



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TÂNIA REGINA SILVA

**SENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO POR FILME
ORGÂNICO IÔNICO PARA A DETECÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS**

Florianópolis – SC

2014

TÂNIA REGINA SILVA

**SENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO POR FILME
ORGÂNICO IÔNICO PARA A DETECÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Tânia Regina

Sensor eletroquímico constituído por filme orgânico iônico
para a detecção de compostos fenólicos / Tânia Regina Silva
; orientador, Iolanda Cruz Vieira - Florianópolis, SC, 2014.
56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Sensores eletroquímicos. 3. Compostos
fenólicos. 4. Filme orgânico iônico. 5. Ácido cafeico. I.
Cruz Vieira, Iolanda. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

TÂNIA REGINA SILVA

**SENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO POR FILME
ORGÂNICO IÔNICO PARA A DETECÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

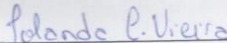
Florianópolis, 25 de fevereiro de 2014.



Prof. Dr. Hugo Gallardo

Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

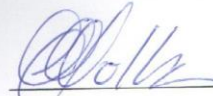


Prof.ª Dr.ª Iolanda Cruz Vieira


Orientadora



Prof. Dr. Almir Spinelli



Prof.ª Dr.ª Carmen Maria
Olivera Müller



Prof. Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira

*Dedico este trabalho ao meu amor e amigo
Henrique Conceição por todo seu carinho,
paciência e apoio nos momentos em que mais
precisei.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela dádiva da vida;
Aos meus pais Jaime e Conceição que mesmo com toda simplicidade sempre me incentivaram a seguir em frente e contribuíram para todas as minhas conquistas;
Às minhas queridas irmãs: Virgínia, Marion, Ana Lúcia e Angela e a toda minha família pelo carinho e apoio;
Ao meu cunhado Dr. Marcelo Alexandre por me incentivar a seguir esta profissão e por importante ajuda principalmente durante a minha graduação.
Ao meu namorado Henrique por todo amor, companheirismo e amizade;
À minha família de coração: Cida, Valdir, Mariana e Beatriz pelo carinho, importantes conselhos e por estarem sempre presentes;
À Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira pela orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho;
Ao Prof. Dr. Hugo Gallardo e, em especial, ao Dr. Eduard Westphal pela síntese e caracterização dos compostos orgânicos, bem como pela importante contribuição no desenvolvimento desse trabalho em colaboração;
Aos meus amigos do Laboratório de Biossensores (LaBios): Daniela, Eduardo, Cristiano, Jéssica, Suellen, Patrícia, Nicolas, Matheus e Marcos, pelo companheirismo e ajuda sempre que precisei;
Aos meus queridos amigos: Edson, Deivid e Priscila por tornarem os dias mais divertidos e os almoços do RU mais suportáveis;
À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica;
A secretaria da PPGQMC pela disposição e ajuda sempre que precisei.
Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC), pelas análises de microscopia;
Aos professores: Dr. Almir Spinelli, Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira e Dr.^a Carmen Maria Olivera Müller, por aceitarem participar da banca examinadora;
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico baseado em filme orgânico iônico para a determinação de compostos fenólicos totais em extratos de erva-mate obtidos a partir de amostras comerciais, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). A molécula iônica anfifílica, iodeto de 1-metil-4-(4-decicloxifeniletinil)piridínio (10Pyl), que apresenta propriedades líquido-cristalinas, foi aplicada na forma de filme sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE), dando origem ao novo sensor GCE/10Pyl. A partir da avaliação de compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina e quercetina), o sensor mostrou maior sensibilidade ao ácido cafeico, sendo este composto selecionado como padrão para a otimização do sensor e aplicação analítica. Sob as condições ótimas de trabalho estabelecidas ($[10Pyl] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; tampão fosfato $(0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0); frequência 100 Hz; amplitude de pulso 60 mV e incremento de varredura 5,0 mV), a curva de calibração apresentou duas regiões lineares distintas, a primeira de $9,9 \times 10^{-7}$ a $3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e a segunda de $4,7 \times 10^{-5}$ a $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os limites de detecção para o ácido cafeico nessas faixas foram de $9,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $8,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O sensor GCE/10Pyl demonstrou excelentes reprodutibilidade (RSD = 2,8%) e repetibilidade (RSD = 4,8%). A determinação de compostos fenólicos totais nos extratos de erva-mate utilizando o sensor desenvolvido apresentou erro relativo inferior a 1,5% e uma ótima correlação com o método espectrofotométrico de referência (Folin-Ciocalteu). Portanto, o sensor proposto representa uma ferramenta útil para a detecção rápida e com exatidão adequada de compostos fenólicos totais em extratos de amostras comerciais de erva-mate, podendo ser avaliado também para aplicação em outras amostras.

Palavras-Chave: Sensor. Filme orgânico iônico. Composto fenólico. Ácido cafeico.

ABSTRACT

This work describes the development of a new electrochemical sensor based on ionic organic film for the determination of total phenolic compounds in extracts of mate herb obtained from the commercial samples using the technique of square-wave voltammetry (SWV). The amphiphilic ionic molecule, 4-[(4-decyloxyphenyl)-ethynyl]-1-methylpyridinium iodide (10PyI), which has liquid-crystalline properties, was applied in the film form on the surface of glassy carbon electrode (GCE), giving rise to new GCE/10PyI sensor. From the evaluation of phenolic compounds (caffeic acid, ferulic acid, rutin and quercetin), the sensor showed higher sensitivity to caffeic acid. Therefore, this compound was selected as standard for the optimization of the sensor and analytical application. Under the optimum conditions established ($[10\text{PyI}] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; phosphate buffer (0.1 mol L^{-1} ; pH 2.0); frequency 100 Hz; pulse amplitude 60 mV and scan increment 5.0 mV), the calibration curve showed two linear ranges: 9.9×10^{-7} to $3.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and 4.7×10^{-5} to $9.9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ caffeic acid with detection limits of $9.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and $8.9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. The GCE/10PyI sensor demonstrated excellent reproducibility (RSD = 2.8%) and repeatability (RSD = 4.8%). The determination of total phenolic compounds in extracts of mate herb using the proposed sensor showed a relative error less than 1.5% and a good correlation with the spectrophotometric reference method (Folin-Ciocalteu). Therefore, the proposed sensor represents a useful tool for the rapid and accurate detection of total phenolic compounds in extracts of mate herb commercial samples and may also be evaluated for application in other samples.

Keywords: Sensor. Ionic organic film. Phenolic compound. Caffeic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Configuração de um sensor eletroquímico, representando a organização dos seus componentes. (A) Elemento de reconhecimento (receptor). (B) Conversão do sinal (transdutor). (C) Unidade de amplificação e processamento do sinal. (D) Sinal observado.	16
Figura 2. Esquema ilustrativo de exemplos de organizações micelares em mesofases liotrópicas.....	21
Figura 3. Esquema representativo de cristais líquidos termotrópicos do tipo: (A) Calamítico. (B) Discótico.	21
Figura 4. Estrutura básica do esqueleto flavonóide.....	23
Figura 5. (A) Estrutura base do esqueleto das duas classes de ácidos fenólicos. (B) estrutura química do ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenóico (ácido cafeico).	24
Figura 6. Estrutura química da molécula iodeto de 1-metil-4-(4-decicloxifeniletinil)piridínio (10Pyl).....	31
Figura 7. (A) Representação esquemática da reação de oxirredução do ácido cafeico a sua respectiva quinona, na superfície do sensor GCE/10Pyl. (B) Esquema ilustrativo da organização das moléculas 10Pyl na superfície do sensor.	32
Figura 8. Imagens morfológicas das superfícies de: (A) GCE. (B) Sensor GCE/10Pyl. Imagens de SEM-FEG obtidas utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV e ampliação de 10.000x.....	33
Figura 9. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) utilizando como eletrodo de trabalho: (a) GCE; (b) GCE/10Pyl. (B) Resposta relativa (%).	34
Figura 10. Influência da concentração de 10Pyl na resposta analítica do sensor proposto em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) utilizando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	36
Figura 11. (A) Voltamogramas de onda quadrada (frequência 100 Hz, amplitude de pulso 60 mV e incremento de potenciais de 5 mV) empregando ácido cafeico $7,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em (a) tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0); (b) tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e (c) HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (B) Resposta relativa (%).	37
Figura 12. (A): Voltamogramas de onda quadrada (frequência 100 Hz, amplitude de pulso 60 mV e incremento de potenciais de 5 mV) empregando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato em: (a) pH 5,0; (b) pH 4,0; (c) pH 3,0; (d) pH 2,0; (e) pH 1,0. (B): (I) Resposta	

relativa (%) para o ácido cafeico em diferentes pH; (II) Deslocamento linear do potencial de pico com a variação do pH.....	39
Figura 13. Representação esquemática da reação de oxirredução da molécula de ácido cafeico.	40
Figura 14. Investigação dos parâmetros de SWV (n = 3) sobre a resposta analítica do sensor proposto empregando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0). (A) Estudo da frequência (10 - 100 Hz); (B) Estudo da amplitude de pulso (10 - 100 mV); (C) Estudo do incremento de potencial (1 - 10 mV).....	41
Figura 15. (A) Voltamogramas de SWV (frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 60 mV e incremento de varredura de 5,0 mV) obtidos utilizando o sensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e soluções de ácido cafeico, nas seguintes concentrações: (b) $9,9 \times 10^{-7}$; (c) $2,9 \times 10^{-6}$; (d) $5,9 \times 10^{-6}$; (e) $9,9 \times 10^{-6}$; (f) $1,9 \times 10^{-5}$; (g) $2,9 \times 10^{-5}$; (h) $3,8 \times 10^{-5}$; (i) $4,7 \times 10^{-5}$; (j) $5,6 \times 10^{-5}$; (k) $6,5 \times 10^{-5}$; (l) $7,4 \times 10^{-5}$; (m) $8,2 \times 10^{-5}$; (n) $9,1 \times 10^{-5}$ e (o) $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração	42
Figura 16. (A) Voltamogramas cíclicos com o sensor proposto (GCE/10Pyl) utilizando ácido cafeico $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) em diferentes velocidades de varredura (20 - 200 mV s^{-1}). (B) i_{pa} e i_{pc} vs. $v^{1/2}$. (C) $\log i_{pa}$ e i_{pc} vs. $\log v$	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resposta relativa do sensor para diferentes compostos fenólicos	35
Tabela 2. Parâmetros da curva de calibração e limites de detecção.	43
Tabela 3. Avaliação de interferentes.	47
Tabela 4. Estudos de recuperação para o ácido cafeico em extratos de erva-mate utilizando o sensor GCE/10Pyl.	48
Tabela 5. Resultados da estimativa do TPT em extratos de erva-mate utilizando o sensor proposto e o método espectrofotométrico de referência	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A** – Área geométrica do eletrodo
a – Amplitude de pulso
Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata/cloreto de prata
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C – Concentração
CL – Cristal líquido
CLL – Cristal líquido liotrópico
CLT – Cristal líquido termotrópico
CV – Voltametria Cíclica (*Cyclic Voltammetry*)
D – Coeficiente de difusão
f - frequência
GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)
GCE/10Pyl – Sensor contendo a molécula 10Pyl
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental
LOD – Limite de detecção (*Limit of detection*)
n – Número de mols de elétrons
RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)
SEM – Microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy*)
SWV – Voltametria de onda quadrada (*Square-wave Voltammetry*)
s – Coeficiente angular ou inclinação (*slope*)
TPT – Teor de polifenóis totais
v – velocidade de varredura
 ΔE_s – Incremento de potenciais
 Δi – Corrente de pico resultante
 σ – Desvio do coeficiente linear ou intercepto
[10Pyl] – Concentração da molécula 10Pyl
10Pyl - Iodeto de 1-metil-4-(4-decicloxifeniletinil)piridíneo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Sensores eletroquímicos: definição e princípio de funcionamento	15
1.2. Modificação da superfície de sensores	16
1.2.1. Adsorção	17
1.2.2. Ligação covalente	18
1.2.3. Filmes poliméricos	19
1.3. Moléculas anfifílicas	19
1.3.1. Cristais líquidos	20
1.4. Compostos fenólicos	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivo específico	27
4. PARTE EXPERIMENTAL	28
4.1. Reagentes e soluções	28
4.2. Instrumentação	28
4.3. Metodologia	29
4.3.1. Construção do sensor	29
4.3.2. Medidas eletroquímicas	29
4.3.3. Preparação dos extratos de erva-mate e determinação de TPT	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Cristal líquido avaliado como modificador	31
5.2. Princípio de funcionamento do sensor proposto	31
5.3. Caracterização morfológica da superfície do sensor	33
5.4. Contribuição do modificador na resposta analítica do sensor	33
5.5. Resposta do sensor para alguns compostos fenólicos	34
5.6. Otimização da construção do sensor e das condições experimentais	36
5.6.1. Efeito da concentração do filme de 10Pyl	36
5.6.2. Estudo da natureza do eletrólito de suporte e pH	37
5.6.3. Estudo dos parâmetros da SWV	40
5.7. Desempenho analítico do sensor GCE/10Pyl	41
5.7.1. Curva de calibração	41
5.7.2. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade	46
5.7.3. Estudo de interferentes	46

5.7.4. Estudos de recuperação e aplicação analítica	47
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sensores eletroquímicos: definição e princípio de funcionamento

Um sensor eletroquímico pode ser definido como um dispositivo de análise utilizado na detecção de uma determinada espécie, em uma amostra de interesse, que combina um componente de reconhecimento químico ou molecular (receptor) com um componente de detecção (transdutor) (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; BARD, 2001; MOUSTY, 2004; CÂMPAS *et al.*, 2008).

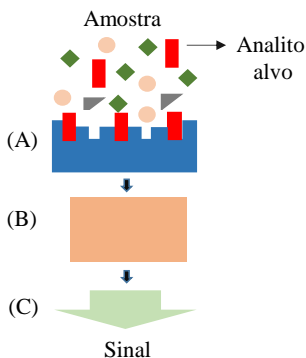
Os sensores eletroquímicos possuem características vantajosas como, por exemplo, a detecção analítica *in situ* e em tempo real, que os distinguem de outros métodos instrumentais como as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, por exemplo. Além disso, esses dispositivos apresentam vantagens relacionadas ao baixo custo, facilidade na construção, portabilidade e possibilidade de miniaturização, o que torna estes dispositivos importantes ferramentas tecnológicas (MURRAY, 1980; ABRUNA *et al.*, 1981; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

O funcionamento destes sensores (Figura 1) baseia-se na interação seletiva do analito com o componente receptor, resultando na alteração de alguma propriedade físico-química, tais como a transferência de elétrons e a variação de massa, por exemplo, que é reconhecida e medida por um transdutor adequado, que converte o sinal referente a interação entre o analito e o receptor em um sinal que pode ser mensurado. Por fim, ocorre a amplificação e o processamento do sinal correspondente à concentração do analito na amostra (MELLO e KUBOTA, 2002; ALFAYA *et al.*, 2008; CÂMPAS *et al.*, 2008).

Nestes dispositivos, a obtenção da informação analítica depende essencialmente das características da sua superfície que está associada ao reconhecimento da espécie de interesse de forma seletiva. Neste sistema de reconhecimento encontra-se o elemento conhecido como receptor, que é o componente responsável pela seletividade/ especificidade dos sensores, sendo capaz de reconhecer, reagir ou ligar-se ao analito, fornecendo uma resposta eletroquímica que poderá ser quantificada. Os receptores podem ser elementos biológicos (por exemplo: enzimas, anticorpos e DNA), os quais são empregados no desenvolvimento de biossensores, ou ainda compostos químicos capazes de tornar o dispositivo mais sensível (por exemplo: polímeros, nanopartículas,

moléculas anfífilas e líquidos iônicos) (MELLO e KUBOTA, 2002; MELLO, 2008; CÂMPAS *et al.*, 2008).

Figura 1. Configuração de um sensor eletroquímico, representando a organização dos seus componentes. (A) Elemento de reconhecimento (receptor). (B) Conversão do sinal (transdutor). (C) Unidade de amplificação e processamento do sinal.



O transdutor é a parte responsável pela conversão do sinal e pode operar baseado em diferentes propriedades físico-químicas, dependendo do tipo de sensor (por exemplo, eletroquímico, óptico, calorimétrico e piezoelétrico). Na construção de sensores que empregam medidas elétricas, o transdutor corresponde ao eletrodo e ao sistema de transdução de sinal, que atua como interface, medindo a mudança física ou química que ocorre na interação entre o analito e o receptor. O sinal gerado é então processado e amplificado pela unidade processadora de sinal e corresponde, proporcionalmente, a concentração do analito na amostra (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002).

1.2. Modificação da superfície de sensores

Os primeiros trabalhos relacionados a modificação da superfície de eletrodos surgiram no início da década de 70, com o objetivo de controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, onde os processos eletroquímicos ocorrem, como uma forma de aumentar a reatividade, seletividade e especificidade do sensor base, podendo

desenvolver novos sensores a partir de substratos como ouro, platina e carbono, por exemplo (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002).

O desenvolvimento e utilização de novos sensores e biossensores representam um importante avanço tecnológico. Cada vez mais, novas técnicas e materiais são empregados para este fim, com o intuito de melhorar a capacidade analítica desses dispositivos, tornando-os altamente seletivos para inúmeros tipos de analitos, o que permite a aplicação desses sensores em diversas áreas, tais como na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica, no monitoramento ambiental, nos laboratórios de análises clínicas, entre outras (MELLO e KUBOTA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; CÂMPAS *et al.*, 2008).

Os sensores modificados são compostos pelo eletrodo base e pelo modificador químico. A escolha do material do eletrodo base é um aspecto importante no desenvolvimento de eletrodos modificados, pois o substrato escolhido (ouro, platina, carbono vítreo, pasta de carbono) deve apresentar características eletroquímicas apropriadas como, por exemplo, boa condutividade elétrica, estabilidade térmica e química e biocompatibilidade. A forma como a modificação é realizada, também é importante e depende das características desejáveis do sensor proposto como, por exemplo, aumento na sensibilidade, seletividade, estabilidade e reatividade (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002).

De forma geral, os métodos mais empregados para a incorporação do agente modificador sobre o eletrodo base consiste em adsorção, ligação covalente, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com adição de modificadores (MURRAY *et al.*, 1987; VIDAL *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 2011).

1.2.1. Adsorção

A adsorção representa a maneira mais simples e amplamente utilizada de modificar a superfície de eletrodos. O método se baseia na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição da superfície do eletrodo a esta solução, a qual pode ser feita por imersão do eletrodo na solução ou por transferência de um volume conhecido da solução (gotejamento) para o eletrodo. A adsorção ocorre quando o solvente é evaporado e o modificador fixa-se sobre o substrato (por exemplo: ouro, carbono ou carbono vítreo) que constitui a superfície do eletrodo (EMR *et al.*, 1995; SOUZA, 1997; ALBAREDA-SIRVENT *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2002; QUINTINO, 2003).

Eletrodos de carbono apresentam uma capacidade particular de adsorver certas substâncias. Na maioria dos casos, é capaz de fixar moléculas que apresentam longas cadeias alifáticas, como polímeros e surfactantes. Esta adsorção ocorre devido as interações de van der Waals entre essas moléculas com características hidrofóbicas e a superfície do eletrodo. Moléculas que apresentam sistemas de elétrons π conjugados, como compostos orgânicos aromáticos, por exemplo, também podem adsorver facilmente sobre a superfície de eletrodos de carbono. Esta adsorção é proveniente da interação entre o plano do eletrodo e o sistema π de elétrons da molécula aromática (IKEDA *et al.*, 1981; MURRAY *et al.*, 1987; SOUZA, 1997; QUINTINO, 2003).

1.2.2. Ligação covalente

A imobilização de agentes modificadores através de ligações covalentes sobre a superfície de eletrodos possibilita a incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes nos modificadores e/ou no substrato do eletrodo (SOUZA, 1997; WINK *et al.*, 1997).

Eletrodos de carbono são muito utilizados para este tipo de incorporação de modificadores, uma vez que, apresentam grupos funcionais (ácidos carboxílicos, anidridos, cetonas e álcoois), gerados a partir de reações de oxigenação da superfície de carbono, que facilitam a ligação covalente de substâncias que possuem em sua estrutura aminas, organossilanos, cloreto de tionila, entre outros. A ligação covalente pode ser também realizada em eletrodos metálicos como, por exemplo, ouro e platina, através de reações de silanização, envolvendo organossilanos e óxidos presentes na superfície do eletrodo (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002).

A formação de monocamadas auto-organizadas sobre eletrodos também é outra forma de imobilizar covalentemente o modificador sobre o substrato. Neste caso, a estrutura da monocamada irá depender fortemente do substrato e da sua morfologia (MANDLER e TURRYAN, 1996; FREIRE *et al.*, 2003). Monocamadas de tióis sobre substratos de ouro são exemplos de modificações covalentes e são muito utilizadas no desenvolvimento de sensores e biossensores (MANDLER e TURRYAN, 1996 CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002; XIA *et al.*, 2013)

1.2.3. Filmes poliméricos

Esta técnica consiste no recobrimento da superfície do eletrodo base com filmes poliméricos, condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e a espécie de interesse, imobilizados por policamadas na superfície do substrato (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002).

Devido às características como eletrocatalise (polímeros eletroativos), propriedades ligantes (polímeros quimicamente ativos) e exclusão de interferentes (polímeros inertes), os filmes poliméricos têm sido amplamente empregados na construção de eletrodos quimicamente modificados, para os mais variados fins, dos quais se destacam a imobilização de biomoléculas (BRONDANI *et al.*, 2013) e a incorporação de mediadores (ZAPP *et al.*, 2013). Neste contexto, filmes condutores são amplamente utilizados, pois aumentam a velocidade de transferência de elétrons, através da superfície modificada. Dentre os materiais condutores mais utilizados encontram-se as moléculas com características anfifílicas (por exemplo, surfactantes) devido à capacidade destes em formar filmes e proporcionar uma maior sensibilidade na detecção (EMR *et al.*, 1995; TROJANOWICZ e KRAWCZNSKI, 1995; MIMICA *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2012).

1.3. Moléculas anfifílicas

Moléculas anfifílicas apresentam em sua estrutura uma pequena parte polar (hidrofílica), que é caracterizada pela presença de cargas (grupos carboxilatos, sulfatos, amônios quaternários, grupos zwitteriônico, entre outros) ou grupos hidrofílicos contendo uma longa cadeia com átomos de oxigênio capazes de estabelecer ligações de hidrogênio, bem como interações dipolares com a água, por exemplo. Além da parte hidrofílica, essas moléculas apresentam uma grande cadeia hidrocarbônica apolar (hidrofóbica) geralmente constituída por hidrocarbonetos alifáticos (SÉRGIO, 2005; XU *et al.*, 2009).

Essas moléculas com estruturas anfifílicas podem adsorver espontaneamente sobre interfaces de duas fases com diferentes polaridades, como é o caso de eletrodos de carbono imersos em solventes aquosos, por exemplo, ao qual a adsorção dessas moléculas sobre a superfície carbônica, por interações de van der Waals, altera as propriedades desta superfície (YI *et al.*, 2001; SÉRGIO, 2005).

Surfactantes e tensoativos são os exemplos mais conhecidos dentro dessa classe de moléculas (YI *et al.*, 2001; SÉRGIO, 2005; VITTAL *et*

al., 2006). Porém, algumas moléculas com propriedades líquido-cristalinas (conhecidas como cristais líquidos) também podem ser classificadas como anfífilas, uma vez que, possuem partes hidrofóbicas e hidrofílicas em sua estrutura.

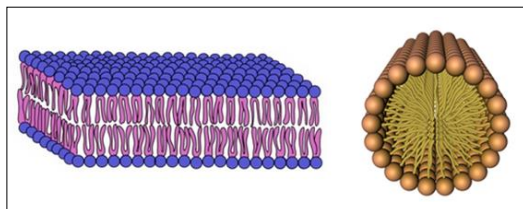
1.3.1. Cristais líquidos

Cristais líquidos (CL) são moléculas que apresentam uma combinação entre o alto grau de organização molecular e a fluidez, pertencendo a um quarto estado da matéria ao qual possui simultaneamente características dos estados sólido e líquido. Esta singularidade, presente apenas em determinados compostos, confere a esta classe de moléculas propriedades únicas. Como resultado, a aplicabilidade deste tipo de material é muito abrangente, podendo ser utilizado em dispositivos luminescentes, displays e sensores químicos (CHANDRASEKHAR e MADHUSUDANA, 1980; GOODBY *et al.*, 2001; WESTPHAL, 2009).

As moléculas que apresentam propriedades líquido-cristalinas são conhecidas como mesógenas e a fase onde os estados sólido e líquido coexistem é denominada de mesofase (CHANDRASEKHAR e MADHUSUDANA, 1980; GOODBY *et al.*, 2001). Estas moléculas são classificadas em dois principais grupos, liotrópicos (CLL) e termotrópicos (CLT), de acordo com o tipo de mesofase que apresentam.

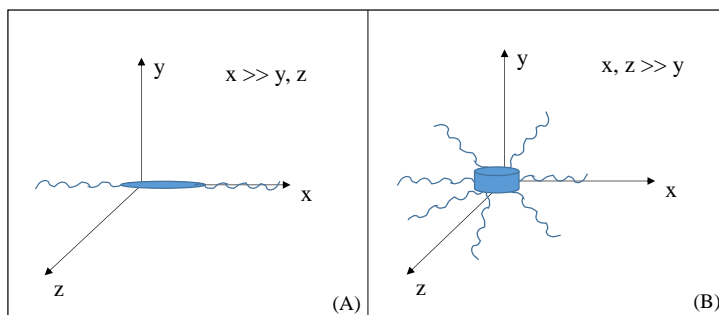
Os CL da classe dos liotrópicos possuem micelas, que são constituídas por agregados de moléculas anfífilas, como unidades fundamentais. Estas moléculas possuem em sua estrutura uma pequena parte polar e uma grande cauda apolar que tendem a formar agregados, a partir de uma determinada concentração (Concentração Micelar Crítica – CMC), devido a incompatibilidade entre as suas partes hidrofílicas e hidrofóbicas e interações com o solvente. Desta forma, as moléculas podem se auto-organizar formando estruturas com variadas formas (Figura 2) e, sendo assim, o estado de mesofase dessas moléculas é dependente de fatores como a sua estrutura, concentração, temperatura e solvente utilizado (WESTPHAL, 2009; HASSANZADEH e LINDQUIST, 2012).

Figura 2. Esquema ilustrativo de exemplos de organizações micelares em mesofases liotrópicas.



Por outro lado, na classe dos CLT, o estado de mesofase depende apenas da temperatura e do próprio mesógeno (GOODBY *et al.*, 2001; BISOYI e KUMAR, 2011). Os CLT são ainda subdivididos em dois grupos: calamíticos e discóticos. Os calamíticos são constituídos por moléculas que possuem um núcleo rígido alongado seguido de cadeias flexíveis, similar à estrutura de um bastão (Figura 3-A). Os discóticos, por sua vez, também apresentam um núcleo rígido central seguido de cadeias flexíveis ao seu redor, similar a estrutura de um disco (Figura 3-B) (WESTPHAL, 2009; KAAFARANI, 2010; WESTPHAL *et al.*, 2010; HASSANZADEH e LINDQUIST, 2012).

Figura 3. Esquema representativo de cristais líquidos termotrópicos do tipo: (A) Calamítico. (B) Discótico.



Ainda com relação à classificação dos CL, existem casos especiais em que as moléculas que apresentam propriedades líquido-cristalinas podem ter características liotrópicas e termotrópicas simultaneamente. Estas moléculas são conhecidas como CL anfotrópicos (TSCHERSKE, 1996; TSCHERSKE, 2002).

Além da propriedade intrínseca de auto-organização, os CL possuem muitas formas de funcionalização (BISOYI e KUMAR, 2011; TSCHERSKE, 2013). Um exemplo é a presença de cargas em suas estruturas, dando origem aos cristais líquidos iônicos, que podem ser aplicados como catalisadores e como materiais condutores de íons (BINNEMANS, 2005; BISOYI e KUMAR, 2011). Estas características tornam-se interessante para aplicação desses materiais em sensores eletroquímicos.

A aplicação de CL em displays e sensores ópticos, onde as propriedades eletro-ópticas desses materiais são exploradas, é bem conhecida na literatura (CHANDRASEKHAR e MADHUSUDANA, 1980; GOODBY *et al.*, 2001; WESTPHAL, 2009), mas pouco se sabe sobre a aplicação dessas moléculas em sensores eletroquímicos, onde propriedades eletroquímicas dos cristais líquidos são investigadas. Desta forma, este trabalho pretende abordar o emprego de uma molécula com estrutura anfífila e que possui propriedades líquido-cristalinas na construção de um novo sensor eletroquímico aplicado na determinação de antioxidantes fenólicos.

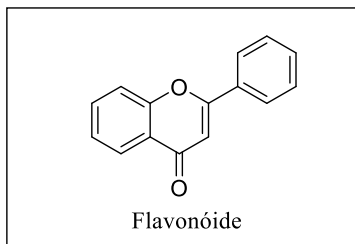
1.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma ampla variedade de moléculas de estruturas simples e complexas que possuem pelo menos um anel aromático no qual um ou mais átomos de hidrogênio são substituído por grupos hidroxila. Os fenóis de origem natural são produzidos no metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Estas substâncias também são responsáveis pelas características nutricionais e sensoriais do reino vegetal (ZHENG e WANG, 2001; IGNAT *et al.*, 2011; FERNANDES, *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos estão classificados de acordo com o seu esqueleto (número de anéis fenólicos e elementos estruturais que esses anéis contêm) e com a sua ocorrência na natureza em três grandes grupos: os ácidos fenólicos, os flavonoides os taninos (ANTOLOVICH *et al.*, 2000; ANGELO e JORGE, 2007; IGNAT *et al.*, 2011). Dentre os fenóis estruturalmente mais simples estão os que apresentam um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila em sua estrutura, como, por exemplo, hidroquinona, catecol e os ácidos fenólicos. Dentre os mais complexos encontram-se a classe dos flavonóides, por exemplo, que representam os maiores grupos fenólicos de ocorrência natural. Sua estrutura base (Figura

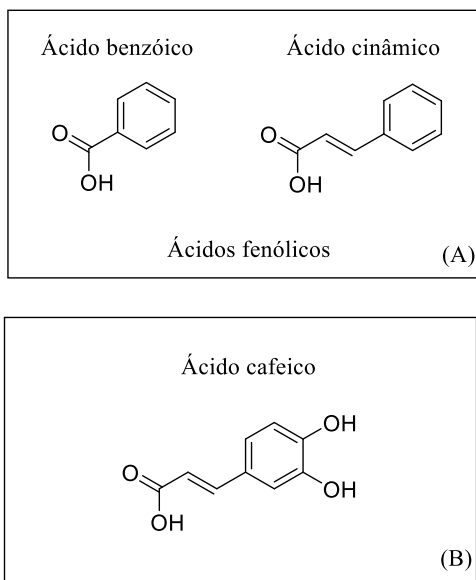
4) é composta por 15 átomos de carbono, onde dois anéis aromáticos são unidos por três átomos de carbonos que formam um anel heterocíclico (C6-C3-C6) (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

Figura 4. Estrutura básica do esqueleto flavonóide.



Os ácidos fenólicos são subdivididos em dois grupos: os fenóis derivados do ácido hidroxicinâmico e os do ácido hidroxibenzóico (Figura 5-A). Os derivados do ácido hidroxicinâmico são fenóis de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia hidrocarbônica, constituída por 3 átomos de carbono ligados ao anel (C6-C3). O ácido cafeico (Figura 5-B) é um exemplo desta subclasse que é comumente encontrado em plantas, café, vinho e azeite, contribuindo no aroma e sabor, assim como, na atividade antioxidante desses alimentos. Também são fenóis desta classe o ácido ferúlico e o cumárico, por exemplo. Os fenóis derivados dos ácidos hidroxibenzóicos são substâncias que possuem um grupo carboxílico ligado ao anel aromático com estrutura C6-C1. São exemplos deste grupo os ácido salicílico e gálico (BELITZ e GROSCH, 1988; DURAN e PADILLA, 1993; HAN *et al.*, 2007).

Figura 5. (A) Estrutura base do esqueleto das duas classes de ácidos fenólicos. (B) Estrutura química do ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenóico (ácido cafeico).



Os substratos fenólicos presentes em alimentos, como frutas e vegetais, desempenham importantes funções biológicas em relação à saúde humana, pois atuam como agentes de proteção contra doenças crônico-degenerativas, que estão associadas ao estresse oxidativo das células, como, por exemplo, doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (BRAVO, 1998; RAMOS, 2008). Este efeito benéfico se deve principalmente a atividade antioxidante desses compostos naturais que atuam no combate aos radicais livres (ABE, *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2007).

A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um próton ao radical livre presente na célula, estabilizando o radical e interrompendo o mecanismo de oxidação catalítico, evitando a propagação desses radicais livres que podem acarretar no envelhecimento celular e no desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Assim, os derivados fenólicos atuam como “moléculas de sacrifício” pois ao doarem o próton, transformam-se em radicais menos reativos, os quais podem se estabilizar, devido à ressonância do anel aromático, sem promover reações de oxidação em cadeia (RAMALHO e JORGE, 2006).

Devido as suas inúmeras funções e propriedades farmacológicas e nutricionais é de grande interesse a identificação, separação e quantificação dessas substâncias. As metodologias mais empregadas na análise de antioxidantes fenólicos atualmente são a espectrofotometria e a cromatografia. No entanto, as técnicas espectrofotométricas são pouco seletivas e as cromatográficas apresentam elevados custos e requerem longos tempos de análises. Além disso, essas técnicas exigem, na maioria dos casos, tratamento prévio das amostras que estão relacionadas a etapas de pré-concentração, separação e extração dos compostos de interesse, por exemplo. Neste contexto, as técnicas eletroquímicas aliadas ao desenvolvimento de sensores e biossensores vêm ganhando destaque devido a sua simplicidade, sensibilidade e baixo custo instrumental e de reagentes (ROSATTO *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

O controle de qualidade é um dos setores mais importantes das indústrias alimentícias e farmacêuticas. Neste cenário, o desenvolvimento de novas técnicas capazes de realizar análises reprodutíveis com alta sensibilidade e seletividade em curto período de tempo e com baixos custos de implementação e manutenção, vêm ganhando cada vez mais espaço.

Neste sentido, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos modificados, empregando novos materiais como, por exemplo, a molécula anfifílica que possui propriedades líquido-cristalinas utilizada no sensor proposto neste trabalho mostram-se promissores quando se busca facilidade na construção do dispositivo e maior sensibilidade na detecção da espécie de interesse, neste caso os compostos fenólicos.

A detecção e quantificação de compostos fenólicos é de suma importância para as indústrias de alimentos e fármacos, pois mesmo em pequenas concentrações, essas substâncias podem afetar a qualidade dos produtos. Estes compostos podem interferir no sabor, aroma e principalmente na estabilidade oxidativa de alimentos e bebidas, assim como, podem interferir no desempenho de fármacos, pois em baixas dosagens podem ser ineficazes no tratamento ou em altas dosagens podem ser tóxicos.

Desta forma, a procura por novos materiais e metodologias que possam oferecer vantagens à construção de dispositivos eletroquímicos voltados à detecção de compostos fenólicos é de grande interesse no meio científico e tecnológico. Especialmente, em razão da fácil construção e portabilidade destes sensores, que permitem análise em tempo real com excelente desempenho, o que justifica a pesquisa proposta.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um novo sensor eletroquímico, através da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com um filme de molécula orgânica anfifílica (10Pyl), para aplicar na determinação de compostos fenólicos totais em extratos de erva-mate obtidos à partir de amostras comerciais, utilizando voltametria de onda quadrada (SWV).

3.2. Objetivo específico

- Construir um sensor eletroquímico a partir de um GCE modificado com um filme de molécula anfifílica, que possui propriedades líquido-cristalinas (10Pyl);
- Investigar a contribuição do material modificador sobre o desempenho analítico do sensor;
- Otimizar as quantidades do modificador (10Pyl) utilizado na construção do sensor proposto;
- Caracterizar a morfologia da superfície do sensor proposto através de microscópica eletrônica de varredura (SEM);
- Otimizar os parâmetros experimentais (pH e natureza do eletrólito suporte) e os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (frequência, amplitude e incremento);
- Avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade das medidas eletroquímicas obtidas com o sensor desenvolvido;
- Avaliar a seletividade do método proposto através do estudo de interferentes;
- Aplicar o sensor desenvolvido na determinação do teor de polifenóis totais (TPT) em diferentes extratos de erva-mate, obtidos à partir de amostras comerciais, bem como realizar estudos de recuperação, utilizando SWV;
- Comparar os resultados obtidos utilizando o sensor proposto, com os obtidos pelo método espectrofotométrico de referência (Folin-Ciocalteu).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos procedimentos experimentais foram de grau analítico e adquiridos a partir de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Vetec e Merck). As soluções foram preparadas com água deionizada e sem tratamento adicional de purificação dos reagentes.

Ácido cafeico, rutina, quercetina, ácido ferúlico, glicose, ácido ascórbico, ácido cítrico, cafeína e o reagente de Folin-Ciocalteu foram obtidos da Sigma-Aldrich. Uma solução estoque de ácido cafeico ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada diariamente em uma mistura etanol:água (20:80%, v/v) e soluções de menor concentração foram preparadas por diluição apropriada, quando necessário. A solução da molécula 10Pyl ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada em diclorometano (Merck).

Soluções tampão fosfato (pH 1,0 - 5,0), tampão acetato (pH 5,0), ácido clorídrico, nitrato de potássio e hidróxido de sódio foram preparadas nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando reagentes obtidos da Vetec.

Para construção do sensor foi empregado um GCE obtido da Metrohn, com diâmetro de 2,0 mm. A molécula orgânica anfifílica, aplicada no desenvolvimento do sensor proposto, foi sintetizada e caracterizada pelo Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos e Materiais Moleculares da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) coordenado pelo Prof. Dr. Hugo Gallardo e cedido para o desenvolvimento deste trabalho.

4.2. Instrumentação

Um banho de ultrassom Unique 1400A foi utilizado para auxiliar no preparo das soluções e limpeza dos GCE. As medidas de pH foram realizadas empregando um pHmetro da Micronal modelo B-475 com um eletrodo de vidro combinado. As análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Agilent G6860A Cary 60 UV-Vis com uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm).

A caracterização morfológica da superfície do sensor foi feita por SEM-FEG (JEOL JSM-6701F, Japão) operando com uma tensão de aceleração de 5,0 kV, pelo Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC).

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie, Holanda) conectado ao software NOVA 1.6.013 para o processamento de dados. As análises voltamétricas foram realizadas em um sistema contendo três eletrodos, acoplado a uma célula de vidro com capacidade para 15,0 mL. Como eletrodo de trabalho foi utilizado o sensor proposto, como contra-eletrodo uma placa de platina (0,5 cm²) e como referência um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

4.3. Metodologia

4.3.1. Construção do sensor

Antes da preparação do sensor, o GCE foi polido mecanicamente em uma suspensão aquosa de alumina (granulometria de 0,05 µm) sobre feltro, fazendo movimentos na forma oito (8), durante 2 minutos. Para remover os resíduos de alumina, o eletrodo foi mergulhado em uma mistura de 1:1 etanol e água, e colocado em um banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada, seco à temperatura ambiente (25 °C) e utilizado na construção do sensor proposto.

A modificação do eletrodo foi feita pelo método “*drop coating*” através do gotejamento de uma alíquota de 2,0 µL da solução da molécula 10Pyl (1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), com o auxílio de uma micropipeta, sobre a superfície do GCE limpo. A superfície do sensor foi seca em dessecador sob vácuo, durante 15 minutos, e utilizado como eletrodo de trabalho.

4.3.2. Medidas eletroquímicas

As experiências de voltametria foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) em uma célula eletroquímica contendo 10,0 mL do eletrólito de suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 2,0) e o volume requerido da substância analisada (solução padrão ou extrato de erva-mate). Os voltamogramas foram registrados após agitação magnética durante 60 segundos, tempo necessário para a homogeneização da solução na célula. Todas as medidas de potencial foram obtidas vs. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ de KCl).

As experiências de SWV foram realizadas em intervalo de potencial de 0,0 a +1,0 V, com frequência de 10 - 100 Hz, amplitude de

pulso de 10 - 100 mV e incremento de varredura de 1 - 10 mV, após sucessivas adições de analito com auxílio de uma micropipeta. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em intervalo de potencial de -0,2 a +1,0 V, com velocidade de varredura de 20 - 200 mV s⁻¹.

4.3.3. Preparação dos extratos de erva-mate e determinação de TPT

Três tipos de amostras comerciais de erva-mate (A, B e C), obtidas de diferentes regiões de Santa Catarina, Brasil, foram empregados na investigação do TPT. Os extratos de erva-mate foram preparados por infusão utilizando 2,00 g de erva em 30,0 mL de água deionizada à 90 °C, durante 30 minutos e diluídas por um fator de 100x, com água deionizada, antes de serem transferidas para a célula eletroquímica.

O método de adição de padrão foi utilizado para a determinação de TPT nos extratos de erva-mate, através de SWV utilizando o sensor proposto GCE/10Pyl. Uma alíquota de 100 µL de cada extrato foi transferida para a célula eletroquímica contendo eletrólito suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 2,0), sendo realizada a medida de SWV. Na sequência, alíquotas de solução padrão de ácido cafeico foram adicionadas, sendo realizadas as medidas voltamétricas após cada adição e homogeneização da solução. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e os resultados obtidos foram expressos em miligramas de ácido cafeico por mililitro do extrato de erva-mate.

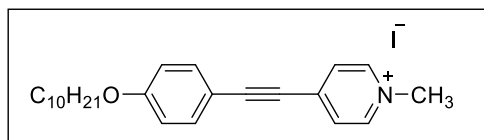
Para verificar a exatidão da metodologia proposta, 200 µL dos extratos de erva-mate também foram analisados por espectrofotometria através do método de Folin-Ciocalteu (seguindo o protocolo de microescala descrito por WATERHOUSE, 2002), utilizando o ácido cafeico como composto fenólico padrão. Todas as medidas foram efetuadas em triplicatas e os resultados para o TPT foram expressos em miligramas de ácido cafeico por mililitro do extrato de erva-mate.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cristal líquido avaliado como modificador

A molécula orgânica iônica anfifílica iodeto de 1-metil-4-(4-deciloifeniletinil)piridínio, 10Pyl, (Figura 6), que exibe propriedades líquido-cristalinas, foi avaliada como modificador para o desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico. A molécula 10Pyl é um CL da classe dos termotrópicos ao qual a mesofase, estado onde há combinação entre a fase sólida cristalina e o líquido isotrópico, tem início apenas em 154 °C. Isto indica que as propriedades líquido-cristalinas dessa molécula não foram exploradas neste trabalho, uma vez que, todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C). Porém, apesar de não ter sido trabalhado em condições em que a mesofase da molécula é favorecida, a sua aplicação na construção do sensor eletroquímico proposto pode ser justificada devido a sua elevada condutividade e estrutura química que facilitam a transferência de elétrons sobre a superfície do sensor.

Figura 6. Estrutura química da molécula iodeto de 1-metil-4-(4-deciloifeniletinil)piridínio (10Pyl).



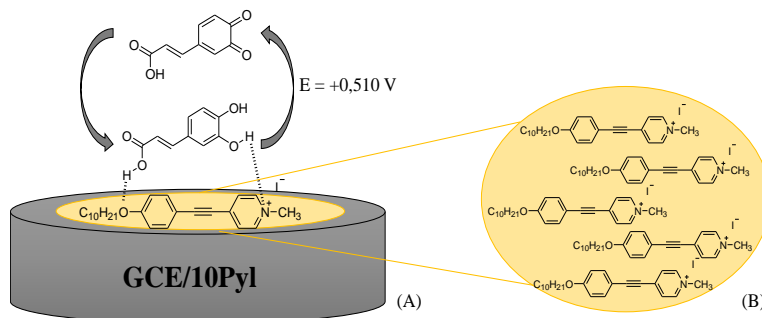
5.2. Princípio de funcionamento do sensor proposto

A Figura 7 ilustra um esquema representativo do funcionamento do sensor GCE/10Pyl, com destaque para a forma de organização da molécula anfifílica 10Pyl na superfície de carbono vítreo.

Como pode ser observado na representação esquemática (Figura 7-A), o processo tem início por interações de hidrogênio entre as moléculas de ácido cafeico e 10Pyl, onde ocorre a transferência de elétrons do ácido cafeico para o filme. Esta transferência de carga é favorecida pelas regiões de ligação conjugada da molécula 10Pyl, por efeitos mesoméricos, facilitando a reação de oxirredução do ácido cafeico a sua respectiva quinona que ocorre em um potencial de + 0,510 V vs. Ag/AgCl, nesta superfície. Desta forma, propõem-se que a molécula 10Pyl se organize de

maneira que os seus anéis aromáticos encontram-se planos à superfície de carbono vítreo, conforme indica a Figura 7-B. Admite-se que esta orientação favorece a formação do filme, uma vez que, a longa cadeia hidrocarbônica alifática presente na estrutura dessa molécula interage, preferencialmente, com a superfície de carbono vítreo através de interações de van der Waals que facilitam a adsorção da molécula 10Pyl, nesta superfície. Este comportamento pode ser comparado ao de filmes de surfactantes (em sistemas de micelas reversas) sobre eletrodos de carbono (GILMARTIN e HART, 1995; LI *et al.*, 2008; ZAPP *et al.*, 2013). A presença da cadeia hidrofóbica é importante, pois na ausência desta, provavelmente a molécula iria se comportar como um sólido altamente cristalino e, conseqüentemente, inadequado para a formação de filmes. Portanto, conclui-se que a orientação proposta para a molécula 10Pyl favorece tanto a transferência de cargas, como a formação do filme na superfície do GCE.

Figura 7. (A) Representação esquemática da reação de oxirredução do ácido cafeico a sua respectiva quinona, na superfície do sensor GCE/10Pyl. (B) Esquema ilustrativo da organização das moléculas 10Pyl na superfície do sensor.

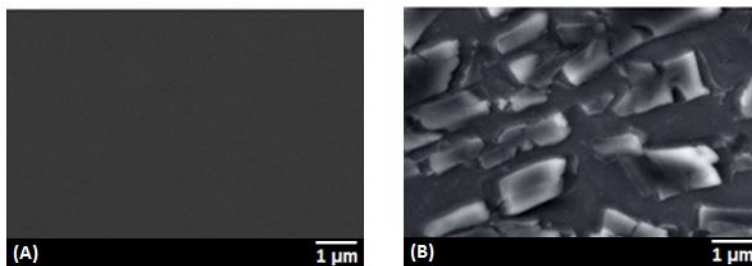


A corrente resultante do processo redox na superfície do sensor GCE/10Pyl é proporcional à concentração de ácido cafeico, sendo usada para a quantificação do analito. O mesmo processo pode ser estendido para outros compostos fenólicos estudados (ácido ferúlico, rutina e quercetina), mudando apenas o potencial de pico.

5.3. Caracterização morfológica da superfície do sensor

A morfologia da superfície do sensor GCE/10Pyl foi investigada por SEM. Ao comparar as imagens apresentadas na Figura 8 é possível perceber uma superfície caracterizada por certa textura e organização (Figura 8-B) que é atribuída a adsorção das moléculas 10Pyl. Também é observado nesta imagem um aumento da área superficial ativa, se comparada ao eletrodo sem modificação (Figura 8-A) ao qual uma superfície uniforme é observada. Este aumento da área contribui para o aumento da sensibilidade analítica do sensor proposto.

Figura 8. Imagens morfológicas das superfícies de: (A) GCE. (B) Sensor GCE/10Pyl. Imagens de SEM-FEG obtidas utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV e ampliação de 10.000x.



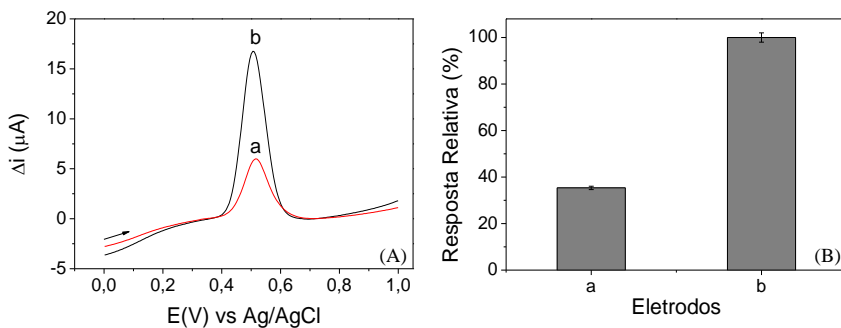
5.4. Contribuição do modificador na resposta analítica do sensor

Para estudar a contribuição do filme de 10Pyl, o sensor GCE/10Pyl foi preparado pelo método “*drop coating*” (descrito no item 4.3.1.) e o seu desempenho analítico foi comparado ao GCE sem modificação. As medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicatas por SWV na faixa de potencial de 0,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl, utilizando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (padrão analítico) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0).

A Figura 9-A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando (a) GCE sem modificação e (b) sensor GCE/10Pyl. Como pode ser observado, um aumento significativo da corrente de pico resultante para o ácido cafeico é obtido utilizando o sensor proposto. A resposta relativa (Figura 9-B) do sensor que contém a molécula 10Pyl em relação ao eletrodo sem modificação é de aproximadamente 65%, este aumento considerável na resposta analítica demonstra o potencial deste novo

sensor (GCE/10Pyl), que pode ser aplicado na determinação de compostos fenólicos em diferentes amostras.

Figura 9. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) utilizando como eletrodo de trabalho: (a) GCE; (b) GCE/10Pyl. (B) Resposta relativa (%).



A presença da molécula 10Pyl contribui para o aumento da sensibilidade analítica do sensor proposto através de uma combinação de fatores, dos quais se destacam:

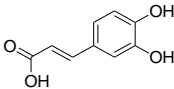
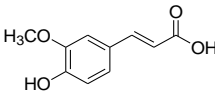
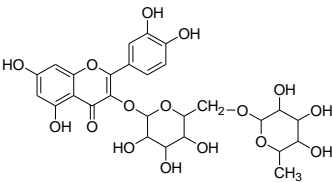
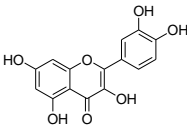
- Aumento da área ativa do sensor proposto, o que faz com que a sensibilidade do sensor aumente, uma vez que, um maior número de moléculas interagem nessa superfície, resultando em um aumento da resposta analítica;
- Presença de uma superfície condutora (o filme 10Pyl é carregado), o que favorece a cinética redox do ácido cafeico nesta superfície;
- A molécula 10Pyl atua como um mediador direto, pois favorece a transferência de cargas, aumentando a sensibilidade do sensor proposto, conforme descrito no item 5.2.

5.5. Resposta do sensor para alguns compostos fenólicos

A fim de avaliar a resposta do sensor frente a alguns compostos fenólicos, um estudo comparativo foi realizado utilizando ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina e quercetina. As medidas de SWV foram obtidas em triplicata, com soluções contendo $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada composto fenólico (individualmente) em tampão de fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0). A Tabela 1 mostra a estrutura, o potencial de pico e a resposta relativa (RR, %) de cada um dos compostos avaliados. Como pode ser observado, o

sensor proposto mostrou sensibilidade decrescente na ordem: ácido cafeico (100 %), ácido ferúlico (24,3 %), rutina (16,6 %) e quercetina (6,9 %), respectivamente.

Tabela 1. Resposta relativa do sensor para diferentes compostos fenólicos.

Compostos fenólicos	Estrutura	Ep (V)	RR (%)
Ácido cafeico		+0,510	100,0
Ácido ferúlico		+ 0,485	24,3
Rutina		+ 0,550	16,6
Quercetina		+ 0,495	6,9

Através da Tabela 1 é possível perceber que os compostos fenólicos estudados apresentam valores muito semelhantes para o potencial de pico (Ep), o que sugere que o sensor é capaz de detectar os compostos fenólicos presentes na amostra, tal como uma mistura e, desta forma, o sensor GCE/10Pyl não é específico para um único composto, mas sim seletivo para este grupo de compostos fenólicos. Por apresentar maior sensibilidade para o ácido cafeico, este composto foi selecionado para os estudos subsequentes ao qual incluem a otimização do método proposto e a determinação de compostos fenólicos totais em extratos de erva-mate, obtidos à partir de amostras comerciais.

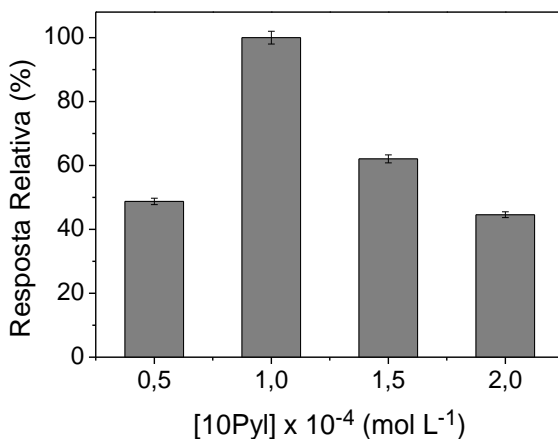
5.6. Otimização da construção do sensor e das condições experimentais

A fim de otimizar a construção do sensor e as condições experimentais do método proposto, alguns parâmetros foram investigados utilizando SWV, em triplicata, com o intuito de obter o melhor desempenho analítico do sensor GCE/10Pyl.

5.6.1. Efeito da concentração do filme de 10Pyl

O efeito da quantidade de 10Pyl sobre a superfície do GCE, foi avaliado em uma faixa de concentração de $0,5 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado na Figura 10, as respostas analíticas do sensor, em tampão de fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) contendo ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, aumentaram até a concentração de 10Pyl $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo esta concentração selecionada para a construção do filme.

Figura 10. Influência da concentração de 10Pyl na resposta analítica do sensor proposto em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) utilizando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

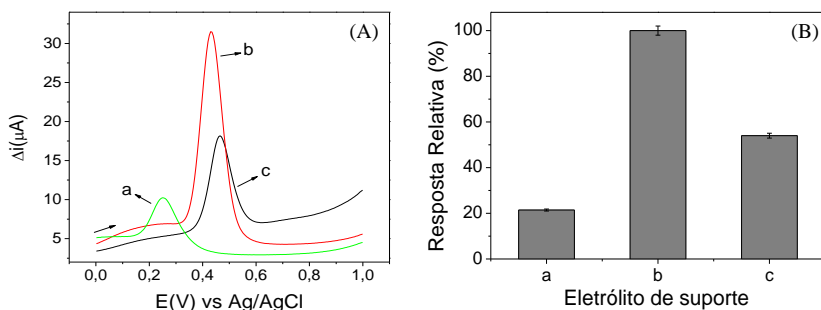


5.6.2. Estudo da natureza do eletrólito de suporte e pH

O eletrólito de suporte é de importância fundamental em sistemas eletroquímicos, pois, quando adicionado em concentrações elevadas (cerca de 100x maior que a concentração do analito), modifica as propriedades da interface eletrodo-solução, como, por exemplo, controlando a força iônica, evitando a migração da espécie eletroativa e aumentando a condutividade do meio (AGOSTINHO *et al.*, 2004). Desta forma, estudos relacionados a natureza do eletrólito de suporte e pH foram investigados a fim de melhorar o desempenho analítico do método proposto.

Em um primeiro momento, para investigar a influência de meios ácidos, básicos e neutros foram avaliadas soluções 0,1 mol L⁻¹ de HCl, NaOH e KNO₃. No entanto, apenas o eletrólito de HCl se mostrou promissor. Desta forma, outros eletrólitos de suporte ácidos como tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 2,0) e tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0) também foram investigados, por SWV, em triplicata, utilizando ácido cafeico 7,4 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. De acordo com os resultados mostrados na Figura 11, a intensidade da corrente resultante para o ácido cafeico foi maior em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 2,0). Desta forma, a solução tampão fosfato foi selecionada como eletrólito de suporte para este trabalho.

Figura 11. (A) Voltamogramas de onda quadrada (frequência 100 Hz, amplitude de pulso 60 mV e incremento de potenciais de 5 mV) empregando ácido cafeico 7,4 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ em (a) tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0); (b) tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 2,0) e (c) HCl 0,1 mol L⁻¹. (B) Resposta relativa (%).



Além da natureza do eletrólito de suporte, o pH da solução também desempenha influência significativa sobre o comportamento eletroquímico do ácido cafeico, podendo levar a variações de corrente de pico e de potencial de pico. Desta forma, uma investigação relacionada ao efeito do pH do eletrólito de suporte selecionado (tampão fosfato) foi avaliada, em triplicadas, por SWV empregando o sensor proposto em uma faixa ácida de pH (1,0 a 5,0), utilizando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Através da Figura 12-A é possível perceber um deslocamento do potencial de pico do ácido cafeico em direção a potenciais mais positivos à medida que o pH diminui. Este deslocamento representa uma relação linear entre o potencial de pico e o pH do eletrólito de suporte que pode ser observado na Figura 12-B-II, com inclinação de $-59,0 \text{ mV/pH}$ ($r^2 = 0,999$). Isto indica que o mecanismo de oxirredução atribuído ao ácido cafeico é um processo dependente do pH e que envolve igual número de elétrons e prótons (Figura 13). Esta relação é consistente com a esperada pela equação de Nernst ($59,2 \text{ mV/pH}$) para sistemas que envolvem dois prótons e dois elétrons, tal como descrito na literatura (MANJUNATHA *et al.*, 2010; HOSSEINI *et al.*, 2010; BRONDANI *et al.*, 2012).

Estudos relacionados à cinética redox do ácido cafeico, relatados na literatura, apontam pH ácido como ideal para esta espécie, pois em condições ácidas (inferiores a pH 5,5) o ácido cafeico está na sua forma protonada ($\text{pK}_a = 4,41$) e a reação de transferência de dois prótons e dois elétrons é reversível, assim como a difusão da espécie eletroativa é favorecida (GIACOMELLI *et al.*, 2002).

A corrente de pico obtida para diferentes valores de pH é mostrada na Figura 12-B-I. A intensidade da corrente de pico resultante para o ácido cafeico foi maior em pH 2,0, diminuindo gradualmente com o aumento do pH. Neste pH também foi observado um melhor perfil voltamétrico. Portanto, a solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) foi selecionada como melhor eletrólito de suporte para o método proposto.

Figura 12. (A): Voltamogramas de onda quadrada (frequência 100 Hz, amplitude de pulso 60 mV e incremento de potenciais de 5 mV) empregando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato em: (a) pH 5,0; (b) pH 4,0; (c) pH 3,0; (d) pH 2,0; (e) pH 1,0. (B): (I) Resposta relativa (%) para o ácido cafeico em diferentes pH; (II) Deslocamento linear do potencial de pico com a variação do pH.

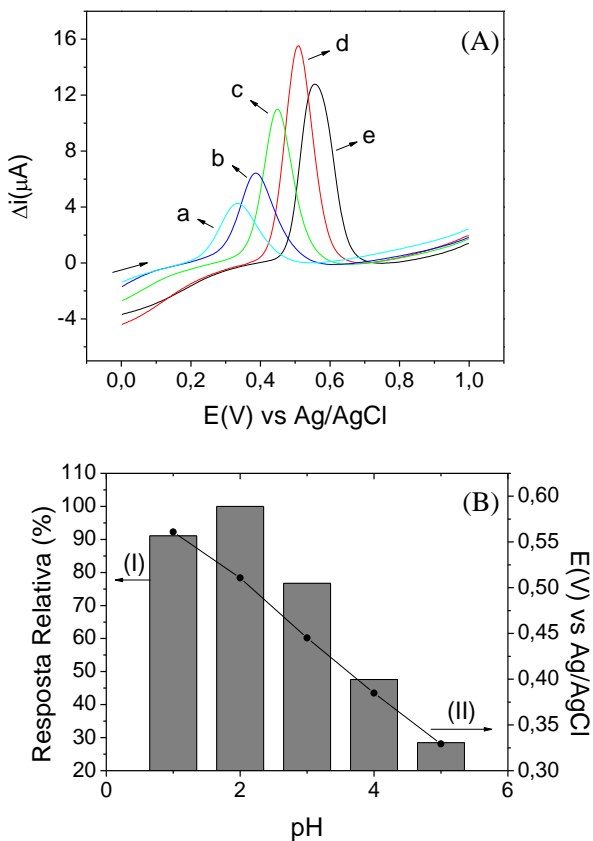
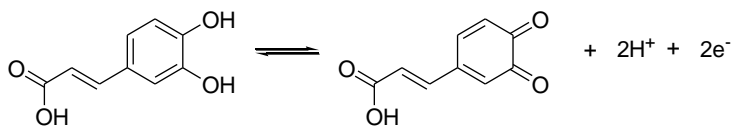


Figura 13. Representação esquemática da reação de oxirredução da molécula de ácido cafeico.

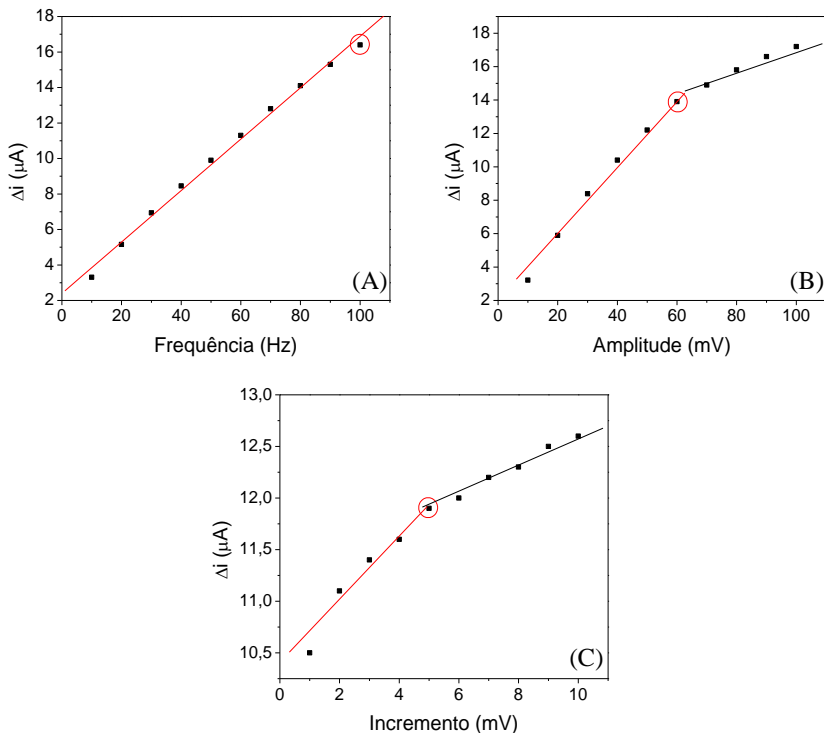


5.6.3. Estudo dos parâmetros da SWV

Na SWV é possível variar parâmetros como a frequência (f), a amplitude de pulso (a) o incremento de potencial (ΔE_s), a fim de obter melhor definição de pico e sensibilidade na determinação de ácido cafeico. Nesta técnica, a amplitude de pulso está diretamente relacionada a resolução do pico, o incremento relacionado ao espaço entre os pontos de potenciais, que também contribuem para a resolução, e a frequência associada à velocidade de varredura, assim como o incremento de potencial ($v = f \times \Delta E_s$). Desta forma, uma otimização desses parâmetros contribui para melhorar a metodologia de análise proposta.

Os efeitos de frequência (10 - 100 Hz), amplitude de pulso (10 - 100 mV) e incremento de varredura (1 - 10 mV) foram investigados, em triplicata, empregando o sensor proposto e utilizando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0). Na Figura 14-A é possível observar um aumento linear na corrente de pico resultante até o valor mais elevado de frequência (100 Hz). Na Figura 14-B observa-se que a intensidade da corrente aumentou linearmente até uma amplitude de 60 mV, mudando a inclinação da reta após este ponto. Na Figura 14-C observa-se uma faixa linear até o ponto onde o incremento correspondente é de 5 mV. Sendo assim, uma melhor resposta analítica foi obtida com frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 60 mV e incremento de varredura de 5 mV, valores aos quais ainda é possível observar uma dependência linear entre a corrente de pico resultante e os parâmetros da técnica.

Figura 14. Investigação dos parâmetros de SWV ($n = 3$) sobre a resposta analítica do sensor proposto empregando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0). (A) Estudo da frequência (10 - 100 Hz); (B) Estudo da amplitude de pulso (10 - 100 mV); (C) Estudo do incremento de potencial (1 - 10 mV).

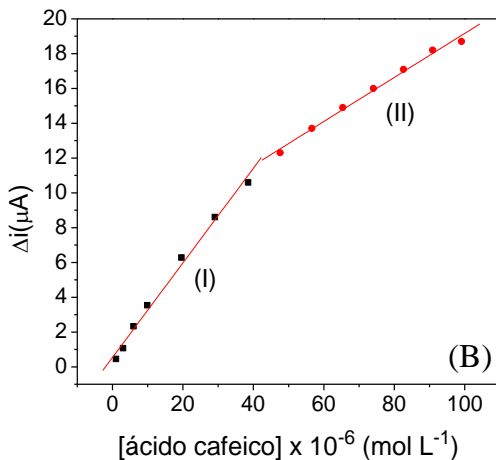
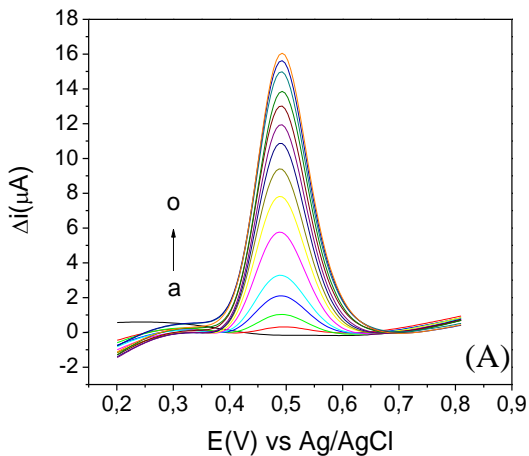


5.7. Desempenho analítico do sensor GCE/10Pyl

5.7.1. Curva de calibração

A Figura 15 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a curva de calibração para o ácido cafeico aplicando o sensor proposto nas melhores condições experimentais (estabelecidas anteriormente) em uma faixa de potencial de 0,0 a + 1,0 V vs. Ag/AgCl.

Figura 15. (A) Voltamogramas de SWV (frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 60 mV e incremento de varredura de 5,0 mV) obtidos utilizando o sensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e soluções de ácido cafeico, nas seguintes concentrações: (b) $9,9 \times 10^{-7}$; (c) $2,9 \times 10^{-6}$; (d) $5,9 \times 10^{-6}$; (e) $9,9 \times 10^{-6}$; (f) $1,9 \times 10^{-5}$; (g) $2,9 \times 10^{-5}$; (h) $3,8 \times 10^{-5}$; (i) $4,7 \times 10^{-5}$; (j) $5,6 \times 10^{-5}$; (k) $6,5 \times 10^{-5}$; (l) $7,4 \times 10^{-5}$; (m) $8,2 \times 10^{-5}$; (n) $9,1 \times 10^{-5}$ e (o) $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração.



Os parâmetros da curva de calibração e o limite de detecção para os dois intervalos lineares da curva estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da curva de calibração e limites de detecção.

Faixa	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Equação	r ²	LOD (mol L ⁻¹)
(I)	9,9 x 10 ⁻⁷ a 3,8 x 10 ⁻⁵	$\Delta i = 0,272[AC] + 5,04 \times 10^{-7} \pm 8,20 \times 10^{-8}$	0,997	9,0 x 10 ⁻⁷
(II)	4,7 x 10 ⁻⁵ a 9,9 x 10 ⁻⁵	$\Delta i = 0,127[AC] + 6,50 \times 10^{-6} \pm 3,78 \times 10^{-7}$	0,996	8,9 x 10 ⁻⁶

AC = ácido cafeico.

Os parâmetros de linearidade estabelecidos na Tabela 2 são considerados aceitáveis pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO), pois a correlação entre os pontos (r^2) satisfaz os valores impostos por esses órgãos ($r^2 > 0,90$ - INMETRO; $r^2 > 0,99$ - ANVISA). O limite de detecção (LOD), menor concentração do analito que pode ser detectada com razoável certeza para uma dada metodologia analítica (RIBANI *et al.*,2004; RIBEIRO *et al.*,2008), foi calculado através dos parâmetros da curva de calibração (Equação (1)).

$$LOD = 3 \frac{\sigma}{s} \quad (1)$$

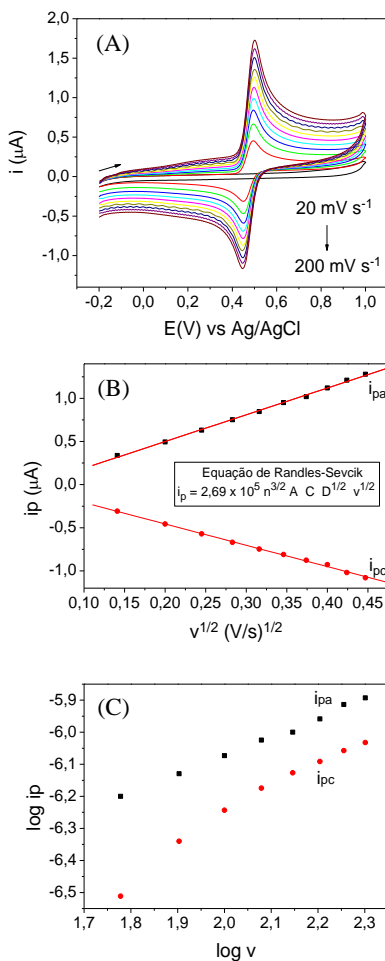
Onde “3” representa o fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança exigido (neste caso 95 %), “ σ ” representa o desvio do intercepto e “ s ” o valor da inclinação da curva de calibração (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A curva de calibração, Figura 15-B, apresentou duas faixas lineares distintas. O fato do sensor demonstrar este comportamento pode estar relacionado com a saturação do filme 10Pyl. Com o aumento na concentração de ácido cafeico, as moléculas começam a se acumular sobre a superfície do sensor e, conseqüentemente, ocorre um impedimento maior para o acesso de outras moléculas de ácido cafeico ao filme, diminuindo a interação da espécie eletroativa com a superfície modificada, o que explica a queda na sensibilidade.

Este acúmulo de moléculas está relacionado à adsorção do produto da reação redox sobre o filme. Isto pode ser observado em estudos relacionados ao controle difusão *vs.* adsorção, que foram realizados por voltametria cíclica, variando a velocidade de varredura em uma faixa de 20 – 200 mV s⁻¹ (Figura 16). Através da Figura 16-B é possível perceber uma relação linear entre as correntes anódica e catódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura (linearização da equação de Randles-Sevcik) o que sugere um processo onde a difusão é o mecanismo dominante. Por outro lado, no plot log i_p *vs.* log v (Figura 16-C), é possível observar uma inclinação de 0,6 para o ácido cafeico (valor mais próximo ao esperado para sistemas controlados por difusão (0,5)) e de 0,8 para o produto redox (valor mais próximo ao esperado para sistemas controlados por adsorção (1,0)), indicando uma contribuição por mecanismos de adsorção do produto redox na superfície do sensor, o que explica a mudança na inclinação da curva de calibração para concentrações maiores de ácido cafeico. Por outro lado, uma maior

acessibilidade da espécie eletroativa ocorre em baixas concentrações do analito, o que demonstra uma inclinação com maior sensibilidade nesta região (faixa (I) da curva de calibração).

Figura 16. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o sensor proposto (GCE/10PyI) utilizando ácido cafeico $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) em diferentes velocidades de varredura ($20 - 200 \text{ mV s}^{-1}$). (B) i_{pa} e i_{pc} vs. $v^{1/2}$. (C) $\log i_{pa}$ e i_{pc} vs. $\log v$.



5.7.2. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade

Os ensaios para avaliar a repetibilidade do sensor proposto foram realizados por SWV (frequência 100 Hz, amplitude de pulso 60 mV, incremento de potenciais 5 mV), em triplicatas, utilizando ácido cafeico $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0). A repetibilidade foi investigada através de cinco medidas sucessivas ($n = 5$), usando o mesmo sensor. O desvio padrão relativo (RSD) entre as correntes de pico resultantes nessas medidas foi menor que 4,8%, indicando que o sensor proposto tem repetibilidade aceitável.

Outro parâmetro importante que deve ser avaliado é a reprodutibilidade do sensor, que foi investigada através da detecção de ácido cafeico $4,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sob as mesmas condições descritas para os estudos de repetibilidade. Três sensores ($n = 3$) foram preparados da mesma forma para avaliar a reprodutibilidade. Para este estudo o RSD das correntes de pico resultantes foi inferior a 2,8%, indicando que o método possui uma excelente reprodutibilidade.

5.7.3. Estudo de interferentes

Alguns dos compostos presentes nos extratos de erva-mate podem atuar como interferentes na determinação de compostos fenólicos. Assim, a resposta analítica do sensor foi investigada na presença de diferentes compostos potencialmente interferentes (cafeína, ácido ascórbico, ácido cítrico e glicose), através da comparação da resposta de uma solução padrão de ácido cafeico $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com aquelas obtidas adicionando várias concentrações do interferente, com proporções de concentração fixadas 1:1, 1:2 e 1:5 ácido cafeico/ interferente (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação de interferentes.

Proporção (AC/interferente)	Alteração no sinal analítico (%)			
	Ácido cítrico ^a	Ácido ascórbico ^a	Cafeína ^a	Glicose ^a
1:1	0,91 ± 0,2	1,62 ± 0,3	0,90 ± 0,1	4,94 ± 0,5
1:5	2,86 ± 0,3	2,35 ± 0,4	5,26 ± 0,4	6,02 ± 0,6
1:10	3,90 ± 0,2	6,03 ± 0,5	8,70 ± 0,5	8,03 ± 0,6

^aMédia ± desvio padrão; n = 3; AC = ácido cafeico.

Como pode ser observado na Tabela 3, não foi avaliado efeito significativo de interferência na determinação de ácido cafeico utilizando o sensor proposto. Nenhuma das substâncias interferiu diretamente no desempenho do sensor (mudança do sinal < 10% para todas as concentrações). Sendo assim, o sensor GCE/10Pyl pode ser utilizado para a determinação de compostos fenólicos em extratos de erva-mate, na presença destes compostos potencialmente interferentes, sem interferência significativa na resposta analítica.

5.7.4. Estudos de recuperação e aplicação analítica

O sensor proposto foi aplicado na determinação do TPT em extratos de erva-mate obtidos a partir de amostras comerciais. O estudo de recuperação e a determinação foram realizados por SWV empregando o método de adição de padrão, em triplicata, usando ácido cafeico como composto fenólico padrão.

Os ensaios de recuperação avaliam a exatidão de um dado método analítico e consistem na adição de diferentes concentrações conhecidas do analito sobre uma amostra, seguida pela determinação dessa concentração adicionada (BRITO *et al.*, 2003). Três diferentes concentrações de ácido cafeico ($2,5 \times 10^{-6}$; $7,4 \times 10^{-6}$ e $12,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram utilizadas para cada uma das amostras nos estudos de recuperação. A percentagem de recuperação variou 96,7 a 108,0 %, indicando a eliminação da interferência da matriz, empregando esta metodologia (Tabela 4).

Tabela 4. Estudos de recuperação para o ácido cafeico em extratos de erva-mate utilizando o sensor GCE/10Pyl.

Amostra ^a	Ácido cafeico (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado ^b	Recuperação (%) ^c
A	2,5	2,6 ± 0,2	104,0
	7,4	7,6 ± 0,1	102,7
	12,3	12,5 ± 0,2	101,6
B	2,5	2,6 ± 0,1	104,0
	7,4	7,7 ± 0,2	104,1
	12,3	12,2 ± 0,3	99,2
C	2,5	2,7 ± 0,2	108,0
	7,4	7,7 ± 0,3	104,1
	12,3	11,9 ± 0,2	96,7

^aA, B e C = extratos de erva-mate obtidos de amostras comerciais; ^b Média ± desvio padrão; n = 3; ^c Recuperação = (valor encontrado/valor adicionado) x 100%.

Para verificar a eficiência do sensor proposto, os extratos de erva-mate foram usadas na determinação de TPT, aplicando o método eletroanalítico desenvolvido. Além disso, para fins de comparação, as amostras também foram analisadas pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2002). Os resultados obtidos para as diferentes amostras, aplicando os dois métodos, foram expressos em miligrama de ácido cafeico por mL de extrato e estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da estimativa do TPT em extratos de erva-mate utilizando o sensor proposto e o método espectrofotométrico de referência.

Amostra ^a	TPT (mg ácido cafeico mL ⁻¹)		
	Folin-Ciocalteu ^b	Sensor ^b	Erro relativo (%) ^c
A	4,72 ± 0,05	4,74 ± 0,02	0,42
B	5,24 ± 0,06	5,30 ± 0,03	1,14
C	4,65 ± 0,05	4,59 ± 0,03	-1,29

^aA, B e C = extratos de erva-mate obtidos de amostras comerciais; ^b Média ± desvio padrão; n = 3; ^cErro relativo = (Sensor- Folin-Ciocalteu)/ FolinCiocalteu x 100 %.

Os resultados demonstram que o método proposto apresenta excelente correlação com o método oficial aplicado para determinação de TPT em amostras de alimentos (Folin-Ciocalteu), com erro relativo entre as técnicas inferior a 1,5 %, o que indica que o método desenvolvido é adequado para a determinação de compostos fenólicos totais em extratos de erva-mate, podendo ser aplicado também para outras amostras.

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a molécula anfifílica iônica (10Pyl), que exibe propriedade líquido-cristalinas, é um excelente mediador pois aumenta a sensibilidade analítica do sensor proposto. A eficiência do sensor GCE/10Pyl se deve a uma combinação de fatores, referentes à utilização do filme de 10Pyl, tais como: o aumento da área ativa do sensor, a presença de cargas que contribui para uma superfície mais condutora, o que facilita a cinética redox e a contribuição por adsorção na superfície do eletrodo.

Quanto à otimização e aplicação do eletrodo modificado, os resultados demonstraram características analíticas favoráveis como excelente reprodutibilidade e repetibilidade, adequada seletividade e exatidão, assim como, ampla linearidade (com duas faixas distintas) e baixos limites de detecção para as duas faixas lineares. A aplicação deste sensor na quantificação de compostos fenólicos totais em extratos de erva-mate apresentou excelente correlação com os resultados obtidos utilizando o método espectrofotométrico de referência (Folin-Ciocalteu). Portanto, conclui-se que o método proposto apresenta ser uma ferramenta útil que oferece vantagens como a facilidade na construção, baixo custo e rápido tempo de análise, podendo ser aplicado na determinação de compostos fenólicos em extratos de erva-mate, bem como pode ser avaliado para aplicação em outras amostras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. Ciênc. Tecnol. Aliment. 27 (2007) 394 - 400.

ABRUNA, H. D.; WALSH, J. L.; MEYER, T. J.; MURRAY, R. W. Kinetic Applications of Chemically Modified Electrodes. Oxidation, Reduction and Linkage Isomerization of a Nitro Complex of Ruthenium Attached to a Silanized Pt Electrode. Inorg. Chem. 20 (1981) 1481 - 1486.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito de suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. Quim. Nova 27 (2004) 813 - 817.

ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKACI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. Sens. Actuators B 69 (2000) 153 - 163.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. Quim. Nova 25 (2008) 835 - 841.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz 66 (2007) 232 - 240.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst 125 (2000) 989 - 1009.

BARD, A. J.; FAULKNER L. R. Electrochemical methods: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons Inc. New York, 2001.

BARROSO, M. F.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; DELERUE-MATOSA, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. Biosen. Bioelectron. 30 (2011) 1 - 12.

- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Química de los alimentos. Zaragoza (1988) 645 - 656.
- BINNEMANS, K. Ionic Liquid Crystals. Chem. Rev. 105 (2005) 4148 - 4204.
- BISOYI, H. K; KUMAR, S. Liquid-crystal nanoscience: an emerging avenue of soft self-assembly. Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 306 - 319.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56 (1998) 317 - 333.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente 13 (2003) 129 - 146.
- BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Halloysite clay nanotubes and platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid applied in the development of a catecholamine biosensor. Analyst 137 (2012) 3732 - 3739.
- BRONDANI, D.; SOUZA, B. S.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: A new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications. Biosens. Bioelectron. 42 (2013) 242 - 247.
- CAMPÀS, M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. Biotechnol. Adv. 26 (2008) 370 - 378.
- CHAKI N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. Biosens. Bioelectron. 12 (2002) 1 - 12.
- CHANDRASEKHAR, S.; MADHUSUDANA, N. V. Liquid Crystals. Annu. Rev. Mater. Sci. 10 (1980) 133 - 155.
- DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Grasas y Aceites 44 (1993) 101 - 106.

EMR, S. A.; YACYNYCH, A. M. Use of polymer films in amperometric biosensors. *Electroanalysis* 7 (1995) 913 - 923.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. *Quim. Nova* 15 (1992) 28 - 39.

FERNANDES, S. C.; SOUZA, F. D.; SOUZA, B. S.; NOME, F.; VIEIRA, I. C. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. *Sens. and Actuators, B* 173 (2012) 483 - 490.

FERNANDES, S. C.; SANTOS, D. M. P. O.; VIEIRA, I. C. Genipin-cross-linked chitosan as a support for laccase biosensor. *Electroanalysis* 25 (2013) 557 - 566.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Quim. Nova* 26 (2003) 381 - 389.

GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F. S.; SPINELLI, A. Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5. *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 332 - 338.

GILMARTIN, M. A. T.; HART, J. P. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrode. *Analyst* 120 (1995) 1029 - 1045.

GOODBY, J. W.; BRUCE, D. W.; HIRD, M.; IMRIE, C.; NEAL M. An introduction to materials science no. 4: molecular topology in liquid crystals. *J. Mater. Chem.* 11 (2001) 2631 - 2636.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 950 - 988.

HASSANZADEH, A.; LINDQUIST, R. G. Liquid crystal sensor microchip. *IEEE Sens. J.* 12 (2012) 1536 - 1544.

HOSSEINI, M.; MOMENI, M. M.; FARAJI, M. An innovative approach to electro-oxidation of dopamine on titanium dioxide nanotubes electrode modified by gold particles. *J. Appl. Electrochem.* 40 (2010) 1421 - 1427.

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

IKEDA, T.; LEIDNER, C. R.; MURRAY, R. W. Kinetics of Outer Sphere Electron Transfers Between Metal Complexes in Solutions and Polymeric Films on Modified Electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 7422 - 7425.

KAAFARANI, B. R. Discotic Liquid Crystals for Opto-Electronic Applications. *Chem. Mater.* 23 (2010) 378 - 396.

LI, J.; ZHOU, L.; HAN, X.; LIU, H. Direct electrochemistry of hemoglobin based on Gemini surfactant protected gold nanoparticles modified glassy carbon electrode. *Sens. Actuators, B* 135 (2008) 322 - 326.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismo de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Quim. Nova* 6 (2006) 1318 - 1325.

MANJUNATHA, R.; SURESH, G. S.; MELO, J. S.; D'SOUZA, S. F.; VENKATESHA, T. V. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique. *Sens. Actuators, B* 145 (2010) 643 - 650.

MANDLER, D.; TURYAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. *Electroanalysis* 8 (1996) 207 - 213.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.* 77 (2002) 237 - 256.

MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para de taninos hidrolisáveis. Dissertação 2008 (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

MIMICA, D.; ZAGAL, J. H.; BEDIQUI, F. Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films. *J. Electroanal. Chem.* 497 (2001) 106 - 113.

MOUSTY, C. Sensors and biosensors based on clay-modified Electrodes—new trends. *Appl. Clay Sci.* 27 (2004) 159 - 177.

MURRAY, R. W. Chemically Modified Electrodes. *Accts. Chem. Res.* 13 (1980) 135 - 141.

MURRAY, R. W. Chemically Modified Electrodes for Electrocatalysis. *Phil. Trans. R. Soc. Long.* 302 (1981) 253 - 265.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. Chemically Modified Electrodes Molecular Design for Electroanalysis. *Anal. Chem.* 59 (1987) 379 - 390.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quim. Nova* 25 (2002) 1012 - 1021.

QUINTINO, M. S. M. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas. Tese 2003 (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova* 29 (2006) 755 - 760.

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy Dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 507 - 526.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst* 122 (1997) 11R - 34R.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27 (2004) 771 - 780.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova*. 31 (2008) 164 - 171.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova* 24 (2001) 77 - 86.

SERGIO, N. M. L. Inclusão de moléculas anfifílicas em ciclodextrina- β em soluções aquosas de electrólitos fortes. Tese 2005 (Doutorado em Química) - Universidade de Aveiro. Portugal 2005.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Quim. Nova* 20 (1997) 191 - 195.

SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. *Quim. Nova* 27 (2004) 790 - 797.

TROJANOWICZ, M.; KRAWCZNSKI, T. V. K. Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Mikrochim. Acta* 121 (1995) 167 - 181.

TSCHIERSKE, C. Molecular self-organization of amphotropic liquidcrystals. *Prog. Polym. Sci.* 21 (1996) 775 - 852.

TSCHIERSKE, C. Amphotropic liquid crystals. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7(2002) 355 - 370.

TSCHIERSKE, C. Development of Structural Complexity by Liquid-Crystal Self-assembly. *Angew. Chem. Int.* 52 (2013) 8828 - 8878.

VIDAL, J. C.; MÉNDEZ, S.; CASTILLO, J. R. Electropolymerization of pyrrole and phenylenediamine over an organic conducting salt based amperometric sensor of increased selectivity for glucose determination. *Anal. Chim. Acta* 385 (1999) 203 - 211.

VITTAL, R.; GOMATHI, H.; KIM, K. J. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 119 (2006) 55 - 68.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics, in: R.E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley. New York, 2002 (units II.1.1–II.1.8).

WESTPHAL, E. Síntese e caracterização de novos cristais líquidos discóticos foto-isomerizáveis. Dissertação 2009 (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2009.

WESTPHAL, E.; BECHTOLD, I. H.; GALLARDO, H. Synthesis and Optical/Thermal Behavior of New Azo Photoisomerizable Discotic Liquid Crystals. *Macromolecules* 43 (2010) 1319 - 1328.

WINK, T.; VANZUILEN, S. J.; BULT, A.; VANBENKROM, W. P. Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst* 122 (1997) 43-50.

XIA, N.; MA, F.; ZHAO, F.; HE, Q.; DU, J.; LI, S.; CHEN, J.; LIU, L. Comparing the performances of electrochemical sensors using p-aminophenol redox cycling by different reductants on gold electrodes modified with self-assembled monolayers. *Electrochim. Acta* 109 (2013) 348 - 354.

XU, Y.; HU, C.; HU, S. Single-chain surfactant monolayer on carbon paste electrode and its application for the studies on the direct electron transfer of hemoglobin. *Bioelectrochem.* 74 (2009) 254 - 259.

YI, H.; WU, K.; HU, S. Adsorption stripping voltammetry of phenol at Nafion modified glassy carbon electrode in the presence of surfactants. *Talanta* 55 (2001) 1205 - 1210.

ZAPP, E.; SOUZA, F. D.; SOUZA, B. S.; NOME, F.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. A bio-inspired sensor based on surfactant film and Pd nanoparticles. *Analyst* 138 (2013) 509 - 517.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5165 - 5170.