



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS UTILIZANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

Gabriella Magarelli¹, Jonatas G. da Silva², Jurandir R. de Souza³ e Clarissa S. P. de Castro⁴

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, gmagarelli@cenargen.embrapa.br

²Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil, jonatasg@yahoo.com.br

³Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil, rodsouza@unb.br

⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, Brasil, clarissa@cenargen.embrapa.br

Resumo: Foi objetivo do trabalho o desenvolvimento e validação de método para a determinação dos ácidos fenólicos: cafeico, clorogênico e gálico, por voltametria de pulso diferencial. Os resultados demonstraram alta sensibilidade, precisão e rapidez do método eletroquímico, e uma excelente alternativa para a determinação destes compostos em amostras de algodão.

Palavras chave: Ácidos fenólicos, Voltametria de pulso diferencial, eletrodo de carbono vítreo, algodão.

1. INTRODUÇÃO

Vários estudos vêm demonstrando que algumas variedades de algodão, que apresentam uma eficiente defesa contra insetos herbívoros e outros patógenos, possuem alto teor de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos [1]. Portanto, a identificação e quantificação de possíveis metabólitos secundários que possam ser usados no campo em armadilhas e no desenvolvimento de plantas melhoradas geneticamente, apresentam grande interesse e potencial para sua utilização no manejo de pragas.

Atualmente, vários métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), combinadas ou não à espectrometria de massas (MS), têm sido propostos para a identificação e quantificação de metabólitos secundários em diversas matrizes (frutas, verduras, produtos industrializados). Todas essas técnicas possuem equipamentos de grande porte, que dificilmente poderão ser aplicados em campo, e exigem laboriosos processos de preparação de amostra, grandes quantidades de reagentes e técnicos altamente especializados.

Os métodos eletroquímicos são métodos não destrutivos, de baixo custo e de alta sensibilidade; que permitem a determinação direta, rápida, simultânea e precisa de diversos analitos em uma única varredura, sem a necessidade de etapa de pré-tratamento e que podem ser adaptados ao campo. Devido a todas essas vantagens, os métodos eletroquímicos (voltametria cíclica e eletrodos de carbono vítreo e grafite) vêm sendo utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de compostos fenólicos e quantificá-los em alimentos, medicamentos e fluidos biológicos. A possibilidade de uso desses métodos se deve a eletroatividade desses compostos, ou seja, a facilidade com

que eles sofrem reações de oxidação ou redução em sensores eletroquímicos inertes [2].

Desta forma, foi objetivo do trabalho o desenvolvimento e validação de método eletroquímico para a determinação de três ácidos fenólicos (cafeico, clorogênico e gálico) utilizando eletrodo de carbono vítreo e voltametria de pulso diferencial.

2. MÉTODO

As medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata utilizando um analisador voltamétrico Metrohm 797 VA acoplado a uma célula eletroquímica composta por Eletrodo de Trabalho: carbono vítreo ($\Phi = 2,0$ mm); Eletrodo de Referência: Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹); Eletrodo Auxiliar: Eletrodo de platina. Antes de iniciar as medidas voltamétricas o eletrodo de carbono vítreo foi polido em suspensão aquosa de alumina 1,0 μ m e limpo com acetona no ultra-som por 5 minutos. Entre cada medida voltamétrica o eletrodo foi limpo eletroquimicamente por cinco ciclos entre 0 e 1,8 V. Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico (Sigma-Aldrich). As soluções estoque dos ácidos fenólicos (cafeico, clorogênico e gálico) de concentração 10⁻³ mol L⁻¹ foram preparadas em uma mistura etanol-água 1:1 (v/v). As curvas analíticas foram obtidas pelo método de adição padrão.

Foram realizados diversos ensaios para a determinação das condições e dos parâmetros experimentais ótimos para a detecção voltamétrica dos ácidos fenólicos. Os parâmetros estudados foram: Eletrólito suporte e pH utilizando tampão fosfato pH 3,0 - 7,0 e tampão Britton-Robinson pH 5,0-9,0; amplitude de pulso variando de 10 – 100 mV e velocidade de varredura variando de 5 – 50 mVs⁻¹. Os parâmetros de validação do método determinados foram: linearidade (r), faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetitividade, precisão intermediária e seletividade. Os parâmetros de validação foram calculados segundo o documento orientativo da Divisão de Acreditação de Laboratórios (DICLA) da CGCRE/INMETRO (2010) [3].

3. RESULTADOS

3.1. Determinação dos parâmetros e condições experimentais para a detecção e quantificação de ácidos

fenólicos por voltametria de pulso diferencial (Estudos Qualitativos):

Os parâmetros e as condições experimentais ótimos obtidos para a análise dos ácidos fenólicos por voltametria de pulso diferencial (DPV) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros ótimos utilizados na análise de ácidos fenólicos por DPV.

Parâmetros eletroquímicos	Ácido clorogênico	Ácido cafeico	Ácido gálico
Amplitude do pulso / mV	50	50	50
Velocidade de Varredura / mV s ⁻¹	50	50	50
Potencial inicial / V	0	0	0
Potencial Final / V	0,8	0,8	0,8
Eletrólito suporte	*TF pH 3,0	*TF pH 3,0	*TF pH 3,0

*Tampão fosfato

3.2. Obtenção das figuras analíticas de mérito ou parâmetros de validação (Estudos Quantitativos):

Voltamogramas (Fig. 1) de adições sucessivas de 1,0 µL de ácido cafeico; 5,0 µL de ácido clorogênico; e 10 µL de ácido gálico, na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em 10 mL de tampão fosfato pH 3,0 foram traçados nas melhores condições de amplitude de pulso e velocidade de varredura (Tabela 1). As equações das curvas analíticas foram: $I_{pa}(A) = -2,72 \times 10^{-7} + 0,51 [\text{Ácido Clorogênico}]$; $I_{pa}(A) = -1,8 \times 10^{-7} + 0,22 [\text{Ácido Gálico}]$; $I_{pa}(A) = -4,15 \times 10^{-8} + 0,97 [\text{Ácido Cafeico}]$.

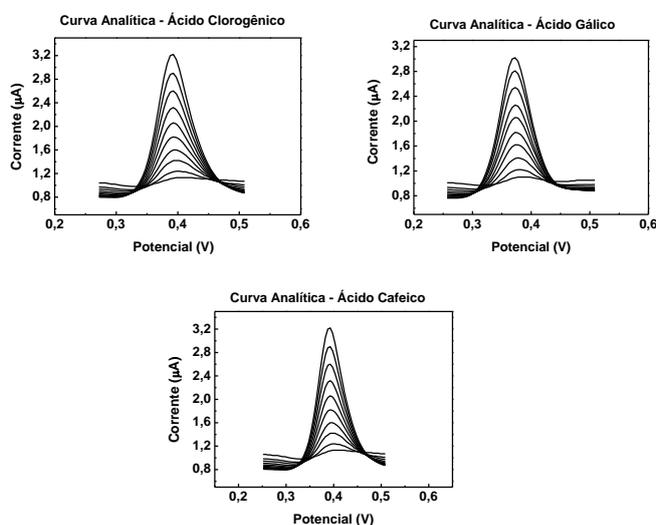


Fig 1. Voltamogramas das curvas analíticas dos ácidos clorogênico, gálico e cafeico.

O estudo para repetitividade de resposta do eletrodo de GC para a quantificação dos ácidos fenólicos clorogênico, cafeico e gálico apresentou desvio padrão relativo (RSD) entre 0,5 a 7,4 %.

O estudo da precisão intermediária do método apresentou RSD entre 2,1 a 41 %. O método apresentou precisão maior para os ácidos cafeico e gálico.

No estudo da seletividade do método foi verificado que, nas condições experimentais otimizadas, não é possível a

determinação simultânea dos ácidos fenólicos estudados, uma vez que os picos de corrente de oxidação aparecem nos voltamogramas (Fig.1) em potenciais muito próximos.

As figuras analíticas de mérito ou parâmetros de validação referentes à faixa linear, coeficiente de correlação (r), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), do método analítico estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Figuras analíticas de mérito do método analítico desenvolvido para a determinação de ácidos fenólicos.

Ácido Fenólico	Faixa Linear (mol L ⁻¹)	r	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)
Clorogênico	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-6}$	0,996	$5,5 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
Cafeico	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-6}$	0,998	$6,8 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$
Gálico	$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5}$	0,998	$8,4 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$

Em etapas futuras, os parâmetros relativos à reprodutibilidade, e exatidão deverão ser determinados. A quantificação total dos ácidos fenólicos estudados em algodão poderá ser feita por meio da concentração de ácido cafeico, pois este ácido fenólico apresentou uma maior sensibilidade na resposta da corrente de oxidação, e maior precisão quando comparados com os ácidos gálico e clorogênico.

4. CONCLUSÃO

O método voltamétrico desenvolvido para a determinação dos ácidos cafeico, gálico e clorogênico, utilizando o eletrodo de carbono vítreo e a técnica de DPV, apresentaram boas precisão e sensibilidade e baixos limites de detecção e quantificação, tornando-se excelentes alternativas para a determinação desses ácidos fenólicos. No entanto, não é possível fazer a determinação em uma única varredura dos três ácidos fenólicos. Apesar disso, o método desenvolvido mostrou-se sensível, preciso e rápido o que possibilitará a sua aplicação na detecção e quantificação dos ácidos fenólicos totais em matrizes complexas como folhas de algodão.

AGRADECIMENTOS

Embrapa, UnB, CNPq, Capes

REFERÊNCIAS

- [1] SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W. M.; MORELLO, C. de L. "Resistência genética do algodoeiro a doenças". In: BELTRÃO, N. E. de M.; AZEVEDO, D. M. P. de. (Ed.). O Agronegócio do algodão no Brasil. 2ª ed. rev. amp. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 1 p. 327-354.
- [2] SOUSA, W. R.; ROCHA, C.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, V. B. "Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods". Journal of Food Composition and Analysis, Jena, v. 17, p. 619-633, 2004.
- [3] INMETRO. DOQ-CGCRE-008. "Orientação sobre validação de métodos analíticos". Revisão 03- FEV/2010.