

Determinação de catequinas por eletrodo de carbono impresso modificado com nanotubo de carbono funcionalizado

Silva, A. L.¹; Da Silva, Q. G.²; Kubota, L. T.^{3 4}; Tanaka, A. T.^{4 5}

Resumo: A Catequina é um composto fenólico com grande potencial oxidante, encontrada em diversos tipos de alimentos, dentre alguns dos benefícios da catequina estão o fortalecimento capilar, melhoria do fluxo sanguíneo, redução dos níveis de colesterol. Neste artigo, utilizou-se da técnica de voltametria cíclica (VC) para otimizar o eletrodo de carbono impresso modificado com nanotubo de carbono funcionalizado para detectar e quantificar catequina por meio da técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Para este eletrodo, os melhores resultados foram obtidos a uma concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹ de catequina em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 a uma velocidade de varredura de potencial de 0,05 V s⁻¹. A partir destas condições foi obtida uma curva analítica com comportamento linear no intervalo de concentração de catequina entre $2,0 \times 10^{-7}$ a $1,68 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limites de detecção e de quantificação de $9,2 \times 10^{-8}$ e $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente por VOQ. Este eletrodo apresentou boa repetibilidade com um desvio de padrão relativo de 4,05%. A oxidação da catequina apresentou um pico localizado em torno de 0,15V vs Ag/AgCl, estando próximo dos potenciais de pico mostrados na literatura.

Palavras-chave: catequina, eletrodo de carbono impresso, nanotubo de carbono, sensor eletroquímico

Abstract: Catechin is a phenolic compound with high oxidizing potential, found in several types of foods, some of the benefits of catechins are capillary strengthening, improvement of blood flow and reduction of cholesterol levels. In this paper, it was used the cyclic voltammetry technique (CV) to optimize the printed carbon electrode modified with carbon nanotube, functionalized to detect and quantify catechin by means of the squarewave voltammetry technique (SWV). For this electrode, the best results were obtained at a catechin concentration of 1×10^{-3} mol L⁻¹ in means of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0 at a potential scan rate of 0.05 V s⁻¹. From these conditions, an analytical curve was obtained with a linear behavior in the catechin concentration range of $1,68 \times 10^{-5}$ to $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, with limits of detection and quantification of $9,2 \times 10^{-8}$ and $3,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectively, by SWV. This electrode showed good repeatability with a standard deviation of 4.05%. Oxidation of catechin showed a peak located around 0,15V vs Ag / AgCl, being close to the peak potentials shown in the literature.

Keywords: catechin, printed carbon electrode, carbon nanotubes, electrochemical sensor

¹ Departamento de Físico-Química, Universidade Federal Fluminense, 24020-141, Niterói, RJ, Brasil.

² Departamento de Química e Biologia, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, MA, Brasil.

³ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Caixa postal 6154, 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

⁴ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, Universidade Estadual de Campinas, Caixa postal 6154, 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

⁵ Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-040, São Luís, MA, Brasil.

Eclética Química, vol. 40, 52-61, 2015.

INTRODUÇÃO

A catequina é um composto fenólico que tem grande interesse dos pesquisadores devido à ação antioxidante encontrada em frutas, chás, vinhos, e, conseqüentemente, seu efeito fisiológico benéfico à saúde [1-3]. As catequinas são os membros mais importantes da classe dos flavonoides, elas foram reconhecidas como um antioxidante potente e uma destruidora de radicais livres [4].

As catequinas têm sido associadas a muitos benefícios à saúde, incluindo diminuição da fragilidade capilar [6], a prevenção de dano ao DNA, devido à oxidação e à melhoria do fluxo sanguíneo, logo, da função hepática[6]. As catequinas são, portanto, tanto antimutagênicas e anticarcinogênicas [7]. Foi também demonstrado serem capazes de proteger os neurônios e células hepáticas contra os danos dos radicais livres gerados durante isquemia [3,8] e de aumentar a resistência de glóbulos vermelhos do sangue ao estresse oxidativo [9,10].

Outras aplicações do uso de catequina é na progressão de retardo das lentes de cataratas [11] para inibir a radiação ultravioleta que causa câncer na pele e reduzir o nível de colesterol por proteger lipoproteínas de baixa densidade a partir da oxidação [6,12]. A estrutura da Catequina está representada na figura 1.

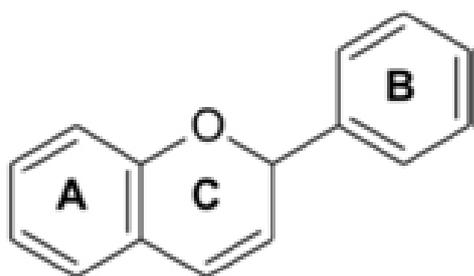


Figura 1 - Estrutura molecular da catequina

Para a determinação de antioxidantes, dentre eles os polifenóis, são geralmente utilizados os métodos espectrofométricos e cromatográficos. Tais métodos são bastante sensíveis. No entanto, requerem instrumentos caros e mais sofisticados, consomem muito tempo, usam reagentes tóxicos, ou fornecem altos limites de detecção [13-15].

Os métodos tradicionais para a detecção de catequinas incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [1,16,17] combinada com quimiluminescência [18,19], espectrofotometria [2], eletroquímica [3,20-26], UV e detecção fluorimétrica [27].

Técnicas que fornecem baixos limites de detecção e uma gama de informações que caracterizam eletroquimicamente alguns sistemas, como as técnicas analíticas, têm algumas vantagens sobre outros métodos, tais como instrumentação relativamente barata, uso de quantidade menor de reagentes, além de serem instrumentos de manuseio fácil [28].

Contudo, o desenvolvimento de novos métodos que possibilitem o mínimo de reagentes e um menor tempo de análise é muito importante. Um campo que tem se destacado é o de desenvolvimento de novos eletrodos [29]. O desenvolvimento desses eletrodos se dá principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse clínico, hospitalar, ambiental, alimentício, farmacêutico, entre outros [30,31].

Para obter uma maior eficácia das técnicas atuais, uma área que está aumentando a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM) [31-34].

Nesse contexto, este artigo tem como objetivo determinar, em diferentes condições, e avaliar eletroquimicamente a catequina, por meio de eletrodo de carbono impresso modificado com nanotubo de carbono funcionalizado.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Reagentes e Soluções

Os reagentes catequina (CTQ) e o nanotubo de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Company®. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e preparados com água deionizada em sistema Milli-Q da Millipore, e o pH das soluções

tampão foi medido em um pH-metro modelo 300 da Analyser (São Luís-Brasil).

Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato /galvanostato EcoChemie modelo μ AUTOLAB-2, acoplado a um computador com o *software* GPES 4.9 e um conjunto de eletrodos de carbono impresso (ECI) adquiridos da DropSens[®],

em sistema convencional. Os ECI (figura 2a) utilizados possuem área geométrica aproximada de $0,05 \text{ cm}^2$. O arranjo consiste em três eletrodos organizados sobre um suporte cerâmico sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência de (Ag|AgCl) e um contra-eletrodo de carbono. Foi utilizada uma célula eletroquímica com capacidade de 5 mL como mostra a figura 2b.

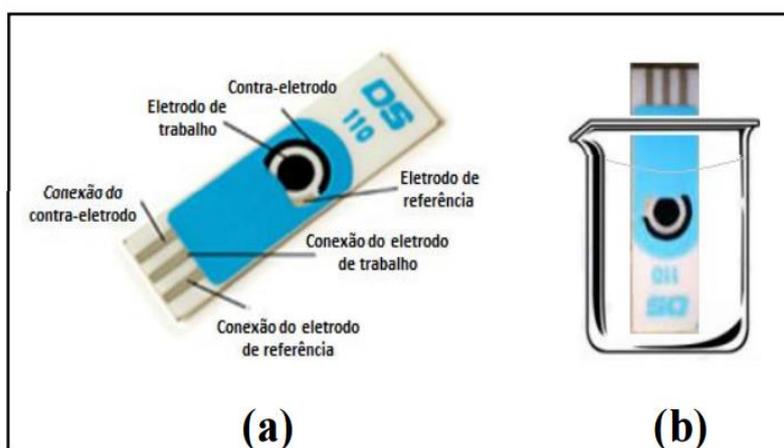


Figura 2 - Representação esquemática do (a) dispositivo contendo os eletrodos impressos e (b) béquer utilizado como célula eletroquímica

O eletrodo de carbono impresso foi modificado por meio da deposição de $7 \mu\text{L}$ da suspensão homogênea de NTC, em seguida o eletrodo é colocado em um dissecador acoplado a bomba de vácuo para a evaporação [35]. Antes de cada análise, o oxigênio das soluções eletrolíticas foi removido por borbulhamento com N_2 do tipo 5.0 – Gases especiais da White Martins S. A.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo Comparativo dos Eletrodos

Inicialmente, realizou-se um estudo comparativo entre os eletrodos de carbono impresso (ECI), eletrodo de carbono impresso contendo nanotubo de carbono sem pré-tratamento (ECI/NTC/SPT) e eletrodo de carbono impresso contendo nanotubo de carbono pré-tratado (ECI/NTC). Na figura 3, estão representados os voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) na presença de Catequina $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre os eletrodos ECI, ECI/NTC/SPT e ECI/NTC.

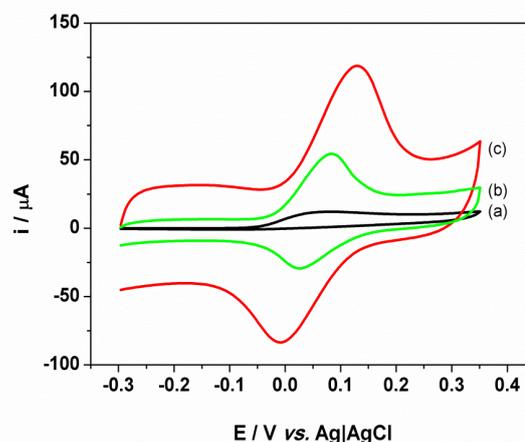


Figura 3 - Voltamogramas cíclicos em meio de solução tampão fosfato pH 7,0 na presença de CTQ $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrodos: (a) ECI; (b) ECI/NTC(SPT) e (c) ECI/NTC, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Observou-se que o ECI/NTC mostrou melhor resultado, uma vez que apresentou maior intensidade de pico, maior área, justificando sua escolha para a determinação da CTQ.

Avaliação da resposta eletroquímica da catequina sobre o eletrodo de carbono impresso pré-tratado

De acordo com os dados anteriores, o eletrodo que melhor se comportou frente à oxidação de CTQ foi o ECI/NTC e, com base nisso, os estudos

posteriores foram realizados utilizando este eletrodo. Utilizou-se a técnica de voltametria cíclica para analisar o comportamento voltamétrico do ECI/NTC em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (Figura 4).

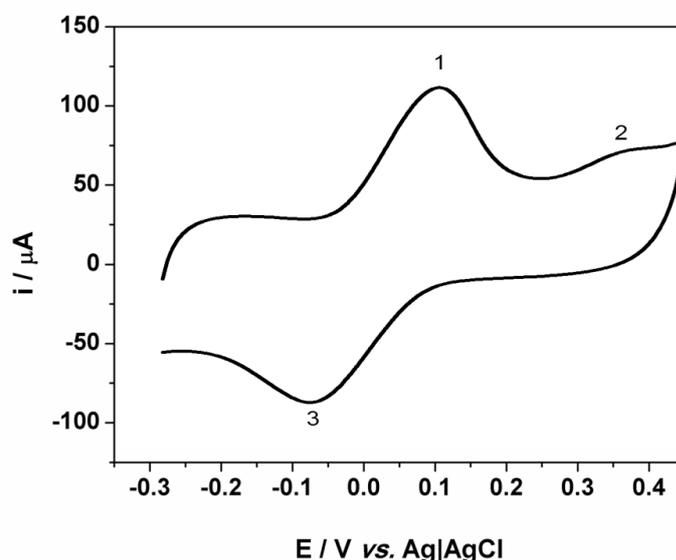


Figura 4 - Voltamograma cíclico do ECI/NTC em solução de tampão fosfato pH 7,0 na presença de CTQ 1x10⁻⁴ mol L⁻¹, v = 0,05 V s⁻¹.

O perfil do voltamograma da figura 4 está de acordo com o estabelecido na literatura [2,21], que associa o pico 1 com a oxidação do grupo catecol e

envolve 2 elétrons e 2 prótons, com a formação de orto-quinona como produto conforme a figura 5.

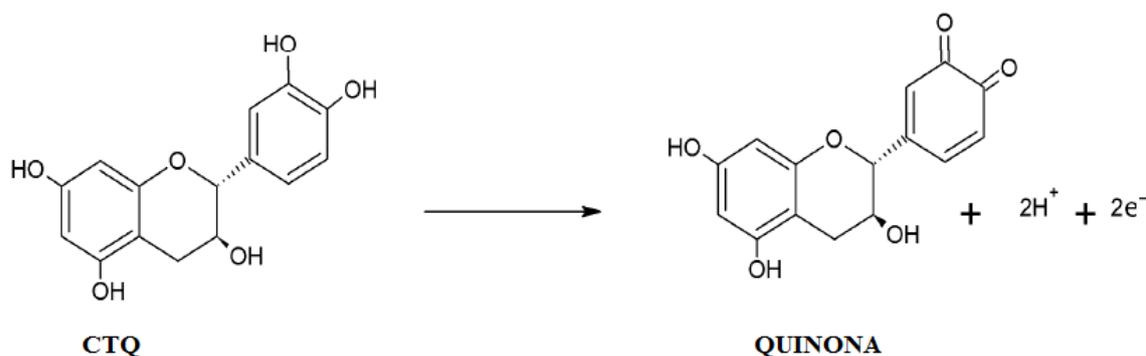


Figura 5 - Mecanismo da oxidação da Catequina [21]

A figura 4 mostra o voltamograma cíclico da CTQ até o potencial 0,55 V, no entanto, ao repetir sucessivas varreduras, o voltamograma da CTQ sofre um deslocamento no potencial de pico e uma diminuição brusca na corrente de pico devido a uma possível reação acoplada à superfície do eletrodo. Com isso, optou-se por limitar o potencial em 0,35 V

conforme a figura 6, uma vez que, ao fazer isso, aumentou a estabilidade e o pico de corrente do eletrodo frente ao analito.

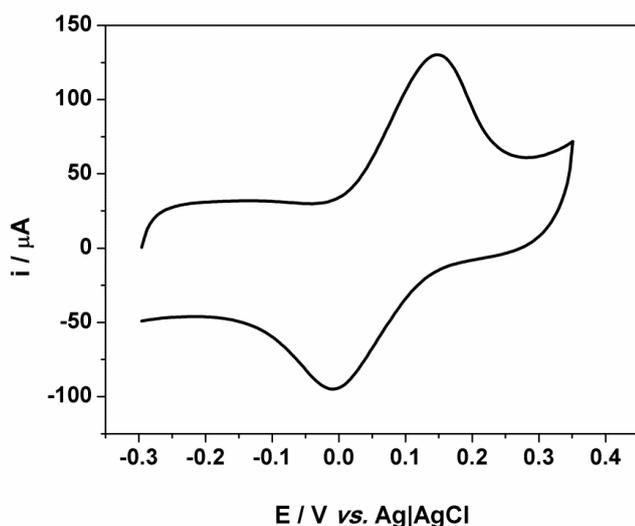


Figura 6 - Voltamograma cíclico do ECI/NTC na presença de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em solução de tampão fosfato pH 7, $v = 0,05$ V s $^{-1}$.

Estudo da natureza do meio

Para estudar o melhor meio para se determinar CTQ, foram obtidos voltamogramas cíclicos em vários eletrólitos suportes tais como: tampão fosfato, tampão Sørensen, tampão McIlvaine e tampão Britton-Roinson (BR) todos em pH 7,0, 0,1 mol L $^{-1}$. Na figura 7, são apresentados os voltamogramas cíclicos em diferentes eletrólitos suporte na presença de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$.

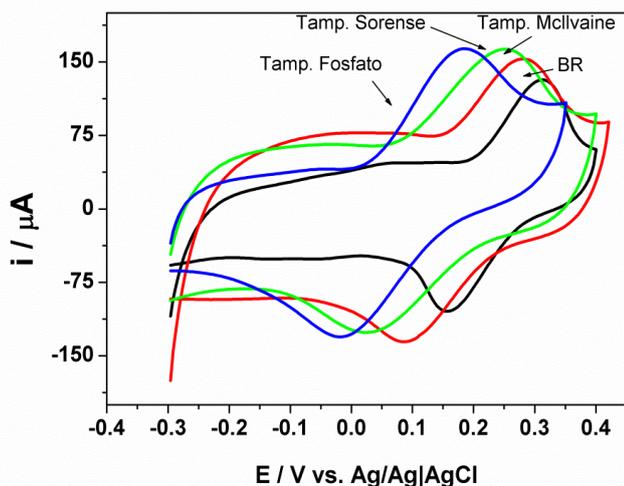


Figura 7 - Voltamogramas cíclicos de diferentes eletrólitos do ECI-NT na presença de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$, $v = 0,05$ V s $^{-1}$.

O eletrólito suporte que proporcionou uma melhor resposta para o processo de oxidação da catequina foi o tampão fosfato, com um perfil voltamétrico melhor definido, intensidade de corrente de pico ligeiramente maior e, ainda, apresentou um potencial de pico menor.

Estudo de Força Iônica

Para o estudo da força iônica em voltametria cíclica com ECI/NTC, usou-se CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em meio de solução tampão fosfato pH 7,0 em diferentes concentrações, 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mol L $^{-1}$. A figura 8 apresenta como melhor sinal de intensidade de corrente a concentração 0,5 mol L $^{-1}$, no entanto, selecionou-se 0,1 mol L $^{-1}$ por usar menos reagente e não ter tanta perda de sinal em relação à concentração de 0,5 mol L $^{-1}$.

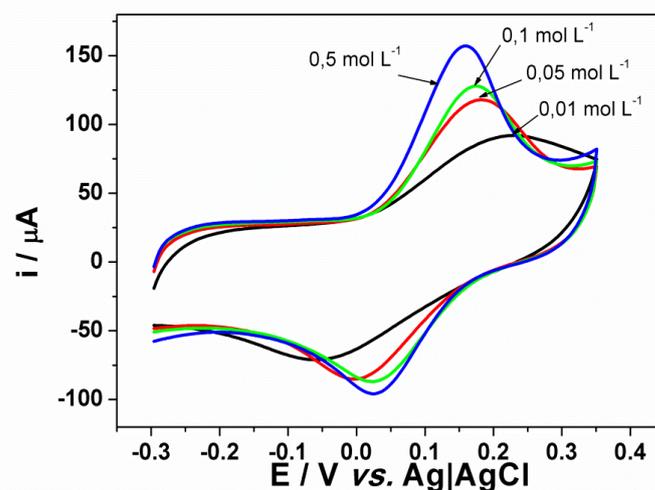


Figura 8 - Voltamogramas cíclicos com ECI/NTC na presença de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em solução de tampão fosfato pH 7,0 em diferentes concentrações: 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mol L $^{-1}$, $v = 0,05$ V s $^{-1}$.

Estudo do pH do meio

Este estudo foi realizado utilizando o eletrólito suporte tampão Britton-Robinson – (BR) por apresentar uma faixa tamponante ampla.

Investigou-se a influência do pH sobre a resposta voltamétrica para a oxidação de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em solução tampão BR 0,1 mol L $^{-1}$ sobre o ECI/NTC variando-se o pH do eletrólito suporte entre 2,0 e 12,0.

As voltametrias cíclicas para CTQ $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ECI/NTC em diferentes valores de pH podem ser visualizadas na figura 9.

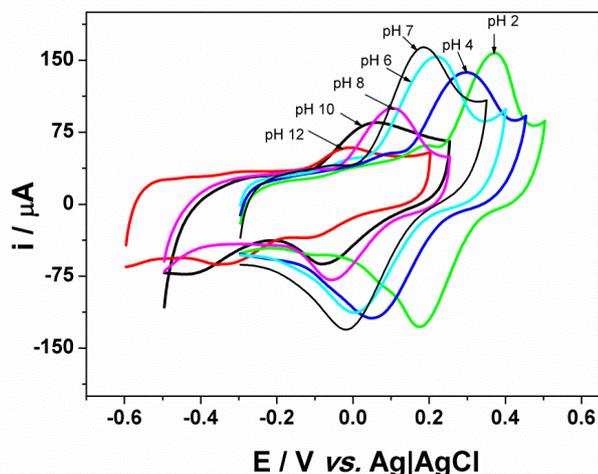


Figura 9 - Voltamogramas cíclicos do ECI-NTC em solução de tampão BR em diferentes valores de pH (2 – 12) na presença de CTQ $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Observa-se um deslocamento no potencial de pico em função do pH do meio. Analisando os gráficos das figuras 10a e 10b, potencial de pico em função do pH do meio, observa-se que o maior potencial de pico se deu no pH 7,0. Na figura 10b, os resultados obtidos apresentam uma relação linear com coeficiente angular igual a $60,6 \text{ mV / pH}$, valor próximo de $59,2 \text{ mV / pH}$ previsto pela equação de Nernst, o que sugere a participação de dois prótons e dois elétrons no processo de oxidação da CTQ [2,21].

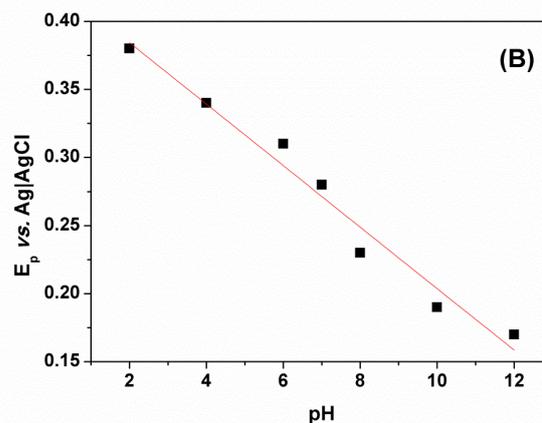
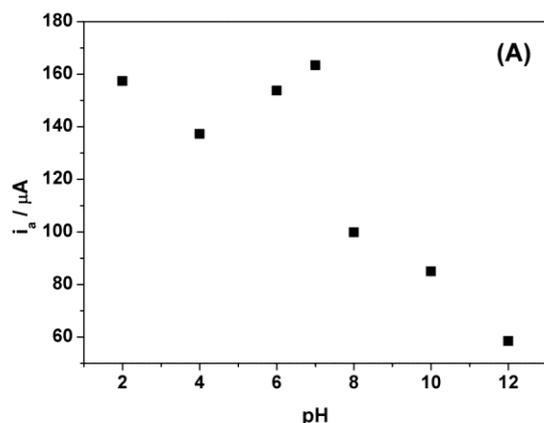


Figura 10 - (a) Corrente de pico em função do pH do meio. Dados extraídos da fig. 9. e (b) potencial de pico em função do pH do meio. Dados extraídos da fig. 10a.

Em valores de pH acima de 10, não são observados picos característicos de oxidação da CTQ, devido a CTQ ser oxidada à quinona que em soluções alcalinas age como ácido fraco dissolvendo-se em soluções alcalinas formando soluções de cor laranja-avermelhada. Contudo o melhor sinal de corrente de pico aliado a um potencial de pico menor foi observado em pH 7,0, por isso, para a otimização e seleção dos parâmetros eletroquímicos optou-se em trabalhar com uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.

Estudo do efeito da velocidade de varredura

Para o estudo do efeito de velocidade de varredura de potencial, foram realizados experimentos em diferentes velocidades em solução de CTQ $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Na figura 11, são observados os voltamogramas cíclicos para o ECI/NTC num intervalo de velocidade de varredura de potencial de $0,01$ e $0,1 \text{ V s}^{-1}$, no qual nota-se um pequeno deslocamento no potencial de pico, indicando um sistema cuja separação de picos de correntes anódica e catódica sugere um processo quase reversível, porém,

a variação linear de I_p versus $v^{1/2}$ indica que ocorre transporte de massa por difusão [36].

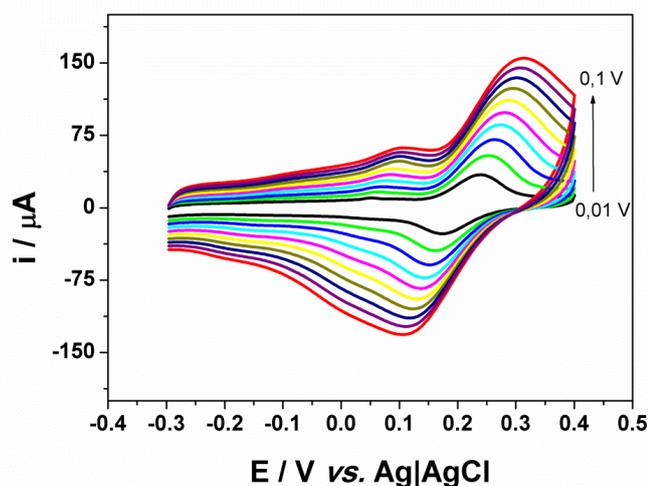


Figura 11 - Voltamogramas Cíclicos do ECI-NT em solução de tampão fosfato pH 7,0 na presença de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de potencial: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 e 0,1 V s $^{-1}$.

A dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (figura 12) obtida com os dados da figura 11, mostra um comportamento linear com coeficiente angular igual a 0,43, valor próximo a 0,5 indicado para sistemas com processo redox controlado pelo transporte de massa [36,37].

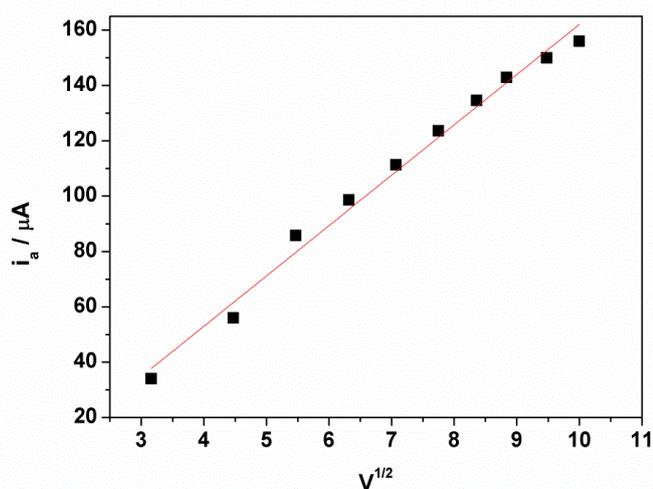


Figura 12 - Corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura do potencial. Dados extraídos da fig. 11.

Estudo de repetibilidade

O estudo de repetibilidade foi realizado no mesmo dia, com o ECI/NTC modificado uma única vez. A repetibilidade do ECI/NTC foi estudada empregando-se uma solução de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em meio de tampão fosfato pH 7,0. Para esse estudo, foram realizadas 20 medidas ($n = 20$) no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível. Na figura 13, estão sobrepostas as 20 medidas consecutivas de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em eletrodo de ECI/NTC. Este estudo foi realizado para avaliar a estabilidade do eletrodo frente à oxidação de CTQ.

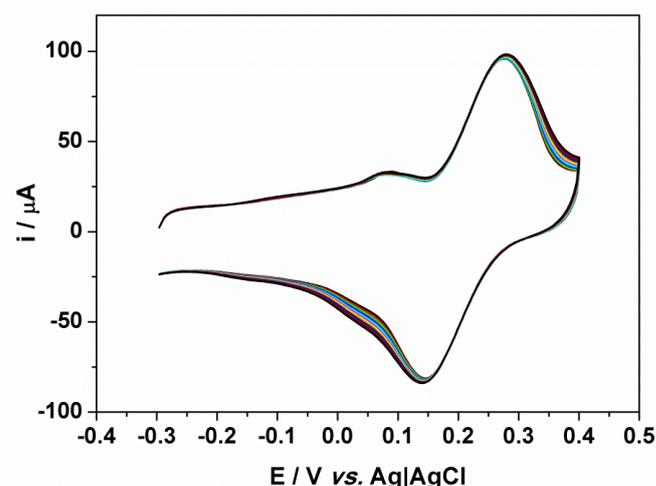


Figura 13 - Voltamogramas Cíclicos do ECI-NT em solução de tampão fosfato pH 7,0 na presença de CTQ 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ em 20 medidas consecutivas, $v = 0,05$ V s $^{-1}$.

O desvio padrão relativo obtido para o estudo de repetibilidade foi de 4,05%. O ECI/NTC apresentou uma boa repetibilidade com um baixo desvio padrão relativo.

Curva analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais para o ECI/NTC utilizando a técnica de voltametria cíclica foram realizadas sucessivas adições de catequina em diferentes concentrações no intervalo de 2×10^{-7} mol L $^{-1}$ a $1,68 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ obtendo os voltamogramas cíclicos para cada concentração (figura 14a) e sua respectiva curva analítica (figura 14b).

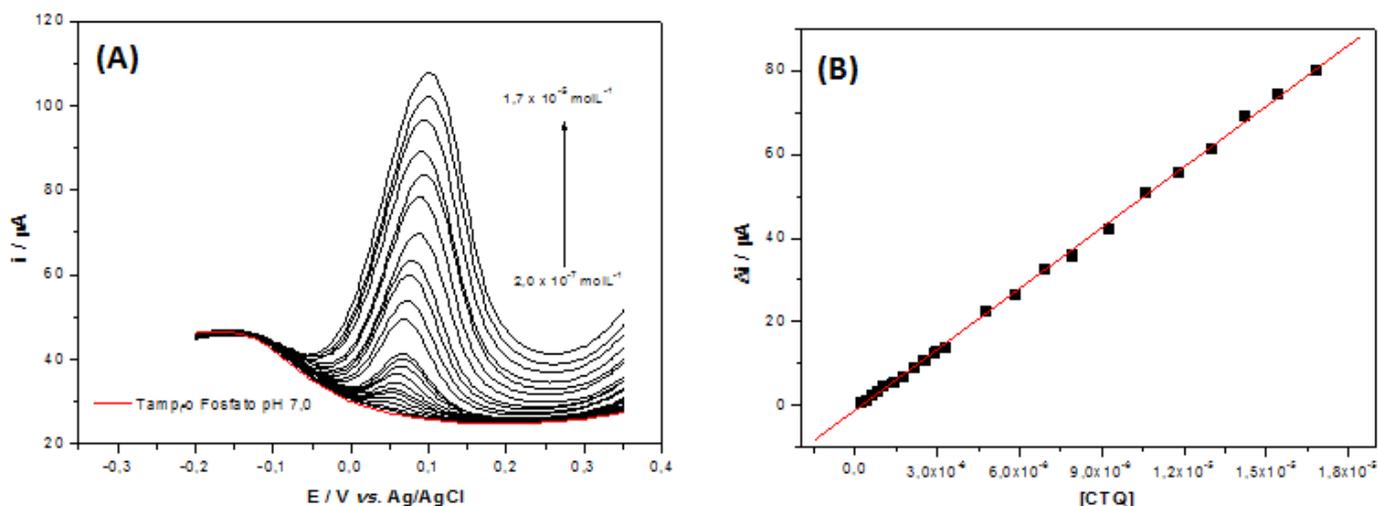


Figura 14 - (a) Voltamogramas cíclicos do ECI-NT em solução tampão fosfato pH 7 na presença de diferentes concentrações de CTQ: (1) tampão fosfato; (2) 2×10^{-7} ; (3) $3,98 \times 10^{-7}$; (4) $5,96 \times 10^{-7}$; (5) $7,94 \times 10^{-7}$; (6) $9,9 \times 10^{-7}$; (7) $1,38 \times 10^{-6}$; (8) $1,77 \times 10^{-6}$; (9) $2,15 \times 10^{-6}$; (10) $2,53 \times 10^{-6}$; (11) $2,91 \times 10^{-6}$; (12) $3,91 \times 10^{-6}$; (13) $4,76 \times 10^{-6}$; (14) $5,84 \times 10^{-6}$; (15) $6,89 \times 10^{-6}$; (16) $7,92 \times 10^{-6}$; (17) $9,26 \times 10^{-6}$; (18) $1,06 \times 10^{-5}$; (19) $1,18 \times 10^{-5}$; (20) $1,3 \times 10^{-5}$; (21) $1,42 \times 10^{-5}$; (22) $1,54 \times 10^{-5}$; (23) $1,68 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. (b) Curva analítica. A equação da reta obtida foi: $(i_p / \mu\text{A}) = -1,07 + 4,84 \times 10^6 [\text{CTQ}] \text{ mol L}^{-1}$ e coeficiente de correlação foi igual a 0,999.

Observa-se um aumento das intensidades de corrente de pico com o aumento da concentração de CTQ, o qual apresentou um coeficiente de correlação (r) de 0,999, e a equação da reta obtida está escrita na equação 1.

$$i(\mu\text{A}) = -1,07 + 4,84 \times 10^6 [\text{CTQ}] \quad (1)$$

O limite de detecção é a menor concentração do analito presente em uma amostra e foi calculado de acordo com a equação 2, na qual sd é o desvio padrão dos valores obtidos para 15 determinações com o eletrólito sem catequina (branco) no mesmo potencial de oxidação da catequina e b é o valor do coeficiente angular da curva analítica.

$$\text{LD} = 3 \text{ sd} / b \quad (2)$$

O limite de quantificação é a concentração mais baixa do analito na curva que pode ser determinada e este foi calculado de acordo com a equação 3:

$$\text{LQ} = x + 10\text{sd} \quad (3)$$

onde x é a média dos brancos e sd é o desvio padrão dos brancos.

O método proposto foi aplicado na determinação de catequina em chás utilizando-se para isso o método de adição de padrão. A tabela 1 mostra os dados obtidos neste trabalho em comparação a outros dados da literatura com estudos de determinação de CTQ.

Tabela 1 - Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e alguns autores para determinação de CTQ

Eletrodos	Técnica	Eletrólito	E_p (V)	LD (mol L^{-1})	Referências
ECI/NTC	VC	Tampão Fosfato pH 7	0,12	$9,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	*
EPC	VC	Tampão Fosfato pH 7,4	0,2	$4,65 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	[3]

ECCM-Ni(OH) ₂	VPD	Tampão Fosfato pH 6,8	----	5,5x10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	[38]
ECCM-Cu ₃ (PO ₄) ₂	VPD	Tampão Fosfato pH 6,8	0,16	5,8x10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	[38]

* este trabalho

Analisando a tabela, é possível observar que o eletrodo objeto de estudo deste trabalho é suficientemente aplicável para a detecção de CTQ, uma vez que apresenta LD e LQ dentro da ordem de grandeza de técnicas eletroanalíticas mais sensíveis comparadas com este trabalho.

CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra a viabilidade do emprego dos eletrodos de carbono impresso associados à nanotubo de carbono funcionalizado (ECI/NTC) para a determinação de catequina em comparação aos eletrodos de carbono impresso (ECI) e eletrodo de carbono impresso associados à nanotubos de carbono sem pré-tratamento (ECI/NTC/SPT) pelos seguintes fatos: aumentou significativamente as correntes de pico e elevada área e capacidade eletrocatalítica que favoreceram o ECI/NTC na determinação de catequina.

Os teste de detecção de CTQ sobre o ECI/NTC mostraram que a resposta de corrente foi mais intensa em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. O estudo do pH sobre o sinal analítico do sensor também mostrou que a melhor sensibilidade na determinação de catequina foi no pH 7,0. Os limites de detecção e quantificação encontrados por voltametria cíclica foram 9,2x10⁻⁸ mol L⁻¹ e 3,0x10⁻⁷ mol L⁻¹, respectivamente, valores bastante significativos para a determinação de CTQ.

AGRADECIMENTOS

À Capes pela bolsa de pesquisa, ao Laboratório de Eletroquímica, ao Mestrado de Biodiversidade e Conservação pelo conhecimento adquirido e à UFMA pelos recursos disponibilizados.

REFERÊNCIAS

- [1] Y. Masukawa, Y. Matsui, N. Shimizu, N. Kondou, H. Endou, M. Kuzukawa, T. Hase, J. Chromatogr. B, 834 (2006) 26-34.
- [2] D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak, Talatnta. 71, (2007) 1155.
- [3] D. A. El-Hady, N. El-Maal, Microchim. Acta. 61, (2008) 225.
- [4] Y. Yilmaz. Trends Food Sci. Tech. 17 (2006) 64.
- [5] J. Tieppo, R. Verdelino, A. S. Dias, M. F. S. Vaz, T. R. Silveira, C. A. Marroni, N. P. Marroni, J. A. P. Henriques, J. N. Picada. Food Chem Toxicol. 45 (2007) 1140.
- [6] R. Wang, W. Zhou, X. Jiang. Journal of Food Engineering. 87 (2008) 505-513.
- [7] M. Mochizuki, S. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda. Biochim. Biophys. Acta. 1 (2002) 1569.
- [8] S. K. Katiyar, F. Afaq, A. Perez, H. Mukhtar. Carcinogenesis. 22 (2001) 287.
- [9] S. Shoham, M. B. H. Youdim. Cell Mol. Biol. 46 (2000) 743.
- [10] A. A. Korish, M. M. Arafah. Archives of Gerontology and Geriatrics. 46 (2008) 25.

- [11] S. E. Thiagarajan, S. M. CHEN. *Talanta*. 74 (2007) 212.
- [12] H. Wang, G. J. Provan, K. Helliwell. *Food Chemistry*. 81 (2003) 307.
- [13] D. Amin, S.T Sulaiman. *Analyst*. 109 (1984) 739.
- [14] F. Onur, N. Acar, N. *Int.J.Pharm.* 78 (1992) 89.
- [15] K. O. Lupetti, L. A. Ramos, I. C. Vieira, O. Fatibello-Filho, O. *Il Farmaco*. 60 (2005) 179.
- [16] Z. Zhong, M. Froh, H. D. Connor, X. L. LI, X. L.; L. O. Conzelmann, J. J. Mason, R. P. Lemasters, R. G. Thurman. *Am. J. Physiol. – Gastrointestinal and Liver Physiology*. [2002] 283.
- [17] E. E. Nishitani, Y. M. Sagesaka. *Journal Food Composositon and Analysis*. 17 [2004] 675.
- [18] K. Nakagawa, T. J. Miyazawa. *Nutr. Sci. Vitaminol*. 43 (1997) 679.
- [19] S. Kim, M. J. Lee, J. I. Hong, C. Li, T. J. Smith, G. Y. Yang, D. N. Seril, C. S. Yang. *Nutrition and Cancer*. 37 (2000) 41.
- [20] B. L. E. Lee, C. N. Ong. *J. Chromatogr. A*. 439 (2000) 881.
- [21] P. Janeiro, A. M. O. Brett. *Anal. Chim. Acta*. 109 (2004) 518.
- [22] A. Jarosz-Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 238.
- [23] J. J. Roy, T. E. Abraham, K. S. Abhijith, P. V. S. Kumar, M. S. Thakur. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 206.
- [24] L. Q. Wu, R. Ghodssi, Y. A. Elabd, G. F. Payne. *Advanced Functional Materials*. 15 (2005) 189.
- [25] D. A. El-Hady. *Anal. Chim. Acta*. 178 (2007) 593.
- [26] S. C. Fernandes, R.E. H. M. B. Osório, A. Dos Anjos, A. Neves, G. A. Micke, I. C. Vieira. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 1215.
- [27] M. A. Rodriguez-Delgado, S. Malovaná, J. P. Pérez, T. Borges, F. L. García Montelongo. *J. Chromatogr. A*. 249 (2001) 912.
- [28] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo, Thonson, 8 ed. (2006).
- [29] A. J. Blasco, M. C. González, A. Escarpa, A. *Anal. Chim. Acta*. 71 (2004) 511 71.
- [30] R. C. S. Luz, A. B. Moreira, F. S. Damos, A. A. Tanaka, L. T Kubota. *J. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 42 (2006) 184-191.
- [31] B. C. Janegitz, L. H. M. Junior, O. Fatibello-Filho, O. *Quim. Nova*. 30 (2007) 1673.
- [32] J. Wang. *Electroanalysis*. 3 (1991) 255.
- [33] J. A. Cox, M. E. Tess, T. E. Cummings. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 15 (1996) 173.
- [34] A. A. Tanaka, J. A. P. Chaves, M. F. A. Araújo, J. J. G. Varela. *Eclética Química*. 28 (2003) 9.
- [35] M. Stoytcheva, N. Nankov, V. Sharkova. *Anal. Chim. Acta*. 315 (1995) 101
- [36] L. J. Yang, C. Tang, C.; H. Y. Xiong, X. H. Zhang, S. F. Wang. *Bioelectrochem.* 75 (2009) 158.
- [37] F. S. Felix, C. M. A. Brett, L. Angnes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1622.
- [38] K. H. G. Freitas, O. Fatibello-Filho. *Anal. Letters*. 43 (2010) 2091-2104.