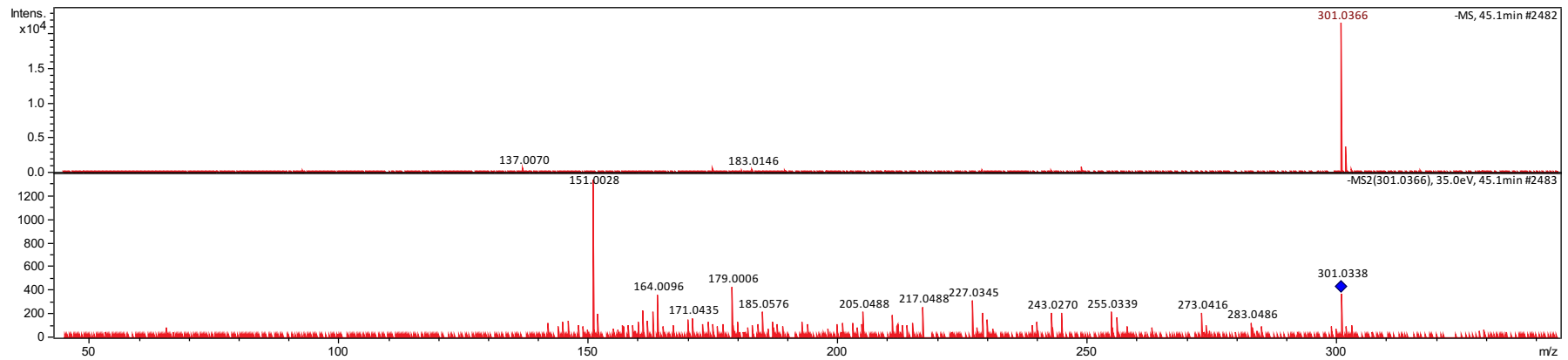
Amostra CV1: m/z 305,0960 (17,7 min)

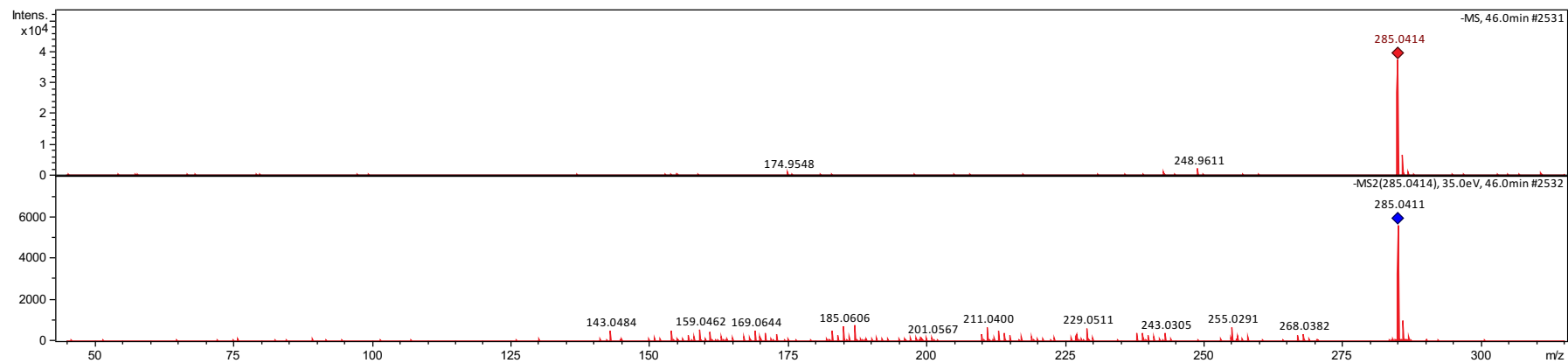
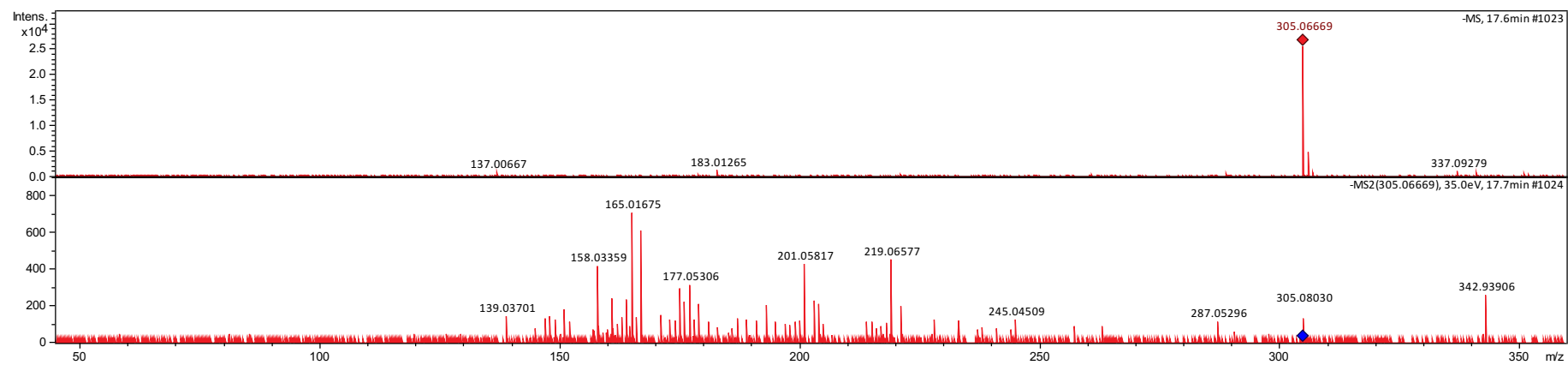


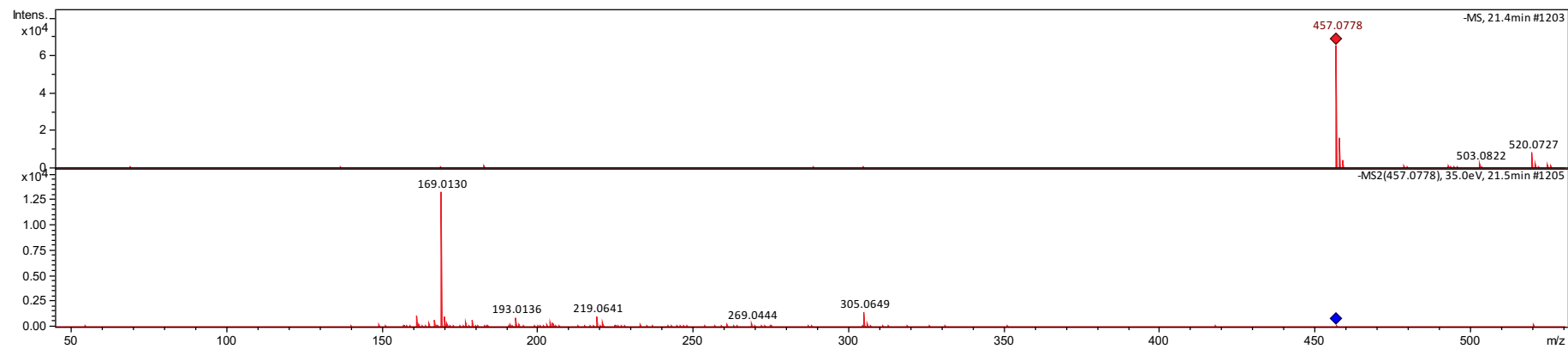
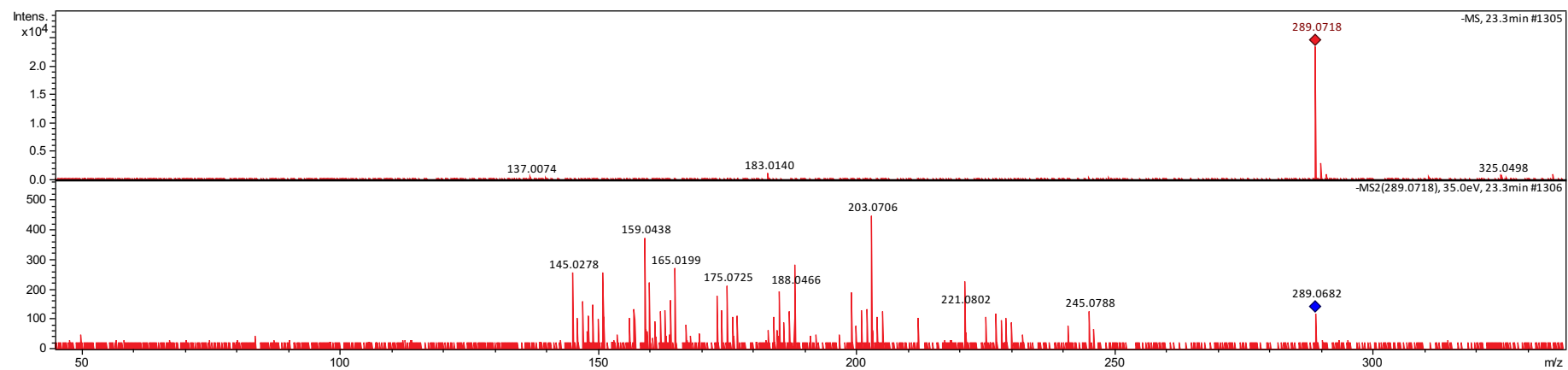
Amostra CV1: m/z 457,0786 (21,3 min)

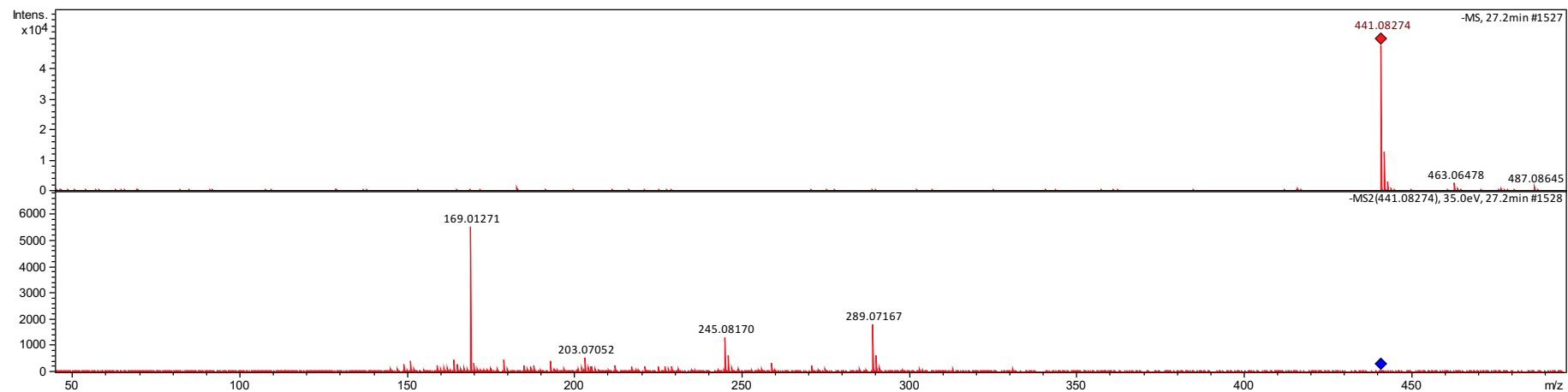
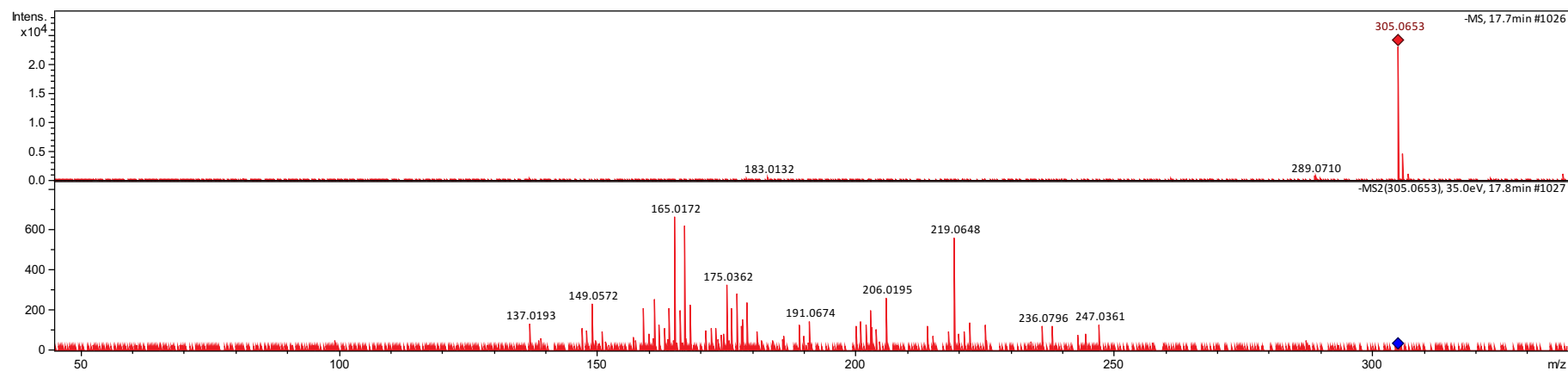


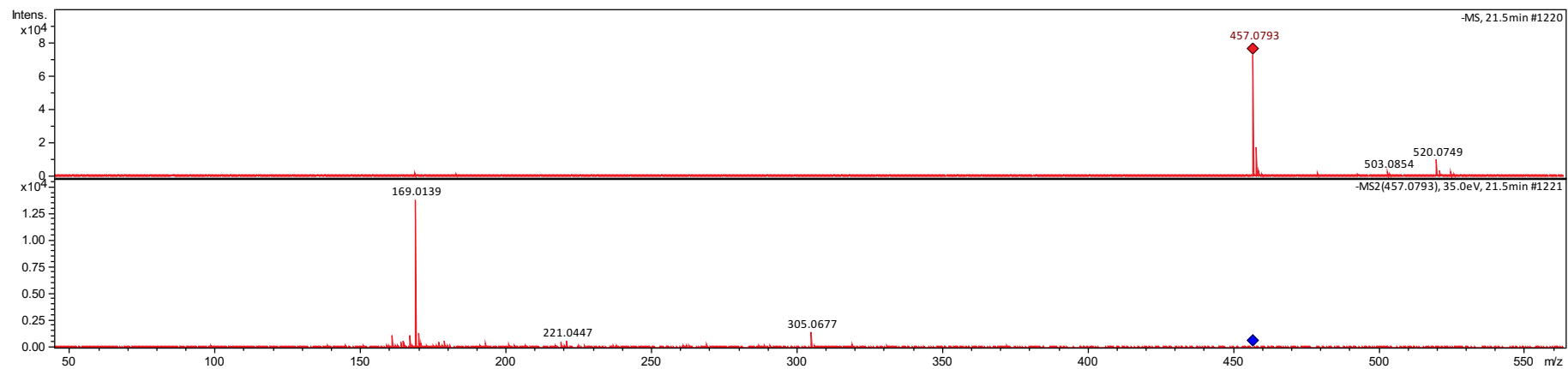
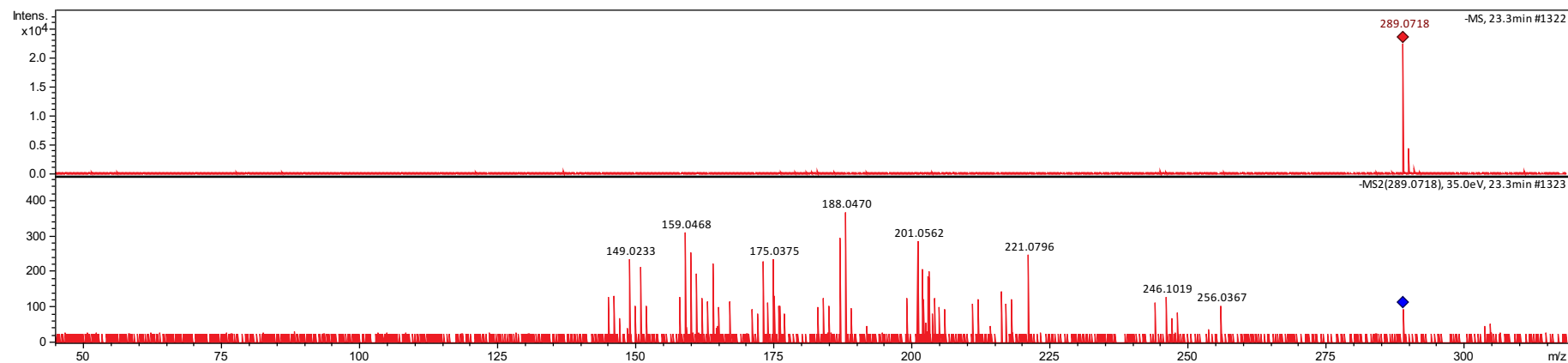
Amostra CV1: m/z 289,0722 (23,3 min)Amostra CV1: m/z 457,0784 (24,0 min)

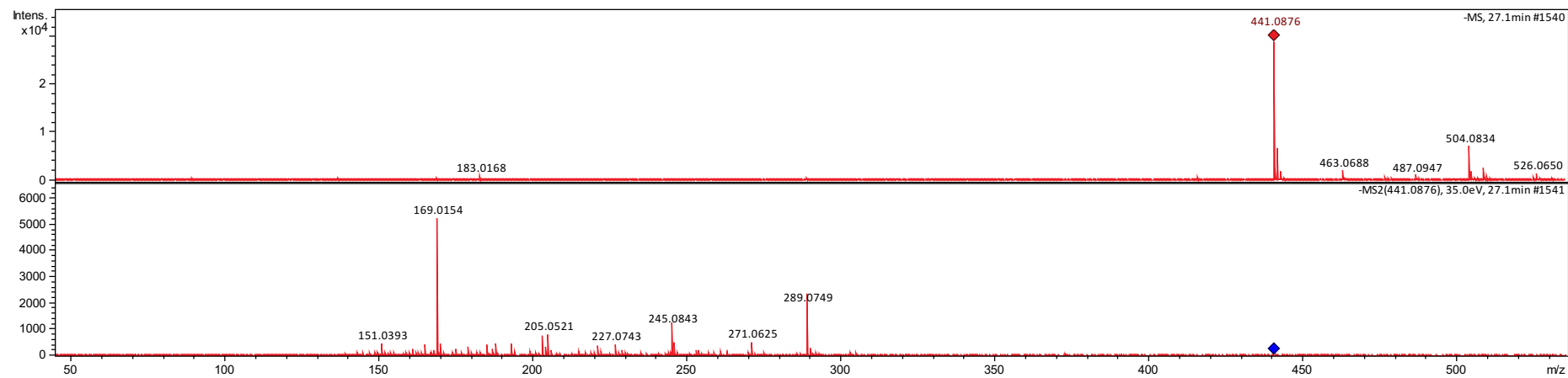
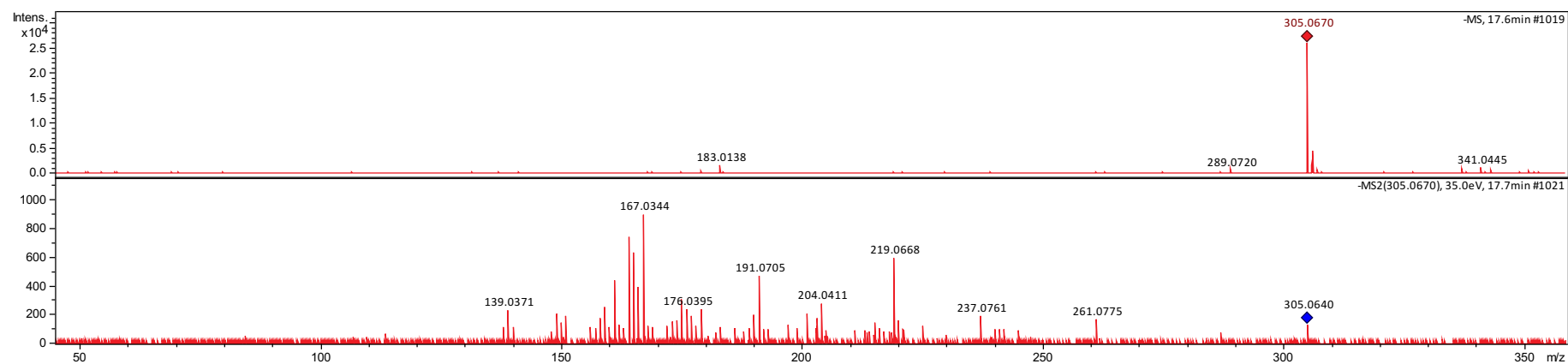
Amostra CV1: m/z 441,0841 (27,2 min)Amostra CV1: m/z 301,0366 (45,1 min)

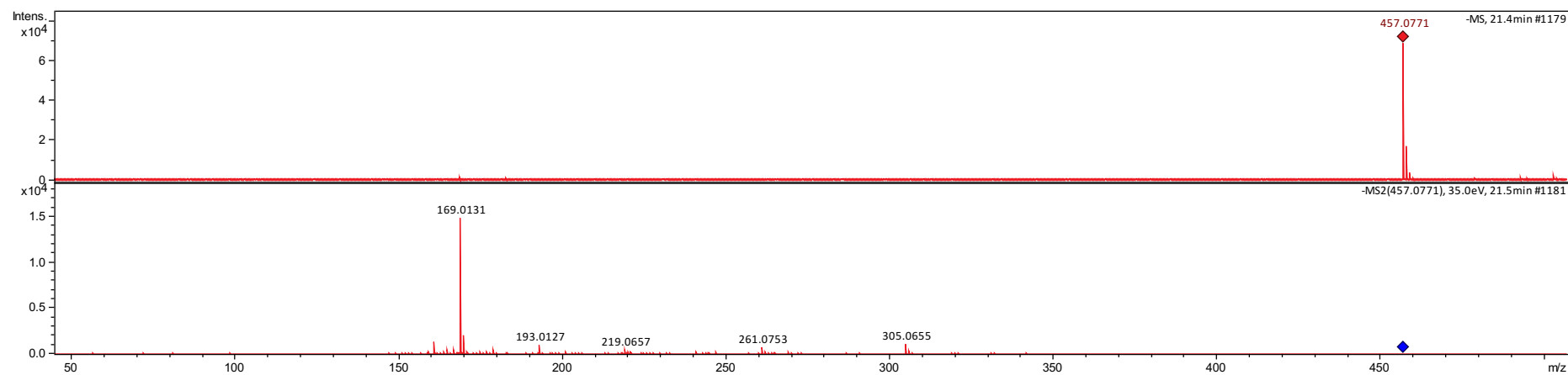
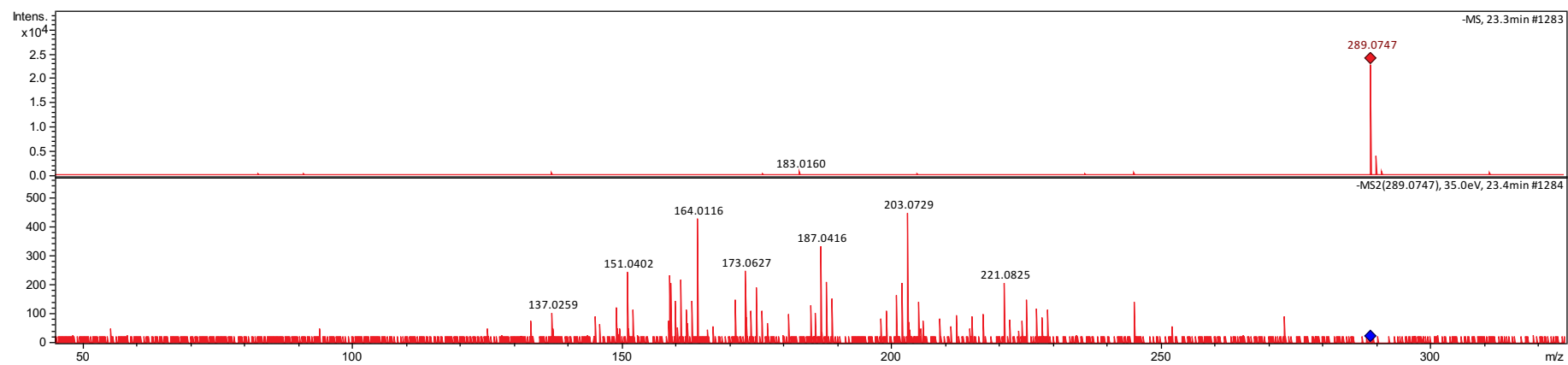
Amostra CV1: m/z 285,0414 (46,0 min)Amostra CV2: m/z 305,06669 (17,6 min)

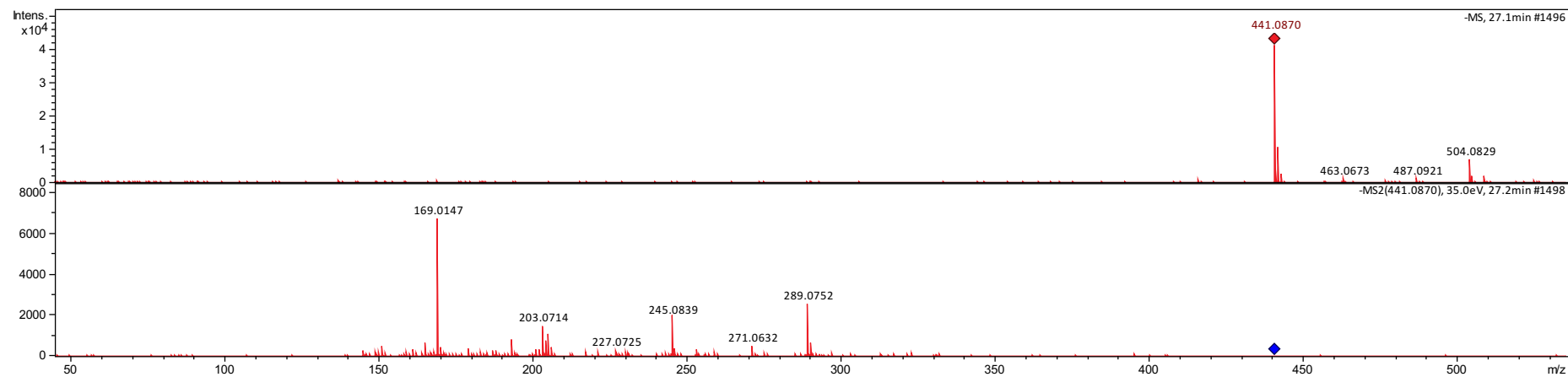
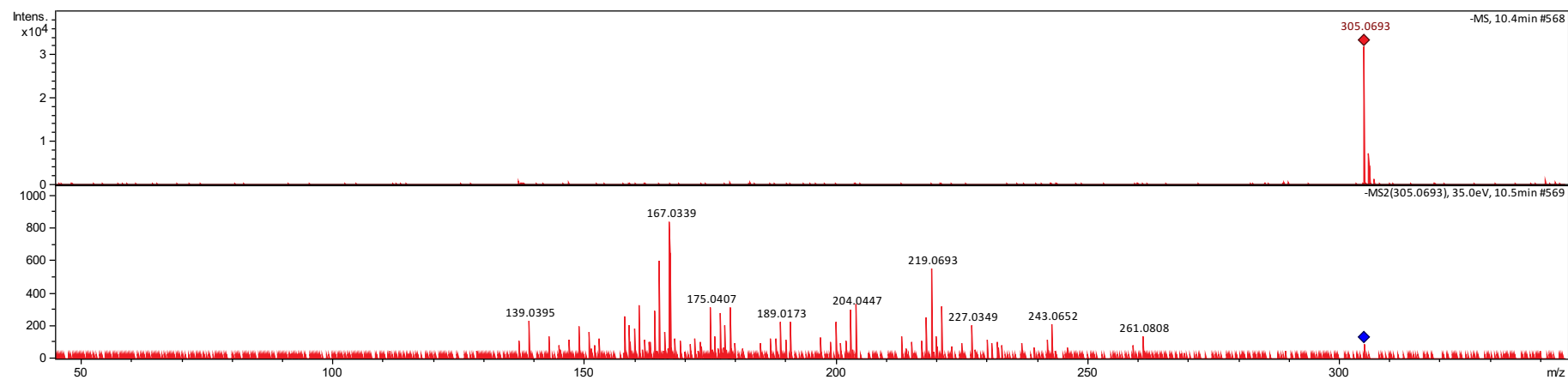
Amostra CV2: m/z 457,0778 (21,5 min)Amostra CV2: m/z 289,0718 (23,3 min)

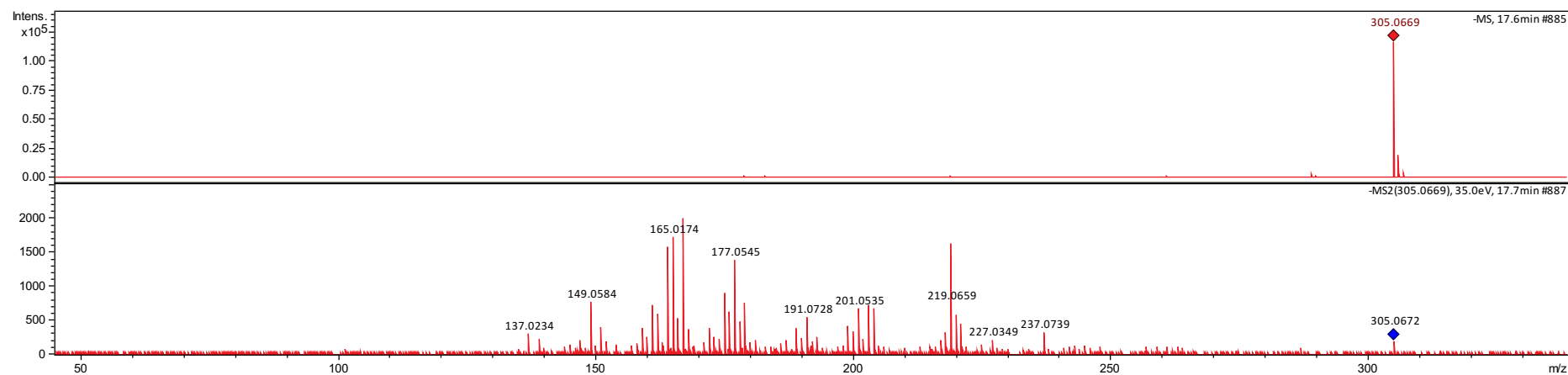
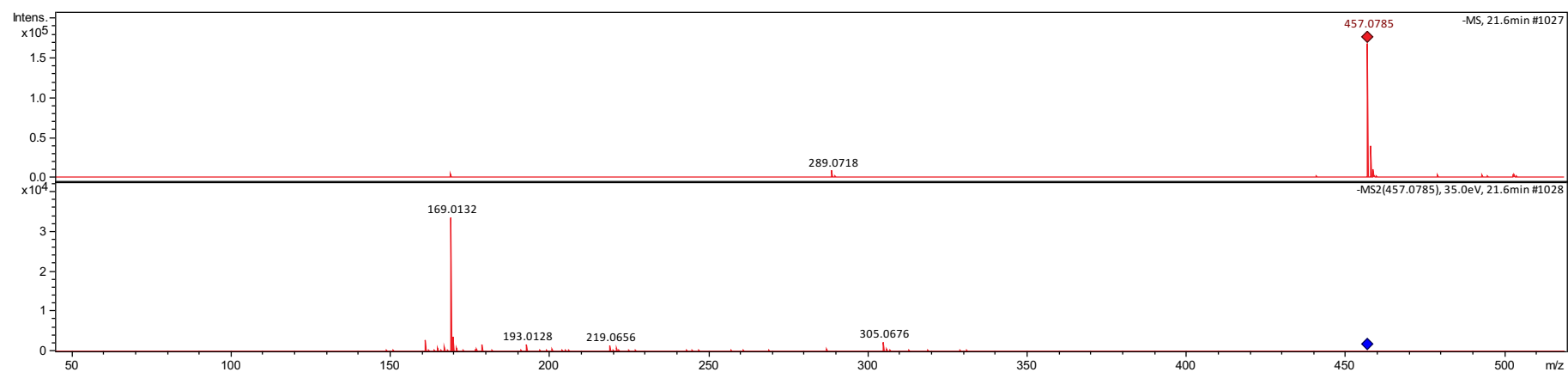
Amostra CV2: m/z 441,08274 (27,2 min)Amostra CV3: m/z 305,0653 (17,7 min)

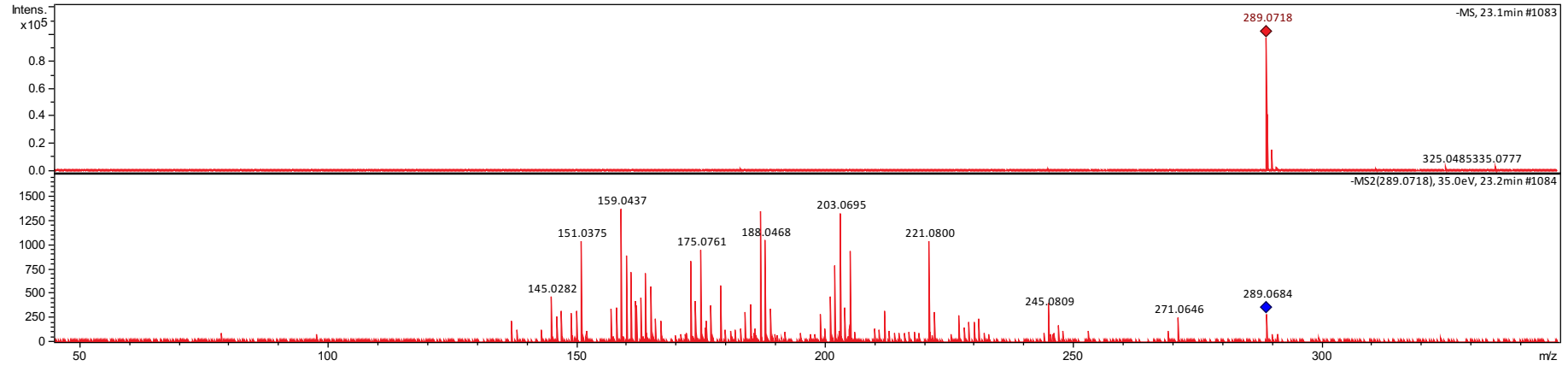
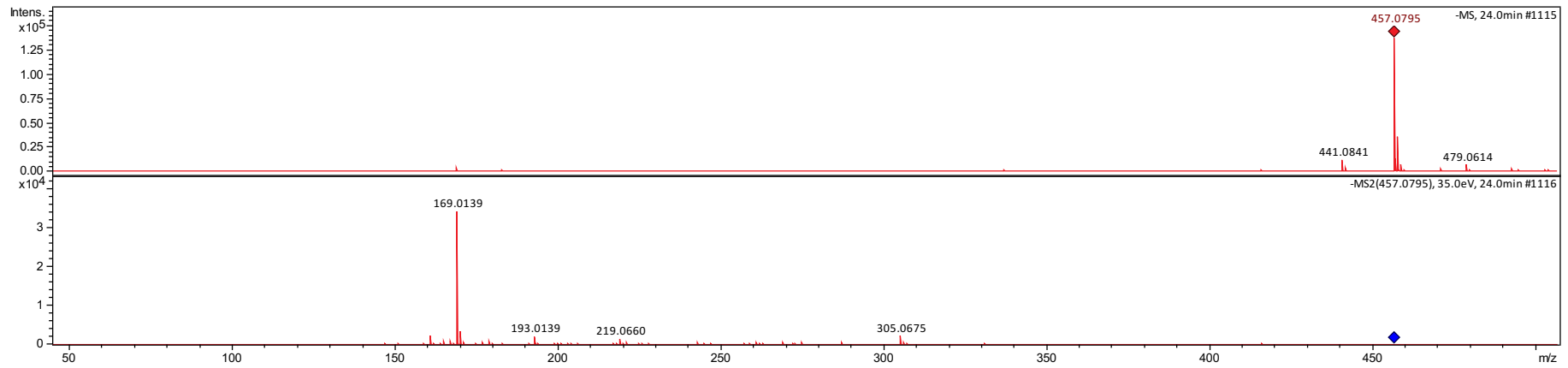
Amostra CV3: m/z 457,0793 (21,5 min)Amostra CV3: m/z 289,0718 (23,3 min)

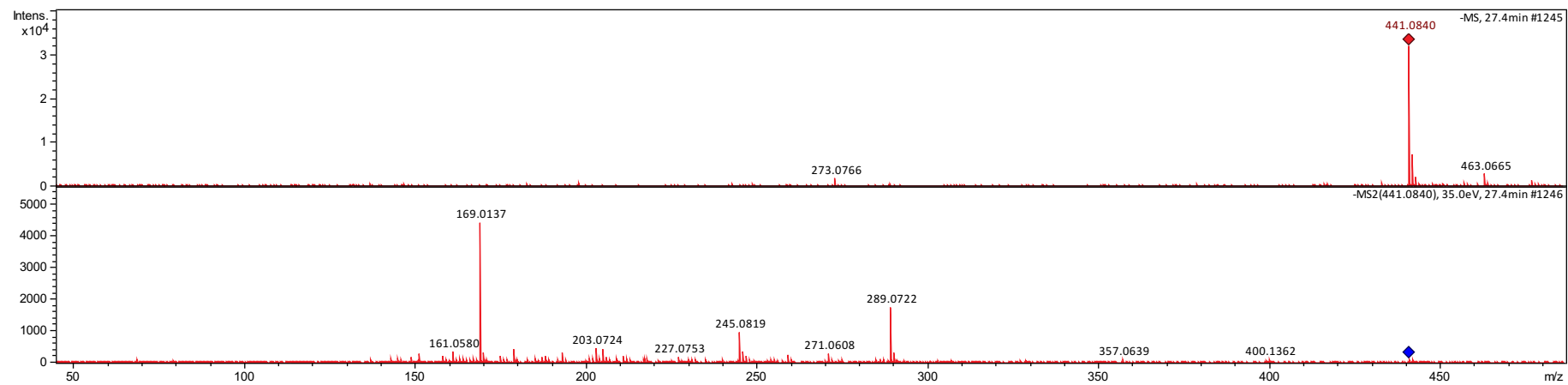
Amostra CV3: m/z 441,0876 (27,1 min)Amostra CV4: m/z 305,0670 (17,6 min)

Amostra CV4: m/z 457,0771 (21,5 min)Amostra CV4: m/z 289,0747 (23,3 min)

Amostra CV4: m/z 441,0870 (27,1 min)Amostra CV5: m/z 305,0693 (10,4 min)

Amostra CV5: m/z 305,0669 (17,5 min)Amostra CV5: m/z 457,0785 (21,6 min)

Amostra CV5: m/z 289,0718 (23,1 min)Amostra CV5: m/z 457,0795 (24,0 min)

Amostra CV5: m/z 441,0840 (27,4 min)Amostra CV5: m/z 301,0377 (45,1 min)