

# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA DE ALIMENTOS  
UTILIZANDO UM SENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM NANOTUBOS DE  
CARBONO E 4-NITROANILINA ADSORVIDA EM SÍLICA GEL MODIFICADA COM  
ÓXIDO DE ZIRCÔNIO**

**DIOGO CEZAR FERRO DO NASCIMENTO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

**Campus A.C. SIMÕES  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970 – Maceió/AL**

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA DE ALIMENTOS  
UTILIZANDO UM SENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM NANOTUBOS DE  
CARBONO E 4-NITROANILINA ADSORVIDA EM SÍLICA GEL MODIFICADA COM  
ÓXIDO DE ZIRCÔNIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Vieira da Silva

Maceió-AL

2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

N244d Nascimento, Diogo Cezar Ferro do.

Determinação de ácido ascórbico em amostra de alimentos utilizando um sensor amperométrico baseado em nanotubos de carbono e 4-nitroanilina adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio / Diogo Cezar Ferro do Nascimento. – 2019.

83 f.: il color.

Orientador: Phabyanno Rodrigues Lima.

Co-orientador: Leonardo Vieira da Silva.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 75-83.

1. Sílica gel. 2. 4-nitroanilina (Compostos orgânicos). 3. Sensor amperométrico (Sensores químicos). 4. Ácido ascórbico. I. Título.

CDU: 543.553



**PPGQB**

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

### FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **DIOGO CEZAR FERRO DO NASCIMENTO**, intitulada: “**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRA DE ALIMENTOS UTILIZANDO UM SENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO E 4-NITROANILINA ADSORVIDA EM SÍLICA GEL MODIFICADA COM ÓXIDO DE ZIRCÔNIO**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 11 de junho de 2019, às 9h, na sala de reuniões do IQB/UFAL.

### COMISSÃO JULGADORA

Prof Dr. Phabyanno Rodrigues Lima  
(Orientador – PPGQB/UFAL);

Prof. Dr. Leonardo Vieira da Silva  
(Coorientador - IFAL),

Prof. Dr. Cleyton Bezerra Lopes  
(IFAL),

Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos  
(PPGQB/UFAL).

## AGRADECIMENTOS

A minha família por todo o amor e carinho, em especial a minha mãe, Maria da Consolação Ferro do Nascimento, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida, sendo minha maior inspiração nos estudos, o que me motiva a continuar sempre em frente por mas que a caminhada seja difícil. Sou grato a ela por me ensinar a valorizar a ética, respeito e simplicidade.

Ao meu irmão, Thiago Ferro, que sempre me aconselhou de forma realista, sendo muito importante em todas as escolhas que faço em minha vida. As minhas irmãs, Carolina Ferro e Karine Ferro que com muito amor tornam essa jornada mais leve e me fazem manter o foco em meus objetivos.

Ao meu orientador Phabyanno Rodrigues Lima, pelo senso de humanidade, sabedoria e bondade, que além de professor e orientador se tornou um amigo. Sou grato pela paciência e todos os ensinamentos que me proporcionou durante o mestrado, não só no quesito acadêmico, mas também fora dele.

Ao professor Leonardo Vieira, meu coorientador, por ter me aceitado como orientando e me ajudado com muita disposição no melhor entendimento na área de eletroanalítica. A Sarah Kelly que me ensinou com muita didática e atenção pontos fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos, Ygor Monteiro, Gustavo Leão, Gilmar Sarmiento e Yuri Monteiro que assim como irmãos se fizeram presentes nos momentos bons e ruins da minha vida. Que a nossa amizade que beira duas décadas seja sempre forte. Em especial ao Helder Barros pelos conselhos, irmandade e alegria que sua amizade proporciona.

A todo o grupo GPAES (Grupo de Pesquisa em Analítica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores Químicos) que abriram os braços com muito afeto desde o primeiro dia que entrei no laboratório 8. Em especial ao Fellipe Pereira, Walker Lima, Mayrane Carla, Monik Tamires e Jailson Santos, amigos que fiz no mestrado e quero levar para o resto da vida. Quero agradecer também aos amigos

Cristian Giertyas e Woodland Oliveira, pelo auxílio e motivação nesses dois anos de pesquisa.

A CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a todos que fizeram parte desse trajeto, pela ajuda e oportunidade de aprender e conviver com vocês.

*“Alague seu coração de esperanças, mas não deixe  
que ele se afogue nelas.”*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

No presente trabalho é descrito o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTPE) à base de 4-nitroanilina (4-NA) adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) para determinação de ácido ascórbico (AA). O filme MWCNT/SZ4NA foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). O processo de ativação do grupo nitro presente na 4-NA gerou *in situ* as espécies eletroativas R-NHOH/R-NO no eletrodo modificado após ciclos na faixa de potencial entre 0,5 e -1,0 vs. Ag/AgCl na primeira varredura em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 com velocidade de varredura de 0,02 V s<sup>-1</sup>. Após o processo de ativação o sensor desenvolvido apresentou atividade eletrocatalítica eficiente frente à oxidação do AA em um potencial de pico catalítico observado em 0,3 V vs. Ag/AgCl. Depois de otimizado as condições operacionais, este sensor forneceu uma faixa de resposta linear de 0,5 - 3,0 μmol L<sup>-1</sup>, com limite de detecção, quantificação e sensibilidade de 0,15 μmol L<sup>-1</sup>, 0,48 μmol L<sup>-1</sup> e 7,60 (mA L mmol<sup>-1</sup>), respectivamente. Este sensor foi aplicado para a determinação amperométrica de AA em amostras de alimentos. Os resultados foram consistentes com aqueles obtidos com o procedimento titulométrico padrão.

**Palavras-chave:** sílica gel, 4-nitroanilina, sensor amperométrico, ácido ascórbico

## ABSTRACT

The present work describes the development of a multi-walled carbon nanotube paste electrode (MWCNTPE) based on 4-nitroaniline (4-NA) adsorbed on silica gel modified with zirconium oxide (SZ) for the determination of ascorbic acid (AA). The MWCNT/SZ4NA film was characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The activation process of the nitro group present in 4-NA generated in situ the electroactive species R-NHOH/R-NO in the modified electrode after cycles in the potential range between 0.5 and -1.0 vs. Ag/AgCl in the first scan in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0 with a scanning speed of 0.02 V s<sup>-1</sup>. After the activation process the developed sensor presented efficient electrocatalytic activity front the oxidation of AA in an observed catalytic peak potential in 0.3 V vs. Ag/AgCl. After optimizing the operating conditions, this sensor provided a linear response range of 0.5 - 3.0 μmol L<sup>-1</sup>, with limit of detection, quantification and sensitivity of 0.15 μmol L<sup>-1</sup>, 0.48 μmol L<sup>-1</sup> and 7.60 (mA L mmol<sup>-1</sup>), respectively. This sensor was applied for the amperometric determination of AA in food samples. The results were consistent with those obtained with the standard titration procedure.

**Keywords:** silica gel, 4-nitroaniline, amperometric sensor, ascorbic acid

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.....	20
<b>Figura 2-</b>	Fatores associados ao desempenho de um sensor eletroquímico....	23
<b>Figura 3-</b>	Métodos de fixação dos modificadores em EQM.....	26
<b>Figura 4-</b>	Representação (a) esquemática de uma folha de grafeno (grafite) que origina um nanotubo (SWCNT) e (b) MWCNT.....	30
<b>Figura 5-</b>	Comparação entre os processos de oxidação: A) Transferência eletrônica homogênea, em solução; B) Transferência eletrônica heterogênea direta, na superfície do eletrodo; C) Transferência de elétrons mediada. (Red) e (Oxi) representam o analito em seus estados reduzido e oxidado, respectivamente. $M_R$ e $M_O$ representam o mediador nos estados reduzido e oxidado, ambos confinados na superfície do eletrodo.....	32
<b>Figura 6-</b>	Estrutura molecular da 4-nitroanilina.....	33
<b>Figura 7-</b>	Esquema da estratégia eletroquímica utilizada para formação do par redox presente na 4-nitroanilina.....	34
<b>Figura 8-</b>	Estrutura molecular da sílica gel.....	35
<b>Figura 9-</b>	Representação de óxidos metálicos ancoradas em sílica gel.....	37
<b>Figura 10-</b>	Estrutura molecular do ácido ascórbico.....	38
<b>Figura 11-</b>	Alimentos ricos em vitamina C fornecem melhor qualidade na saúde.....	39
<b>Figura 12-</b>	Artigos científicos reportados na literatura.....	40
<b>Figura 13-</b>	Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica (A). Voltamograma cíclico para um sistema reversível (B).....	44
<b>Figura 14-</b>	Forma de onda potencial vs. tempo (A) corrente em função do tempo (B).....	45
<b>Figura 15-</b>	Esquema de preparo do EPC/MWCNT/SZ4NA.....	48
<b>Figura 16-</b>	Esquema de preparo da amostra para a análise eletroquímica.....	49
<b>Figura 17-</b>	Potenciostato utilizado nas medidas eletroquímicas.....	50
<b>Figura 18-</b>	Microscópio Eletrônico de Varredura – Tescan.....	51

<b>Figura 19-</b>	Espectrômetro FTIR IRAffinity-1 – Shimadzu.....	51
<b>Figura 20-</b>	Analisador termo gravimétrico (60) – Shimadzu.....	52
<b>Figura 21-</b>	(A) Redução do grupo nitro da 4-NA (a) primeira varredura, (b) segunda varredura e (c) terceira varredura a $5 \text{ mV s}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. (B) Formação do par redox R-NO/R-NHOH a $0,02 \text{ V s}^{-1}$ em uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0. $E_{\text{inicial}} = -0,3 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl.....	53
<b>Figura 22-</b>	Esquema de redução eletroquímica da 4-NA e formação de R-NHOH.....	55
<b>Figura 23-</b>	Mecanismo de oxidação das nitroanilinas.....	56
<b>Figura 24-</b>	Mecanismo para a oxidação dos isômeros da 4-NA.....	58
<b>Figura 25-</b>	Formação das espécies eletroativas R-NO/R-NHOH a $0,02 \text{ V s}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. $E_{\text{inicial}} = -0,3 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. Voltamogramas cíclicos de eletrodo modificado com 4-NA (a) e eletrodo modificado sem 4-NA (b).....	59
<b>Figura 26-</b>	Voltamogramas cíclicos obtidos para EPC/MWCNT/SZ e EPC/MWCNT/SZ4NA em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH 7,0 a $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ . $E_{\text{inicial}} = -0,3 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. EPC/MWCNT/SZ4NA na ausência de AA (a), EPC/MWCNT/SZ na ausência (b) e presença (c) de AA. EPC/MWCNT/SZ4NA com diferentes concentrações de AA: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (d), $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (e) e $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (f).....	60
<b>Figura 27-</b>	Mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise de AA sobre a plataforma EPC/MWCNT/SZ4NA.....	61
<b>Figura 28-</b>	MEV para sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) com diferentes ampliações: (A) 48x, (B) 100x, (C) 196x e (D) 526x.....	63
<b>Figura 29-</b>	MEV para 4-NA adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ4NA) com diferentes ampliações: (A) 536x, (B) 895x, (C) 1.220x e (D) 1.500x.....	64
<b>Figura 30-</b>	MEV para eletrodo modificado (EPC/MWCNT/SZ4NA) com diferentes ampliações: (A) 192x, (B) 277x, (C) 277x e (D) 334x.....	65
<b>Figura 31-</b>	Medição termogravimétrica para sílica modificada SZ e SZ4NA.....	66

<b>Figura 32-</b>	Medição termogravimétrica para 4-NA pura.....	67
<b>Figura 33-</b>	Espectros infravermelhos de SZ e SZ4NA.....	68
<b>Figura 34-</b>	Medidas amperométricas para a eletrooxidação de AA no eletrodo modificado com 4-nitroanilina ativada, obtida em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> em pH 7,0 na concentração: (A) (1) 0,50 a (6) 3,0 mmol L <sup>-1</sup> e (B) Sensibilidade vs. Potencial.....	69
<b>Figura 35-</b>	Curva analítica para eletrodo modificado EPC/MWCNT/SZ4NA. Potencial aplicado: 0,3 V vs. Ag/AgCl em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> em pH 7,0.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Reagentes utilizados/fornecedores.....	47
<b>Tabela 2-</b>	Parâmetros analíticos para detecção de AA em vários eletrodos modificados.....	71
<b>Tabela 3-</b>	Determinação do ácido ascórbico em três amostras de suco de laranja <i>in natura</i> (n = 3) .....	73

## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

4-NA	4-nitroanilina
AA	Ácido ascórbico
AsCH <sup>-</sup>	Ascorbato
Asc <sup>2-</sup>	Ácido dehidroascórbico
Ag/AgCl	Eletrodo de referência (prata cloreto de prata)
DMSO	Dimetilsulfóxido
D	Coeficiente de difusão
E	Potencial
E <sub>pa</sub>	Potencial de pico anódico
E <sub>pc</sub>	Potencial de pico catódico
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
F	Constante de Faraday
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
I	Corrente
I <sub>pa</sub>	Corrente de pico anódico
I <sub>pc</sub>	Corrente de pico catódico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MWCNT	Multi-Walled Carbon Nanotubes – nanotubos de carbono de paredes múltiplas
n	Número de elétrons
NTC	Nanotubos de carbono
NPs	Nanopartículas
pH	Potencial hidrogeniônico
SWCNT	Single-Walled Carbon Nanotubes – nanotubos de carbono de parede simples
SZ	Sílica gel modificada com óxido de zircônio
SZ4NA	4-nitroanilina adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio

TGA Thermogravimetric analysis – Análise termogravimétrica  
VC Voltametria cíclica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>2.1 Sensores Eletroquímicos</b> .....	20
2.2.1 Sensores Amperométricos .....	21
2.2.2 Principais características de um sensor eletroquímico .....	22
2.2.3 Eletrodo Quimicamente Modificado (EQM) .....	24
<b>2.3 Eletrodo de pasta de carbono</b> .....	27
<b>2.4 Nanotubos de carbono</b> .....	29
<b>2.5 Mediadores redox</b> .....	30
2.5.1 4-Nitroanilina .....	33
<b>2.6 Sílica gel</b> .....	34
2.6.1 Sílica gel modificada .....	36
<b>2.7 Ácido Ascórbico</b> .....	38
<b>2.8 Técnicas eletroquímicas</b> .....	43
2.8.1 Voltametria Cíclica .....	43
2.8.2 Cronoamperometria .....	44
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	46
<b>3.1 Geral</b> .....	46
<b>3.2 Específicos</b> .....	46
<b>4. EXPERIMENTAL</b> .....	47
<b>4.1 Reagentes e soluções</b> .....	47
<b>4.2 Construção do sensor</b> .....	48
<b>4.3 Preparação da amostra</b> .....	49
<b>4.4 Equipamentos</b> .....	50

<b>4.4.1 Medidas Eletroquímicas .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4.2 Microscopia Eletronica de Varredura .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4.3 Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR) .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4.4 Análise Térmica Gravimétrica.....</b>	<b>52</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Ativação de 4-nitroanilina em eletrodo modificado MWCNT/SZ4NA e oxidação eletrocatalítica de AA.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com e sem 4-NA, na presença e ausência de AA.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4 Caracterização Termogravimétrica .....</b>	<b>65</b>
<b>5.5 Caracterização por FTIR.....</b>	<b>67</b>
<b>5.6 Medições cronoamperométricas .....</b>	<b>69</b>
<b>5.7 Aplicação em amostras reais.....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A descoberta do ácido ascórbico (AA) foi feita em 1928 e o número de suas funções biológicas conhecidas está em contínua expansão. O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, apresenta propriedades antiescorbútica devido a sua ação na síntese de colágeno em tecidos conjuntivos (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012). O AA desempenha papel importante em muitos processos biológicos, sendo um componente chave no metabolismo humano, atuando como agente redutor e interagindo com espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), auxiliando desta forma na manutenção dos vasos sanguíneos (ERGÜN *et al.*, 2016; ROTKO *et al.*, 2014).

Além disso, o AA é o principal antioxidante nas plantas e sustenta muitas respostas ao estresse abiótico, ou seja, aqueles induzidos pelo ambiente. Abordagens biotecnológicas para aumentar o teor de vitamina C em alimentos *in natura* tem sido desenvolvido para melhorar a saúde humana e a tolerância ao estresse abiótico das culturas. A dose diária recomendada de AA para os seres humanos é de 1 mg/kg/dia sendo que a grande maioria das pessoas não fazem a ingestão adequada, o que pode ocasionar na deficiência desse importante nutriente em nossos organismos. Portanto, o aumento dos níveis de AA em plantas cultivadas também deve fornecer uma maneira de melhorar a nutrição humana (MACKNIGHT *et al.*, 2017; TROESCH *et al.*, 2012).

Visto à importância biológica do AA, sua detecção e quantificação em amostras alimentares é imprescindível. Nos últimos anos, diversos métodos foram desenvolvidos para sua determinação (MAZUREK; JAMROZ, 2015; KUKOC; BIOCIC; RADIC, 2012; EIFF; MONAKHOVA; DIEHL, 2015), entre eles, os métodos eletroquímicos em análise são vantajosos para seu monitoramento, devido a várias características, como alta sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, robustez, facilidade de operação, tempos de resposta rápidos, possibilidade de miniaturização e estabilidade, permitindo análises em matrizes biológicas e ambientais diferentes e complexos (CIUCU, 2014; PISOSCHI *et al.*, 2014).

O desenvolvimento e a aplicação de sensores eletroquímicos têm levado a utilização de diferentes materiais de eletrodos, como a fibra de carbono (LIU *et al.*, 2016), carbono vítreo (ZHANG *et al.*, 2017), diamante dopado com boro (RIBEIRO *et al.*, 2018) e a pasta de carbono (SIARA *et al.*, 2015; TASHKHOURIAN; NAMI-ANA 2015). Dentre esses sensores, os eletrodos de pasta de carbono (EPC) dispõe de grandes vantagens, como a facilidade de construção a partir de materiais de relativo baixo custo, fácil renovação da superfície, baixa corrente de fundo e compatibilidade com diversos tipos de modificadores, que têm sido amplamente utilizados como matrizes adequadas para construção de novos eletrodos modificados (NASRI; SHAMS, 2009).

A incorporação de materiais eletroativos em um eletrodo de pasta de carbono é vantajosamente aplicada no campo eletroanalítico. A eficiência da eletroanálise pode ser aumentada com a inserção de mediadores que constituem um sistema redox reversível, gerados eletroquimicamente na superfície do eletrodo. Os mediadores redox gerados são capazes de sofrer reações químicas subsequentes, envolvendo-se em uma transferência de elétrons reversível ( $E_r$ ) iniciada no eletrodo e seguida por uma reação química (C), permitindo assim um mecanismo catalítico eletroquímico ( $E_rC_{cat}$ ) (SILVA *et al.*, 2018; BARSAN; GHICA; BRETT, 2015).

Entre estes mediadores destacam-se compostos nitro aromáticos. A 4-nitroanilina (4-NA) é um membro particularmente proeminente da família das nitroanilinas isoméricas e é um composto nitro aromático usado como mediador devido aos efeitos específicos de um grupo nitro que retira elétrons e um grupo amino doador de elétrons estando na posição *para* de um anel aromático, tornando esta molécula interessante para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos devido a possibilidade de gerar espécies eletroativas (JBARAH; RUDOLF, 2006).

Espécies eletroativas imobilizadas sobre óxidos metálicos em superfície de sílica gel e incorporadas em eletrodos de pasta de carbono, tem sido utilizada como sensor químico (SANTHIAGO *et al.* 2009; SILVA *et al.* 2013). A sílica gel é aplicada como um suporte inerte devido sua versatilidade, como rigidez, porosidade, tamanho de partícula, alta área superficial específica e estabilidade química fazem desse material um atrativo para a imobilização de mediadores e ligantes adequados

(KOOSHKI; SHAMS, 2007). Para melhorar a transferência de elétrons interfaciais, é necessária a modificação dos eletrodos com eletrocatalisadores adequados. Neste caso, os nanotubos de carbono (NTC) são um bom exemplo.

As propriedades que fazem do NTC um dos melhores nanomateriais e um dos mais utilizados são a diminuição da resistência de transferência de carga (SANTHIAGO *et al.* 2009), alta condutividade elétrica, grande área de superfície, estabilidade mecânica e química (SAJID *et al.* 2016) e possibilidade de funcionalização com ácidos carboxílicos (XIA *et al.* 2009). A presença de metais e grupos ácido carboxílico no NTC facilita a conexão com mediadores através de uma ligação química (ZAVAR *et al.* 2012; OZTEKIN *et al.* 2010).

Neste sentido, é descrito no presente trabalho o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, carbon paste electrode with multi-walled carbon nanotubes, MWCNTPE) à base de 4-nitroanilina (4-NA) adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) para determinação de ácido ascórbico (AA).

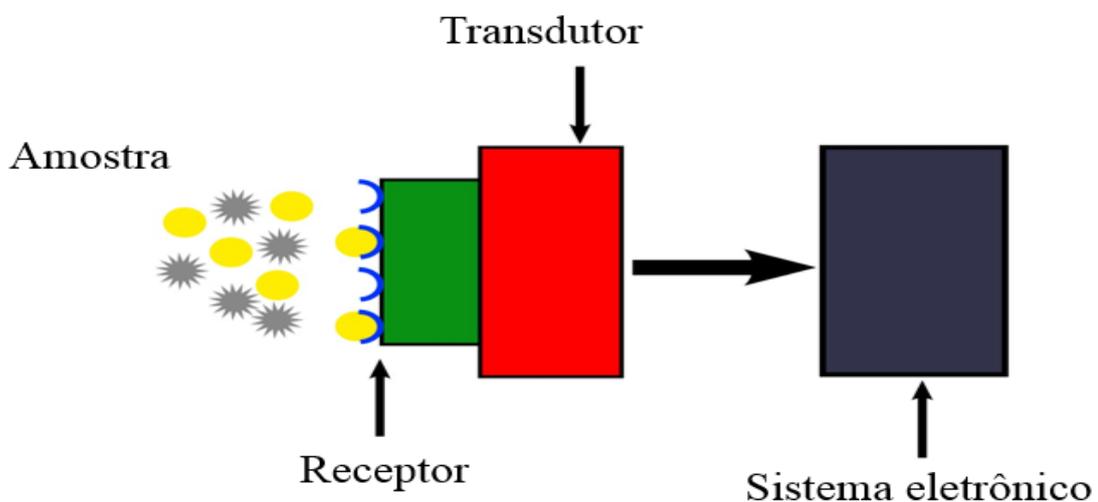
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Sensores Eletroquímicos

A eletroquímica está centralizada na transferência de elétrons, particularmente, nos processos relacionados à interface eletrodo/solução e desempenha papéis relevantes em várias áreas, sejam elas fundamentais e/ou aplicadas. Com isso, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos vem aumentando, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, o qual tem levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como precisão, rapidez na resposta, alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (WONG, 2010; CIOBANU *et al.*, 2007).

Os sensores químicos (Figura 1) são constituídos por um elemento de reconhecimento (receptor) que ao se ligar a um analito gera um sinal químico ou físico e um transdutor (eletrodo), que traduz esse sinal em um sinal de saída quantificável. Se essas alterações forem expressas na forma de dados eletroquímicos, como potencial, corrente, resistência ou condutividade, então temos um sensor eletroquímico (YANG *et al.*, 2018).

**Figura 1 - Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.**



Fonte: TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005 (Adaptado).

A utilização de métodos eletroquímicas no estudo de sensores eletroquímicos fundamenta-se como uma poderosa ferramenta, principalmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade. A versatilidade das técnicas eletroquímicas também merece destaque visto que é possível controlar as reações eletródicas modificando a interface eletrodo-solução e selecionando-se criteriosamente o potencial aplicado à célula eletroquímica (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Sensores eletroquímicos são essencialmente células eletroquímicas que usam um sistema de dois ou três eletrodos, e a medição pode ser realizada em um estado estacionário ou sob uma condição transitória. De acordo com os parâmetros de detecção, os sensores eletroquímicos empregam diferentes técnicas eletroanalíticas; as propriedades medidas comuns são a corrente, pois o potencial é variado (voltametria), a corrente a uma voltagem fixa (amperometria), a voltagem em corrente zero (potenciometria), condutividade e mudanças de capacitância ou impedância (AHMAD *et al.*, 2018).

### 2.2.1 Sensores amperométricos

Os sensores amperométricos continuam sendo os mais populares em grande parte das técnicas de detecção/quantificação devido à sua simplicidade, facilidade de produção e ao baixo custo dos dispositivos e instrumentação. Em particular, áreas importantes nas quais os sensores amperométricos são vantajosamente aplicados são autenticação ou processamento de alimentos, monitoramento ambiental, controle de qualidade em várias produções, saúde humana e um grande número de setores industriais e naturais nos quais a detecção traz valor agregado em relação às análises laboratoriais (SEEBER *et al.*, 2015).

Os sensores amperométricos são baseados na detecção de espécies eletroativas envolvidas no processo de reconhecimento químico ou biológico. Na detecção amperométrica, o sinal de corrente é gerado em função da redução ou oxidação de um produto eletroativo na superfície de um eletrodo de trabalho (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006). O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência serve como força motriz para a reação de transferência de

elétrons das espécies eletroativas. Como certas moléculas são oxidadas ou reduzidas (reações redox) no eletrodo de trabalho (por exemplo, Pt, Au, pasta de carbono, entre outros), os elétrons são transferidos do analito para o eletrodo de trabalho ou do eletrodo de trabalho para o analito (CIUCU, 2014).

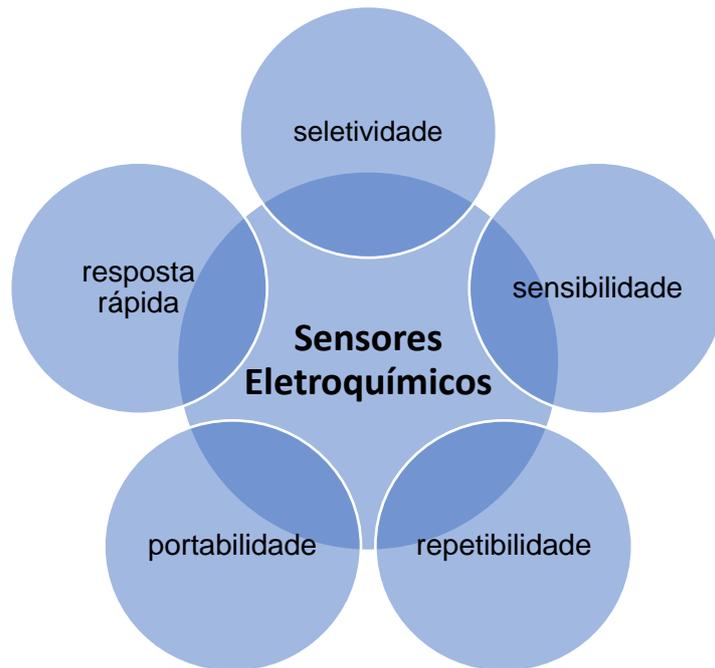
A direção do fluxo de elétrons depende das propriedades do analito, que podem ser controladas pelo potencial elétrico aplicado ao eletrodo de trabalho. Se o eletrodo de trabalho for levado a um potencial positivo, ocorre uma reação de oxidação, e o fluxo de corrente depende da concentração das espécies eletroativas (analito) difundidas na superfície do eletrodo de trabalho. Da mesma forma, se o eletrodo de trabalho for levado a um potencial negativo, ocorrerá uma reação de redução. A corrente resultante é uma medida direta da taxa da reação de transferência de elétrons. É, portanto, refletida a taxa de reconhecimento do evento que é proporcional à concentração do analito alvo (PERUMAL; HASHIM, 2014).

Sensores amperométricos utilizam também mediadores de reação química, ou seja, moléculas que são capazes de transferir elétrons. Eles podem participar da reação redox com o analito alvo e ajudar na transferência de elétrons mais rápida. Como resultado, é possível trabalhar com baixos potenciais, diminuindo a influência de diferentes interferentes na resposta do sensor (CIUCU, 2014).

### 2.2.2 Principais características de um sensor eletroquímico

Os sensores eletroquímicos possuem características que os tornam ferramentas diferenciadas na aplicação de amostras complexas para determinação de analitos biologicamente importantes (Figura 2).

**Figura 2 - Fatores associados ao desempenho de um sensor eletroquímico.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

A sensibilidade para um determinado analito é definida como a inclinação da curva de calibração analítica e um método analítico é sensível quando uma pequena alteração na concentração do analito causa uma grande mudança na resposta. A seletividade é definida como a razão entre os declives das linhas de calibração do analito de interesse a uma interferência específica. Um método é seletivo quando a resposta do analito pode ser diferenciada de todas as outras respostas. Neste caso, o método é completamente capaz de quantificar com precisão um analito na presença de interferências, e somente o analito de interesse contribuirá para o sinal medido (JUSTINO *et al.*, 2010).

A repetibilidade e reprodutibilidade referem-se à proximidade da concordância entre os resultados de medições sucessivas da mesma medida e realizadas nas mesmas condições (repetibilidade) ou diferentes (reprodutibilidade) relacionadas a operadores, aparelhos, laboratórios e/ou intervalos de tempo de análise (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Dado que, o potencial dos sensores amperométricos é mantido constante durante a medição da corrente, destaca-se a importância da avaliação da seletividade

das determinações uma vez que, via de regra, em amostras complexas podem existir espécies químicas que também são eletroativas no potencial selecionado. A rota bem-sucedida para superar os problemas de seletividade é modificar a superfície do eletrodo, por exemplo, através de nanopartículas (NPs) e/ou nanotubos (NTs), incorporação de enzimas no sistema de transdução, entre outros (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

A modificação pode diminuir o excesso de potencial dos processos eletródicos, geralmente presente em eletrodos convencionais, requerido para oxidar ou reduzir espécie de interesse, evitar incrustação do eletrodo e melhorar a velocidade de transferência de elétrons. Ganhos no aumento da sensibilidade e seletividade dos sensores sempre foram de interesse primordiais, sendo os eletrodos quimicamente modificados (EQM) conhecidos como uma excelente estratégia de melhoria para validação dos métodos eletroanalíticos. (CHAKRABORTY; RAJ, 2007).

### 2.2.3 Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)

As superfícies dos eletrodos são modificadas na tentativa de tornar possível uma função eletroquímica impraticável ou difícil de se realizar usando eletrodos convencionais (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007). Os pioneiros dessa engenharia são Lane, Hubbard, Murray e Miller. Há mais de quatro décadas, uma extensa pesquisa foi dedicada ao projeto de diversas formas de materiais de eletrodo, envolvendo um importante desenvolvimento nesta área. Assim, o uso desses eletrodos quimicamente modificados como ferramentas para síntese, análise, eletrocatalise e detecção de biomoléculas mostrou-se atrativo e muito interessante (OURARI *et al.*, 2015).

Em particular, um eletrodo quimicamente modificado é um material condutor ou semicondutor, revestido com um filme monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico, que modifica as propriedades eletroquímicas da interface. Os substratos condutores e semicondutores são derivados de materiais de eletrodos convencionais e podem ser fabricados comercialmente ou no próprio laboratório, alguns materiais são mais convenientes para modificação, como Au, Pt, Ag, eletrodo de carbono e nanofibras de carbono, enquanto que os modificadores são amplamente

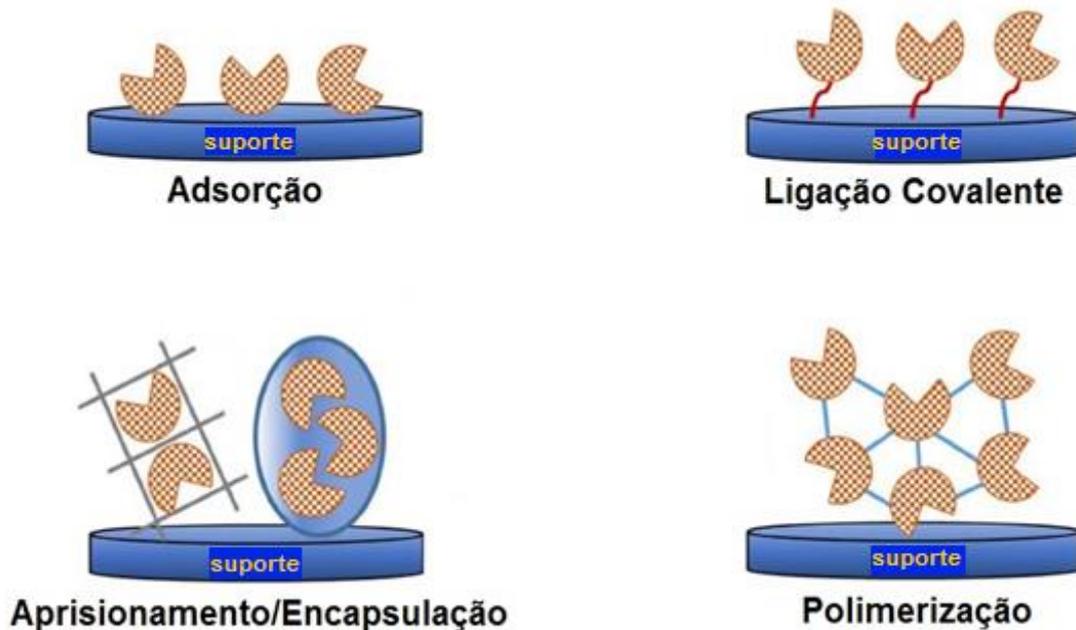
diversificados em suas origens e propriedades. (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007).

A modificação da superfície do eletrodo melhora o desempenho de um eletrodo como um dispositivo, sensor, de várias formas (SHARMA *et al.*, 2018):

- A modificação química limita o acesso à interferência e fornece melhor seletividade para a molécula alvo, como resultado de interações específicas do material de modificação com a molécula alvo.
- O material de modificação atua como um mediador rápido na transferência de elétrons entre a molécula alvo e o eletrodo que induz a rápida oxidação ou redução do alvo. Isso resulta em um deslocamento para menores potenciais que acarreta na diminuição de energia, que por sua vez, permite um melhor pico de separação entre diferentes analitos.
- Melhor sensibilidade é observada com os materiais de revestimento tendo grande área superficial devido a atividades eletrocatalíticas melhoradas.
- Leva a rápida difusão e pré-concentração da molécula alvo na superfície do eletrodo.
- Reduz o efeito de incrustação.

Outro ponto importante nos EQM refere-se ao método de fixação dos modificadores na superfície do eletrodo (Figura 3).

**Figura 3 - Métodos de fixação dos modificadores em EQM.**



Fonte: NGUYEN; KIM, 2017 (Adaptado).

Além dos substratos terem que apresentar características eletroquímicas apropriadas, devem ser adequados para o método de imobilização a ser utilizado, dentre eles, podemos citar:

### **Adsorção**

Adsorção, ou mais apropriadamente quimisorção, foi o processo pioneiro e é a maneira mais simples de fixar um modificador ao substrato do eletrodo base. Consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo à esta solução (SOUZA, 1997).

### **Aprisionamento/Encapsulação**

É um método de mistura de componentes, portanto outra forma de preparar um EQM é simplesmente adicionar um mediador de transferência de elétrons, misturado com compostos carbonáceos (grafeno, nanotubos de carbono) e/ou sílica a outros modificadores, sendo uma técnica adequada para eletrodo de pasta de carbono (CAPELETTI *et al.*, 2019).

### **Ligação Covalente**

O modificador também pode ser ligado covalentemente ao substrato do eletrodo através de uma ligação covalente entre camadas monomoleculares do modificador e a superfície do eletrodo. São empregadas por exemplo reações de silanização, envolvendo organosilanos e óxidos presentes à superfície do eletrodo, o silano atuará como um tipo de ponte para fixar um grupo funcional específico à superfície do eletrodo (SOUZA, 1997).

### **Polimerização/Filmes Poliméricos**

Outra técnica bastante atrativa para a preparação de eletrodos modificados é o recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos, que devem ser condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Ao contrário da modificação por adsorção ou por formação de ligação covalente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A fabricação de eletrodos de superfície modificada é uma abordagem avançada que proporciona descobertas de novos materiais condutores em eletrodos práticos e mais adequados para o reconhecimento químico ou biológico, assim, o desenvolvimento ou escolha de um eletrodo adequado é um estágio importante nos processos de pesquisa eletroanalítica (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

O eletrodo de pasta de carbono (EPC) faz parte das classes dos eletrodos modificados por incorporação de substâncias que promovam a melhoria de sensibilidade e/ou seletividade e apresentam algumas vantagens como, superfície porosa, facilidade e velocidade na preparação e obtenção de uma superfície renovável, baixa corrente de fundo e baixo custo. Os eletrodos de pasta de carbono são matrizes condutoras convenientes para a preparação de eletrodos quimicamente modificados (NASRI; SHAMS, 2009).

### **2.3 Eletrodo de Pasta de Carbono**

O eletrodo está em contato íntimo com elementos de reconhecimento ou espécies mediadoras de sinal. Biocompatibilidade e capacidade de incorporar

espécies químicas sem a sua perda em meio operacional são de extrema importância. Boa condutividade elétrica e sensibilidade as espécies de interesse, juntamente com a inércia química e física em relação a solução de contato são as condições básicas. O uso de materiais de grafite, que apresentam vantagens intrínsecas em solução aquosa, por exemplo, alta condutividade, relativa inertização e ampla faixa de tensão, deu origem ao desenvolvimento do eletrodo de pasta de carbono (EPC) por Ralph Norman Adams em 1958 (MILLA *et al.*, 2013).

Ralph N. Adams durante uma investigação das propriedades de um eletrodo de carbono, desenvolveu um eletrodo de pasta que possuía vantagens exclusivas na polarografia anódica. A pasta era preparada misturando-se o carbono e um líquido orgânico até a massa aparentar um aspecto uniformemente molhado e o eletrodo propriamente dito foi desenvolvido a partir de uma haste curta de Teflon com uma cavidade de cerca de 0,5 cm de diâmetro e 3 mm de profundidade com um fio de platina que passava através da haste até o fundo da cavidade para contato elétrico (ADAMS, 1958).

O EPC foi uma alternativa introduzida por Adams com o objetivo de atingir potenciais mais positivos do que os eletrodos de mercúrio, que não conseguiam alcançar tais potenciais devido à sua oxidação. Desde então, os EPC e sensores baseados nele, tem despertado considerável interesse, devido ao baixo custo, superfície renovável e a fácil modificação ou dopagem, que estão relacionadas ao procedimento inovador de fabricação (FERREIRA *et al.*, 2011).

O eletrodo de pasta de carbono é basicamente uma mistura de pó de grafite com um aglutinante não condutor e eventualmente um modificador. Os EPC podem ser configurado a partir de várias formas de carbono, particularmente, grafite, nanotubos de carbono de paredes única ou múltiplas, grafeno e fulereno (MILLA *et al.*, 2013). A pasta de carbono apresenta uma matriz adequada para incorporação de modificadores orgânicos, metálicos ou inorgânicos utilizados para uma enorme gama de aplicações. A composição da pasta afeta grandemente a reatividade do eletrodo, uma vez que o aumento do aglutinante provoca uma diminuição na taxa de transferência de elétrons (VYTRAS; SVANCARA; METELKA, 2009).

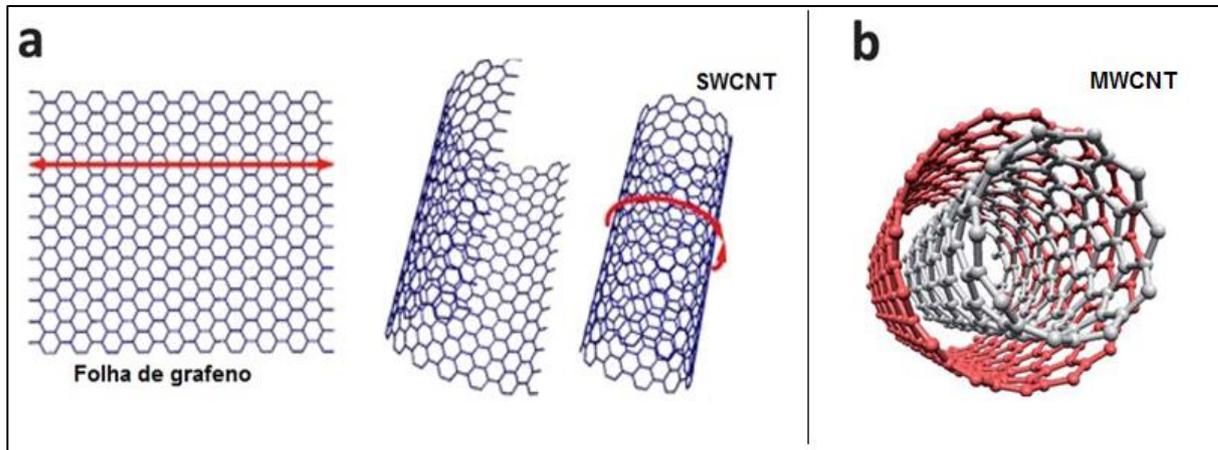
Os aglutinantes mais usados são Nujol (óleo mineral), óleo de rícino (vegetal), óleo de parafina, querosene e graxa de silicone. A função do aglutinante é fixar a pasta ao eletrodo e preencher os espaços vazios entre as partículas de carbono. Requisitos básicos para um aglutinante: ser insolúvel na solução sob medição, ter baixa pressão de vapor para garantir estabilidade mecânica e longa vida útil, e no caso de aplicações voltamétricas e amperométricas, deve possuir inatividade eletroquímica na faixa de potencial de interesse (VYTRAS; SVANCARA; METELKA, 2009).

As principais desvantagens dos eletrodos de pasta de carbono são: a tendência do aglutinante em se dissolver em solução contendo solvente orgânico, rápido envelhecimento dos dispositivos e a reprodutibilidade limita sua utilidade em algumas aplicações eletroanalíticas, especialmente quando uma longa vida útil é necessária. Desta forma, desde o surgimento dos EPC, numerosos materiais são utilizados em sua produção na tentativa de tornar esses eletrodos em plataformas de maior reprodutibilidade e estabilidade. Dentre as várias formas de carbono supracitadas, destaca-se os nanotubos de carbono como materiais nanoestruturados na modificação de eletrodos (MILLA *et al.* 2013).

## **2.4 Nanotubos de carbono**

Os nanotubos de carbono (NTC) são nanoestruturas cilíndricas com diâmetros da ordem de poucos nanômetros e comprimentos da ordem de micrometros. Os NTCs são parte da família de carbono com ligações covalentes e hibridização  $sp^2$ , podem ser classificados em duas principais categorias: nanotubos de parede única ou simples (SWCNT, do inglês single-wall nanotubes), que são construídos por apenas uma camada cilíndrica de grafite, e nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês multi-walls nanotubes), que são constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite (Figura 4) (ZHANG; LIEBER, 2016).

**Figura 4 - Representação (a) esquemática de uma folha de grafeno (grafite) que origina um nanotubo (SWCNT) e (b) MWCNT.**



Fonte: ANNU *et al.*, 2017 (Adaptado).

Os NTCs em eletrodos modificados têm sido amplamente utilizados para a detecção de várias biomoléculas devido às suas propriedades únicas, incluindo grande área superficial ativa, alta condutividade elétrica, cinética de transferência de elétrons rápida, alta resistência mecânica, excelente adsorção e biocompatibilidade. Algumas dessas propriedades levam à redução do excesso de potencial, à incrustação mínima do eletrodo e ao aumento da sensibilidade e seletividade (YANG *et al.* 2016).

Desde a primeira aplicação dos NTCs em eletroquímica por Britto *et al.*, (1996), numerosos grupos de pesquisa trabalharam com a construção de sensores eletroquímicos com NTCs. Os NTCs possibilitam a imobilização de mediadores orgânicos, inorgânicos, biológicos e também por processos de polimerização em eletrodos modificados. O uso dos mediadores redox e NTC em uma matriz pode gerar sinergia em termos de melhorar o desempenho do sensor e também oferecem formas mais eficientes de comunicação entre os eletrodos dos sensores e os sítios redox ativos de moléculas biológicas (DUMITRESCU; UNWIN; MACPHERSON, 2009).

## 2.5 Mediadores redox

A função de um mediador redox é intermediar a transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie de interesse, onde a reação eletroquímica ocorre sem que ele

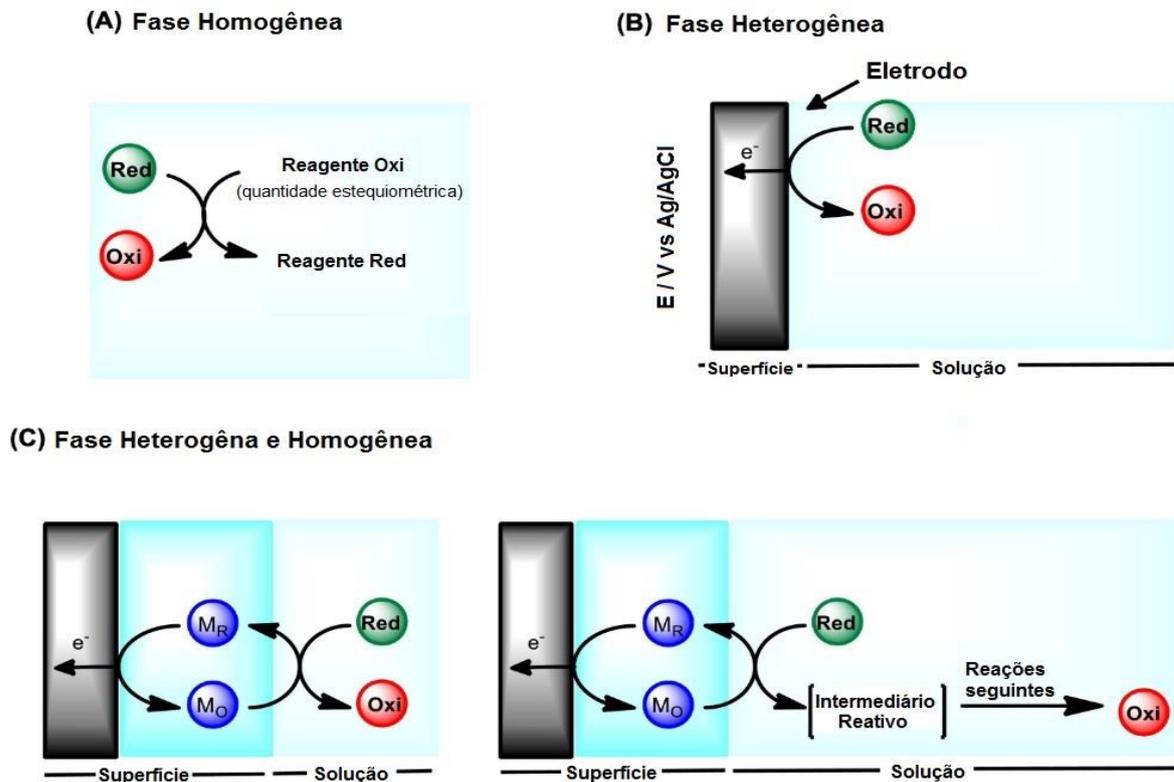
próprio participe da reação. Este tipo de troca indireta de elétrons entre o substrato e o eletrodo é referida como transferência eletrônica mediada (MASA; SCHUHMANN, 2016).

As reações orgânicas de transferência de elétrons são frequentemente acompanhadas por grandes energias de ativação (excesso de potencial). O uso de mediadores redox ligados à superfície eletródicas é uma das abordagens usadas para diminuir esse potencial, sendo energeticamente vantajoso. Mediadores redox, idealmente, envolvem-se em uma transferência de elétrons reversível ( $E_r$ ) iniciada no eletrodo e seguida por uma reação química (C), permitindo assim um mecanismo catalítico eletroquímico ( $E_rC_{cat}$ ) (Figura 5) (SILVA *et al.*, 2018).

Como em qualquer processo catalítico o objetivo da eletrocatalise é reduzir a energia de ativação da reação, no caso uma reação envolvendo transferência de elétrons. Conversões eletroquímicas indireta são híbridos entre processos redox homogêneos (Figura 5A), a reação ocorre por transferência de elétrons com ambos os reagentes na solução e conversões eletroquímicas heterogêneas diretas (Figura 5B) em que o analito na forma reduzida entra em contato com o eletrodo por difusão e sofre oxidação na interface eletrodo-solução (MASA; SCHUHMANN, 2016)

A transferência heterogênea de elétrons entre o sensor e o analito, em eletroquímica direta, é substituída por uma reação redox, que ocorre entre uma espécie ativada eletroquimicamente (mediador) na superfície do eletrodo e o analito. As condições são escolhidas de modo que somente o mediador sofra oxidação ou redução no eletrodo, já o analito, as espécies intermediárias e os produtos formados não podem interferir na regeneração eletroquímica do catalisador (Figura 5C) (SILVA *et al.*, 2018).

Figura 5 - Comparação entre os processos de oxidação: A) Transferência eletrônica homogênea, em solução; B) Transferência eletrônica heterogênea direta, na superfície do eletrodo; C) Transferência de elétrons mediada. (Red) e (Oxi) representam o analito em seus estados reduzido e oxidado, respectivamente.  $M_R$  e  $M_O$  representam o mediador nos estados reduzido e oxidado, ambos confinados na superfície do eletrodo.



Fonte: SILVA *et al.*, 2018 (Adaptado).

As características mais importantes, que são essenciais para a função de mediadores redox são **(i)** uma taxa de transferência de elétrons rápida, tanto com o substrato de interesse quanto a superfície do eletrodo, **(ii)** um potencial redox baixo, a fim de evitar co-oxidação ou co-redução de compostos interferentes, **(iii)** estabilidade química suficiente da forma oxidada e reduzida, e **(iv)** uma baixa energia de reorganização para permitir a rápida transferência de elétrons mesmo sobre distâncias significativas de transferência de elétrons (RATHEE *et al.*, 2016).

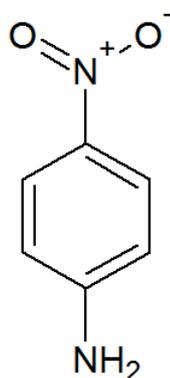
As características mencionadas já foram exploradas empregando vários tipos de mediadores redox, destinados para determinação de AA (KILMARTIN; MARTINEZ; BARTLETT, 2008; THIAGARAJAN; TSAI; CHEN, 2009; LIN; YEH; CHEN, 2012.) Nessa perspectiva, espécies aromáticas que apresentam o grupo funcional nitro

(R-NO<sub>2</sub>), como a 4-nitroanilina, têm se destacado na literatura como mediador redox (OZTEKIN *et al.*, 2010). O uso de diferentes compostos contendo o grupo nitro para o desenvolvimento de novos dispositivos tem sido amplamente empregados para detecção de diferentes substâncias, principalmente os compostos de interesse biológico (LOPES *et al.*, 2015).

### 2.5.1 4-Nitroanilina

A 4-nitroanilina, como um membro particularmente proeminente da família das nitroanilinas isoméricas, tem atraído a atenção devido aos efeitos específicos de um grupo nitro que retira elétrons e um grupo amino doador de elétrons, estando na posição *para* de um sistema de anéis aromáticos (Figura 6). Isso resulta em transições eletrônicas de baixa energia baseadas na migração de carga dentro da molécula, tornando este composto um interessante mediador redox para sensores eletroquímicos (JBARAH; RUDOLF, 2006).

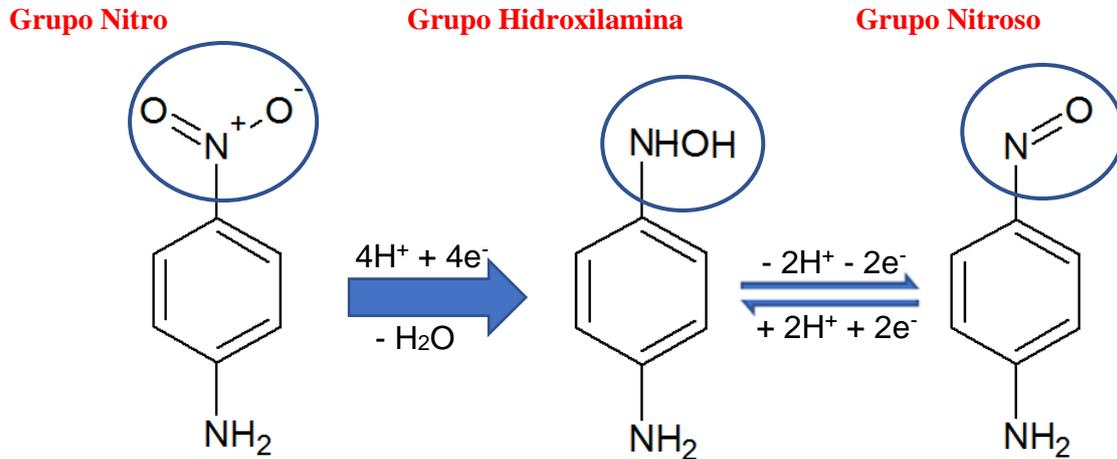
**Figura 6 - Estrutura molecular da 4-nitroanilina.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

Entretanto, os nitrocompostos quando imobilizado na superfície do eletrodo, em seu estado oxidado não têm atividade electrocatalítica para várias moléculas, mas o grupo nitro (R-NO<sub>2</sub>) presente na molécula pode ser irreversivelmente reduzido à hidroxilamina (R-NO<sub>2</sub> → R-NHOH), fornecendo um par eletroativo e reversível R-NO/R-NHOH (Figura 7) (SANTHIAGO *et al.* 2009).

Figura 7 - Esquema da estratégia eletroquímica utilizada para formação do par redox presente na 4-nitroanilina.



Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

A hidroxilamina formada (R-NHOH) pode ser oxidada reversivelmente através de um processo de  $2H^+/2e^-$  sobre a superfície eletródica, gerando, portanto, o correspondente grupo nitroso ( $R-NHOH \Rightarrow R-NO + 2e^- + 2H^+$ ). O par redox formado apresenta uma alta atividade catalítica na eletrooxidação de espécies biológicas a baixos potenciais, assim sendo, os compostos nitro constituem uma família de mediadores redox eficientes para aplicações em sensores eletroquímicos (LIMA *et al.*, 2009).

Espécies eletroativas imobilizadas sobre óxido de metal em superfície de sílica gel e incorporadas em eletrodos de pasta de carbono, tem sido utilizada como sensor químico devido a facilidade de construção, baixo custo, baixa corrente de fundo, principalmente nos aspectos de melhorar a incorporação dessas espécies nos EPC, com ganhos significativos na estabilidade e reprodutibilidade do sensor (PANICE *et al.*, 2014).

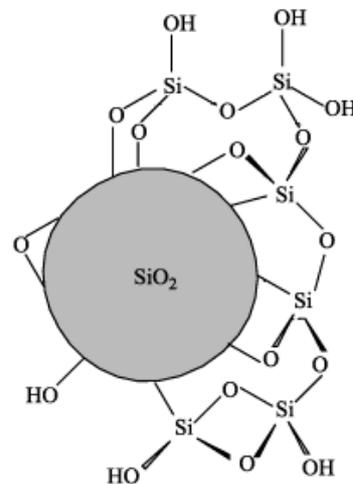
## 2.6 Sílica gel

A principal desvantagem dos EPC é que os modificadores nesses sensores estão em associação frouxa ou apenas contato físico com o eletrodo. Assim, o sensor pode degradar-se facilmente ao longo do tempo a partir da perda do modificador,

especialmente para modificadores que têm um alto grau de solubilidade. Se os modificadores forem imobilizados primeiro através de ligação covalente em substratos (isto é, suportes de sílica de alta área superficial) antes de serem incorporados na matriz de grafite de carbono, a funcionalidade química do sensor é retida apesar da difusão, desgaste abrasivo ou grau de solubilidade dos modificadores (SHAMS *et al.*, 2009).

A sílica compreende uma grande classe de produtos com fórmula geral  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , sendo amplamente utilizadas nas indústrias como cargas minerais, catalisadores, adsorventes, suportes cromatográficos, dentre outros (GHOSH *et al.*, 2008). A sílica pode ser considerada como um polímero do ácido silícico, constituída por tetraedros de  $\text{SiO}_4$  interligados entre si, sendo constituída por grupos siloxanos ( $\text{Si-O-Si}$ ) e diversas formas de grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ) (PENG *et al.*, 2009) como representados na figura 8.

**Figura 8 - Estrutura molecular da sílica gel.**



Fonte: PRADO; FARIA; PADILHA, 2005 (Adaptado).

Do ponto de vista químico, os silanóis se comportam como ácidos fracos de Brønsted-Lowry, sendo os principais responsáveis pelas reações que a superfície da sílica pode apresentar. Os silanóis atuam como centros de adsorção molecular e interagem fortemente com adsorbatos capazes de formar ligações de hidrogênio. Os grupos silanóis conferem à sílica suas propriedades polares, sendo considerados sítios de adsorção eficientes (GUSHIKEM; ROSATTO, 2001).

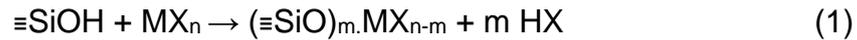
A sílica gel é um material abundante e barato com propriedades atrativas, incluindo: alta capacidade de adsorção, propriedades ácido/base, insolubilidade na maioria dos solventes e estabilidade térmica. Além disso, a sílica pode ser acrescida com uma variedade de grupos funcionais, levando a um considerável enriquecimento das suas propriedades de superfície. A alta área superficial de sílicas sintéticas, torna-as valiosas como suportes para vários catalisadores (NASRI; SHAMS, 2009).

### 2.6.1 Sílica gel modificada

Sílica modificada refere-se a todos os processos que levam a mudanças na composição química da sua superfície. A modificação pode ser tanto por tratamentos físicos (térmicos), que leva a alterações nas proporções silanol/siloxanos na superfície da sílica, quanto por tratamentos químicos, que levam a mudanças das características químicas da superfície da sílica. Após essas modificações as propriedades de adsorção das sílicas são significativamente afetadas (JAL; PATEL; MISHRA, 2004).

A superfície da sílica gel pode ser modificada por dois processos distintos: organofuncionalização, onde o agente modificador é um grupo orgânico, e inorganofuncionalização, em que o grupo ancorado na superfície pode ser um composto organometálico ou um óxido metálico (JAL; PATEL; MISHRA, 2004). A imobilização de moléculas com propriedades específicas na superfície da sílica promove sua estabilidade química, diminuindo ou mesmo impedindo que ela se solubilize em meio aquoso. Alguns estudos têm mostrado que sílicas com moléculas quimicamente imobilizadas apresentam alta eficiência e boas seletividades para aplicações específicas (JAL *et al.*, 2001).

Nos óxidos metálicos  $M_xO_y$  altamente dispersos como camadas sobre a superfície porosa de  $SiO_2$  (denominados como  $SiO_2/M_xO_y$ ) constituem uma classe de materiais que proporcionam suportes com elevada estabilidade química e térmica. Embora o  $SiO_2$  tenha sido considerado como um material relativamente inerte, grupos de silanol de superfície ou grupos de siloxano diluídos, podem reagir de acordo com as seguintes equações:



onde  $\text{MX}_n$  é um composto de metal ativo,  $\equiv\text{SiOH}$  e  $(\equiv\text{Si})_2\text{O}$  representam o grupo silanol e siloxano, respectivamente.

O caráter anfotérico de muitos dos óxidos ancorados na sílica gel, permite a imobilização de várias espécies químicas, ácidos ou bases, resultando em uma ampla aplicação destes materiais com superfícies modificadas. Muitas aplicações dos óxidos metálicos ancorados à superfície da sílica são descritas na literatura, tais como adsorventes seletivos, em processos de pré-concentração, como materiais de recheio para uso em HPLC, suporte para imobilização de enzimas, eletrodos amperométricos, sensores e biossensores (GUSHIKEM; ROSATTO, 2001).

Os óxidos metálicos como Ti (IV), Zr (IV) e Nb (V) são os mais utilizados na matriz de sílica devido à alta acidez e forte interação eletrostática que apresentam com o material de superfície (Figura 9). Dessa forma, sílica modificada com óxidos metálicos é considerada uma matriz de alta troca iônica e que promove uma melhor atividade eletroquímica dos mediadores (PEREIRA *et al.*, 2011).

**Figura 9 – Representação de óxidos metálicos ancoradas em sílica gel.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2019.

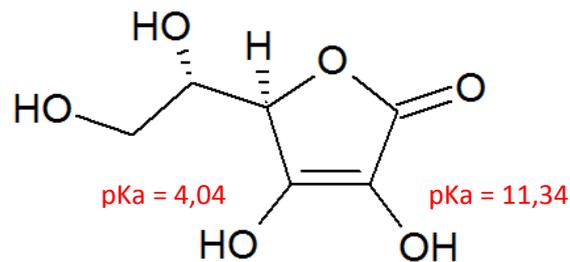
Como visto até aqui o presente trabalho aborda o desenvolvimento de um sensor amperométrico baseado em um EPC modificado com nanotubos de carbono,

sílica gel modificada e um agente mediador (4-nitroanilina) para determinar um composto de reconhecida ação biológica, o ácido ascórbico.

## 2.7 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (Figura 10) é um antioxidante hidrossolúvel que possui estrutura de um éster cíclico ( $\gamma$ -lactona) e representa o enantiômero L do ácido ascórbico, a forma bioquímica e fisiologicamente ativa. O AA puro é um sólido cristalino de cor branca e inodoro, é um ácido de açúcar hexanóico com dois prótons dissociáveis ( $pK_a$  4.04 e 11.34). Portanto, sob condições fisiológicas, ocorre como um ânion ascorbato (PISOSCHI, *et al.* 2014).

**Figura 10 - Estrutura molecular do ácido ascórbico.**



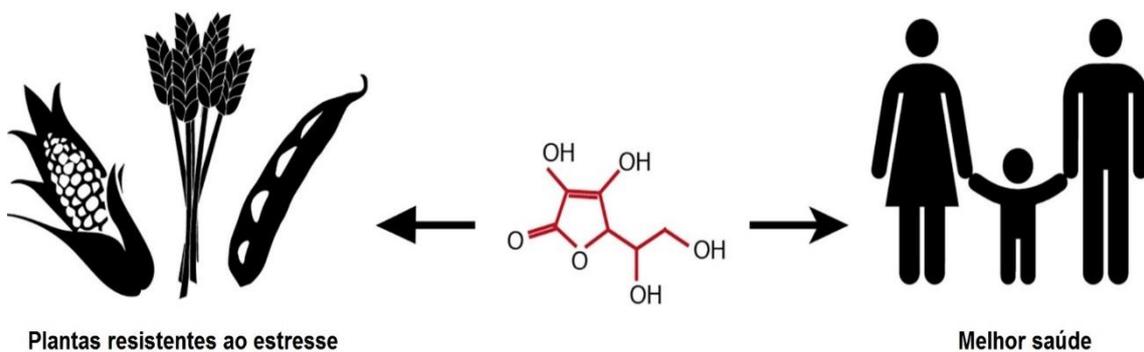
Fonte: DU; CULLEN; BUETTNER, 2012 (Adaptado).

A maioria das plantas e animais sintetizam a vitamina C, mas os seres humanos e outros primatas são os únicos mamíferos incapazes de sintetizá-la. Neles, a deficiência, geneticamente determinada, da enzima L-gulonolactona oxidase (GLO) impede a síntese do ácido L-ascórbico a partir da glicose, o que torna estas espécies completamente dependentes do fornecimento dessa vitamina na dieta, sendo um nutriente vital para o funcionamento metabólico adequado (MASTRANGELO *et al.*, 2018).

O ascorbato também desempenha um importante papel protetor em plantas sob condições de estresse, onde o dano a estrutura celular causa aumento na produção de ERO (AKRAM; SHAFIQ; ASHRAF, 2017). Espera-se que os padrões climáticos globais em mudança aumentem as condições ambientais extremas, como

altas temperaturas e secas. O desenvolvimento de culturas tolerantes ao estresse abiótico será, portanto, fundamental para garantir a segurança alimentar para uma população mundial crescente. As plantas com níveis aumentados de ascorbato são mais tolerantes ao estresse, esta é uma maneira promissora de gerar culturas mais resistentes, garantindo uma alimentação mais saudável aos seres humanos (Figura 11) (MACKNIGHT *et al.*, 2017).

**Figura 11 - Alimentos ricos em vitamina C fornecem melhor qualidade na saúde.**



Fonte: MACKNIGHT *et al.*, 2017 (Adaptado).

O AA apresenta vários efeitos benéficos a saúde humana, ajuda a promover o desenvolvimento saudável das células, absorção de cálcio e o crescimento normal dos tecidos, também pode ser usado como medicamento para escorbuto, intoxicação por drogas, doença hepática, reações alérgicas e aterosclerose (YU *et al.*, 2015). Possui papel importante na inibição e tratamento do resfriado comum, doença mental, infertilidade e câncer tem sido investigado (GHANBARI; HAJHEIDARI, 2015).

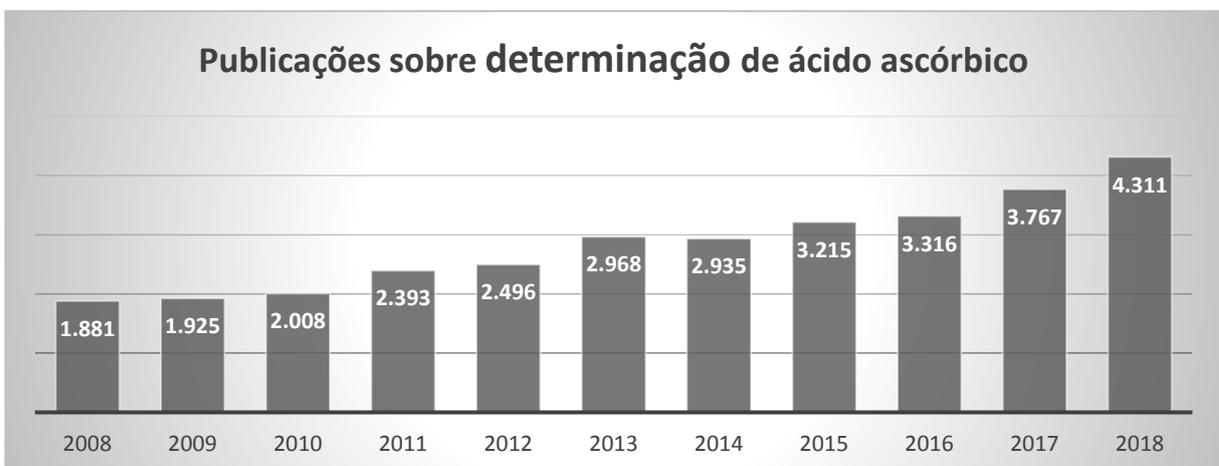
Além disso, este agente redutor existente em fluidos biológicos é frequentemente usado em larga escala na indústria alimentícia como um potente antioxidante para prevenir mudanças indesejadas na cor e no sabor dos alimentos. É também usado em ração animal, formulações farmacêuticas e aplicações cosméticas (ZHANG *et al.*, 2013). Como doador de elétrons, o AA serve como um dos mais relevantes antioxidantes de pequeno peso molecular que contribui para a capacidade antioxidante total, sendo um importante indicador de qualidade de alimentos e bebidas (POPA *et al.*, 2012; PISOSCHI; CHEREGI; DANET, 2009).

O nome químico do AA é 2-oxo-L-treoexono-1,4-lactona-2,3-enodiol e encontra-se na natureza sob duas formas: ácido L-ascórbico (L-AscH<sub>2</sub>), uma forma reduzida e como ascorbato (AscH<sup>-</sup>), forma ionizada (PUTCHALA *et al.*, 2013). O AA é uma substância lábil, facilmente degradado por enzimas e oxigênio atmosférico. Sua oxidação é dependente do pH e é acelerada por metais catalíticos, na ausência desses metais a oxidação espontânea do ascorbato é bastante lenta em pH 7,0. Esta auto-oxidação, ou seja, a oxidação na ausência de catalisadores ocorre através do diânion dehidroascórbico (Asc<sup>2-</sup>). Em pH 7,0 a espécie dominante da vitamina C é AscH<sup>-</sup> (99,895%), com baixas concentrações de AscH<sub>2</sub> (0,100%) e Asc<sup>2-</sup> (0,005%) (PISOSCHI, *et al.* 2014; DU; CULLEN; BUETTNER, 2012).

O amplo espectro de funções biológicas associados ao AA é explicado pelo fato de que o AscH<sub>2</sub> é um cofator específico para uma grande família de enzimas, coletivamente conhecidas como dioxigenases dependentes de Fe e de 2-oxoglutarato. Estas enzimas desempenham funções relevantes em vários processos biológicos e são caracterizadas pela capacidade de catalisar a adição de um grupo hidroxila a vários substratos (KUIPER; VISSERS, 2014).

Em decorrência do papel substancial da vitamina C na saúde humana e nas aplicações industriais, sua determinação apresenta grande interesse de pesquisa na comunidade científica com vários trabalhos sendo reportados na literatura (Figura 12).

**Figura 12 - Artigos científicos reportados na literatura.**



Fonte: Science direct, 2018.

Dessa forma, há uma grande necessidade de medir com precisão o AA em várias amostras, como frutas, plantas, produtos industrializados e fluidos biológicos. O monitoramento dos níveis de vitamina C durante a produção e controle de qualidade dos alimentos é uma etapa fundamental na segurança alimentar e o desenvolvimento de plataformas simples, de baixo custo e de fácil manipulação são requisitos básicos para uma possível aplicação mercadológica.

Com intuito de comparar vários EPC empregados para detecção e quantificação de AA, são apresentados os resultados analíticos obtidos nos artigos publicados e citados no presente trabalho:

Mukdasai *et al.*, (2015) reportaram o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de paládio e monólito de carbono para determinação simultânea de AA e ácido úrico (AU), o sensor voltamétrico apresentou uma faixa linear de 3,27 a 40,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 3,27 a 13,89  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AA e AU, respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,53  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AA e 0,66  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para AU. O eletrodo também demonstrou atividade eletrocatalítica na oxidação de AA e AU, diminuindo o excesso de potencial e aumentando a corrente de pico. O método proposto mostrou fácil fabricação, alta sensibilidade e estabilidade, além de boa reprodutibilidade.

Beitollahi e Mohammadi (2013) construíram um EPC modificado com nanotubos de carbono e 5-amino-3,4-dimetil-bifenil-2-ol (5ADB) para determinar ácido ascórbico na presença de acetaminofeno (AC) e triptofano (TRP). A determinação de AA foi realizada por técnica voltamétrica e exibiu resposta linear de 0,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 1.000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com um limite de detecção de 0,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Este eletrodo modificado separou os potenciais de pico de oxidação anódica de AA, AC e TRP com boa definição.

Kingsley *et al.*, (2015) visando o desenvolvimento de novos dispositivos com melhor desempenho, modificaram um eletrodo de pasta de carbono com nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) para determinar simultaneamente AA e ácido fólico (AF). O eletrodo assim construído apresentou para o AA e AF um limite de

detecção de  $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$  e faixa linear de  $0,9 - 4,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,065 - 98 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Hsu *et al.*, (2017) também desenvolveram um sensor amperométrico a base de EPC para detecção eletrocatalítica de AA. Os autores verificaram que o EPC modificado com poliaminas de sílica mesoporosa (PANI) e nanopartículas de ouro apresentaram ganho considerável na resposta analítica em relação ao eletrodo convencional, demonstrando efeito eletrocatalítico frente ao AA, apresentando uma ampla faixa linear  $5,0 - 13.300 \mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $0,97 \mu\text{mol L}^{-1}$  com alta sensibilidade e excelente repetibilidade.

Um eletrodo de pasta de carbono modificado com bis (metanilideno) bis (benzeno)-2,2-(1E) - (1,2-fenileno bis (azanilideno)) -1,2-diol) (PBD) e nanotubos de carbono foi fabricado pelo grupo Mazloum *et al.*, (2018) e usado para determinação eletrocatalítica de AA. Os resultados demonstraram que a eletrooxidação de AA na superfície do eletrodo ocorreu a um potencial 130 mV menos positivo que o EPC convencional. O dispositivo voltamétrico apresentou faixa linear de resposta e limite de detecção de  $1,0 - 80 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. O dispositivo também foi utilizado com sucesso para a determinação simultânea de AA, AU e TRP.

Seguindo com o uso de EPC para determinação de AA os autores Noroozifar, Motlagh e Tavakkoli (2011), preparam um EPC modificado com nanotubos de carbono com múltiplas camadas e iodeto de tetraheptilamônio, o eletrodo proposto não apenas desviou o potencial de oxidação do AA para um potencial menos positivo, mas também aumentou sua corrente de pico de oxidação. O sensor exibiu uma ampla faixa linear  $56,0 - 12.000 \mu\text{mol L}^{-1}$  e um limite de detecção de  $36,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Como pode ser visto, a busca por modificadores que possam tornar os EPC em ferramentas ainda mais promissoras na determinação de AA e outros importantes compostos biológicos e químicos tem sido tema regular na eletroanalítica.

Com o objetivo de passar ao leitor uma abordagem integral de todos os recursos utilizados nesta dissertação, o próximo e último tópico têm como finalidade apresentar os princípios básicos das técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho.

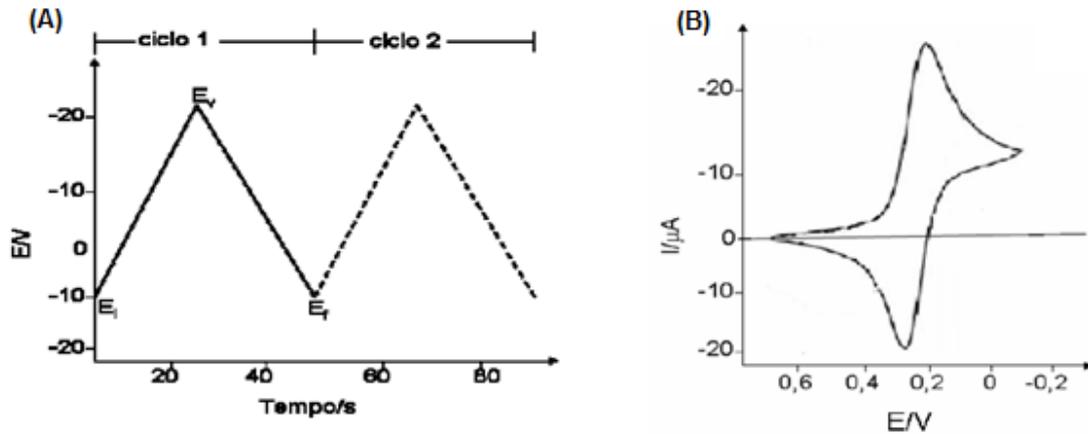
## 2.8 Técnicas eletroquímicas

### 2.8.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma técnica utilizada constantemente para analisar espécies eletroativas, sendo possível determinar mecanismos de reação e constantes de velocidade. Na voltametria cíclica avalia-se de maneira geral a cinética e termodinâmica dos processos eletroquímicos que ocorrem em uma região de potencial elétrico, sendo escolhida geralmente como técnica de entrada em vários tipos de experimentos. Esta técnica é possivelmente a mais usada para a obtenção de dados qualitativos sobre as reações eletroquímicas. Com a voltametria cíclica é possível obter informações sobre: potencial de deposição, sobrepotencial de nucleação, reversibilidade da reação, controle cinético da reação (por transporte de massa ou transferência de carga), entre outros (WANG, 2001).

A técnica consiste em uma varredura triangular de potencial versus tempo (Figura 13A), ou seja, começa em um potencial inicial ( $E_i$ ) onde não há nenhum processo de oxidação ou redução de interesse até um segundo potencial ( $E_v$ ) onde há a inversão da varredura até o potencial final ( $E_f$ ) (Figura 13A), geralmente a uma mesma velocidade de varredura (GREEF *et al.*, 1985). Dependendo do objetivo do estudo podem ser feitos somente um ou vários ciclos, com ou sem modificação de parâmetros. Durante a varredura, o instrumento (potenciostato) registra a corrente resultante do potencial aplicado (WANG, 2001) e a curva resultante do registro de corrente versus potencial é chamada voltamograma cíclico (Figura 13B).

Figura 13 - Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica (A). Voltamograma cíclico para um sistema reversível (B).



Fonte: LOURENÇÃO, 2009 (Adaptado).

A voltametria cíclica é caracterizada por alguns parâmetros importantes: *potenciais de pico anódico* ( $E_{pa}$ ) e *catódico* ( $E_{pc}$ ), *correntes de pico anódica* ( $I_{pa}$ ) e *catódica* ( $I_{pc}$ ), *potencial de meio-pico anódico* ( $E_{p/2}$ ) e *potencial de meia-onda* ( $E_{1/2}$ ). A definição de  $E_{1/2}$  vem da polarografia clássica (de acordo com a equação 3).

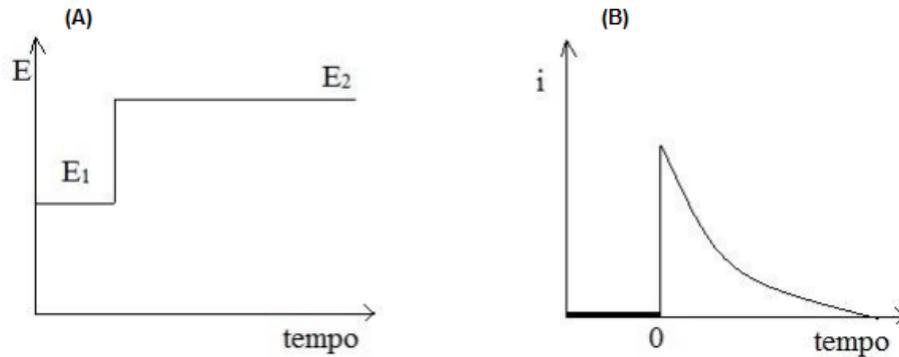
$$E_{1/2} = E^{\circ} + (RT/nF)\ln(D_R/D_O)^{1/2} \quad (3)$$

Na equação (3),  $E^{\circ}$  é o potencial formal relativo à força iônica da solução usada,  $D_O$  e  $D_R$  são os coeficientes de difusão das formas oxidada e reduzida, respectivamente, e  $n$  é o número de elétrons na semi-reação. Se  $D_O$  e  $D_R$  forem iguais,  $E_{1/2}$  será o próprio  $E^{\circ}$  (EVANS *et al.*, 1983).

### 2.8.2 Cronoamperometria

Na técnica de cronoamperometria, fixa-se um potencial de interesse para o eletrodo de trabalho e monitora-se o sinal resultante de corrente ao longo do tempo. Utiliza-se um salto de potencial de um potencial inicial, como visto na Figura 14A onde não ocorre nenhum processo faradaico para um potencial onde há um processo eletroquímico, podendo-se notar a depleção da espécie eletroativa e mudanças no gradiente de concentração. A Figura 14B expõe um típico cronoamperograma, onde se adquire o sinal da corrente ( $i$ ) versus o tempo ( $t$ ) (BARD; FAULKNER, 2001).

Figura 14 - Forma de onda potencial vs tempo (A) corrente em função do tempo (B).



Fonte: BARD; FAULKNER, 2001 (Adaptado).

Fixar o potencial numa condição em que a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo é nula, resulta na equação de Cottrell, com a qual é possível determinar, por exemplo, o coeficiente de difusão da espécie eletroativa (equação 4).

$$I_t = \frac{nFAC_oD_o^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = bt^{-1/2} \quad (4)$$

onde:  $I_t$  é a corrente a um tempo  $t$  (s),  $n$  é o número de elétrons ( $\text{eq mol}^{-1}$ ),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C eq}^{-1}$ ),  $A$  é a área geométrica do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $C$  é a concentração das espécies oxidadas ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) e  $D$  é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ). A transferência de massa para o eletrodo de trabalho ocorrerá por difusão, e a curva corrente-tempo resultante será uma curva de decaimento exponencial da corrente com o tempo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um sensor amperométrico a base de pasta de carbono modificado com óxido de zircônio e 4-nitroanilina para a determinação de ácido ascórbico em suco de laranja.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Imobilizar a 4-nitroanilina em sílica gel modificada;
- b) Incorporar sílica modificada com 4-NA em pasta de grafite;
- c) Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas entre o analito/superfície do eletrodo modificado com 4-NA fazendo uso de técnicas eletroquímicas;
- d) Otimizar os parâmetros experimentais tais como: pH, velocidade de varredura, tipo de solução tampão e concentração da solução tampão sobre o sinal analítico;
- e) Caracterizar o sensor a partir de técnica de Microscopia (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA) e Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR);
- f) Obter parâmetros analíticos como LD, LQ e sensibilidade;
- g) Realizar estudos de possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade do sensor;
- h) Aplicar o sensor em amostras reais.

## 4. EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e soluções

Para a realização dos experimentos todas as substâncias utilizadas são de grau analítico (tabela 1).

**Tabela 1 - Reagentes utilizados/fornecedores.**

Reagentes	Fornecedor
4-Nitroanilina (4NA)	Aldrich
Ácido Ascórbico (AA)	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Sigma-Aldrich
Óleo Mineral Nujol	Mantercop
Sílica Gel	Fluka
Fosfato Monossódico	Synth
Fosfato Dissódico	Synth
NaOH	Sigma-Aldrich

Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

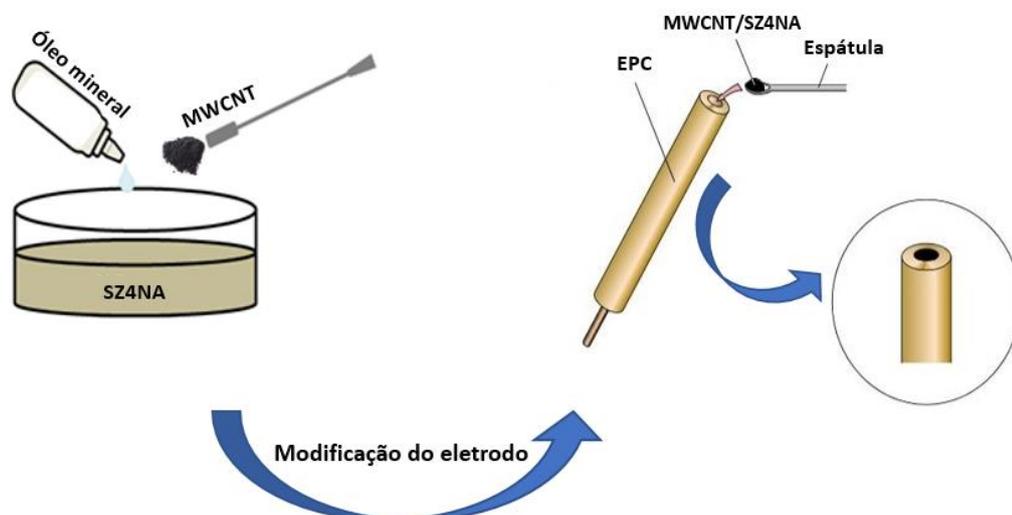
A sílica gel adquirida possui diâmetro médio dos poros de 6 nm e tamanho de partícula de 0,04 - 0,063 mm e os MWCNT > 95%, 7-15 nm x 0,5-10 µm. As soluções foram preparadas com água purificada em um sistema Milli-Q (18,2 MΩ cm, Millipore (Merck), Darmstadt, Alemanha). Os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com soluções de NaOH e determinado com um pHmetro (Tecno-pon mPA 210).

## 4.2 Construção do sensor

Para a construção do sensor foi utilizado um eletrodo com área geométrica de  $0,0314 \text{ cm}^2$ . A superfície da sílica gel foi modificada com óxido de zircônio (SZ) de acordo com o procedimento descrito por Yamashita e colaboradores (2003). A imobilização da 4-NA em sílica modificada foi realizada através do preparo de uma solução de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  em DMSO. Após este passo,  $1,0 \text{ mL}$  desta solução foi adicionado a  $20 \text{ mg}$  de SZ sob agitação. Após 4 horas, o sólido resultante foi filtrado em um sistema a vácuo, através de uma membrana PTFE com filtro de nylon (tamanho de poro de  $0,27 \text{ m}$ ) e lavado por várias vezes com DMSO, e depois foi secado em estufa a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.

Este material foi denominado como “4-nitroanilina imobilizada em sílica modificada com óxido de zircônio” (SZ4NA). O eletrodo modificado foi preparado misturando-se  $12 \text{ mg}$  de MWCNT com  $12 \text{ mg}$  de SZ4NA e óleo mineral Nujol, até que uma pasta homogênea fosse obtida, em seguida essa pasta foi transferida para a cavidade de um EPC. O eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado obtido neste trabalho foi identificado como EPC/MWCNT/SZ4NA. Todas as respostas obtidas com o sensor proposto são dadas como a corrente observada para uma área geométrica conhecida do eletrodo de trabalho (sensor), determinada como  $A = \pi r^2$  (PONTIÉ *et al.*, 2018).

Figura 15 - Esquema de preparo do EPC/MWCNT/SZ4NA.



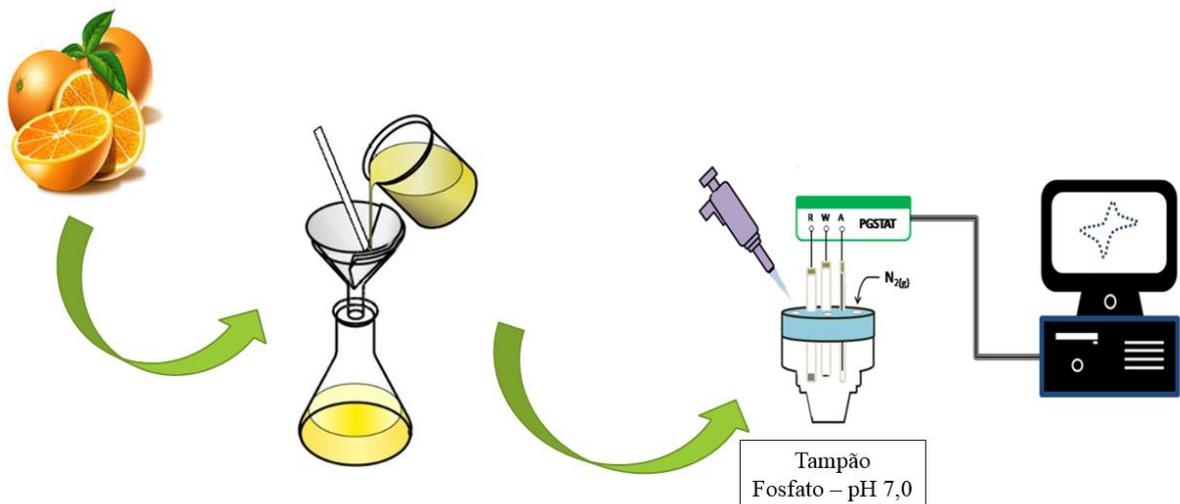
Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

### 4.3 Preparação da amostra

Para avaliar o método analítico proposto, o EPC/MWCNT/SZ4NA foi utilizado para detectar AA em amostra de suco de laranja diluído em tampão fosfato a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0. O Suco da fruta fresca *in natura* foi obtido da variedade *Citrus limettioides*, pertencente à família das Rutáceas, popularmente conhecida como laranja lima, adquirida no comércio varejista da cidade de Maceió – AL, durante o mês de setembro de 2018.

As laranjas foram cortadas com o auxílio de uma faca doméstica, espremeu-se manualmente cada variedade e o suco obtido foi filtrado em um filtro de papel qualitativo. Em seguida 0,1 mL do suco foi adicionado a 9,9 mL do tampão fosfato (pH 7,0) e diluições sucessivas foram realizadas. As alíquotas diluídas do suco de laranja foram adicionadas à célula eletroquímica imediatamente após a filtração e submetidas às análises amperométricas. Todas as análises foram feitas sob borbulhamento de nitrogênio na solução por 10 minutos para eliminação de oxigênio dissolvido. A quantidade de vitamina C na amostra foi avaliada pelo método de adição de padrão. Para validar o método proposto, utilizou-se o método de titulação iodométrica, realizado de acordo com o procedimento do Instituto Adolf Lutz (ZENEBOON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

**Figura 16 – Esquema de preparo da amostra para a análise eletroquímica.**



Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

## 4.4 Equipamentos

### 4.4.1 Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas (voltamétrica e amperométrica) foram realizadas com um potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Echo Chemie (Utrecht, Holanda) conectado a um computador (Software NOVA 1.10).

**Figura 17 - Potenciostato utilizado nas medidas eletroquímicas.**



Fonte: Metrohm.com

Uma célula eletroquímica com três eletrodos foi usada, como eletrodo de referência o Ag/AgCl (KCl saturado), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de pasta de carbono como eletrodo de trabalho, para todas as análises. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente utilizando-se 10,00 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,0. O oxigênio foi removido do sistema eletroquímico fazendo-se borbulhar azoto através da solução tampão durante pelo menos 10 minutos. Para os experimentos realizados em potencial constante, a resposta atual foi registrada em função do tempo, após a adição de AA. A resposta do sensor foi medida como a diferença entre as correntes total e residual.

### 4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia da superfície de SZ4NA foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando TESCAN, modelo VEGA3 tipo câmara LM com um cátodo convencional de tungstênio para operações de alto vácuo com detectores de elétrons

secundários (SE), após metalização do ouro (Quorum Technologies LTD, Ashford, modelo Q15OR), Figura 18.

**Figura 18 - Microscópio Eletrônico de Varredura – Tescan.**



Fonte: laboratório de pesquisa GPAES.

#### **4.4.3 Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR)**

A espectroscopia de FTIR foi realizada usando um IRAffinity-1 da shimadzu (Kyoto, Japão), os espectros de infravermelho foram obtidos na faixa de  $4.000-400\text{ cm}^{-1}$ , em pastilhas de KBr (2 mg de amostra - 200 mg de KBr seco).

**Figura 19 - Espectrômetro FTIR IRAffinity-1 – Shimadzu.**

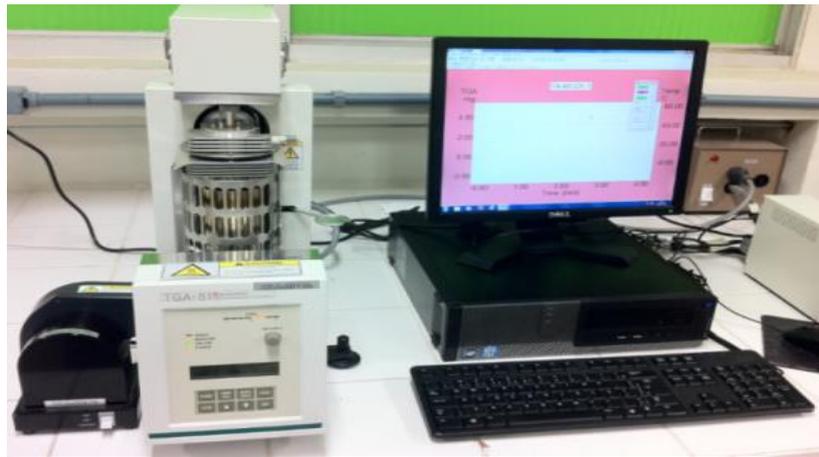


Fonte: Shimadzu.com

#### 4.4.4 Análise Térmica Gravimétrica

A análise térmica gravimétrica foi realizada em um TGA-50 / 50H da shimadzu (Kyoto, Japão) a uma taxa de aquecimento de 10 °C / min na faixa de temperatura de 10 a 1000 °C em atmosfera de nitrogênio.

**Figura 20 - Analisador termo gravimétrico (60) – Shimadzu.**



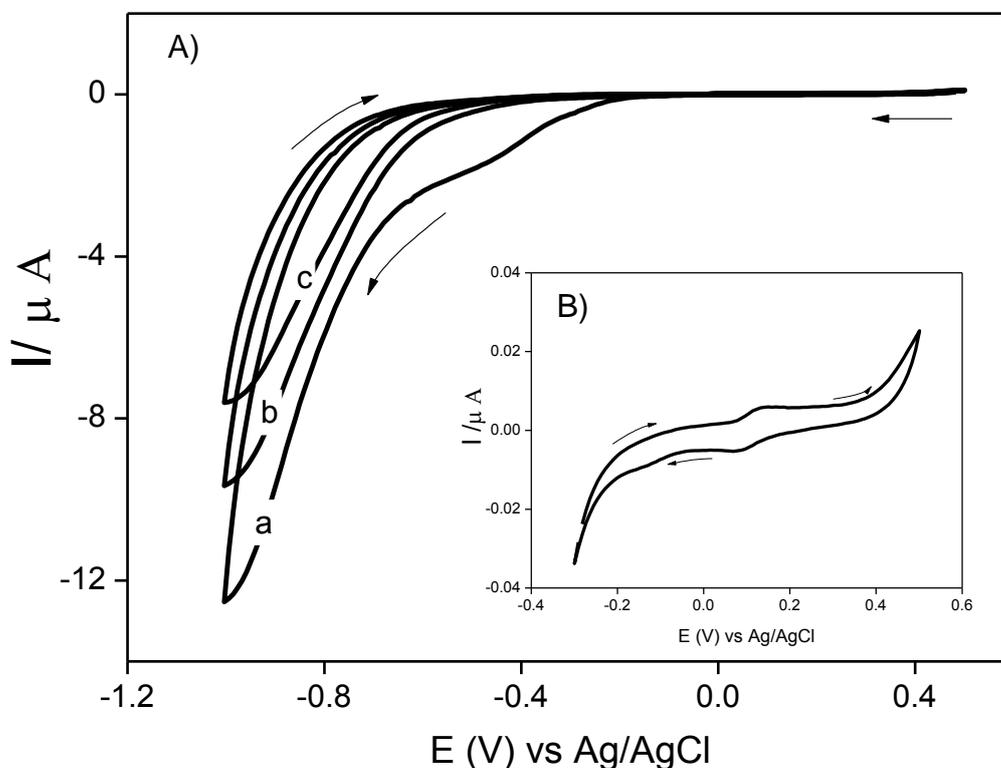
Fonte: laboratório de pesquisa GPAES.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ativação de 4-nitroanilina em eletrodo modificado MWCNT/SZ4NA e oxidação eletrocatalítica de AA

Voltamogramas cíclicos obtidos usando o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono modificado com a matriz SZ4NA mostraram picos redox das espécies eletroativas, R-NHOH/R-NO (Figura 21B), que foram eletrogeradas *in situ* a partir da ativação da 4-NA (Figura 21A), devido à redução do grupo nitro após o ciclo na faixa de potencial entre 0,5 e -1,0 V vs. Ag/AgCl na primeira varredura em 0,1 mol L<sup>-1</sup> tampão fosfato, pH 7,0 com uma taxa de velocidade de varredura de 0,005 V s<sup>-1</sup>. A ciclagem potencial foi realizada por 10 ciclos.

**Figura 21 – (A) Redução do grupo nitro da 4-NA (a) primeira varredura, (b) segunda varredura e (c) terceira varredura a 5 mV s<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. E<sub>inicial</sub> = 0,5 V e E<sub>final</sub> = - 1,0 V vs. Ag/AgCl. (B) Formação do par redox R-NO/R-NHOH a 0,02 V s<sup>-1</sup> em uma solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> a pH 7. E<sub>inicial</sub> = - 0,3 V e E<sub>final</sub> = 0,5 V vs. Ag/AgCl.**



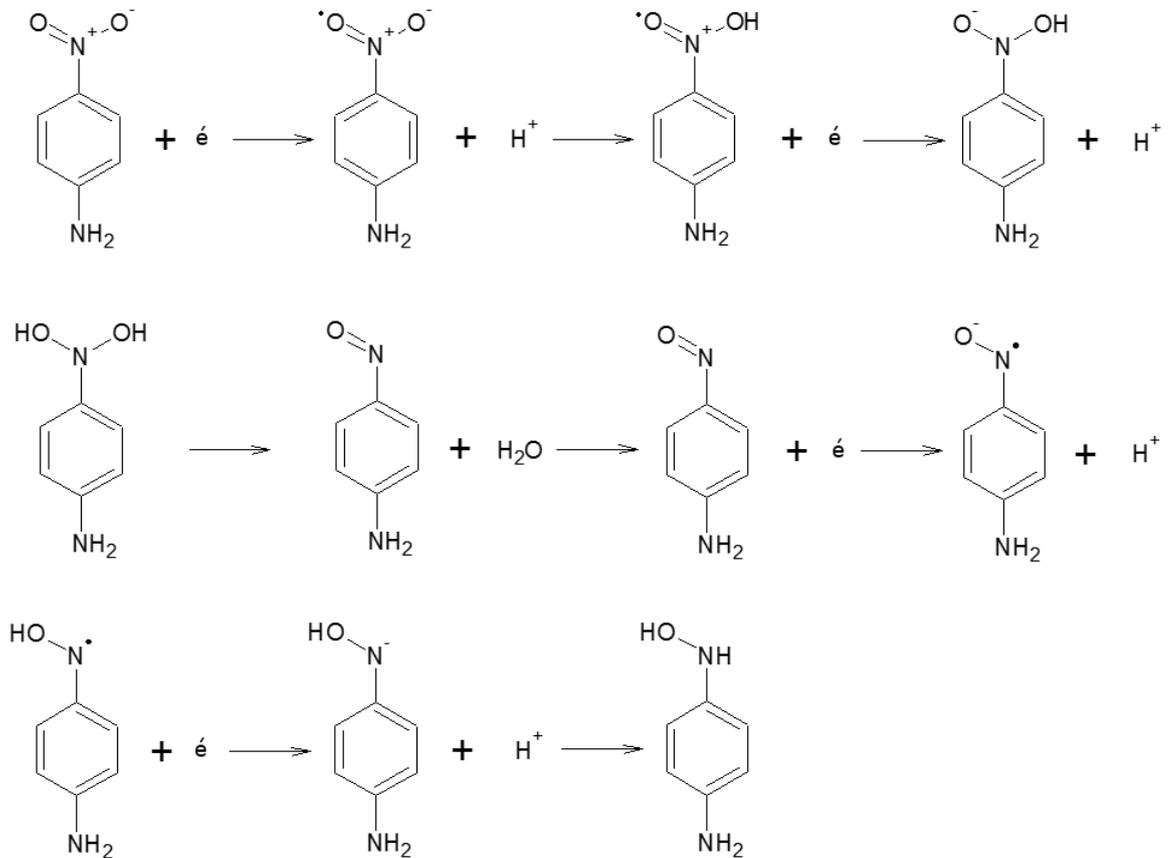
Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

A ativação do grupo nitro da 4-NA tem um papel importante para o sucesso da imobilização do mediador redox na sílica gel para minimizar reações indesejáveis. Na Figura 21A, no primeiro ciclo de varredura o grupo nitro ( $R-NO_2$ ) é reduzido a hidroxilamina ( $R-NHOH$ ), essa redução sugere que o processo eletroquímico é totalmente irreversível visto que a cada novo ciclo diminui-se a corrente Faradaica referente ao grupo nitro, já na varredura reversa a  $R-NHOH$  é oxidada a  $R-NO$  (Figura 21B), corroborando com a literatura onde menciona que é possível preparar compostos nitrosos por uma sequência de dois passos, que é reduzir o composto nitro eletroquimicamente à hidroxilamina, e depois oxidar eletroquimicamente a hidroxilamina ao composto nitroso (PATAI, 1996).

Embora não seja possível observar no segundo e terceiro ciclos um pico redox definido que pode ser atribuído ao par redox  $R-NO/R-NHOH$  (Figura 21A), este pico redox pode ser visto na inserção onde a faixa de potencial na direção do ânodo estava entre -0,3 e 0,5V vs. Ag/AgCl com uma taxa de varredura de  $0,02 \text{ V s}^{-1}$  (Figura 21B).

A formação do par redox é atribuída a ativação do grupo nitro presente na molécula de 4-nitroanilina, devido a uma redução irreversível de quatro elétrons do grupo nitro  $-NO_2$  (Figura 22) para um grupo hidroxilamina ( $-NHOH$ ). Esta redução eletroquímica de  $-NO_2$  contribui para a formação dos outros dois pares redox, devido à redução e oxidação de dois elétrons reversíveis do grupo hidroxilamina ( $-NHOH$ ) a um grupo nitroso ( $-NO$ ) (SANTHIAGO *et al.*, 2010).

Figura 22 – Esquema de redução eletroquímica da 4-NA e formação de R-NHOH.

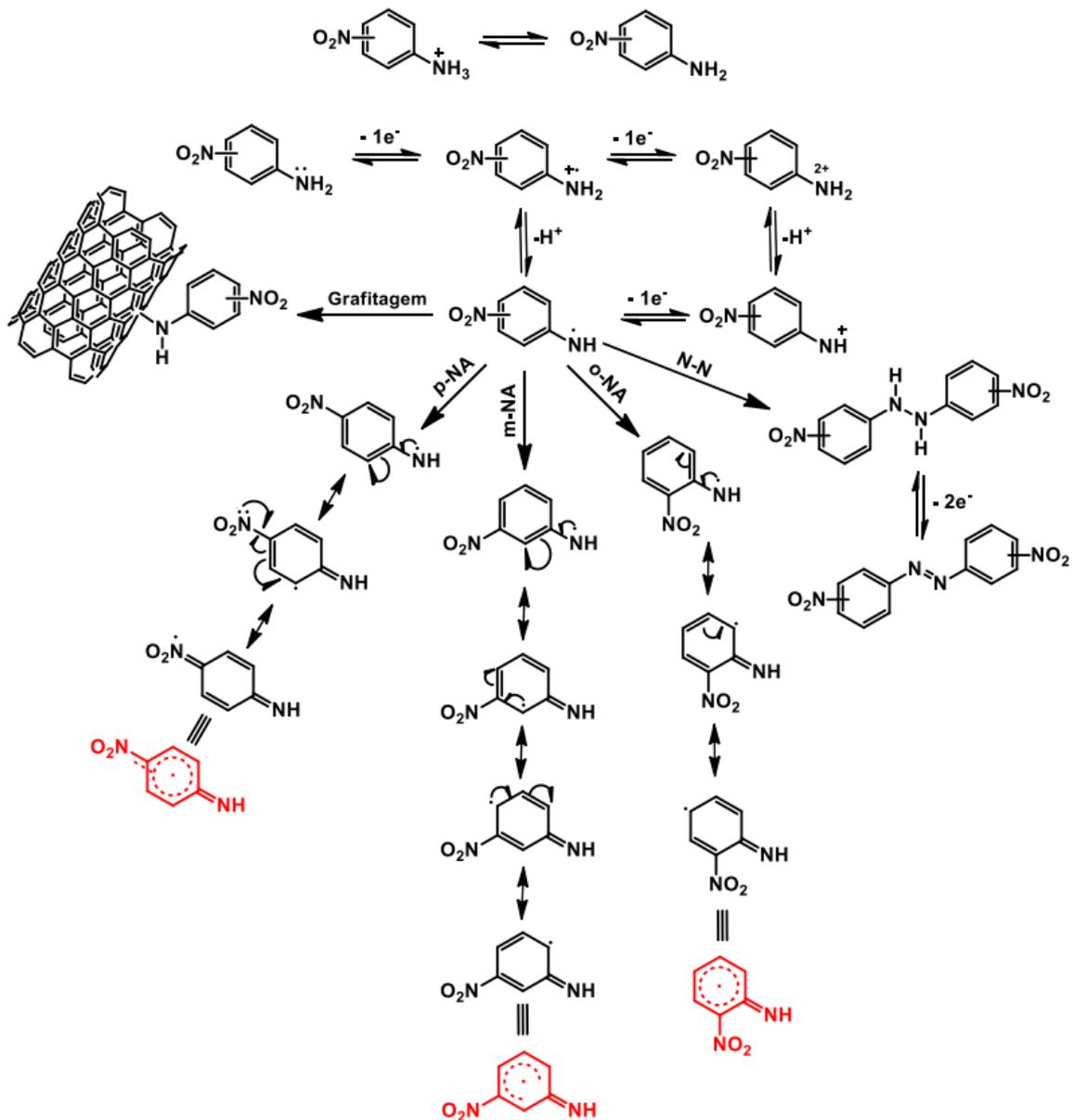


Fonte: Autor desta dissertação, 2018.

A 4-nitroanilina representa um típico sistema "push-pull" com o grupo amino como doador de elétrons e grupo nitro um retirador de elétrons conectados por um sistema conjugado  $\pi$ - $\pi$ , onde as duas estruturas correspondem às formas benzenoide e quinóide (ZAVAR *et al.* 2010).

Uma possível explicação para a incorporação de 4-NA na matriz da sílica é a oxidação dessa molécula e a consequente formação de polímeros. Neste caso, a polimerização e reatividade da 4-NA ocorre via oxidação de 1 elétron, seguida da desprotonação em meio aprótico (Figura 23), o que leva a formação de dímeros, trímeros e estruturas quinoides das nitroanilinas (DINGA *et al.*, 2012). A Figura 23 mostra a rota de oxidação das nitroanilinas. Sabe-se que a natureza química e a posição destes substituintes no núcleo aromático (p-NA, m-NA e o-NA) também influenciam a cinética do processo de polimerização (HAMMERICH *et al.*, 2015).

Figura 23 – Mecanismo de oxidação das nitroanilinas



Fonte: HAMMERICH *et al.*, 2015.

Compostos nitro e intermediários têm uma ligação polar de N-O. A redução eletroquímica de compostos nitro de fato dá origem a vários intermediários. Alguns deles podem ser identificados diretamente, enquanto a existência de outros podem, às vezes, ser apenas inferida. (SASSYKOVA *et al.*, 2019)

Além disso, uma variedade de caminhos pode interconectar os vários intermediários, materiais de partida e produtos da redução eletroquímica de um dado

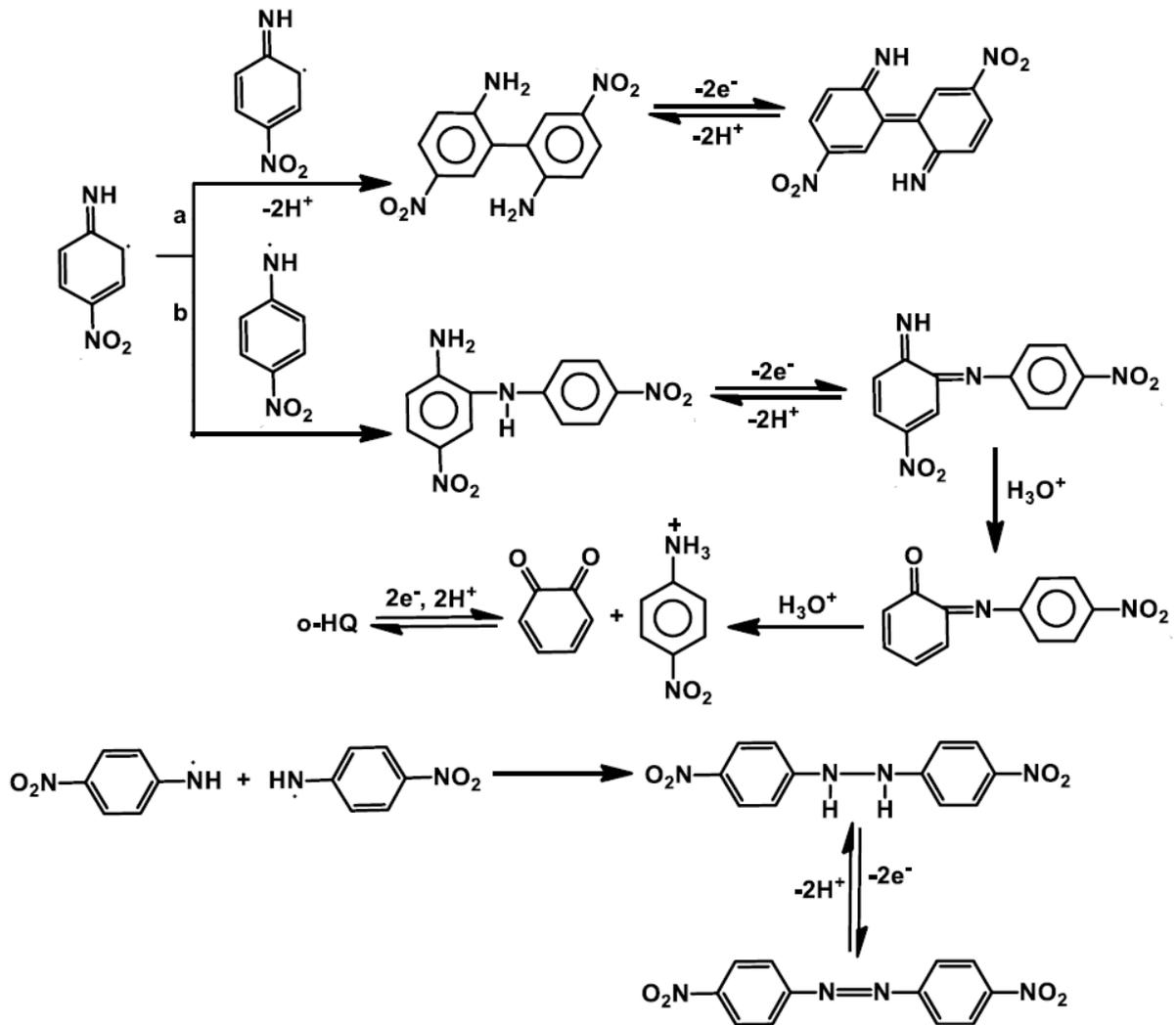
composto nitro, dependendo das condições experimentais particulares que estão sendo empregadas (PATAI, 1996).

Os compostos nitro ligam três moléculas ao longo de três rotas principais (p-NA, m-NA e o-NA). Os nitrocompostos aromáticos hidrogenados, quando diminuem a taxa de redução, formam uma série de compostos, dentre eles a 4-NA, alguns substituintes doadores de elétrons reduzem a taxa de redução destes compostos nitro, como é o caso do grupo amino presente na molécula 4-NA (SASSYKOVA *et al.*, 2019)

O principal fato do qual devemos estar cientes é que a eletroquímica dos compostos nitro é exclusivamente catódica: o alto nível de oxidação do nitrogênio no grupo nitro significa que, embora sejam facilmente reduzidos, eles geralmente não podem ser oxidados. Os compostos nitrosos são prontamente oxidados e reduzidos, embora a literatura sobre essas substâncias seja muito mais esparsa (PATAI, 1996)

Um possível mecanismo para a inibição da polimerização é que os grupos nitro capturam elétrons de partículas do próprio grupo amino da 4-nitroanilina, e uma estrutura inerte menos propensa a perder um elétron é formada (DINGA *et al.*, 2012). Assim, um mecanismo pode ser sugerido para o acoplamento entre os radicais formados pela oxidação de 4-NA (Figura 24).

Figura 24 - Mecanismo para a oxidação dos isômeros da 4-NA.



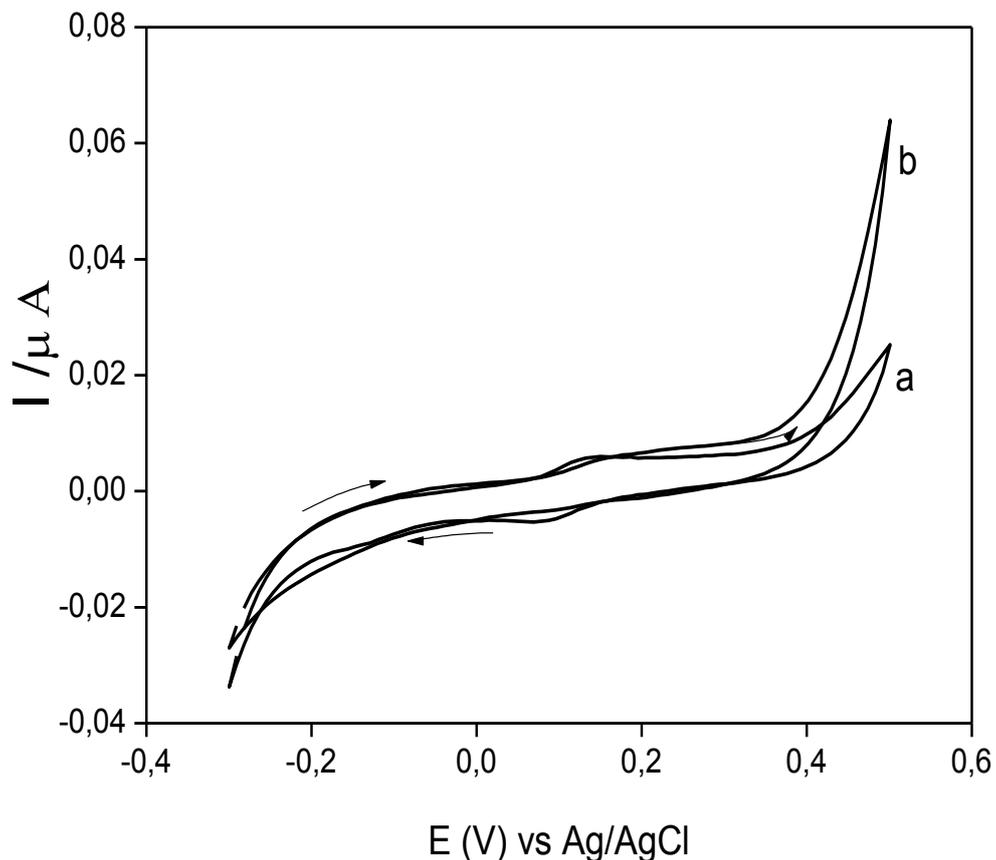
Fonte: HAMMERICH *et al.*, 2015.

## 5.2 Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com e sem 4-NA, na presença e ausência de AA

Inicialmente, estudos eletroquímicos via técnica de voltametria cíclica (VC) foram efetuados com o propósito de verificar as atividades eletroquímicas dos sensores EPC/MWCNT/SZ4NA e EPC/MWCNT/SZ antes do processo de adição do AA. Aplicou-se um potencial no sentido anódico em ambos os eletrodos modificados para verificar a existência de corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) e no sentido reverso para corrente de pico catódica ( $I_{pc}$ ).

Pode ser observado na Figura 25 (a) a formação de um par de picos redox bem definidos de R-NO/R-HNOH no eletrodo modificado com a 4-NA (EPC/MWCNT/SZ4NA). Já o eletrodo modificado sem a 4-NA (EPC/MWCNT/SZ) não apresentou atividade eletroquímica considerável (Figura 25 b). Para o estudo eletroquímico foi selecionada uma faixa de potencial de - 0,3 V a 0,5 V vs. Ag/AgCl, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e velocidade de varredura de potencial de 0,02 V s<sup>-1</sup>.

**Figura 25 - Formação das espécies eletroativas R-NO/R-NHOH a 0,02 V s<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. E<sub>inicial</sub> = - 0,3 V e E<sub>final</sub> = 0,5 V vs. Ag/AgCl. Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com 4-NA (a) e eletrodo modificado sem 4-NA (b).**



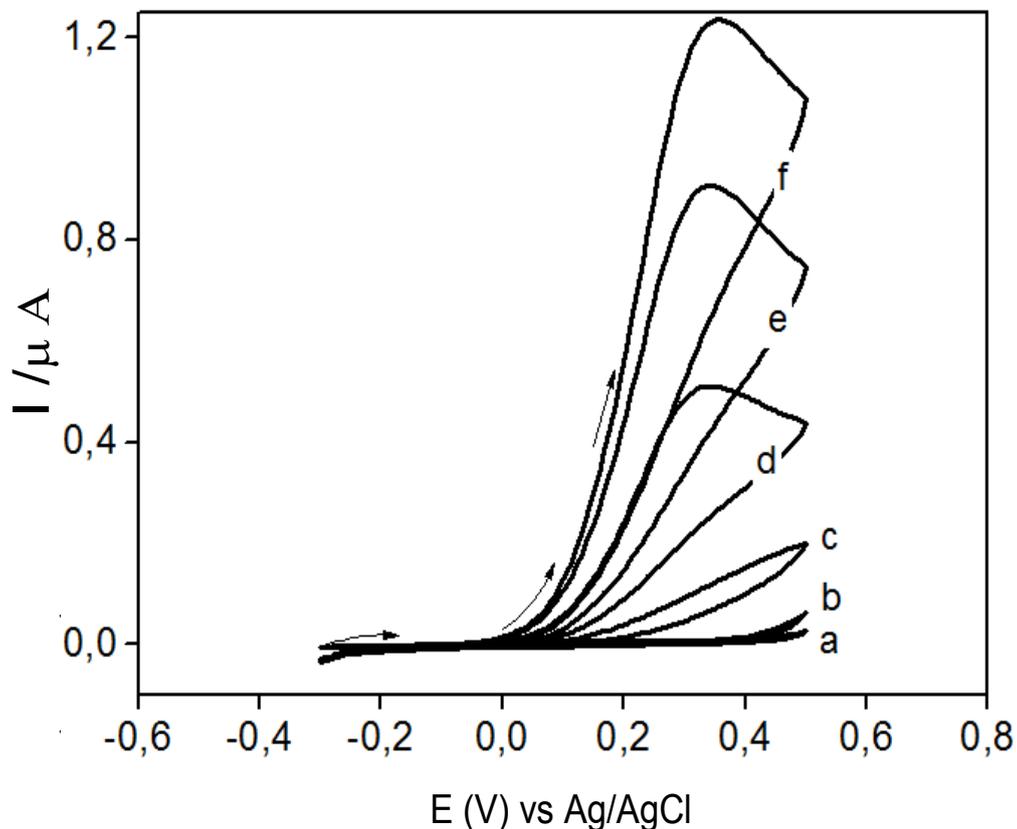
Fonte: Autor dessa dissertação, 2018.

Para verificar a atividade electrocatalítica da 4-NA na presença de AA, diferentes ensaios foram realizados utilizando VC. A Figura 26 mostra os voltamogramas cíclicos para EPC/MWCNT/SZ4NA em solução tampão fosfato, pH 7,0 utilizando varredura

anódica a  $0,005 \text{ V s}^{-1}$ , com  $E_{\text{inicial}} = -0,3$  e  $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$ , na presença de AA na faixa de concentração de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 26 d, e, f) respectivamente. Utilizou-se o mesmo eletrodo na ausência de AA em velocidade de varredura com potencial de  $0,02 \text{ V s}^{-1}$  (Figura 26 a).

Para fins comparativos, voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/MWCNT/SZ na ausência (Figura 26 b) e presença de AA (Figura 26 c) também são apresentados.

**Figura 26 - Voltamogramas cíclicos obtidos para EPC/MWCNT/SZ e EPC/MWCNT/SZ4NA em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato, pH 7,0 a  $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = -0,3 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl. EPC/MWCNT/SZ4NA na ausência de AA (a), EPC/MWCNT/SZ na ausência (b) e presença (c) de AA. EPC/MWCNT/SZ4NA com diferentes concentrações de AA:  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  (d),  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  (e) e  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  (f).**



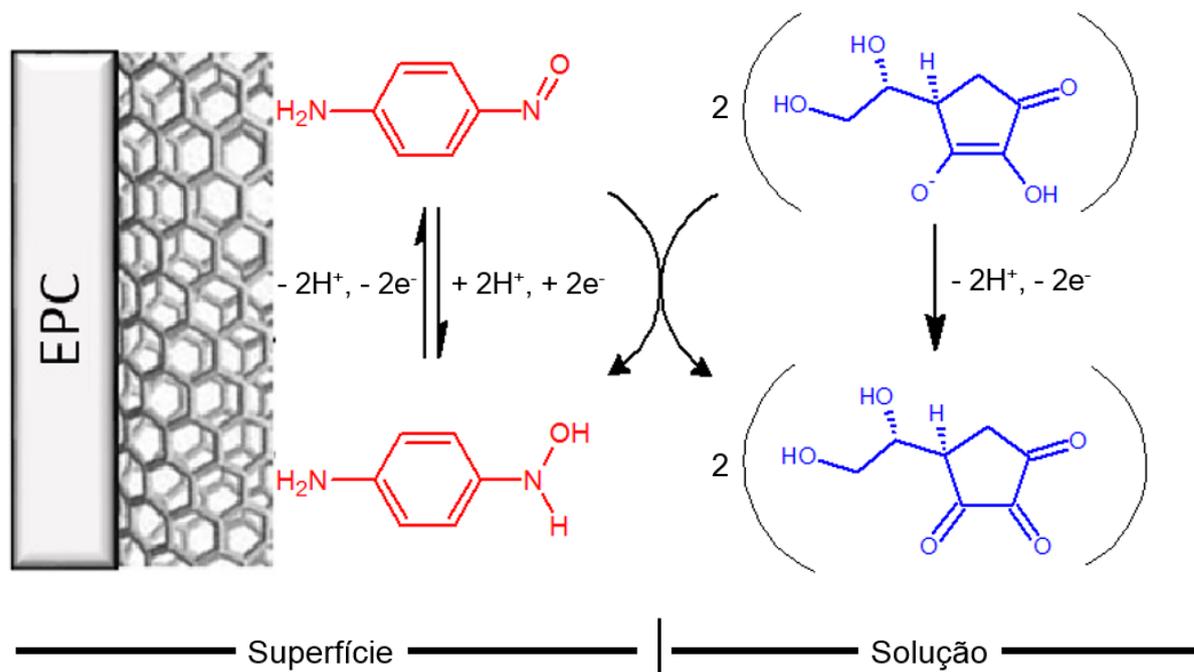
Fonte: Autor dessa dissertação, 2018.

Após a adição de diferentes concentrações de AA ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ), houve um aumento exponencial da corrente de pico anódico a  $0,3 \text{ V}$

e, além disso, não foi observada corrente na varredura reversa, sentido catódico (Figura 26 d, e, f). Isso resulta em um forte efeito eletrocatalítico, indicando que um aumento na concentração de AA corresponde a um aumento na corrente de oxidação (HSU *et al.*, 2017).

O mecanismo eletrocatalítico ( $EC_{cat}$ ) pode ser explicado através da interação entre a 4-NA ativada, que forma espécies eletroativas na plataforma com nanotubos de carbono e sílica gel modificada e interage formando um ciclo catalítico para oxidação eletrocatalítica de AA, o qual envolve o par redox (hidroxilamina/nitroso) (Figura 27), semelhante a vários mediadores redox presentes na literatura (SILVA *et al.*, 2016, 2018).

**Figura 27 - Mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise de AA sobre a plataforma EPC/MWCNT/SZ4NA.**



Fonte: Autor dessa dissertação, 2019.

Sob as mesmas condições experimentais, a oxidação direta de AA em um eletrodo de pasta de carbono modificado sem a 4-NA (EPC/MWCNT/SZ) mostra uma onda irreversível em potenciais mais positivos e um pico de 0,4 V é mostrado (Figura 26 c), indicando que o eletrodo de pasta de carbono modificado sem a 4-NA não possui comportamento eletrocatalítico para o AA. Assim, uma redução no excesso

de potencial de aproximadamente 100 mV e um aumento da corrente de pico é alcançada no eletrodo de pasta de carbono modificado com a 4-NA.

A corrente de pico anódica 0,3 V observada por VC na presença de AA é mostrada como um valor abaixo do relatado em outros trabalhos incluindo sensores de pasta de carbono (HSU *et al.*, 2017; ĐORDEVIC *et al.*, 2012; FANG *et al.*, 2015), assim o eletrodo de pasta de carbono baseado em 4-nitroanilina imobilizada em sílica gel é um bom sensor para detectar AA.

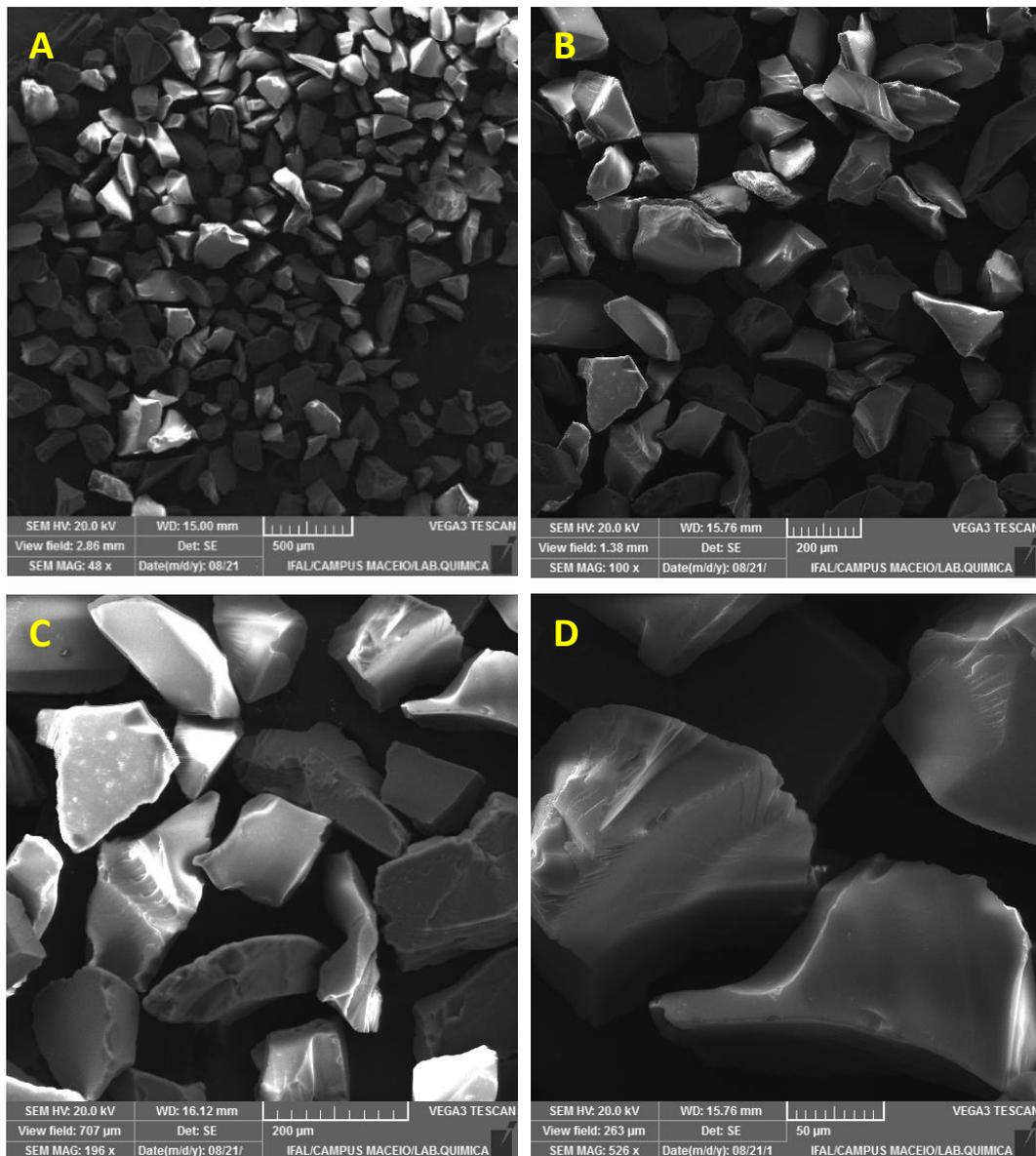
Após a caracterização eletroquímica do eletrodo modificado, outras técnicas foram estrategicamente selecionadas para estudar o comportamento morfológico do sensor desenvolvido.

### **5.3 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Com o objetivo de analisar a morfologia das plataformas e suas respectivas superfícies, foram realizadas observações por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nessa perspectiva, várias micrografias foram efetuadas para cada etapa do processo de modificação do eletrodo. Diferentes ampliações foram utilizadas para que fossem evidenciadas as morfologias de cada região das superfícies modificadas.

Para caracterizar a morfologia da superfície dos filmes SZ, SZ4NA e EPC/MWCNT/SZ4NA algumas imagens foram realizadas com diferentes ampliações. A Figura 28 mostra a imagem MEV com diferentes ampliações para o SZ, é possível notar que o óxido de zircônio está distribuído sobre a superfície do eletrodo de forma homogênea, observa-se também partículas bem definidas e tamanhos uniformes.

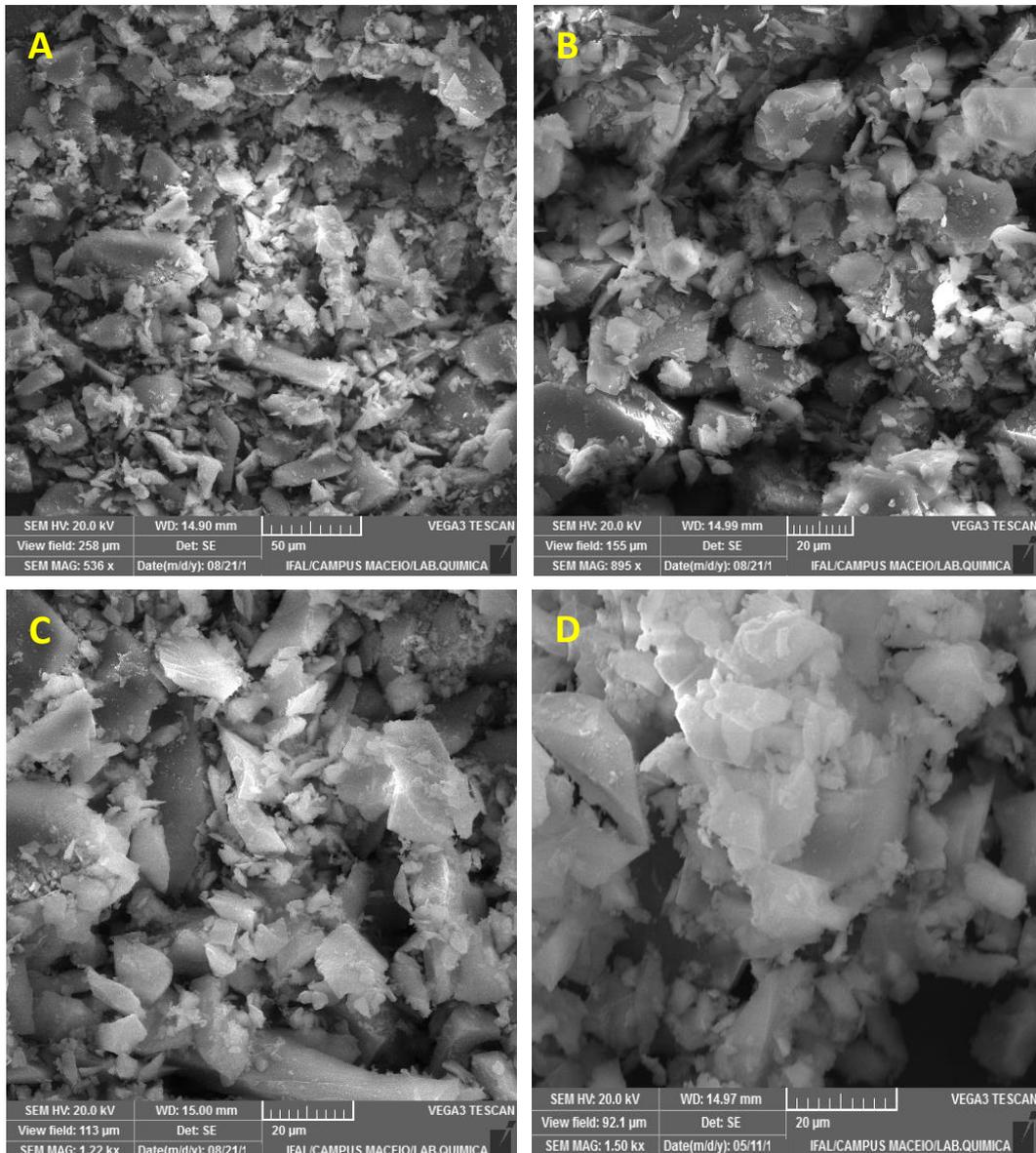
Figura 28 – MEV para sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) com diferentes ampliações: (A) 48x, (B) 100x, (C) 196x e (D) 526x.



Fonte: Autor dessa dissertação, 2019.

A imagem MEV mostra que, dentro da ampliação usada (48X – 526X) (Figura 28 A - D), foi conseguida uma dispersão uniforme das partículas sem aglomerados visíveis na matriz. No entanto, na figura 29 observa-se que as partículas não são bem definidas e existem aglomerados de formação, indicando que 4-NA alterou a morfologia em sílica. É possível notar que a 4-NA está distribuída por toda a extensão do SZ. Para visualização mais detalhada destes aglomerados foi necessária uma grande ampliação (1,50kX).

Figura 29 – MEV para 4-NA adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ4NA) com diferentes ampliações: (A) 536x, (B) 895x, (C) 1.220x e (D) 1.500x.

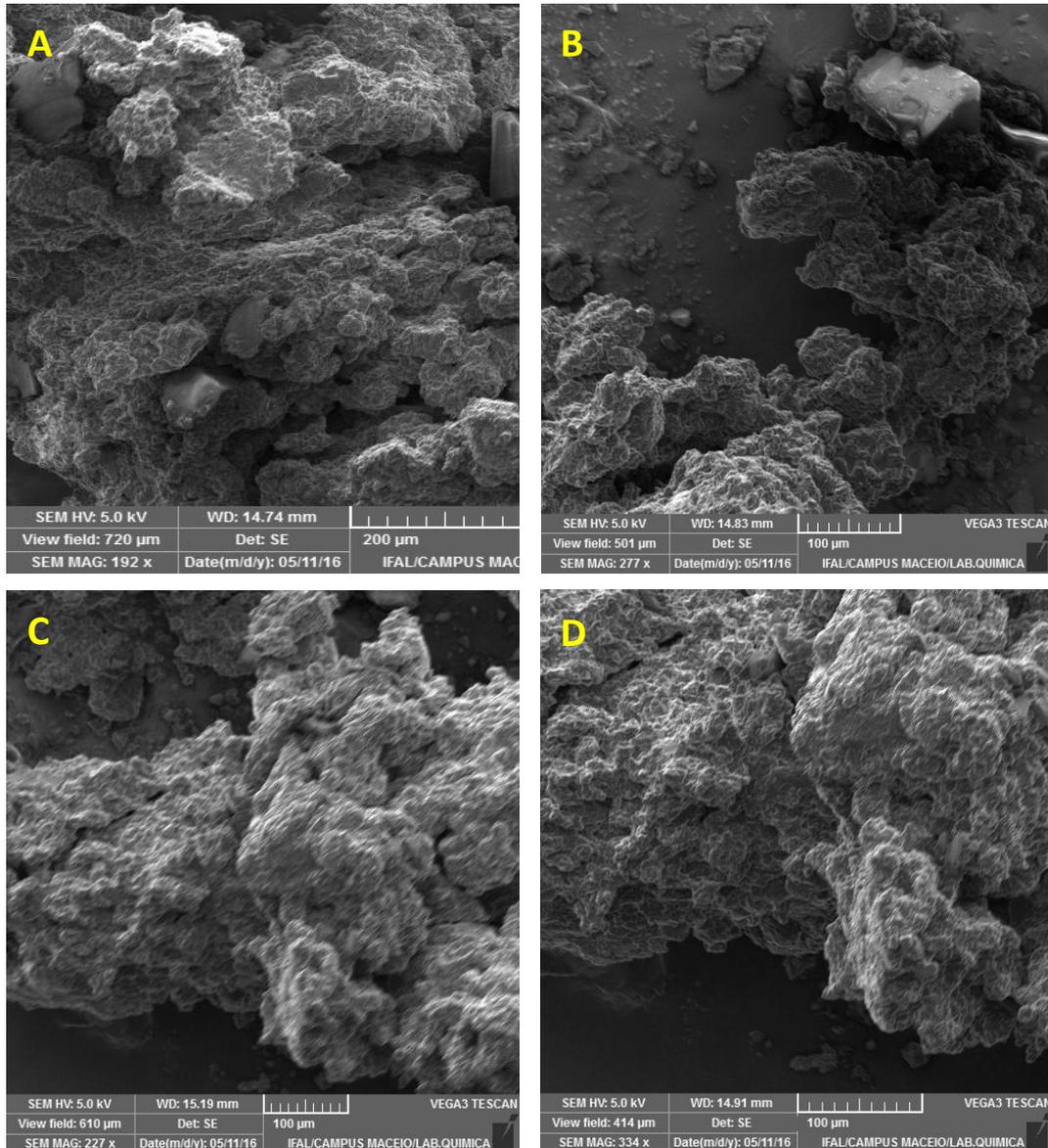


Fonte: Autor dessa dissertação, 2019.

Comparando-se a micrografia anterior com as da Figura 30, que reporta o EPC/MWCNT/SZ4NA observa-se diferenças significativas na morfologia a partir da presença dos nanotubos de carbono, sendo possível perceber a formação mais uniforme quando comparada com a Figura 29, pode ser visto também formas de aglomerações irregulares do material, indicando que o SZ4NA foi preparado com sucesso e revestido uniformemente na superfície do eletrodo. A Figura 30B e 30C

mostra imagens de MEV com a mesma ampliação, mas de regiões diferentes do eletrodo.

Figura 30 – MEV para eletrodo modificado (EPC/MWCNT/SZ4NA) com diferentes ampliações: (A) 192x, (B) 277x, (C) 277x e (D) 334x.



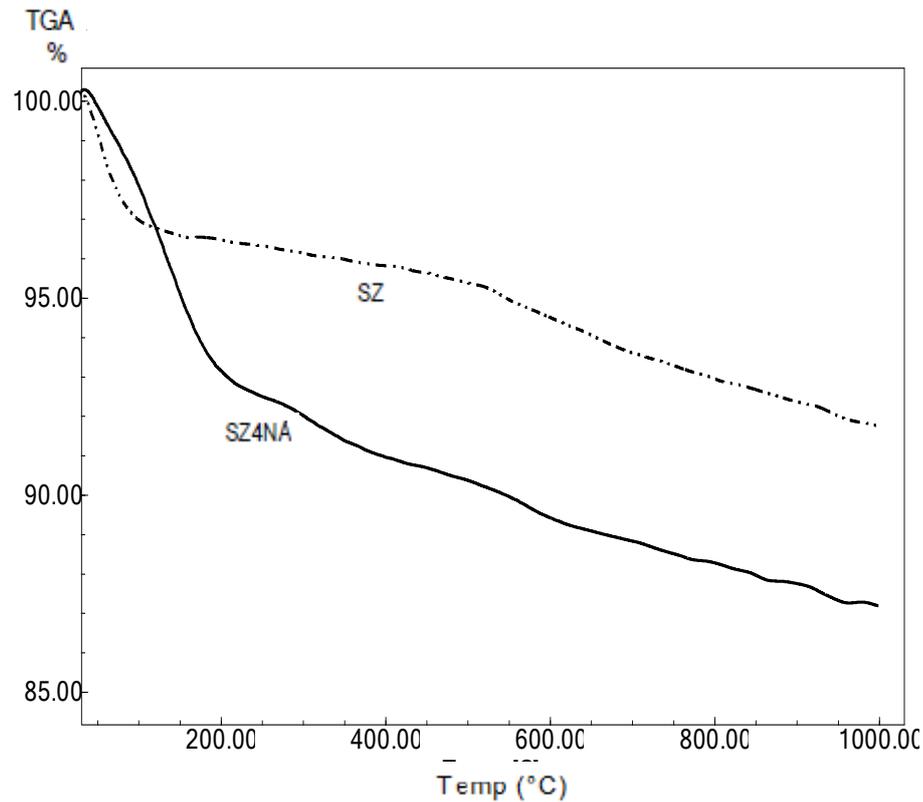
Fonte: Autor dessa dissertação, 2019.

#### 5.4 Caracterização Termogravimétrica

O processo de caracterização via análise termogravimétrica foi realizado com intuito de estudar a estabilidade térmica dos materiais, bem como verificar cada etapa

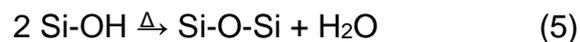
de modificação frente ao perfil de decomposição térmica das matrizes utilizadas na modificação do eletrodo.

**Figura 31 - Medição termogravimétrica para sílica modificada SZ e SZ4NA.**



Fonte: Autor dessa dissertação, 2018.

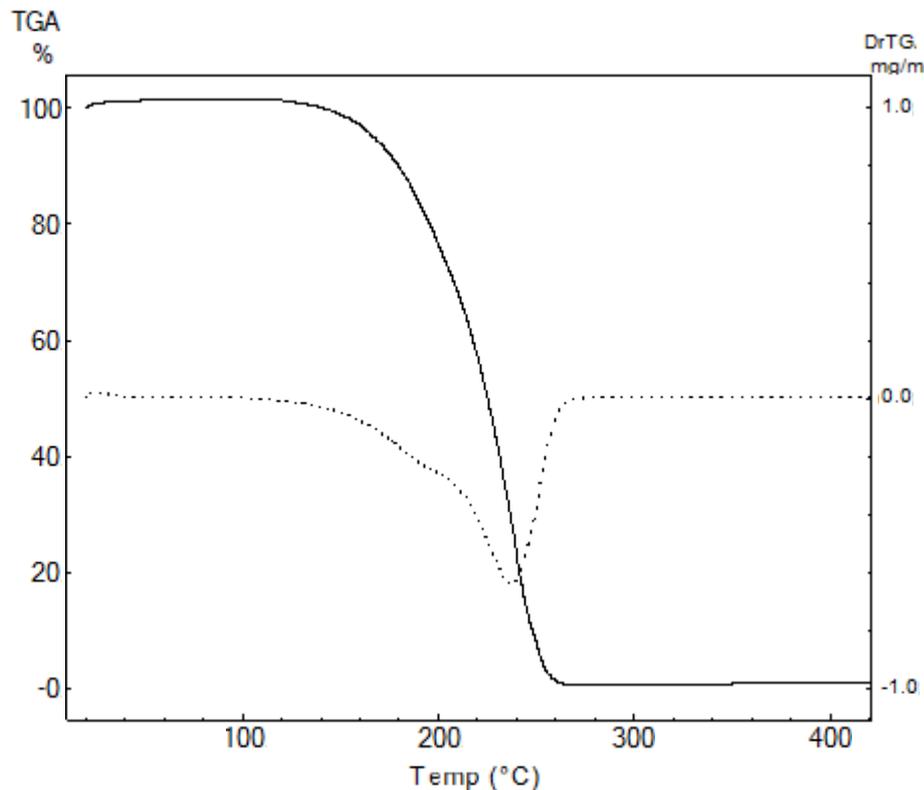
A Figura 31 mostra curvas termogravimétricas (TG) para os nanomateriais SZ e SZ4NA desde a temperatura ambiente até 1000 °C no ar de nitrogênio. Uma perda de massa em SZ a 100 °C pode ser devido à reação de condensação na superfície das nanopartículas de acordo com a seguinte equação:



Resultando na evaporação das moléculas de água produzidas, embora a quantidade de água produzida foi bem menor que a da espécie orgânica (LIU *et al.* 2017).

Uma redução gradual na massa foi registrada para o SZ4NA em torno de 240°C, com uma redução de massa total de 9,70%. Isto pode ser atribuído à decomposição das espécies orgânicas ligadas às superfícies de SiO<sub>2</sub>. Os resíduos foram pó sólidos de SiO<sub>2</sub> produzidos a alta temperatura. Estes dados indicaram que o SZ4NA era composto por cerca de 80-85% de SiO<sub>2</sub>, 5-10% de espécies orgânicas como 4-NA e assim como 1-5% de água. A inserção apresenta um resultado experimental típico de maior perda de massa para o padrão 4-NA em torno de 200°C na curva TG, o que corrobora com a presença de 4-NA na matriz desenvolvida, como pode ser visto na Figura 32, que mostra o perfil térmico do padrão da 4-NA.

**Figura 32 - Medição termogravimétrica para 4-NA pura.**



Fonte: Autor dessa dissertação, 2018.

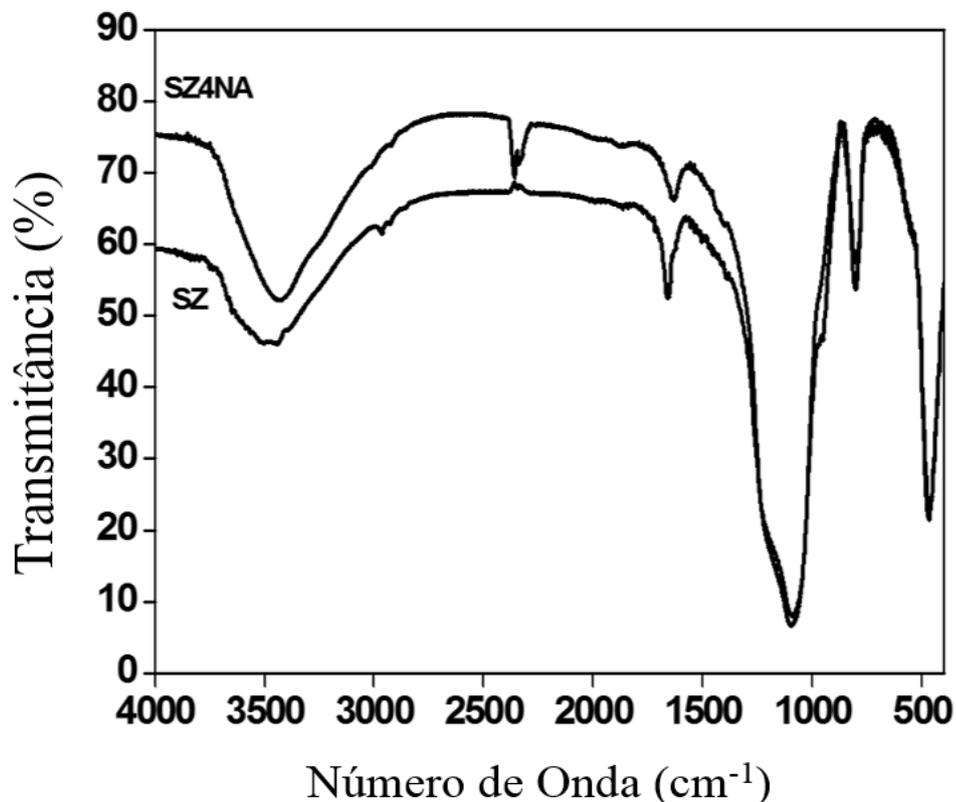
## 5.5 Caracterização por FTIR

Na tentativa de esclarecer ainda mais os componentes presentes nas estruturas de SZ e SZ4NA, optou-se por estudo de espectroscopia no infravermelho com transformada de Forrier (FTIR).

A análise por Infravermelho pode ser aplicada para proporcionar informação relativa aos grupos funcionais que estão presentes em uma determinada molécula. Como as moléculas e suas ligações covalentes entre átomos são propensas a vibrações (alongamento, flexão) a radiação IR incidente leva a um aumento na vibração. Caso ocorra adsorção, uma menor intensidade de IR atinge o detector que resulta em uma banda a esse comprimento de onda específico ou faixa de comprimento de onda (DE MIDDELEER *et al.*, 2016).

Os espectros de FTIR para os nanomateriais SZ e SZ4NA são mostrados na Figura 33. Primeiro, uma banda larga foi registrada na região 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$ , o que poderia ser atribuído aos grupos OH na superfície das partículas de nano- $\text{SiO}_2$  (LIU *et al.* 2017) pode ser devido à água residual e alongamento de Si-OH (FARRINGTON; REGAN, 2009).

Figura 33 - Espectros infravermelhos de SZ e SZ4NA.



Fonte: Autor dessa dissertação, 2018.

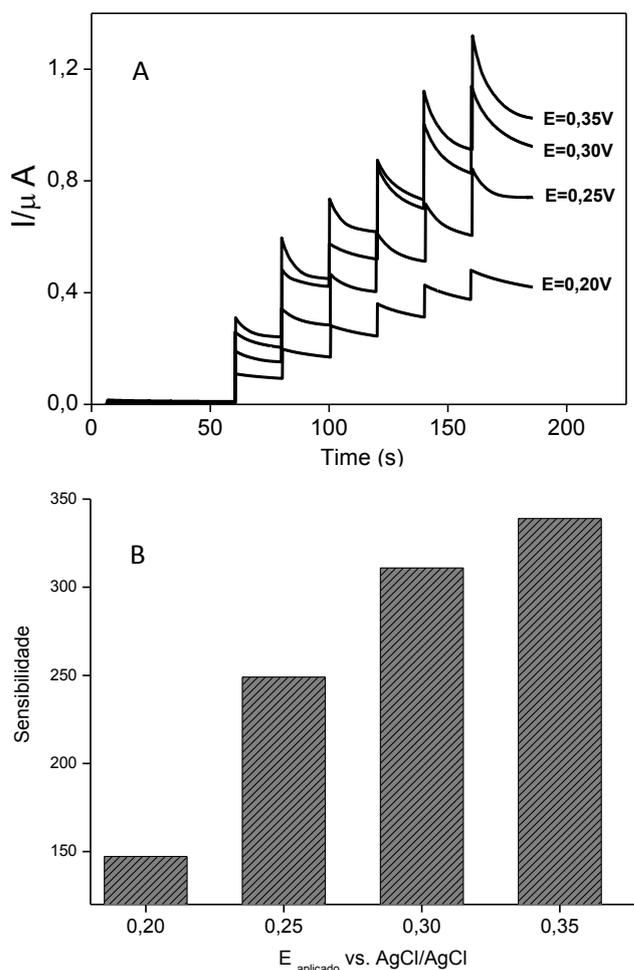
Uma banda forte em torno de 1095  $\text{cm}^{-1}$  é indicativo de banda de alongamento assimétrica de Si-O-Si e faixa de alongamento simétrico de Si-O a 805  $\text{cm}^{-1}$ , bandas

típicas de vibração de materiais de sílica (SHARMA; SHARMA, 2014). Assim, vale a pena notar que não há alterações significativas observadas nas estruturas SZ e SZ4NA, o que mostra que a molécula 4-NA não é observada nos espectros de FTIR.

## 5.6 Medições cronoamperométricas

O método cronoamperométrico foi empregado para a quantificação de AA. Assim, as características do eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-NA ativada foram verificadas e estas análises foram realizadas em tampão fosfato a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0. Vários potenciais foram aplicados (0,20 V, 0,25 V, 0,30 V, 0,35 V) (Figura 34 A).

**Figura 34 – Medidas amperométricas para a eletrooxidação de AA no eletrodo modificado com 4-nitroanilina ativada, obtida em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 na concentração: (A) (1) 0,50 a (6)  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e (B) Sensibilidade vs. potencial**

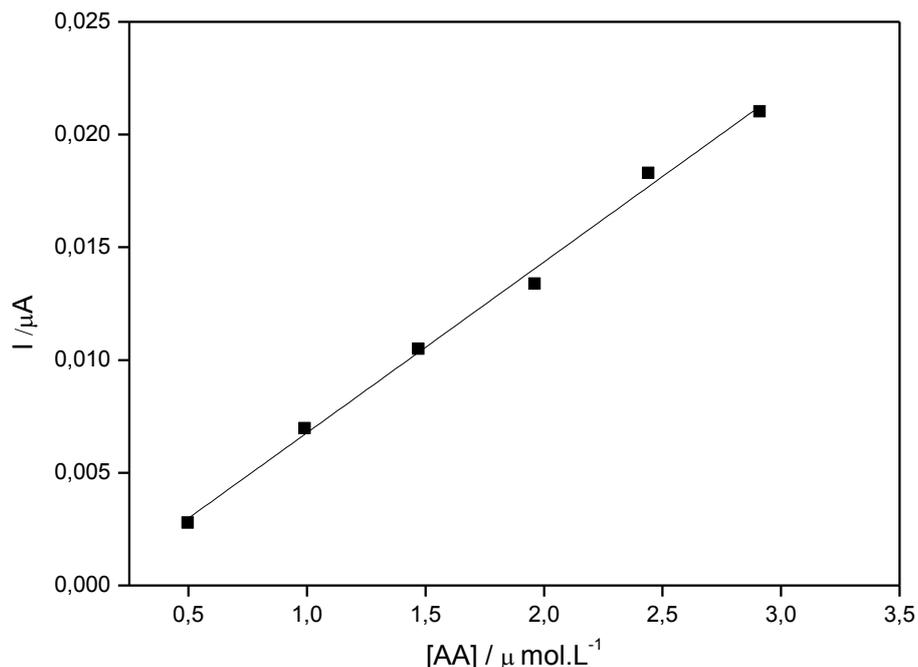


Fonte: Autor dessa dissertação, 2019.

Com o propósito de traçar as figuras de méritos para o sensor desenvolvido, o estudo inicial foi realizado para determinar o melhor potencial a ser aplicado no eletrodo. Como pode ser visto na Figura 34 B a melhor resposta foi registrada a um potencial de 0,3 V vs. Ag/AgCl, confirmando o potencial de investigação anterior com a voltametria cíclica. Para medições amperométricas, o potencial aplicado tem uma influência importante sobre a resposta do sensor, porque o potencial aplicado contribui para a sensibilidade do sistema (SAJID *et al.*, 2016). Além disso, a partir da Figura 34 B, observa-se que a sensibilidade tende a uma estabilização no potencial aplicado de 0,35 V vs. Ag/AgCl. Portanto, como o potencial é uma variável que está relacionada com a seletividade do dispositivo eletroquímico e a variação desta não se mostrou suficiente, optou-se, portanto, para o uso do potencial 0,3 V.

A fim de obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, foram realizados amperogramas para oxidação de AA em diferentes concentrações em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,0, após otimização dos parâmetros experimentais. A curva de calibração foi construída plotando a corrente de pico de oxidação em função da concentração de AA adicionado (Figura 35).

**Figura 35 – Curva analítica para eletrodo modificado EPC/MWCNT/SZ4NA. Potencial aplicado: 0,3 V vs. Ag/AgCl em tampão fosfato a pH 7,0.**



Fonte: Autor dessa dissertação, 2018.

O sensor proposto apresentou um coeficiente de correlação linear de  $R = 0,99472$ , conforme verificado na Figura 35, faixa de resposta linear de 0,50 a 3,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com limite de detecção bastante promissor quando comparado aos relatados na literatura (Tabela 2). Essa boa sensibilidade de 7,60 mA L  $\text{mmol}^{-1}$  pode ser atribuída à eficiência da transferência de elétrons entre a 4-nitroanilina e o AA. Apresentou um limite de detecção de 0,15  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de quantificação foi de 0,48  $\mu\text{mol L}^{-1}$  usando  $10\sigma / \text{slope}$ , onde  $s$  é o desvio padrão do valor médio para 10 amperogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC.

**Tabela 2 - Parâmetros analíticos para detecção de AA em vários eletrodos modificados.**

Plataforma	Método	Faixa Linear ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Ref.
$\mu\text{Au-PEDOT}$	Amperometria	5 - 300	2,5	BELAIDI; BOYER; GROSS, 2010
GCE	Amperometria	10 - 1800	0,5	ZHANG et al., 2013
NiHCF/LDH/Au	Amperometria	100 - 3500	21	WANG et al., 2014
GCPE	Amperometria	176 - 2601	27	DIMITRIJEVIC et al., 2016
GCPE	Amperometria	2,64 - 1500	0,8	ÇEVIK; AKPOLAT; ANIK, 2016
DOPA/MWCNT/GCE	VPD	2,0 – 13,2	0,62	ZARE et al., 2016
GCE/CNO/oAP	Amperometria	0 - 50	0,34	BARTOLOME; FRAGOSO, 2017
GCE	Voltametria	30 - 500	45	MOTSHAKERI et al., 2018
CNTs/CFE	Voltametria	25,6 - 2000	10	ZHAO et al., 2018
EPC	Amperometria	0,5 - 30	0,15	Este trabalho

$\mu\text{Au-PEDOT}$ : Microeletrodo de ouro modificado por PEDOT; GCE: eletrodo de carbono vítreo; NiHCF/LDH/Au: Eletrodo de ouro modificado com LDH-NiHCF; GCPE: eletrodo de pasta de carbono vítreo; DOPA/MWCNT/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e L-DOPA; GCE/CNO/oAP: eletrodo de carbono vítreo modificado com orto-aminofenol e CNO; CNTs/CFE: eletrodo de fibra de carbono modificado

com nanotubos de carbono; EPC: eletrodo de pasta de carbono; VPD: Voltametria de pulso diferencial.

Na maioria das estratégias de modificação da superfície de eletrodos apresentados na tabela 2, o supracitado eletrodo de carbono vítreo apresenta algumas desvantagens como, elevado valor quando comparado ao eletrodo de pasta de carbono (EPC), não podem ser renovadas em caso de vazamento, contaminação ou passivação e muitas vezes a limpeza da superfície do eletrodo são laboriosas. Estas comparações podem mostrar como o sensor proposto neste trabalho pode ser uma alternativa promissora na detecção de AA.

### 5.7 Aplicação em amostras reais

Para verificar o desempenho do sensor eletroquímico desenvolvido, o mesmo foi aplicado em três amostras de suco de laranja *in natura* para detecção e quantificação de AA. As três amostras de suco de laranja foram da variedade *Citrus limettioides*, o procedimento foi realizado em triplicata, utilizando o método de adição padrão.

Para a realização do método de adição de padrão foi utilizado AA adquirido da Sigma Aldrich, preparando-se uma solução padrão de (0,01 M). Em seguida, retirou-se 1,0 mL de suco de laranja em tampão fosfato a 0,1 mol L<sup>-1</sup> preparado anteriormente, como amostra inicial. Neste sentido, foi adicionada à célula eletroquímica uma alíquota de 50 µL da amostra de suco de laranja diluído. Após obtenção do sinal analítico da referida amostra, foram adicionadas cinco (5) alíquotas sucessivas de 50 µL do padrão de AA 100 µmol L<sup>-1</sup>, e, portanto, novos sinais analíticos foram obtidos e usados para determinação de AA na amostra.

Os valores das análises eletroquímicas encontrados foram comparados com os obtidos seguindo o procedimento de ensaio preconizado pelo Instituto Adolf Lutz, usando o método de titulação iodométrica (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008) (Tabela 3).

**Tabela 3 - Determinação do ácido ascórbico em três amostras de suco de laranja *in natura* (n = 3).**

Amostra	Este método (mg kg <sup>-1</sup> )	Ensaio de titulometria (mg kg <sup>-1</sup> )
Amostra 1	131,0 ± 2,0	132.0 ± 2,1
Amostra 2	130,0 ± 2,1	132.7 ± 2,2
Amostra 3	131,0 ± 2,0	130.2 ± 2,0

P<0.0002

Um ponto importante quando comparamos os dois métodos na determinação de AA é o gasto e descarte de reagentes na titulação iodométrica, que utiliza ácido sulfúrico, iodo e amido todas as vezes que uma nova análise é requisitada, outra desvantagem é o tempo gasto no processo de determinação. Os resultados obtidos para o ácido ascórbico pelo ensaio titulométrico comparados com o proposto, sugerem que o método desenvolvido neste trabalho é muito eficiente para determinação de AA em baixos níveis de concentração, demonstrando ser sensível, preciso e rápido.

## 6. CONCLUSÃO

A 4-nitroanilina imobilizada sobre óxido de zircônio na superfície da sílica gel foi sintetizada com sucesso, o eletrodo modificado com 4-NA quando submetido a uma redução preliminar do grupo nitro promove a formação do par redox R-NHOH/R-NO na superfície, sendo uma alternativa promissora para a determinação eletroanalítica de AA em amostra de suco de laranja.

O desenvolvimento de sensores para avaliação da vitamina C é vital, dada a substancial importância e presença deste analito chave em alimentos, plantas, indústrias e fluidos biológicos, com implicações na saúde humana e qualidade dos alimentos. Este trabalho demonstra que o presente eletrodo modificado EPC/MWCNT/SZ4NA é sensível e útil para a rápida determinação de AA em suco de laranja, devido ao seu baixo limite de detecção e efeito catalítico. Ele abre a possibilidade para outras aplicações importantes e para estudos em várias amostras de alimentos.

Assim, o sistema desenvolvido neste trabalho apresenta avanços quando comparado a outros reportados na literatura, com a diminuição do potencial aplicado 0,3 V, limite de detecção (LD), quantificação (LQ) e sensibilidade de 0,15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0,48  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 7,60  $\text{mA L mmol}^{-1}$ , respectivamente.

## **7. PERSPECTIVAS**

- 1) Realizar estudos de possíveis interferentes.
- 2) Aplicar o sensor desenvolvido em várias amostras de alimentos, como suplementos alimentares, sucos de frutas (caju, acerola, limão, tangerina) entre outros.
- 3) Escrever um artigo com os dados obtidos nesta dissertação.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1576, 1958.
- AHMAD, O. S. et al. Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 1-16, 2018.
- AKRAM, A. N.; SHAFIQ, F.; ASHRAF, M. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**. V. 8, p. 1-17, 2017.
- ANNU, A. et al. Carbon nanotube using spray pyrolysis: Recent scenario. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 691, p. 970-982, 2017.
- BARD, A. J., FAULKNER, L. R. Electrochemical methods, fundamentals and applications. 2 nd ed. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 833 p., 2001.
- BARSAN, M. M.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 881, p. 1-23, 2015.
- BARTOLOME, J. P.; FRAGOSO, A. Electrochemical detection of nitrite and ascorbic acid at glassy carbon electrodes modified with carbon nano-onions bearing electroactive moieties. **Inorganica Chimica Acta**, v. 468, p. 223–231, 2017.
- BEITOLLAHI, H.; MOHAMMADI, S. Voltammetric determination of ascorbic acid in the presence of acetaminophen and tryptophan using an improved carbon nanotube paste electrode. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, p. 1098-1104, 2013.
- BELAIDI, F. S.; BOYER, P. T.; GROS, P. Voltammetric microsensor using PEDOT-modified gold electrode for the simultaneous assay of ascorbic and uric acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 647, p. 159–168, 2010.
- BRITTO, P. J.; SANTHANAM, K. S. V.; AJAYAN, P. M. Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, p. 121-125, 1996.
- CAPELETTI, L. B. et al. Chemically modified silica-based sensors: Effect of the nature of organosilane. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 282, p. 798-808, 2019.
- ÇEVIK, S.; AKPOLAT, O.; ANIK, Ü. Ascorbic Acid Detection with MnO<sub>2</sub>-Modified GCPE. **Food Anal. Methods**, p. 500–504, 2016.
- CHAKRABORTY, S.; RAJ, C. R. Mediated electrocatalytic oxidation of bioanalytes and biosensing of glutamate using functionalized multiwall carbon nanotubes-biopolymer nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 609, p. 155-162, 2007.
- CIOBANU, M. et al. 1 - Fundamentals. **Handbook of Electrochemistry**, p. 3-11, 2007.

CIUCU, A. A. Chemically modified electrodes in biosensing. **J. Biosens Bioelectron**, v. 5, p. 1-10, 2014.

DE MIDDELEER, G.; DUBRUEL, P.; DE SAEGER, S. Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current-state-of-the-art. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 71-85, 2016.

DIMITRIJEVIC, T. et al. Amperometric ascorbic acid sensor based on doped ferrites nanoparticles modified glassy carbon paste electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 504 p. 20-26, 2016.

DINGA, L. et al. Copolymerization of aniline with m-nitroaniline and removal of m-nitroaniline from aqueous solutions using a polyaniline-modified electrode: A comparative study. **Electrochimica Acta**, v. 77, p. 302–308, 2012.

ÐORDEVIC, J. S. et al. Glassy carbon and boron doped glassy carbon electrodes for voltammetric determination of linuron herbicide in the selected samples. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1271-1279, 2012.

DU, J.; CULLEN, J. J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of câncer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1826, p. 443-457, 2012.

DUMITRESCU, I; UNWIN, P. R.; MACPHERSON, J. V. Electrochemistry at carbon nanotubes: perspective and issues. **Chemical Communications**, v. 7345, p. 6886-6901, 2009.

EDWARDS, G. A.; BERGREN, A. J.; PORTER, M. D. Chemically Modified Electrodes. **Handbook of Electrochemistry**, [s.l: s.n.]. p. 295-327, 2007.

EIFF, J.; MONAKHOVA, Y. B.; DIEHL, B. W. Multicomponent Analysis of Fat- and Water-Soluble Vitamins and Auxiliary Substances in Multivitamin Preparations by qNMR. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 63, p. 3135–3143, 2015.

ERGÜN, E. et al. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid and uric acid using poly(glyoxal-bis(2-hydroxyanil)) modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 55-64, 2016.

EVANS, D. H.; O'CONNELL, K. M.; PETERSEN, A. R.; KELLY, M. J. Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, v. 60, n. 4, p. 290, 1983.

FANG, Y. et al. Preparation in-situ of carbon nanotubes/polyaniline modified electrode and application for ascorbic acid detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 755, p. 39-46, 2015.

FARRINGTON, K.; REGAN, F. Molecularly imprinted sol gel for ibuprofen: An analytical study of the factors influencing selectivity. **Talanta**, v. 78, p. 653–659, 2009.

FERREIRA, A. A. P. et al. Eletrodo de pasta de carbono em minicavidade de contato sólido. *Ecl. Quím.*, v. 36, p. 183-204, 2011.

GHANBARI, Kh.; HAJHEIDARI, N. ZnO-CuxO/polypyrrole nanocomposite modified electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Analytical Biochem.*, v. 473, p. 53-62, 2015.

GHOSH, K. et al. Pore size engineering in fluorinated surfactant templated mesoporous silica powders through supercritical carbon dioxide processing. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 113, p. 106-113, 2008.

GREEF, R., PEAT, R., PETER, L.M., PLETCHER, D., ROBINSON, J. Instrumental Methods in electrochemistry. 1ed., Ed. Ellis Horwood Limited. p. 42 – 75, 1985.

GUSHIKEM, Y.; ROSATTO, S. S. Metal Oxide Thin Films Grafted on Silica Gel Surfaces: Recent Advances on the Analytical Application of these Materials. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 12, p. 695 – 705, 2001.

HAMMERICH, O. et al. Organic Electrochemistry Revised and Expanded, 5th ed., Florida: CRC Press, 2015.

HSU, S. C. et al. Electrochemical Sensor Constructed Using a Carbon Paste Electrode Modified with Mesoporous Silica Encapsulating PANI Chains Decorated with GNPs for Detection of Ascorbic Acid. *Electrochimica Acta*, v 238, p. 246-256, 2017.

JAL, P. K.; PATEL, S.; MISHRA, B. K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Talanta*, v. 62, p. 1005-1028, 2004.

JAL, P. K. et al. Extraction of metal ions using chemically modified silica gel: a PIXE analysis. *Talanta*, v. 55, p. 233-240, 2001.

JBARAH, A. A.; HOLZE, M. Comparative spectroelectrochemical study of the redox electrochemistry of nitroanilines. *J. Solid State Electrochemistry*, v. 10, p. 360–372, 2006.

JUSTINO, C. I. L. et al. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, p. 1172-1183, 2010.

KILMARTIN, P. A.; MARTINEZ, A.; BARTLETT, P. N.; Polyaniline-based microelectrodes for sensing ascorbic acid in beverages. *Current Applied Physics*, v. 8, p. 320-323, 2008.

KINGSLEY, M. P.; DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. S. Simultaneous electro-catalytic oxidative determination of ascorbic acid and folic acid using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 741, p. 71–79, 2015.

KOOSHKI, M.; SHAMS, E. Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid on carbon paste electrode modified with titanium phosphated silica gel. **Analytica Chimica Acta**, v. 587, p. 110-115, 2007.

KUIPER, C.; VISSERS, M. C. M. Ascorbate as a co-factor for Fe-and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 1-10, 2014.

KUKOC, M. L.; BIOCIC, M.; RADIC, N. Indirect method for spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations with 2,4,6-tripyridyl-s-triazine by flow-injection analysis. **Talanta**, v. 96, p. 174–179, 2012.

LIMA, P. R. et al. Modified Carbon Paste Electrode for Kinetic Investigation and Simultaneous Determination of Ascorbic and Uric Acids. **Electroanalysis**, v. 21, p. 2311 – 2320, 2009.

LIN, K. C.; YEH, P. C.; CHEN, S. M. Electrochemical determination of ascorbic acid using poly(xanthurenic acid) and multi-walled carbon nanotubes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 12752-12763, 2012.

LIU, H. et al. Plasma-assisted synthesis of carbon fibers/ZnO core–shell hybrids on carbon fiber templates for detection of ascorbic acid and uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 857-862, 2016.

LIU, J. et al. Fabrication, electrochemical and electrocatalytic properties of carbon nanotube@nano-SiO<sub>2</sub>BenV/phosphomolybdic acid polynary nanocomposite materials. **Applied Surface Science**, v. 408, p. 68–76, 2017.

LOPES, C. B. et al. Electrocatalytic activity of activated niclosamide on multi-walled carbon nanotubes glassy carbon electrode toward NADH oxidation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v, 19, p 2819–2829, 2015.

LOURENÇÃO, B.C. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São Carlos, 2009.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, p. 1318-1325, 2006.

MACKNIGHT, R. C. et al. Increasing ascorbate levels in crops to enhance human nutrition and plant abiotic stress tolerance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 153-160, 2017.

MASA, J.; SCHUHMANN, W. Electrocatalysis and bioelectrocatalysis - Distinction without a difference. **Nano Energy**, v. 29, p. 466-475, 2016.

MASTRANGELO, D. et al. Mechanisms of anti-cancer effects of ascorbate: Cytotoxic activity and epigenetic modulation. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 69, p. 57-64, 2018.

MAZLOUM, H. A. et al. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Uric Acid and Tryptophan by Novel Carbon Nanotube Paste Electrode. **Irã J. Pharm. Res.**, v. 17, p. 851-863, 2018.

MAZUREK, A.; JAMROZ, J. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. **Food Chemistry**, v.173, p. 543–550, 2015.

MILLA, D. B. et al. Recent advances in graphite powder-based electrodes. **Analytical Bioanal Chem.**, v. 405, p. 3525–3539, 2013.

MOTSHAKERI, M. et al. Rapid electroanalysis of uric acid and ascorbic acid using a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified sensor with application to milk. **Electrochimica Acta**, v. 265, p. 184-193, 2018.

MUKDASAI, S. et al. Electrodeposition of palladium nanoparticles on porous graphitized carbon monolith modified carbon paste electrode for simultaneous enhanced determination of ascorbic acid and uric acid. **Sensors and Actuators B**, v. 218, p. 280–288, 2015.

NASRI Z.; SHAMS E. Application of silica gel as an effective modifier for the voltammetric determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 7416-7421, 2009.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Appl. Sci. Converg. Technol.**, v. 26, p. 157-163, 2017.

NOROOZIFAR; M.; MOTLAGH, M. K.; TAVAKKOLI, H. Preparation of tetraheptylammonium iodide-iodine graphite-multiwall carbon nanotube paste electrode: electrocatalytic determination of ascorbic acid in pharmaceuticals and foods. **Analytical sciences**, v. 27, p. 929-935, 2011.

OURARI, A. et al. Elaboration of new electrodes with carbon paste containing polystyrene functionalized by pentadentate nickel(II)-Schiff base complex – Application to the electrooxidation reaction of methanol and its aliphatic analogs. **Electrochimica Acta**, v. 170, p. 311-320, 2015.

OZTEKIN, Y. et al. Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper(II). **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 387–395, 2010.

PANICE, et al. Electrochemical properties of the hexacyanoferrate(II)–ruthenium(III) complex immobilized on silica gel surface chemically modified with zirconium(IV) oxide. **Materials Science and Engineering: B**, v. 188, p. 78-83, 2014.

PATAI, Saul (Ed.). **The chemistry of amino, nitroso, nitro, and related groups**. John Wiley & Sons Inc, 1996.

PENG, L. et al. Investigation of the states of water and OH groups on the surface of sílica. **Colloids and Surfaces A: Phys. and Engineering Aspects**, v. 334, p. 112-115, 2009.

PEREIRA, A. C. et al. Development of a Carbon Paste Electrode for Lactate Detection Based on Meldola's Blue Adsorbed on Silica Gel Modified with Niobium Oxide and Lactate Oxidase. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1470-1477, 2011.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, p. 1-15, 2014.

PISOSCHI, A. M.; CHREGI, M. C.; DANET, A. F. Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches **Molecules**, v. 14, p. 480-493, 2009.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; SERBAN, A. I.; FAFANEATA, C. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. **Electrochimica Acta.**, v.121, p. 443– 460, 2014.

PONTIÉ, M. et al., Paracetamol Sensitive Cellulose-Based Electrochemical Sensors. **J. Renew. Mater.**, v. 6, p. 242-250, 2018.

POPA, C. V. et al. Determination of total antioxidant capacity of some fruit juices and noncarbonated soft drinks by a FIA-CL method. **Rev. Chim.**, v. 63, p. 978-983, 2012.

PRADO, A. G. S.; FARIA, E. A.; PADILHA, P. M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. **Quím. Nova**, v. 28, p. 544 - 547, 2005.

PUTCHALA, M. C. et al. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. **Archives of oral biology**, v. 58, p. 563–574, 2013.

RATHEE, K. et al. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **B. and Biophysics Reports**, v. 5, p. 35-54, 2016.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím. Nova**, v. 31, p.164-171, 2008.

RIBEIRO, F. W. P. et al. Sensing of formetanate pesticide in fruits with a boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 142, p. 24-29, 2018.

ROTKO, K. T. et al. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and ascorbic acid using a boron-doped diamond electrode modified with nafion and lead films. **Talanta**, v. 129, p. 384-391, 2014.

SAJID, M. et al. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 15-29, 2016.

SANTHIAGO, M. et al. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v. 54 p. 6609-6616, 2009.

SANTHIAGO, M. et al. An amperometric sensor for L-cysteine based on nanostructured platform modified with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, p. 213-220, 2010.

SASSYKOVA, L. R. et al. Studying the Mechanisms of Nitro Compounds Reduction (A-Review). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 35, p. 22-38, 2019.

SEEBER, R. et al. Amperometric sensing. A melting pot for material, electrochemical, and analytical sciences. **Electrochimica Acta**, v. 179, p. 350-363, 2015.

SHAMS, E. et al. Voltammetric determination of dopamine at a zirconium phosphated silica gel modified carbon paste electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 75, p. 83-88, 2009.

SHARMA, R. K.; SHARMA, S. Silica nanosphere-supported palladium(II) furfural complex as a highly efficient and recyclable catalyst for oxidative amination of aldehydes. *Dalton Trans.*, v. 43, p. 1292–1304, 2014.

SHARMA, S. et al. A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 107, p. 76-93, 2018.

SIARA, L. R. et al. Electrochemically pretreated zeolite-modified carbon-paste electrodes for determination of linuron in an agricultural formulation and water. **Electrochimica Acta**, v.151, p. 609-618, 2015.

SILVA, C. F. N. et al. Adsorption of a copper (II) complex on calcium phosphate intercalated with 4-aminobenzoic acid – synthesis and electrochemical investigation. *Química Nova*, v. 36, p. 1170-1175, 2013.

SILVA, L. V. et al. Phenol based redox mediators in electroanalysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 827, p. 230-252, 2018.

SILVA, L. V. et al. Amperometric sensor based on carbon nanotubes and electropolymerized vanilic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, p. 1-5, 2016.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v 20, p. 191-195, 1997.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Quim. Nova**, Vol. 28, p. 1087-1101, 2005.

TASHKHOURIAN J.; NAMI-ANA S. F. A sensitive electrochemical sensor for determination of gallic acid based on SiO<sub>2</sub> nanoparticle modified carbon paste electrode. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 103-110, 2015.

THIAGARAJAN, S.; TSAI, T. H.; CHEN, S. M. Easy modification of glassy carbon electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 2712-2715, 2009.

TROESCH, B. et al. Dietary surveys indicate vitamin intakes below recommendations are common in representative Western countries. **British Journal of Nutrition**, v 108, p. 692-698, 2012.

VYTRAS, K.; SVANCARA, I.; METELKA, R. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. **J Serb Chem Soc**, v. 74, p. 1021–1033, 2009.

WANG, J. Analytical Electrochemistry. 2ed., Ed. Wiley-VCH, p. 28 - 39, 2001.

WANG, Y. et al. Electrodeposition of nickel hexacyanoferrate/layered double hydroxide hybrid film on the gold electrode and its application in the electroanalysis of ascorbic acid. **Electrochimica Acta**, v. 117, p. 398-404, 2014.

WONG, A. **Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2010.

XIA, W. et al. A highly efficient gas-phase route for the oxygen functionalization of carbon nanotubes based on nitric acid vapor. **Carbon**, v. 47, p. 919-922, 2009.

YAMASHITA, M.; PESSÔA C. A.; KUBOTA L. T. Electrochemical behavior of pyrroloquinoline quinone immobilized on silica gel modified with zirconium oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 99–105, 2003.

YANG, B. et al. Frontiers in highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensors: Challenges and strategies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 52-67, 2018.

YANG, C. et al. Carbon Nanotubes Grown on Metal Microelectrodes for the Detection of Dopamine. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 645–652, 2016.

YU, Z. et al. Hydrothermal synthesis of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/graphene nanocomposite for selective determination of ascorbic acid in the presence of uric acid. **Electrochim. Acta**, v. 158, p. 264-270, 2015.

ZARE, H. R. et al. Application of L-DOPA modified carbon nanotubes as a bifunctional electrocatalyst for simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline, acetaminophen and tyrosine. **Measurement**, v. 90, p. 510-518, 2016.

ZAVAR, M. H. A. et al. Electrochemical behavior of para-nitroaniline at a new synthetic crown ether-silver nanoparticle modified carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 4, 953-958, 2012.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4<sup>a</sup> ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHANG, L. et al. Simultaneously electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using glassy carbon electrode modified with chrysanthemum-like titanium nitride. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 803, p. 11-18, 2017.

ZHANG, A.; LIEBER, C. M. Nano-Bioelectronics. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 215–257, 2016.

ZHANG, X. et al. An electrochemical biosensor for ascorbic acid based on carbon-supported PdNin nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 183-190, 2013.

ZHAO, Y. et al. Carbon Nanotube/Carbon Fiber Electrodes via Chemical Vapor Deposition for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, p. 1-24, 2018.