

JAMILLE VALÉRIA PIOVESAN

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO
DE NOVOS ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS
PARA DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE TANINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

**Florianópolis
2018**

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

Piovesan, Jamille Valéria

Desenvolvimento, caracterização e aplicação de novos eletrodos quimicamente modificados para determinação eletroanalítica de taninos / Jamille Valéria Piovesan ; orientador, Almir Spinelli, 2018. 151 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

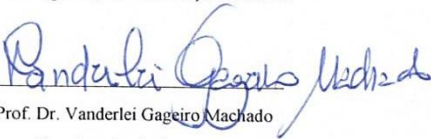
1. Química. 2. Eletroanalítica. 3. Eletrodos quimicamente modificados. 4. Taninos. I. Spinelli, Almir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

JAMILLE VALÉRIA PIOVESAN

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE NOVOS
ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS PARA DETERMINAÇÃO
ELETROANALÍTICA DE TANINOS**

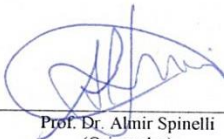
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutora em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 16 de março de 2018.



Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

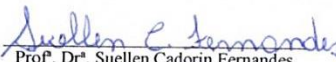
BANCA EXAMINADORA



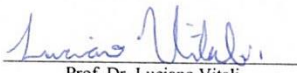
Prof. Dr. Almir Spinelli
(Orientador)



Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
(Relator - UEL/PR)



Prof. Dr. Suellen Cadorin Fernandes
(IFC - Araquari/SC)



Prof. Dr. Luciano Vitali
(DQ/UFSC)

*Dedico este trabalho às duas
pessoas que sempre acreditaram
na realização dos meus sonhos e
nunca mediram esforços pra torná-
los realidade.*

Aos meus pais: Adelia e Valmor.

Quero agradecer...

Primeiro de tudo, quero agradecer a Deus pelo dom da vida e por permanecer sempre ao meu lado, me mantendo firme nos momentos difíceis, e me dando sabedoria e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, por sempre cuidarem de mim com muito amor e carinho e pelo espírito de luta que transmitem aos seus filhos, nos ensinando sempre que na vida é preciso muito esforço e humildade.

Aos meus irmãos Gracielle e Arlen, e meus cunhados, Leandro e Lauriane, pelo grande apoio, amor e carinho de sempre.

À minha sobrinha/afilhada Valentina, que traz tanta luz e amor para minha vida.

Em especial, ao Prof. Dr. Almir Spinelli, pela orientação, paciência e apoio durante a execução desse trabalho e ao longo dos seis anos de GEPEEA.

Aos amigos e colegas do Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos – GEPEEA, pelos bons momentos e principalmente pela força e união nas horas difíceis. Agradeço por todo respeito, generosidade e amizade. Sem vocês esta jornada não seria tão prazerosa!

Aos professores da banca, pela disponibilidade em participar da mesma e pelas contribuições a este trabalho.

À todos os meus professores, pelos ensinamentos ao longo dos anos.

Aos colegas da UFSC: Dr^a. Bruna Baggio (Laboratório de Filmes Finos e Superfícies), Dr. Paulo Sérgio da Silva (Laboratório de Biossensores) e doutoranda Eloah Latochewski (Laboratório de Catálise Biomimética) pelo auxílio nas análises de perfilometria, espectroscopia de impedância eletroquímica e potencial Zeta, respectivamente.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC) pelas medidas de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Às agências de fomento (CNPq, CAPES e FAPESC) pelo suporte financeiro.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora aqui não nomeados, me presentearam com seu apoio em diferentes momentos dessa caminhada. Deixo aqui o meu reconhecimento e minha gratidão!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Quem busca algo novo e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO
(*período 2014 – 2018*)

❖ Artigos publicados em revistas científicas:

1. PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Determination of quercetin in a pharmaceutical sample by square-wave voltammetry using a poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 517-525, 2014.
2. BRONDANI, D.; PIOVESAN, J. V.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; DUTRA, R. F.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Label-free electrochemical immunosensor based on ionic organic molecule and chitosan-stabilized gold nanoparticles for the detection of cardiac troponin T. **Analyt**, v. 139, p. 5200-5208, 2014.
3. PIOVESAN, J. V.; JOST, C. L.; SPINELLI, A. Electroanalytical determination of total phenolic compounds by square-wave voltammetry using a poly(vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode. **Sensors and Actuators B, Chemical**, v. 216, p. 192-197, 2015.
4. LIMA, C. A.; SANTANA, E. R.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Silver nanoparticle-modified electrode for the determination of nitro compound-containing pesticides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 2595-2606, 2016.
5. SANTANA, E. R.; LIMA, C. A.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. An original ferroferric oxide and gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode for the determination of bisphenol A. **Sensors and Actuators B, Chemical**, v. 240, p. 487-496, 2017.
6. PIOVESAN, J. V.; LIMA, C. A.; SANTANA, E. R.; SPINELLI, A. Voltammetric determination of condensed tannins with a glassy carbon electrode chemically modified with gold nanoparticles stabilized in carboxymethylcellulose. **Sensors and Actuators B, Chemical**, v. 240, p. 838-847, 2017.
7. SILVEIRA, J. P.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Carbon paste electrode modified with ferrimagnetic nanoparticles for voltammetric

detection of the hormone estriol. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 22-30, 2017.

❖ **Resumos publicados em congressos:**

1. PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Determinação eletroanalítica de compostos fenólicos totais utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(vinilpirrolidona). In: **XXI Encontro de Química da Região Sul**, 2014, Maringá - PR. Anais do XXI Encontro de Química da Região Sul, 2014.

2. PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Determinação voltamétrica de taninos com eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em carboximetilcelulose. In: **XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2015, Uberlândia - MG. Anais do XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015.

3. LIMA, C. A.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Detecção de pesticidas nitroaromáticos utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de prata estabilizadas em quitosana. In: **XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2015, Uberlândia - MG. Anais do XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015.

4. BRONDANI, D.; PIOVESAN, J. V.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; DUTRA, R. A. F.; SPINELLI, A. ; VIEIRA, I. C. Imunossensor eletroquímico à base de molécula orgânica iônica e nanopartículas de ouro estabilizadas em quitosana para detecção de biomarcador cardíaco. In: **XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2015, Uberlândia - MG. Anais do XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015.

5. SILVEIRA, J. P.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Comportamento eletroquímico do hormônio estriol sobre um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de Fe_3O_4 . In: **XXII Encontro de Química da Região Sul**, 2015, Joinville - SC. Anais do XXII Encontro de Química da Região Sul, 2015.

6. SANTANA, E. R.; LIMA, C. A.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Estudo eletroquímico do bisfenol A sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e óxido de ferro. In: **XXII Encontro de Química da Região Sul**, 2015, Joinville - SC. Anais do XXII Encontro de Química da Região Sul, 2015.
7. LIMA, C. A.; PIOVESAN, J. V.; SANTANA, E. R.; SPINELLI, A. Determinação eletroanalítica do organofosforado etil-paration em amostras de mel e alface. In: **XXI Encontro de Química da Região Sul**, 2015, Joinville - SC. Anais do XXII Encontro de Química da Região Sul, 2015.
8. ALVES, I. C.; PIOVESAN, J. V.; LIMA, C. A.; VIEIRA, I. C. A experimentação no ensino de química através do projeto de extensão “ConsCiência Química”: avaliação dos alunos do ensino médio do Colégio Policial Militar Feliciano Nunes Pires. In: **XVIII Encontro Nacional de Ensino de Química**, 2016, Florianópolis - SC. Anais do XVIII Encontro Nacional de Ensino de Química, 2016.
9. PIOVESAN, J. V.; SILVEIRA, J. P.; SPINELLI, A. Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas ferrimagnéticas para detecção voltamétrica de estriol. In: **18º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2016, Florianópolis - SC. Anais do 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016.
10. PIOVESAN, J. V.; HADDAD, V. F.; SPINELLI, A. Aplicação de nanopartículas ferrimagnéticas e quitosana na preparação de um detector para o pesticida etil paration. In: **XXIII Encontro de Química da Região Sul**, 2016, Santa Maria - RS. Anais do XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016.
11. PIOVESAN, J. V.; MOREIRA, F.; SPINELLI, A. Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas ferrimagnéticas e líquido iônico para determinação de estrona. In: **XXIII Encontro de Química da Região Sul**, 2016, Santa Maria - RS. Anais do XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016.
12. SANTANA, E. R.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de ouro para detecção de metilparabeno. In: **XXIII Encontro de Química da Região Sul**, 2016, Santa Maria - RS. Anais do XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016.

13. PIOVESAN, J. V.; HADDAD, V. F.; PEREIRA, D. F.; SPINELLI, A. Eletrodo modificado com nanopartículas ferrimagnéticas e quitosana para detecção de etil paration em amostras de alimentos. In: **XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2017, Natal - RN. Anais do XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.

14. SANTANA, E. R.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Aplicação de um eletrodo modificado com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido/nanopartículas de ouro para determinação voltamétrica de metilparabeno. In: **XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2017, Natal - RN. Anais do XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.

15. PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Emprego de um eletrodo de pasta de carbono modificado com polietilenoglicol como detector eletroquímico para ácido tânico. In: **XXIV Encontro de Química da Região Sul**, 2017, Florianópolis - SC. Anais do XXIV Encontro de Química da Região Sul, 2017.

16. PEREIRA, D. F.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Comportamento eletroquímico da cianocobalamina (vitamina B₁₂) sobre um eletrodo de diamante dopado com boro. In: **XXIV Encontro de Química da Região Sul**, 2017, Florianópolis - SC. Anais do XXIV Encontro de Química da Região Sul, 2017.

17. MOREIRA, F.; PIOVESAN, J. V.; GERENT, G. G.; SANTANA, E. R.; SPINELLI, A. Determinação eletroanalítica de 17β-estradiol utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de Fe₃O₄ e BMI.PF₆. In: **XXIV Encontro de Química da Região Sul**, 2017, Florianópolis - SC. Anais do XXIV Encontro de Química da Região Sul, 2017.

RESUMO

Este trabalho descreve a preparação, caracterização e aplicação de dois novos eletrodos quimicamente modificados para a determinação eletroanalítica de taninos. O primeiro eletrodo proposto consiste na modificação de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com um filme de nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas no polímero carboximetilcelulose (CMC). As AuNPs foram obtidas pela redução do ácido tetracloroáurico, sendo caracterizadas em seguida pelas técnicas de espectroscopia UV-vis, microscopia eletrônica de transmissão e potencial zeta. Após modificada com a dispersão de AuNPs, a superfície do GCE foi analisada usando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, perfilometria, microscopia de força atômica, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. O GCE modificado com AuNPs e CMC foi usado para determinar taninos condensados. O segundo eletrodo quimicamente modificado proposto neste trabalho foi um eletrodo de pasta de carbono modificado com polietilenoglicol (PEG/CPE), o qual também teve sua superfície caracterizada por microscopia eletrônica de varredura, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Em seguida o PEG/CPE foi aplicado na quantificação de taninos hidrolisáveis. A catequina e o ácido tânico foram os compostos modelo usados no estudo dos taninos condensados e hidrolisáveis, respectivamente. Para estudar o comportamento da catequina e do ácido tânico sobre os eletrodos modificados e para otimizar os parâmetros experimentais das metodologias (pH, eletrólito suporte, velocidade de varredura), foi usada a técnica de voltametria cíclica. As modificações dos eletrodos com AuNPs-CMC e PEG mostraram-se alternativas bastante viáveis, pois aumentaram a sensibilidade dos detectores na determinação da catequina e do ácido tânico. A curva de calibração para a catequina foi obtida usando a técnica de voltametria de onda quadrada e foi linear na faixa de concentração de 0,3 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação de 0,274 e 0,831 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Por outro lado, a curva de calibração para o ácido tânico foi obtida pela técnica de voltametria de pulso diferencial e foi linear no intervalo de 0,08 a 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação de 72,65 e 220,17 nmol L^{-1} , respectivamente. Por fim, o AuNPs-CMC/GCE e o PEG/CPE foram empregados com sucesso na quantificação de taninos condensados em extratos vegetais e taninos hidrolisáveis em cervejas. Ambas as metodologias proporcionaram resultados com elevada

precisão e exatidão, comparáveis aos obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu.

Palavras-chave: Eletroanalítica. Eletrodos quimicamente modificados. Taninos.

ABSTRACT

This work describes the preparation, characterization and application of two novel chemically modified electrodes for the electroanalytical determination of tannins. The first proposed electrode consists of the modification of a glassy carbon electrode (GCE) with a gold nanoparticles (AuNPs) film stabilized in the polymer carboxymethylcellulose (CMC). AuNPs were obtained by the reduction of tetrachlorouric acid and characterized by UV-vis spectroscopy, transmission electron microscopy and zeta potential. After being modified with the AuNPs dispersion, the surface of the GCE was analyzed using scanning electron microscopy, profilometry, atomic force microscopy, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The GCE modified with AuNPs and CMC was used to determine condensed tannins. The second chemically modified electrode proposed in this work was a carbon paste electrode modified by poly(ethylene glycol) (PEG/CPE), which also had its surface characterized by scanning electron microscopy, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Then the PEG/CPE was applied on the quantification of hydrolyzable tannins. Catechin and tannic acid were the model compounds used in the study of condensed and hydrolyzable tannins, respectively. To study the behavior of catechin and tannic acid on the modified electrodes and to optimize the experimental parameters of the methodologies (pH, support electrolyte, scan rate), the cyclic voltammetry technique was used. The modifications of the electrodes with AuNPs-CMC and PEG showed themselves as quite feasible alternatives, since they increased the sensitivity of the detectors in the determination of catechin and tannic acid. The calibration curve for catechin was obtained using square-wave voltammetry and it was linear in the concentration range of 0.3 to 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with limits of detection and quantification of 0.274 and 0.831 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Conversely, the calibration curve for tannic acid was obtained by differential pulse voltammetry and it was linear at the range of 0.08 to 2.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with limits of detection and quantification of 72.65 and 220.17 nmol L^{-1} , respectively. Finally, the AuNPs-CMC/GCE and PEG/CPE were successfully employed on the quantification of condensed tannins in plant extracts and hydrolyzable tannins in beers. Both methodologies provided results with high

precision and accuracy, comparable to those obtained by the Folin-Ciocalteu method.

Keywords: Electroanalysis. Chemically modified electrodes. Tannins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química (A) da catequina e (B) de um tanino condensado.	34
Figura 2. Estrutura química do ácido tânico, um tanino hidrolisável.	35
Figura 3. Imagens do cálice de <i>Lycurgus</i> , exposto no Museu Britânico, à esquerda sendo iluminado por fora e à direita, por dentro.	48
Figura 4. Representação de (A) estabilização eletrostática e (B) estabilização estérea de NPs.	50
Figura 5. Representação da estabilização eletroestérica de NPs metálicas.	50
Figura 6. Estrutura da unidade dimérica da carboximetilcelulose (sal de sódio).	54
Figura 7. Estrutura monomérica da molécula de PEG.	55
Figura 8. Representação esquemática da preparação do AuNPs-CMC/GCE.	61
Figura 9. Representação esquemática da preparação do PEG/CPE.	62
Figura 10. (A) Solução aquosa de CMC; (B) após adição de 10,0 μL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e (C) após adição de NaBH_4 .	66
Figura 11. Fotografia digital das dispersões de AuNPs estabilizadas em CMC sintetizadas em diferentes valores de pH: (A) pH 1,0; (B) pH 4,0; (C) pH 7,0 e (D) 10,0.	67
Figura 12. Espectros UV-vis para AuNPs estabilizadas em CMC com diferentes valores de pH.	67
Figura 13. (A, C, E e G) Imagens de TEM para AuNPs obtidas em diferentes valores de pH; (B, D, F e H) histogramas de distribuição do diâmetro médio das AuNPs para os pH 1, 4, 7 e 10, respectivamente.	68
Figura 14. Espectros UV-vis para AuNPs estabilizadas em CMC (a) 3 horas após a síntese e (b) 7 dias após a síntese.	71
Figura 15. Gráficos de perfilometria das superfícies do (a) GCE; (b) filme de CMC e (c) filme de AuNPs-CMC.	72
Figura 16. Microscopias de força atômica para (A) GCE e (B) AuNPs-CMC/GCE.	72
Figura 17. Micrografias de SEM-FEG (A) GCE; (B) filme de AuNPs-CMC e (C) região da imagem (B), ampliada 5 vezes.	73
Figura 18. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de ouro e (b) AuNPs-CMC/GCE em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , $v = 50$ mV s^{-1} .	74
Figura 19. (A) Voltamogramas cíclicos para $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1,0 mmol L^{-1} sobre GCE/AuNPs-CMC em KCl 0,5 mol L^{-1} (a) branco, (b-h) $v = 10$ a 200 mV s^{-1} ;	

(B) Espectroscopia de impedância eletroquímica para (a) GCE, (b) CMC/GCE e (c) AuNPs-CMC/GCE. 76

Figura 20. Voltamogramas cíclicos para (a) branco; (b) GCE; (c) CMC/GCE e (d) AuNPs-CMC/GCE na presença de catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 77

Figura 21. Voltamogramas cíclicos sobre o AuNPs-CMC/GCE em (a) branco; (b e c) catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 79

Figura 22. (A) Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (a) branco; (b-k) $\nu = 10$ a 350 mV s^{-1} ; (B) gráfico $\log i_p$ vs. $\log \nu$ 80

Figura 23. Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (A) pH 1,0 a 4,0; (B) pH 5,0 a 8,0; (C) pH 9,0 a 12,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 81

Figura 24. Variação (A) da corrente de pico anódica e catódica e (B) dos potenciais de pico de oxidação e de redução em função do pH do eletrólito suporte; demais parâmetros semelhantes à figura anterior. 83

Figura 25. Mecanismo de oxidação da catequina. 84

Figura 26. Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em (A) pH 2,0; (B) pH 3,0 e (C) pH 4,0. Sendo: a – B-R, b – fosfato, c – Clark-Lubs, d – McIlvaine e e – acetato; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 85

Figura 27. Respostas (A) de corrente anódica e (B) de corrente catódica em função do pH e da natureza do eletrólito suporte; a – B-R, b – fosfato, c – Clark-Lubs, d – McIlvaine e e – acetato, $n = 3$ 86

Figura 28. (A) Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em diferentes concentrações de solução tampão fosfato pH 2,0: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; (B) Respostas de correntes anódica e catódica em função da concentração do eletrólito suporte, $n = 3$ 87

Figura 29. Voltamogramas para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o AuNPs-CMC/GCE: (a) LSV, (b) DPV e (c) SWV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 88

Figura 30. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a-k: $f = 10$ a 100 Hz); (B) dependência da corrente resultante com a variação da frequência ($a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$) para catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $n = 3$ 89

Figura 31. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a-k: $a = 10$ a 100 mV); (B) dependência da corrente resultante com a variação da amplitude ($f = 80 \text{ Hz}$ e

$\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ para catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $n = 3$90

Figura 32. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a-j: $\Delta E_s = 2$ a 10 mV); (B) dependência da corrente resultante com a variação do incremento ($f = 80 \text{ Hz}$ e $a = 100 \text{ mV}$) para catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $n = 3$91

Figura 33. (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina: (a) branco (b) 0,3, (c) 0,5, (d) 0,7, (e) 1,0, (f) 2,0, (g) 3,0, (h) 4,0, (i) 5,0, (j) 6,0, (k) 7,0, (l) 8,0, (m) 9,0 e (n) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0); $f = 80 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração para a catequina, $n = 5$92

Figura 34. (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina: (a) branco (b) 1,0, (c) 2,0, (d) 3,0, (e) 4,0, (f) 5,0, (g) 6,0, (h) 7,0, (i) 8,0, (j) 9,0 e (k) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, sobre GCE em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0); $f = 80 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração, $n = 5$93

Figura 35. (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina: (a) branco (b) 1,0, (c) 2,0, (d) 3,0, (e) 4,0, (f) 5,0, (g) 6,0, (h) 7,0, (i) 8,0, (j) 9,0 e (k) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, sobre eletrodo de ouro em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0); $f = 80 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração, $n = 5$94

Figura 36. (A, B e C) Voltamogramas de onda quadrada para as amostras A, B e C, respectivamente, sendo (a) brancos, (b) amostras e (c-g) sucessivas adições de solução padrão de catequina. (D, E e F) curvas de calibração (em preto) e curvas de adição de padrão (em vermelho) para as três amostras.97

Figura 37. Micrografias de SEM-FEG para (A) CPE e (B) PEG/CPE.101

Figura 38. (A) Voltamogramas cíclicos para $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ sobre (a) CPE e (b) PEG/CPE em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Diagramas de Nyquist para (a) CPE e (b) PEG/CPE.102

Figura 39. (A) Voltamogramas cíclicos para $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) sobre PEG/CPE, (a - g) $= v = 10$ a 300 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de i vs. $v^{1/2}$103

Figura 40. (A) Voltamogramas cíclicos para $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) sobre CPE, (a - g) $= v = 10$ a 300 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de i vs. $v^{1/2}$104

Figura 41. (A) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre diferentes eletrodos: (a) branco, (b) CPE, (c) PEG- Fe_3O_4 /CPE e (d) PEG/CPE, em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Respostas de corrente anódica do ácido tânico para cada um dos eletrodos.106

- Figura 42.** Representação esquemática da interação do ácido tânico com a superfície do PEG/CPE. 107
- Figura 43.** Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o PEG/CPE em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, sendo (a) 1º ciclo e (b) 2º ciclo. 108
- Figura 44.** (A) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sobre o CPE modificado com diferentes proporções de PEG: (a, b, c, d, e, f) = 0, 5, 10, 15, 20, 25% de PEG, respectivamente. (B) Resposta de corrente anódica para o ácido tânico em função da quantidade de PEG, $n = 3$ 109
- Figura 45.** Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o PEG/CPE em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (A) pH 1,0 a 4,0; (B) pH 5,0 a 8,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (C) Respostas de potencial (a) e de corrente (b) de pico de oxidação em função do pH do eletrólito suporte. 111
- Figura 46.** Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o PEG/CPE em diferentes soluções tampão $0,2 \text{ mol L}^{-1}$: (a) B-R, (b) acetato e (c) McIlvaine ajustados em (A) pH 4,0; (B) pH 5,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 113
- Figura 47.** (A) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) (a - h) = $10 - 250 \text{ mV s}^{-1}$; (B) $\log i$ vs. $\log \nu$ 115
- Figura 48.** Respostas de corrente de pico anódico em função do tempo de pré-concentração; (B) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) (a) branco, (b) sem pré-concentração e (c) com 60 s de pré-concentração. 117
- Figura 49.** Voltamogramas (a) linear, (b) de pulso diferencial e (c) de onda quadrada para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$; (B) Respostas de corrente anódica para o ácido tânico usando diferentes técnicas eletroanalíticas, $n = 3$ 118
- Figura 50.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), (a - j) = $E_{\text{pulso}} = 10,0 - 100,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 2,0 \text{ ms}$, $\nu = 30,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$; (B) Gráfico de i vs. E_{pulso} , $n = 3$ 120
- Figura 51.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\nu = 10,0 - 100,0 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 2,0 \text{ ms}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$; (B) Gráfico de i vs. ν , $n = 3$ 121
- Figura 52.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $t_{\text{pulso}} = 1,0 - 10,0 \text{ ms}$, $\nu = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$; (B) Gráfico de i vs. t_{pulso} , $n = 3$ 122

Figura 53. Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de ácido tânico sobre o PEG/CPE: (a) branco, (b) 0,08, (c) 0,1, (d) 0,3, (e) 0,5, (f) 0,7, (g) 0,9, (h) 1,1, (i) 1,3, (j) 1,5, (k) 1,7, (l) 1,9 e (m) 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,2 mol L^{-1} (pH 5,0); $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 3,0 \text{ ms}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$; (B) Curva de calibração para o ácido tânico ($n = 5$)... 124

Figura 54. Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de ácido tânico sobre o CPE: (a) branco, (b) 0,3, (c) 0,5, (d) 0,7 (e) 0,9, (f) 1,1, (g) 1,3, (h) 1,5, (i) 1,7, (j) 1,9 e (k) 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,2 mol L^{-1} (pH 5,0); $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 3,0 \text{ ms}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$; (B) Curva de calibração para o ácido tânico ($n = 5$). 125

Figura 55. (A, B, C, D e E) Voltamogramas de pulso diferencial para as amostras 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. (a) branco, (b) amostras e (c-f) sucessivas adições de solução padrão de ácido tânico em solução tampão B-R 0,2 mol L^{-1} (pH 5,0); $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 3,0 \text{ ms}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$. À direita, curvas de calibração (em preto) e de adição de padrão (em vermelho) para cada uma das amostras..... 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos utilizando eletrodos modificados com AuNPs para detecção de diferentes compostos.	51
Tabela 2. Resultados obtidos na caracterização das AuNPs-CMC.	69
Tabela 3. Parâmetros analíticos das curvas de calibração para catequina usando diferentes detectores.	95
Tabela 4. Determinação de taninos em extratos de plantas.	98
Tabela 5. Recuperação de catequina em amostras de taninos usando o eletrodo proposto.	99
Tabela 6. Valores de corrente de pico anódico (i_{pa}) e de potencial de pico de oxidação (E_{po}) em diferentes eletrólitos suporte.	113
Tabela 7. Características analíticas da curva de calibração para ácido tânico usando o PEG/CPE e o CPE.	126
Tabela 8. Comparação do desempenho de diferentes eletrodos para determinação de ácido tânico.	127
Tabela 9. Resultados obtidos na determinação de ácido tânico em amostras de cervejas.	131
Tabela 10. Dados para o estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras de cerveja usando o PEG/CPE.	132

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ΔE_s – incremento de pulso de potencial
 a – amplitude de pulso de potencial
a.C. – Período antes de Cristo
AFM – Microscopia de força atômica (do inglês, *atomic force microscopy*)
ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária
AuNPs – Nanopartículas de ouro
AuNPs-CMC – Nanopartículas de ouro estabilizadas em carboximetilcelulose
CMC – Carboximetilcelulose
CPE – Eletrodo de pasta de carbono (do inglês, *carbon paste electrode*)
CV – Voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry*)
DPR – Desvio padrão relativo
DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry*)
EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*)
 E_{po} – Potencial de pico de oxidação
 E_{pr} – Potencial de pico de redução
 E_{pulso} – amplitude de pulso de potencial
EQCM-CV – Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo aliada a voltametria cíclica (do inglês, *electrochemical quartz crystal microbalance cyclic voltammetry*)
EQM – Eletrodos quimicamente modificados
 f – frequência de aplicação do pulso
GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, *glassy carbon electrode*)
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
 i_{pa} – Corrente de pico anódica
 i_{pc} – Corrente de pico catódica
ITO – Eletrodo de óxido de estanho dopado com óxido de índio (do inglês, *indium thin oxide*)
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
LSV – Voltametria linear (do inglês, *linear sweep voltammetry*)
NPs – Nanopartículas
PEG – Poli(etilenoglicol)
RMN – Ressonância magnética nuclear
 R_{tc} – Resistência à transferência de carga

SEM-FEG – Microscopia eletrônica de varredura com campo de emissão (do inglês, *scanning electronic microscopy with field emission gun*)

SPR – Ressonância plasmônica de superfície (do inglês, *surface plasmon resonance*)

SWNTs – Nanotubos de carbono de paredes simples (do inglês, *single wall carbon nanotubes*)

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês, *square-wave voltammetry*)

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *transmission electronic microscopy*)

t_{pc} – tempo de pré-concentração

t_{pulso} – tempo de duração do pulso

v – velocidade de varredura de potencial

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA	31
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
1.1 Taninos: estrutura e classificação	33
1.2 Compostos modelo para taninos	35
1.3 Alguns aspectos químicos e biológicos	36
1.4 Aplicações comerciais e industriais.....	38
1.5 Métodos para quantificação de taninos	40
1.6 Determinação eletroanalítica de taninos	43
1.7 Eletrodos quimicamente modificados.....	46
<i>1.7.1 Utilização de nanopartículas metálicas na preparação de EQM</i>	<i>48</i>
<i>1.7.2 Utilização de polímeros na preparação de EQM.....</i>	<i>52</i>
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	57
2.1 Objetivo geral	57
2.2 Objetivos específicos.....	57
CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL.....	59
3.1 Reagentes, soluções e amostras	59
3.2 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro	60
3.3 Preparação e caracterização dos EQM	60
<i>3.3.1 GCE modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs-CMC/GCE).....</i>	<i>60</i>
<i>3.3.2 CPE modificado com poli(etilenoglicol) (PEG/CPE)</i>	<i>62</i>
3.4 Medidas eletroquímicas	63
3.5 Método comparativo	64
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Estudos com taninos condensados	65
<i>4.1.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro</i>	<i>65</i>
<i>4.1.2 Caracterização morfológica e eletroquímica do AuNPs-CMC/GCE</i>	<i>71</i>
<i>4.1.3 Comportamento eletroquímico da catequina sobre diferentes eletrodos.....</i>	<i>76</i>
<i>4.1.4 Efeito da velocidade de varredura</i>	<i>79</i>
<i>4.1.5 Influência do pH, da natureza e da concentração do eletrólito suporte.....</i>	<i>81</i>
<i>4.1.6 Escolha da técnica e otimização dos parâmetros experimentais</i>	<i>87</i>
<i>4.1.7 Curva de calibração e características analíticas</i>	<i>91</i>
<i>4.1.8 Repetibilidade e estabilidade.....</i>	<i>95</i>

4.1.9 Aplicação analítica do AuNPs-CMC/GCE.....	96
4.2 Estudos com taninos hidrolisáveis.....	100
4.2.1 Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos..	100
4.2.2 Comportamento eletroquímico do ácido tânico sobre diferentes eletrodos	104
4.2.3 Otimização dos parâmetros experimentais.....	108
4.2.4 Escolha e otimização dos parâmetros da técnica eletroanalítica	117
4.2.5 Curva de calibração e características analíticas	122
4.2.6 Repetibilidade da resposta eletroanalítica e estabilidade do eletrodo.....	127
4.2.7 Aplicação analítica do PEG/CPE em amostras de cervejas..	128
CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS	137

APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os taninos formam uma classe de compostos com grande importância comercial, sobretudo no setor da indústria de curtimento de couro de origem animal e também na indústria de bebidas, onde são usados principalmente como agentes clarificadores. Neste cenário, a necessidade de técnicas que sejam capazes de quantificar taninos com respostas reprodutíveis, alta sensibilidade e seletividade, em um curto período de tempo e com baixos custos de implementação e manutenção, mostra-se de grande relevância.

Atualmente, os métodos mais empregados no estudo de taninos são os colorimétricos, cromatográficos, gravimétricos, eletroquímicos e de precipitação de proteínas. Neste sentido, as técnicas eletroanalíticas vêm sendo cada vez mais utilizadas para o desenvolvimento de novas estratégias, principalmente por apresentarem as seguintes vantagens: baixo custo da instrumentação, baixos limites de detecção e quantificação, portabilidade dos equipamentos, alta frequência analítica e simplicidade no preparo das amostras. Ainda o uso de eletrodos quimicamente modificados, quando aliado à estas técnicas, pode proporcionar aumento da sensibilidade e/ou da seletividade das metodologias.

Desta forma, a procura por novos materiais e por diferentes arquiteturas para a construção de dispositivos voltados à detecção de taninos é de grande interesse no meio científico e tecnológico, o que justifica a proposta desta pesquisa. Tal proposta consiste em utilizar materiais poliméricos que apresentam forte interação com as moléculas de taninos para a construção de detectores eletroquímicos. Além disso, este trabalho busca também investigar a aplicação de nanomateriais como agentes modificadores, a fim de se obter eletrodos sensíveis, de fácil preparação e que forneçam respostas rápidas e reprodutíveis.

Para fins de apresentação, esta tese foi dividida em seis capítulos, onde: o primeiro capítulo versará sobre a fundamentação teórica, na qual há uma revisão bibliográfica sobre os temas em estudo. No capítulo dois serão apresentados os objetivos (geral e específicos) desta pesquisa. No capítulo três são descritos os procedimentos experimentais empregados durante o trabalho. O quarto capítulo apresenta os resultados e discussão acerca dos experimentos realizados. E por fim, no quinto e sexto capítulos são descritas as considerações finais e as referências bibliográficas, respectivamente.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Taninos: estrutura e classificação

O termo tanino é derivado da palavra '*tanin*' (que em francês significa substância de curtimento) e é utilizada para designar uma série de polifenóis naturais (KHANBABAEI; REE, 2001). Lekha e Lonsane (1997) definem taninos como sendo compostos fenólicos com alta massa molar e que possuem a propriedade de se combinar com proteínas, celulose e pectina formando um complexo insolúvel (LEKHA, LONSANE, 1997). Bate-Smith, por sua vez, define taninos como compostos fenólicos solúveis em água, com massa molar entre 500 e 3000 g mol⁻¹ e que têm a capacidade de precipitar proteínas (BATE-SMITH, 1977). Em geral, os taninos são compostos de elevada massa molar, que contêm muitos grupamentos fenólicos que permitem a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (MUELLER-HARVEY, 2001).

Na forma não oxidada, os taninos interagem com as proteínas através de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas. Quando oxidados, os taninos se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfidrilos da cisteína e aminos da lisina (SGARBIERI, 1996).

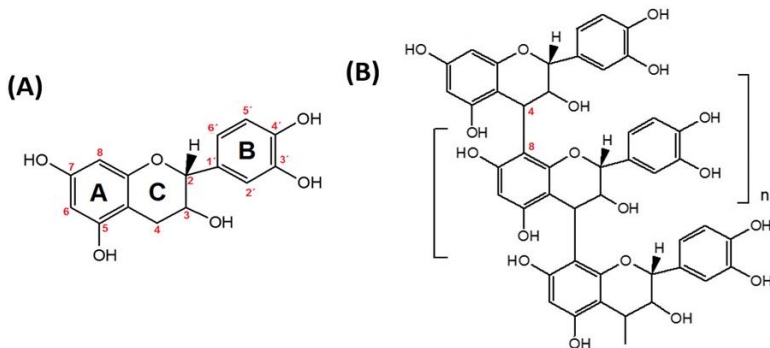
Os taninos são compostos presentes em alimentos e bebidas, principalmente na cerveja, chá e vinho (PANSERA et al., 2003). Esses componentes são muito importantes na indústria de alimentos, principalmente pelas influências que apresentam sobre suas características físico-químicas, por formarem precipitados com proteínas e alguns sais e estarem sensorialmente ligados a adstringência de certos frutos, além de apresentarem ação antioxidante. A propriedade que os taninos possuem de causar adstringência ao paladar está envolvida diretamente com a sua capacidade de interagir com as proteínas presentes na saliva (PONCET-LEGRAND et al., 2006).

De acordo com a estrutura química, os taninos obtidos de plantas terrestres podem ser classificados em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BRUNETON, 2001; SANTOS, MELLO, 2003). Existem ainda os florotaninos, encontrados apenas em determinadas espécies de algas marinhas (SWANSON; DRUEHL, 2002; NAGAYAMA et al., 2003; JORMALAINEN et al., 2005).

Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas, são formados pela policondensação de duas ou mais

unidades flavan-3-ol, tais como catequina ou epicatequina (Figura 1), respectivamente unidas por pares de ligações C_4-C_8 ou C_4-C_6 , as quais não são susceptíveis de serem rompidas por hidrólise (BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2003; SHOJI et al., 2006). As várias formas de estrutura dos flavan-3-óis existentes na natureza diferem na estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel C (C2 e C3) bem como no grau de hidroxilação dos anéis A e B.

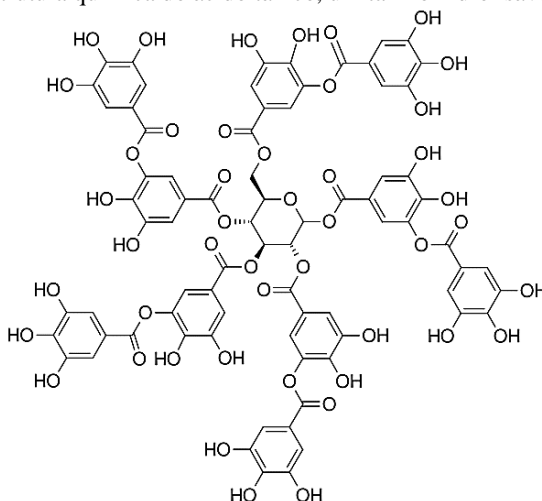
Figura 1. Estrutura química (A) da catequina e (B) de um tanino condensado.



Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila (HAGERMAN; RICE; RITCHARD, 1998). A unidade básica desse tipo de tanino é um poliol, usualmente D-glucose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido elágico (elagitaninos) (KHANBABAEE; REE, 2001). São facilmente hidrolisados, química ou enzimaticamente, e podem ser quebrados em açúcares, ácidos carboxílicos e compostos fenólicos simples (RAMÍREZ-CÁRDENAS, 2006). Na Figura 2 está representada a estrutura do ácido tânico, um exemplo bastante comum de tanino hidrolisável.

Os taninos condensados são mais comuns na dieta humana do que os taninos hidrolisáveis, estando presentes em concentrações relativamente importantes em alguns frutos (uvas, maçãs, etc.) e suas bebidas derivadas, e também no cacau e no chocolate (SCALBERT, 1991; SANTOS-BUELGA; SCALBERT, 2000).

Figura 2. Estrutura química do ácido tânico, um tanino hidrolisável.



1.2 Compostos modelo para taninos

A análise quantitativa de taninos torna-se difícil pela, já mencionada, complexidade e variedade das estruturas existentes e também pela escassez de técnicas analíticas que permitam a separação, identificação e quantificação das estruturas mais simples. Apesar de estruturas mais complexas constituírem a maioria dos polifenóis das plantas, a análise química se limita, normalmente, a monômeros, dímeros e alguns trímeros (CHEYNIER, 2005). Por causa dessa complexidade estrutural das moléculas de taninos, e da dificuldade em separá-los em moléculas mais simples, neste estudo foram utilizados compostos modelo para representar sua estrutura. Os dois compostos utilizados são descritos a seguir e foram escolhidos justamente por representarem partes básicas da estrutura total do tanino complexo.

A catequina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) foi selecionada como composto modelo para os taninos condensados. Este composto é um polifenol da família dos flavonóides, sendo encontrado em várias plantas e alimentos. Sua atividade antioxidante proporciona a proteção contra doenças diretamente ou parcialmente relacionadas à acumulação de radicais livres no corpo humano (YASARAWAN et al., 2013). O ácido tânico (1,2,3,4,6-pentadigaloilglucose) foi o composto utilizado como modelo para os taninos hidrolisáveis. Este consiste numa unidade

central de carboidrato (glucose) e 10 grupos galoil. É um polifenol de origem natural, amplamente utilizado em medicamentos veterinários e fábricas de tintas, apresentando coloração marrom (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999). As estruturas químicas da catequina e do ácido tânico já foram descritas na seção anterior. A catequina apresenta massa molar de $290,24 \text{ g mol}^{-1}$, enquanto a massa molar do ácido tânico é de $1701,19 \text{ g mol}^{-1}$. Ambos são ligeiramente solúveis em água e amplamente solúveis em etanol a temperatura ambiente. Além disso, são comercializados livremente como resultado da sua baixa toxicidade e da extensa gama de aplicações, as quais serão discutidas nos tópicos a seguir.

1.3 Alguns aspectos químicos e biológicos

Os taninos constituem o quarto grupo de compostos fenólicos mais abundante nos vegetais, depois da celulose, hemicelulose e lignina (HASLAM, 2007). Como citado anteriormente, os múltiplos grupos hidroxila presentes na estrutura dos taninos permitem a formação de complexos com proteínas (NACZK et al., 1996; HAGERMAN et al., 1998), íons metálicos (ACKER, et al., 1998; YURTSEVER; ŞENGİL, 2009; MANGRICH et al., 2014) e outras macromoléculas, como polímeros e polissacarídeos (KAWAMOTO; NAKATSUBO; MURAKAMI, 1995; GETACHEW; MAKKAR; BECKER, 2000; MUELLER-HARVEY, 2001). A complexação com taninos envolve principalmente a interação com os grupos hidroxilas presentes em alta quantidade em suas estruturas. No caso de proteínas, polímeros e polissacarídeos, os grupos fenólicos interagem por ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (SIEBERT; TROUKHANOVA; LYNN, 1996; MIN et al., 2003). No caso de íons metálicos, a complexação ocorre através da desprotonação dos grupos fenólicos dos taninos, a qual forma centros com alta densidade eletrônica, capazes de interagir com íons de carga positiva (SPENCER et al., 1988; MORISADA et al., 2012). Diversos estudos têm reportado a aplicação de taninos em tratamentos de água residual devido a sua habilidade de complexar metais, podendo em alguns casos substituir os sais de alumínio e ferro (YURTSEVER; ŞENGİL, 2009; MORISADA et al., 2012; MANGRICH et al., 2014).

Na parte biológica, os taninos atuam como parte do mecanismo de defesa das plantas contra ação de microrganismos, herbívoros e condições ambientais hostis. As plantas que contém altos níveis de

taninos podem apresentar vantagens evolucionárias significativas sobre seus predadores e outras espécies vegetais (AERTS; BARRY; MCNABB, 1999; PANSERA et al., 2003). As propriedades antimicrobianas dos taninos também são bem conhecidas e documentadas. Moléculas de taninos já foram testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente contra o HIV (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998; TAYLOR et al., 1998; SINGH; BHAT; SHARMA, 2001). Nesse sentido, Hashimoto e colaboradores (1996) observaram que galotaninos mostraram atividade inibitória somente em concentrações tóxicas, elagitaninos e taninos condensados inibiram fracamente a replicação viral e os taninos complexos mostraram potente atividade contra a replicação do HIV. Além disso, os pesquisadores concluíram que a atividade anti-HIV exibida por esses taninos é devida à inibição da transcriptase reversa, dificultando assim a replicação viral (HASHIMOTO et al., 1996).

Com relação às propriedades antibacterianas, uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações pequenas ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido (CASTRO, 1999). Nishizawa e colaboradores demonstraram atividade bactericida significativa da raiz de *Nuphar variegatum* Durand contra microrganismos patógenos. Em seu trabalho, relataram que, por séculos, o rizoma e as raízes desta erva aquática têm sido usados na medicina popular por suas propriedades afrodisíacas, hemostáticas, adstringentes e sedativas. O rizoma, em especial, é empregado na cura de diversas infecções e a raiz para tratamento de infecções dos olhos, garganta e dores internas. A análise por HPLC do extrato aquoso da raiz desta planta evidenciou a presença de dois galotaninos e dois elagitaninos em concentrações bastante elevadas (NISHIZAWA et al., 1990).

Por outro lado, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, os taninos também podem apresentar atividades tóxicas. Ayres e colaboradores verificaram que a rápida mortalidade de insetos tratados com taninos condensados é causada pela atividade tóxica destes compostos e não pela inibição da digestibilidade, como se pensava (AYRES et al., 1997). Entre os complexos mecanismos de toxicidade, que envolvem os taninos, alguns deles envolvem a complexação com íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo microorganismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos. Por exemplo, ratos tratados com bebidas ricas em compostos fenólicos

tiveram redução da absorção de ferro, elemento essencial para o crescimento (SCALBERT, 1991).

Os taninos também são considerados indesejáveis do ponto de vista nutricional pelo fato de precipitarem proteínas, inibirem enzimas digestivas e afetarem a utilização de vitaminas e minerais podendo, ainda, em alta concentração, desenvolver câncer de bochecha e esôfago (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998; TAYLOR et al., 1998; SINGH; BHAT; SHARMA, 2001). Chung e colaboradores relataram que nozes contendo elevados teores de taninos podem ser responsáveis pela alta incidência de câncer de esôfago em uma determinada comunidade dos Estados Unidos, onde pessoas costumam consumi-las após o almoço. Contraditoriamente, a atividade anticarcinogênica é evidenciada pelos mesmos autores, onde afirmam que os japoneses consomem o chá verde, rico em ácido tânico e outros polifenóis, em grandes quantidades e o risco de câncer gástrico mostrou-se reduzido (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998).

Em herbívoros, os taninos promovem efeitos negativos na digestão e na absorção de nutrientes, devido à precipitação das proteínas, inibição de enzimas digestivas e complexação com vitaminas e sais minerais (MAKKAR; BECKER, 1993; LIAO; LU; SHI, 2003; MONTEIRO et al., 2005). Acredita-se que altos teores de taninos ingeridos por animais domésticos, através de alimentos como sorgo ou farinha de sementes, podem também levar à morte.

Diversos estudos indicam a maior toxicidade dos taninos hidrolisáveis em relação aos condensados. Isso porque os taninos hidrolisáveis podem ser facilmente degradados nos sistemas biológicos e os produtos da hidrólise podem chegar a órgãos como fígado e rins. Os taninos condensados não são hidrolisados e, portanto, não chegam à corrente sanguínea (LIAO; DU; SHI, 2003).

1.4 Aplicações comerciais e industriais

Devido à sua estrutura e propriedades, os taninos possuem aplicações em diversas áreas, dentre as quais se destacam as indústrias agroalimentares e de bebidas, farmacológicas, de resinas e de curtimento de couros.

Os taninos para uso industrial são extraídos principalmente das partes lignificadas e dos frutos de um grande número de espécies vegetais, sendo que as mais utilizadas são o quebracho (*Schinopsis* spp.) e a acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). Além dessas podem ser

produzidos também a partir dos gêneros *Çeneros*, *Tsuga*, *Castanea*, *Quercus* e *Terminalia* (SANTOS; MELLO, 2003).

Na indústria alimentícia, os taninos são usados principalmente como fonte de antioxidantes em sucos de frutas e outras bebidas. Uma outra aplicação que merece destaque é na estabilização de cervejas. A quantidade de ácido tânico a ser dosada nesse caso depende de vários parâmetros, como matérias-primas empregadas, conteúdo de proteínas, tempo de maturação e temperatura, e especificações de qualidade. O objetivo da adição de taninos em cervejas é reduzir a concentração de proteínas através de precipitação como complexos tanino-proteicos, que são retirados da bebida através de sedimentação ou centrifugação/filtração (BATTESTIN; MACEDO, 2007).

Na indústria têxtil, os taninos são usados como corantes para tecidos e borrachas, em virtude de sua pigmentação característica. Além disso, também são aplicados como coagulantes e floculantes no tratamento de águas residuais.

O uso de taninos no beneficiamento do couro é feito há milhares de anos e merece certo destaque uma vez que são aplicadas grandes quantidades de taninos no dito “curtimento” e em outras etapas do processo. O curtimento é a transformação de peles (putrecíveis) em couros (não putrecíveis). Nesse sentido, os taninos são empregados em função da sua capacidade de se combinar com proteínas da pele animal, formando complexos que aumentam a resistência e a durabilidade das peles. Essa finalidade tem aplicação na confecção de sapatos, bolsas e demais artefatos de couro. De acordo com Zaman e Khan, a utilização de taninos em artefatos de couros remonta à antiguidade, considerando que os arqueólogos encontraram artigos em couro datados de 10.000 a.C, mostrando traços de taninos (ZAMAN; KHAN, 1961). Mas, segundo Pourrat (1980), foi somente a partir do final do século XVII que os taninos tiveram um destaque especial para esta finalidade (POURRAT, 1980). No Brasil, a principal fonte de taninos para as indústrias de couro é a Acácia negra (*Acacia mearnsii*), que é originária da Austrália, com cerca de 200 mil hectares de florestas plantadas principalmente no estado do Rio Grande do Sul.

Taninos condensados também têm sido muito usados para fabricação de colas e resinas, bem como na produção de borrachas, na fabricação de conglomerados e laminados de madeira. Com menor extensão, também são relatados como agentes floculantes ou coagulantes em processos de purificação de água e de outros líquidos como combustíveis, por exemplo (BATTESTIN; MACEDO, 2007).

1.5 Métodos para quantificação de taninos

Vários são os métodos para determinação de taninos que têm sido empregados, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Dentre eles destacam-se pela maior utilização os métodos colorimétricos, cromatográficos, gravimétricos, eletroquímicos e de precipitação de proteínas. Eles podem ser empregados na determinação de compostos fenólicos totais, quantificação de um tanino de forma individual e/ou de uma classe de taninos (MOURE et al., 2001). A sensibilidade alcançada por todos estes procedimentos é satisfatória para a quantificação analítica de taninos. Todavia, em alguns casos, uma etapa prévia é exigida antes da quantificação, envolvendo extração do analito com outros compostos ou a partir de amostras complexas, tornando análises de rotina economicamente inviáveis. Por essas moléculas também apresentarem uma grande variedade de estruturas, tanto taninos condensados quanto os hidrolisáveis, alta reatividade de suas subunidades com materiais oxidativos e fácil complexação com macromoléculas, o processo de isolamento, identificação e quantificação acaba sendo bastante complexo e trabalhoso. A solubilidade dos taninos também é um fator que influencia nas análises, pois varia de acordo com a polaridade do solvente usado, o grau de polimerização e suas interações com outros constituintes da matriz. Sendo assim, os solventes mais utilizados para a extração e quantificação destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (ANGELO; JORGE, 2007).

Em um trabalho de revisão, publicado em 2005, Monteiro e colaboradores (MONTEIRO et al., 2005) relacionaram os principais métodos para quantificação e determinação de taninos totais, condensados e hidrolisáveis, bem como as vantagens e limitações destes métodos. Os autores ressaltam também que, apesar da diversidade, não há um método ideal para quantificação. Esses métodos empregam geralmente os reagentes de Folin-Denis, Folin-Ciocalteu e o complexo azul da Prússia. São baseados na oxidação dos polifenóis por reações de oxidação-redução seguida por formação de compostos coloridos, passíveis de quantificação fotométrica. Outros métodos colorimétricos bastante empregados são os métodos da vanilina e do butanol/HCl. O primeiro baseia-se na formação do radical vanilina em meio ácido, que se liga ao anel meta substituído por grupos hidroxila pelos carbonos 6 ou 8 do anel A (Figura 1), formando um grupo cromóforo vermelho capaz de absorver luz em 500 nm (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; MONTEIRO et al., 2005). O método butanol/HCl, por sua vez, é

considerado o melhor método para determinação de taninos condensados. Através dessa metodologia, subunidades do polímero tanino condensado são oxidadas para produzir antocianidinas cromóforas (clivagem oxidativa) que assumem uma coloração vermelha com máximos de absorção em torno de 550 nm. No entanto, os métodos colorimétricos são geralmente demorados, necessitam de reagentes específicos e, sobretudo, apresentam falta de especificidade, sendo apropriados somente para análise de amostras purificadas. A aplicação destes métodos em extratos brutos é prejudicada principalmente pela presença de outros compostos fenólicos, impurezas e demais interferentes (HERDERICH; SMITH, 2005). Além disso, outra limitação dos métodos colorimétricos é a necessidade de obtenção de substâncias adequadas para serem utilizadas como padrão no processo de quantificação. Se a capacidade da substância utilizada como padrão não é precisamente a mesma do extrato analisado, a concentração calculada a partir da curva de calibração do padrão não refletirá, obviamente, o teor de fenóis da amostra (APPEL et al., 2001).

Os métodos cromatográficos, por sua vez, podem ser aplicados para taninos condensados e taninos hidrolisáveis. As separações cromatográficas em gel, papel e camada delgada são bastante utilizadas (NACZK et al., 1996), porém, atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica mais usada para a identificação e quantificação destes compostos. Para taninos hidrolisáveis há relatos de uso na determinação de massa molar, e também para determinação de ácido gálico e ácido elágico após a hidrólise das estruturas poliméricas (MUELLER-HARVEY, 2001). No caso de taninos condensados, podem ser usados apenas na determinação de estruturas com no máximo 7 ou 8 unidades de repetição (SCHOFIELD et al., 2001). Lopes e colaboradores desenvolveram um método para separação e quantificação de taninos por HPLC em fase reversa usando água:acetoneitrila como fase móvel, em sistema gradiente, para a análise dos flavan-3-óis presentes no extrato semipurificado das cascas de três árvores: *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron polyphyllum* e *Stryphnodendron obovatum*. A análise foi realizada após extração em fase sólida (cartucho C18-E) com metanol:água (2:8), filtrada por membrana de porosidade 0,5 µm; a pré-coluna e coluna empregadas foram Phenomenex® Gemini C-18 (5 µm), com esta última mantida a 30 °C, com vazão de 0,8 mL min⁻¹ e detecção em 210 nm. As soluções dos padrões utilizados foram de ácido gálico e galocatequina. O método proposto foi validado de acordo com a resolução RE nº 899/2003 da ANVISA e os resultados mostraram que existe similaridade no teor de

galocatequina nas três espécies. No entanto, *S. adstringens* apresentou teor de ácido gálico em uma proporção superior a 60% em relação às outras duas espécies (LOPES et al., 2009).

Outra metodologia de doseamento foi desenvolvida por Hagerman e consiste na precipitação de proteínas. Tem como base a propriedade que os taninos possuem de se complexar com macromoléculas, neste caso, as proteínas. Uma das formas de aplicar essa técnica é usando a albumina soro bovina (BSA) incorporada a um gel de Ágar no qual são perfurados poços onde são colocadas as amostras contendo taninos. Imediatamente após a introdução, a amostra começa a difundir-se pelo gel incorporado de proteína, esta em contato com o tanino precipita, formando um disco claramente visível. O diâmetro do disco formado é diretamente proporcional à quantidade de tanino colocada na cavidade. É uma metodologia bastante simples, rápida e econômica, muito útil em estudos que envolvem uma grande quantidade de amostras. Entretanto tem se mostrado um método pouco sensível e com exatidão relativamente baixa (HAGERMAN, 1987).

Zeller e colaboradores (ZELLER et al., 2015) usaram a técnica de precipitação de proteínas para avaliar a influência de dois taninos condensados, de cadeias médias e de cadeia longas, formados por unidades de flavan-3-ol, na precipitação de albumina soro bovina (BSA), lisozima (LYS) e proteína de folha de alfafa (ALF). As três proteínas foram selecionadas por sua interação com taninos e por ter aplicação direta no preparo de trato para ruminantes. A complexação de proteínas solúveis, tais como aquela que ocorre entre ALF com taninos, limita a sua degradação pelas proteases produzidas no rúmen, e isto potencialmente aumenta a quantidade de forragem proteica que é direcionada no trato gastrointestinal para utilização no crescimento e produção animal. Os taninos condensados com diferentes cadeias foram isolados de espécies de trevos brancos e trevos grandes, em seguida analisados por RMN 1D/2D usando a técnica de tiólise e apresentaram elevado grau de pureza (> 90%). Os ensaios foram realizados em solução tamponada em pH 6,5. As proteínas foram incubadas com várias quantidades de taninos, e a precipitação foi estimada por meio da análise dos sobrenadantes com um reagente de ensaio de proteína que não reage com os taninos. A capacidade global do tanino em precipitar a proteína foi determinada por ajuste dos dados a uma curva de dose-resposta para estimar o PP50 que foi definida como a quantidade de tanino necessária para precipitar 50% da proteína a partir de uma solução a $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Os resultados indicaram que taninos com grau de polimerização em torno de 18 exibiram comportamento de

precipitação mais eficaz do que os de cadeia média (grau de polimerização de aproximadamente 9). Os taninos médios exibiram habilidade semelhante entre si para precipitar ALF ou BSA, mas foram relativamente diferentes na precipitação de LYS. Todos os taninos precipitaram com maior facilidade a ALF do que as demais proteínas. Este estudo é um dos primeiros a usar taninos condensados de alta pureza para demonstrar que o grau de polimerização tem influência direta na capacidade de precipitação proteica.

Os métodos eletroquímicos também são muito úteis na análise de taninos. Estes métodos podem ser utilizados tanto para determinar o potencial redutor destes compostos fenólicos, como para identificar mecanismos de oxidação-redução e/ou identificar compostos através da comparação com um composto padrão. O conhecimento do potencial redutor dos taninos, por exemplo, é de grande interesse para a indústria de alimentos, pois fenólicos oxidados podem afetar negativamente a qualidade de vinhos, cervejas, sucos de uva, entre outros (ANGELO; JORGE, 2007). Além disso, o baixo custo da instrumentação analítica necessária para a execução das técnicas eletroquímicas, bem como a pequena quantidade de reagentes necessários e a facilidade na preparação das amostras, tornam sua aplicação mais adequada em muitos casos.

Além de serem usadas para quantificação, as técnicas eletroquímicas também podem ser utilizadas no estudo da aplicação de taninos como inibidores de corrosão, como nos trabalhos de Tan e Mourya (TAN; KASSIM, 2011; MOURYA; BANERJEE; SINGH, 2014) e ainda nos estudos que usam taninos como espécies modificadoras de eletrodos, como no trabalho realizado por Banu e colaboradores (BANU; SHIMURA; SADEGHI, 2015). Nesse sentido, as técnicas eletroquímicas vêm se destacando por consistir numa alternativa simples, de baixo custo e com boa sensibilidade em relação às demais. Por outro lado, ainda são relativamente escassos os trabalhos que relatam a quantificação eletroanalítica de taninos em amostras complexas. Dessa forma, o tópico a seguir será utilizado para discutir de maneira mais detalhada alguns trabalhos encontrados na literatura que relatam o estudo e quantificação eletroanalítica de alguns taninos.

1.6 Determinação eletroanalítica de taninos

Devido a algumas desvantagens para quantificação de taninos, apresentadas por determinadas técnicas analíticas, como influência de

interferentes e baixa seletividade, cresceu nas últimas décadas o interesse na utilização de técnicas eletroanalíticas para esta finalidade. Como citado anteriormente, estas técnicas apresentam diversas vantagens com relação às demais, como rapidez na realização das análises, alta sensibilidade, facilidade no preparo das amostras e baixo custo da instrumentação (ROY et al., 2005; EL-HADY; EL-MAALI, 2008; FERNANDES et al., 2008). Desse modo, alguns trabalhos têm relatado o uso de eletrodos modificados com diferentes espécies, com o objetivo de melhorar a sensibilidade, pela diminuição dos limites de detecção e quantificação e aumentar a seletividade dos sensores propostos (SOLANKI et al., 2011). Alguns trabalhos recentes que relatam a determinação de taninos condensados e hidrolisáveis foram selecionados e serão discutidos a seguir.

Em 2015, Yao e colaboradores (YAO et al., 2015), publicaram um trabalho no qual um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes simples (SWNTCs) funcionalizados com grupos carboxílicos foi aplicado na determinação eletroquímica de catequina. Em condições otimizadas, o eletrodo modificado apresentou resposta de corrente linear em função da concentração de catequina no intervalo de concentração de 0,039 a 40,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de 0,013 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Também para quantificação de catequina, Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2008), desenvolveram um sensor biomimético baseado em um complexo de cobre (II). A curva de calibração utilizando o sensor proposto foi linear no intervalo de concentração de 4,95 a 32,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,28 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O sensor foi aplicado com sucesso na determinação de catequina em amostras de chá verde, com porcentagens de recuperação na faixa de 93,8 a 106,9%.

As propriedades eletroquímicas da catequina foram também estudadas por Yang e colaboradores (YANG et al., 2009). Em seu trabalho foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo modificado com SWNTs e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Sobre o SWNTs-CTAB/GCE, variando o potencial entre 0,4 e 1,0 V em solução tampão PBS (pH 7,0), foram observados dois sinais de oxidação e um de redução para a catequina. A conclusão obtida pelos autores foi que a primeira oxidação da catequina é um processo reversível, enquanto que a segunda oxidação, em potencial mais elevado, é irreversível, nestas condições. A corrente do pico de redução foi utilizada como sinal analítico, e esta aumentou linearmente com o aumento da concentração de catequina no intervalo de 0,32 a 2,38 nmol L^{-1} . O limite de detecção obtido foi de 0,11 nmol L^{-1} . No entanto, o trabalho não reporta a

aplicação do sensor para a quantificação de taninos, no caso a catequina, em amostras reais.

Em outro trabalho, Moccelini e colaboradores (MOCCELINI et al., 2009), utilizaram monocamadas auto-organizadas de um complexo de níquel (II) e ácido mercaptopropiônico para modificar um eletrodo de ouro, o qual foi usado para determinação de catequina pela técnica de voltametria de onda quadrada. As análises foram feitas sob condições otimizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), frequência de 80,0 Hz, amplitude de pulso de 60,0 mV e incremento de potencial de 10,0 mV. Os valores de corrente resultante, obtidos nos voltamogramas de onda quadrada, foram lineares em função da concentração de catequina no intervalo de concentração de 3,31 a 25,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,83 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O eletrodo de ouro modificado foi aplicado na quantificação de catequina em amostras de chás e os resultados obtidos foram comparados aos obtidos pela técnica de eletroforese capilar. As duas técnicas forneceram resultados estatisticamente semelhantes, para um nível de confiança de 95%.

Xu e co-autores (XU et al., 2009), avaliaram a resposta do ácido tânico sobre quatro diferentes eletrodos de pasta de carbono (CPE), foram eles: pseudo eletrodo de pasta de carbono poroso (PPCPE), CPE modificado com polipirrol (PCPE), CPE modificado com BSA (BSA-MCPE) e CPE sem modificação. Os resultados obtidos mostraram que a sensibilidade do PPCPE foi maior que os demais. O limite de detecção obtido usando este sensor foi de 10,0 nmol L^{-1} , o qual foi 10 vezes menor do que o obtido usando o eletrodo sem nenhuma modificação. Neste trabalho, o PPCPE foi preparado pela maceração de pó de grafite com microesferas de carbonato de cálcio. Em seguida a pasta foi compactada dentro de um tubo de vidro e foi inserido em contato elétrico de cobre. O eletrodo foi imerso em uma solução de FeCl_3 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ até a pasta ser polimerizada completamente. Finalmente, o eletrodo foi imerso sob agitação em ácido clorídrico para dissolver o carbonato de cálcio, resultando em um eletrodo poroso.

O ácido tânico também foi determinado eletroquimicamente por Raj e colaboradores (RAJ; REVIN; JOHN, 2013). Neste trabalho os autores descrevem a utilização de nanopartículas de ouro estabilizadas em 4-amino-6-hidroxi-2-mercaptopirimidina e a modificação de eletrodos de óxido de estanho dopado com índio (ITO) com essas nanopartículas, pelo método sol-gel, usando (3-mercaptopropil) trimetoxissilano (MPTS). O valor da constante de transferência de elétrons para o sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ calculado utilizando o eletrodo modificado foi relativamente maior ($1,14 \times 10^{-7} \text{ m s}^{-1}$) que o

obtido usando o eletrodo sem modificação ($8,79 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$) ou modificado apenas com MPTS ($4,94 \times 10^{-9} \text{ m s}^{-1}$), indicando que a transferência de elétrons é mais rápida sobre a superfície modificada com nanopartículas de ouro. Além disso, as nanopartículas apresentaram excelente atividade catalítica para a oxidação do ácido tânico, traduzida no alto valor da constante de velocidade heterogênea (k_s) obtida sobre o eletrodo modificado ($k_s = 7,35 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$), que foi maior que a obtida sobre o eletrodo de ITO ($k_s = 5,45 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$). Usando a técnica de amperometria, o limite de detecção obtido para o ácido tânico foi de $20,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Os autores realizaram ainda a aplicação analítica do sensor, determinando o teor de ácido tânico em amostras comerciais de cerveja.

1.7 Eletrodos quimicamente modificados

As informações obtidas com o uso das técnicas eletroanalíticas descritas no tópico anterior são absolutamente dependentes da superfície eletródica que é usada como eletrodo de trabalho. Esta deve apresentar elevada razão sinal-ruído do comportamento redox do analito e das correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado e boa reprodutibilidade. Também se deve considerar a janela de potencial de trabalho, condutividade elétrica, reprodutibilidade da superfície, as propriedades mecânicas, o custo de fabricação, a disponibilidade e a toxicidade (WANG, 1985). A importância da escolha do material do eletrodo de trabalho também se deve ao fato de que as respostas obtidas são relacionadas às reações redox que ocorrem em sua superfície ou na interface eletrodo-solução. Entretanto, se a transferência de elétrons na superfície do eletrodo é muito lenta ou não ocorre, é possível realizar uma modificação química em sua superfície, a fim de melhorar a resposta final. Além disso, os eletrodos quimicamente modificados podem proporcionar aumento de sensibilidade e/ou seletividade, melhorando as propriedades do sensor (GALLI et al., 2006).

A denominação eletrodos quimicamente modificados (EQM) surgiu no início dos anos 70 (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002). Segundo a definição da IUPAC, eletrodo quimicamente modificado é um dispositivo feito de um material condutor ou semicondutor que é modificado com um componente químico monomolecular, multimolecular, iônico ou filme polimérico e que passa a apresentar propriedades químicas, eletroquímicas e ópticas diferentes com relação

à transferência de carga ou ao potencial de superfície (DURST; BAUMER; MURRAY, 1997).

De maneira geral, o objetivo principal da modificação é controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo-solução, para melhorar a transferência eletrônica entre o eletrodo e o analito, e dessa forma aumentar a seletividade e sensibilidade, diminuir o potencial de trabalho, entre outras propriedades (COX; TESS; CUMMINGS, 1996). Segundo Pereira, a utilização de um EQM deve ser justificada sempre pelo aumento da sensibilidade e/ou seletividade numa determinação eletroanalítica (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

Os métodos mais amplamente empregados para a incorporação do agente modificador sobre o eletrodo base consiste em adsorção, ligação covalente, recobrimento com filmes poliméricos ou na preparação de compósitos, com adição de agentes modificadores (MURRAY, 1980; VIDAL; MÉNDEZ; CASTILLO, 1999; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

O desenvolvimento dos EQM é uma área da eletroquímica em constante crescimento e consiste na modificação de um eletrodo base (substrato condutor) com um agente modificador. A escolha de um bom substrato é uma etapa importante. Deve-se escolher um substrato que apresente características eletroquímicas apropriadas e adequadas para o método selecionado de imobilização do modificador. Dentre os substratos convencionais mais utilizados para modificação, podemos destacar os eletrodos metálicos de ouro, platina e cobre e os materiais carbonáceos, como carbono vítreo e carbono grafite. A preparação de um EQM pode ser feita de diferentes maneiras. A escolha do método mais adequado deve levar em consideração as propriedades analíticas desejadas, bem como a natureza do substrato, cuja superfície sofrerá a modificação (SOUZA, 1997; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

A busca por EQM cada vez mais sensíveis e com alta seletividade levou o desenvolvimento destes dispositivos a uma grande evolução. Atualmente diversos materiais, tanto orgânicos como inorgânicos, vêm sendo utilizados para se obter EQM para diferentes finalidades. Nos próximos tópicos serão apresentados alguns trabalhos que utilizaram essencialmente dois diferentes modificadores (nanopartículas de ouro e polímeros) para a modificação de eletrodos. A discussão será limitada a apenas estes materiais por serem o objeto de estudo deste trabalho.

1.7.1 Utilização de nanopartículas metálicas na preparação de EQM

A pesquisa e o desenvolvimento de materiais em nanoescala cresceu muito nos últimos anos, principalmente devido a algumas características destes materiais, as quais podem ser utilizadas para melhorar a qualidade de vida das pessoas. Materiais nanoparticulados são tema de um número crescente de publicações, por causa de suas propriedades físico-químicas muito específicas e na maioria das vezes diferentes de seu material de origem (*bulk*). As nanopartículas metálicas (NPs), por exemplo, são amplamente utilizadas pelas suas excelentes propriedades condutoras e eletrocatalíticas. Metais nobres como ouro, platina e prata estão entre os metais mais investigados para obtenção de nanopartículas (CAMPBELL; COMPTON, 2010; IOST; CRESPILO, 2012).

Apesar do termo nanotecnologia ter surgido recentemente, o uso de nanopartículas metálicas é muito mais antigo do que se imagina, porém na época os conceitos científicos que estão envolvidos ainda eram desconhecidos. Por exemplo, desde o século IV d.C sabia-se que diferentes materiais poderiam exibir diferentes colorações dependendo do ângulo de incidência da luz. Um exemplo bastante interessante desse fenômeno é o cálice de Lycurgus, Figura 3, que possui em sua composição NPs de ouro e prata, cuja coloração depende do ângulo de incidência da luz visível sobre a superfície do material. Quando iluminado por fora, a reflexão da luz pela superfície do cálice leva à coloração verde. Quando iluminado por dentro, o material exibe coloração vermelha (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Figura 3. Imagens do cálice de Lycurgus, exposto no Museu Britânico, à esquerda sendo iluminado por fora e à direita, por dentro.



Fonte: MARTINS; TRINDADE, 2012.

Apenas em 1857, Michael Faraday propôs uma explicação científica relacionando a cor vermelha com o tamanho das partículas de ouro. Quase um século depois, John Turkevich descobriu com o uso de um microscópio eletrônico, que a coloração vermelha era observada em dispersões de NPs de ouro que tinham diâmetro médio inferior a 10 nm (TOMA; SILVA; ANAISSI, 2005; MARTINS; TRINDADE, 2012).

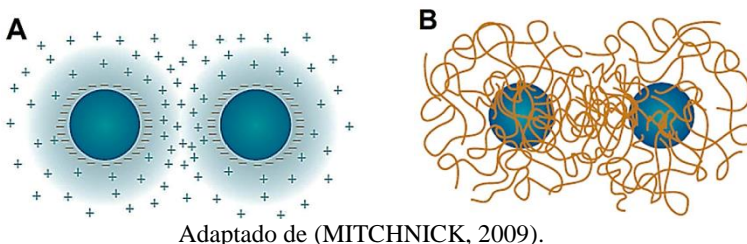
Hoje, sabe-se que a dimensão das NPs metálicas está diretamente relacionada com a sua coloração. Nanopartículas de ouro (AuNPs) com tamanho médio inferior a 20 nm apresentam uma coloração avermelhada, devido às transições entre bandas eletrônicas que acomodam os elétrons superficiais (plasmons), denominada de banda plasmônica. Com o aumento do tamanho médio, as AuNPs tendem a coloração violeta. Isso porque a densidade dos estados eletrônicos aumenta e, assim ocorre uma diminuição da energia de estado de transição entre as bandas eletrônicas (TOMA; SILVA; ANAISSI, 2005).

Essa absorção específica em determinada região do espectro permite a caracterização das NPs metálicas através de espectroscopia UV-vis. No caso do ouro, NPs com diâmetro médio inferior a 10 nm apresentam uma banda de absorção máxima em meio aquoso em torno de 517 nm, enquanto que diâmetros médios de 48 e 99 nm apresentam bandas de absorção máximas em 533 e 575 nm, respectivamente (TOMA; SILVA; ANAISSI, 2005; MARTINS; TRINDADE, 2012; MELO et al., 2012).

A síntese de AuNPs é um procedimento relativamente simples. O método mais comum foi desenvolvido por John Turkevich em 1951 (TURKEVICH; STEVENSON; HILLIER, 1951). Neste, o íon citrato em meio aquoso é utilizado como agente estabilizante e redutor do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) para formar AuNPs com diâmetro médio de 20 nm. Atualmente, outros métodos que utilizam o borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor podem fornecer AuNPs com diâmetro médio inferior a 10 nm. No entanto, um detalhe bastante importante é que a maioria das NPs possui alta energia livre de superfície e, por isso, é termodinamicamente instável, isto é, têm a tendência natural de se agregar e formar aglomerados com menor área superficial e menor energia de superfície. Assim, uma das ferramentas que se utiliza durante a síntese das NPs é um material que atue como agente estabilizante com o objetivo de evitar a aglomeração das nanoestruturas. Este material pode ser um surfactante, um composto polar que tenha a capacidade de formar camadas auto organizadas sobre a superfície da partícula ou um polímero. Existem basicamente dois mecanismos de estabilização das NPs metálicas: a primeira é chamada de estabilização eletrostática e

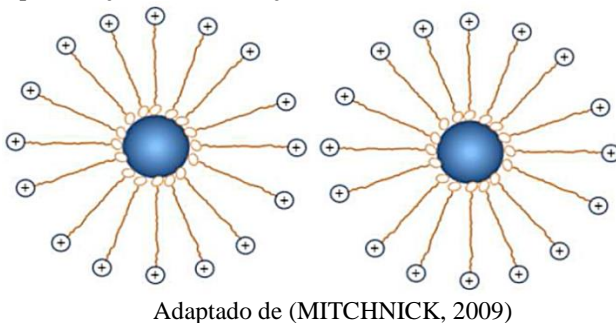
consiste na utilização de moléculas carregadas que, pela repulsão das cargas iguais são responsáveis por manter as NPs afastadas. O segundo mecanismo é chamado de impedimento estérico e se dá pelo impedimento espacial das cadeias das macromoléculas que envolvem as NPs (HANG et al., 2009; MITCHNICK, 2009). As duas formas são representadas na Figura 4.

Figura 4. Representação de (A) estabilização eletrostática e (B) estabilização estérica de NPs.



Além disso, as estabilizações eletrostática e estérica podem ser combinadas dando origem a uma estabilização do tipo eletroestérica. Esta estabilização pode ser obtida, por exemplo, utilizando surfactantes iônicos. A cabeça polar destes compostos pode gerar uma dupla camada elétrica, enquanto que a cadeia lipofílica pode gerar uma repulsão estérica (FRITZ et al., 2002), como ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Representação da estabilização eletroestérica de NPs metálicas.



Quando aplicadas na modificação de eletrodos, as NPs metálicas podem melhorar diversas propriedades do substrato inicial, entre elas: aumentar a condutividade elétrica e a área superficial ativa, melhorar a seletividade, a atividade catalítica e a biocompatibilidade. Essas

propriedades fazem das NPs metálicas materiais ideais para serem aplicados em eletroanalítica (CAMPBELL; COMPTON, 2010; YU et al., 2011; YIN; QIN, 2013). Na Tabela 1 foram resumidos alguns trabalhos que utilizam AuNPs estabilizadas em diferentes materiais, bem como sua aplicação como modificadores de eletrodos para determinação eletroanalítica de diversas espécies.

Tabela 1. Trabalhos utilizando eletrodos modificados com AuNPs para detecção de diferentes compostos.

Sensor	Analito	Técnica	Limite de detecção (nmol L ⁻¹)	Referência
GCE modificado com AuNPs sintetizadas: - quimicamente - eletroquimicamente	Se(IV)	SWASV	2,2 1,5	(SEGURA et al., 2015)
GCE modificado com óxido de grafeno reduzido (rGO), AuNPs e um polímero molecularmente impresso (MIP)	carbofurano	DPV	20,0	(TAN et al., 2015)
GCE modificado com filme de AuNPs estabilizadas em hidrocloreto de polialilamina (PAH)	vanilina	SWV	55,0	(SILVA et al., 2015)
ITO modificado com camadas auto organizadas de ácido fenilfosfônico e AuNPs dispersas em HS-β-ciclodextrina	2,4,6-triclorofenol	DPV	1,0	(ZHENG et al., 2015)
CPE modificado com uma dispersão de AuNPs estabilizadas em citrato	eugenol	SWASV	2000,0	(AFZALI et al., 2014)
CPE modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e AuNPs	tiocianato	SWV	5,0	(AFKHAMI et al., 2014)

GCE modificado com filme de AuNPs estabilizadas em citrato seguida pela adsorção de 2-(2,3-dihidroxifenil) benzotiazol (DPB)	isoproterenol e ácido úrico	DPV	82,0	(MAZLOUM-ARDAKANI et al., 2015)
Eletrodo de ouro modificado com camadas auto organizadas de hexanoditióis (HDT) decoradas com AuNPs, seguida pela funcionalização com cistamina e ligação do anticorpo AFB1	micotoxina alimentar AFB1	EQCM-CV	8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	(CHAUHAN et al., 2016)

Dentre os trabalhos acima citados, podemos destacar o desenvolvido por Segura e colaboradores (SEGURA et al., 2015), no qual foi realizada uma comparação entre eletrodos de carbono vítreo modificados com AuNPs quimicamente (AuNPs/C) e eletroquimicamente (AuNPs/E) sintetizadas. Os eletrodos modificados com AuNPs foram aplicados como sensores para determinação de Se(IV). O interessante deste trabalho foi que as NPs obtidas pelas duas metodologias apresentaram diâmetros médios bastante diferentes (AuNPs/E = $75,0 \pm 20,0$ nm e AuNPs/C = $7,4 \pm 1,3$ nm). No entanto, a resposta eletroquímica do Se(IV) sobre os sensores modificados com as diferentes AuNPs foi bem semelhante. Os limites de detecção calculados também foram bastante próximos: $0,120 \mu\text{g L}^{-1}$ para o GC/AuNPs/E e $0,175 \mu\text{g L}^{-1}$ para o GC/AuNPs/C. Os dois sensores foram aplicados com sucesso na determinação de Se(IV) em amostras de água do mar com recuperações entre 94,14% e 99,81%.

1.7.2 Utilização de polímeros na preparação de EQM

Os polímeros são compostos que também vêm sendo amplamente empregados na modificação de eletrodos. Segundo Nascimento (NASCIMENTO, 1998), os objetivos principais de aplicar estes materiais na modificação são a possibilidade de aprisionamento de espécies químicas e biológicas na superfície do eletrodo e do aumento da seletividade (através da exclusão de interferentes por tamanho ou por carga elétrica). Ainda, a barreira difusional estabelecida pela presença

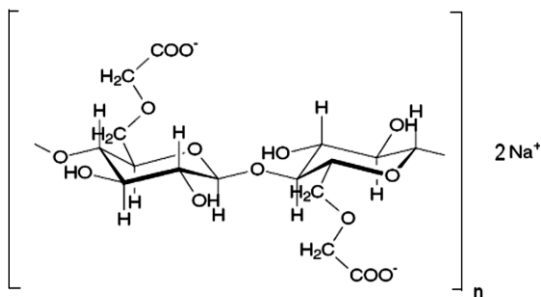
do filme polimérico é também um recurso usado para ampliar a linearidade de resposta do sensor a concentrações mais altas do analito.

Dependendo da aplicação, pode ser usado um polímero eletroativo (se o objetivo é eletrocatalise), quimicamente ativo (propriedades de ligação ou de troca iônica para pré-concentração) ou inerte (apenas para exclusão de interferentes). A modificação polimérica pode ser obtida de diferentes formas. As mais comuns são a partir da deposição de soluções poliméricas pré-preparadas, através de polimerização *in situ* a partir das unidades monoméricas e por formação de compósitos. No caso de eletropolimerização, o recobrimento polimérico pode ser obtido por aplicação de potencial eletroquímico ou por meio de métodos não eletroquímicos como, por exemplo: polimerização ativada por plasma, foto-induzida por UV ou polimerização de organosilanos (SOUZA, 1997).

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados dois polímeros para efetuar a modificação dos eletrodos: a carboximetilcelulose (CMC) e o poli(etilenoglicol) (PEG). A CMC contendo AuNPs foi depositada sobre um eletrodo de carbono vítreo pelo método conhecido como “*drop coating*”. O PEG, por sua vez, foi adicionado a preparação de um eletrodo de pasta de carbono para formação de um compósito. As formas como eles são incorporados sobre os substratos encontram-se descritas com mais detalhes na Parte Experimental (Seção 3.0). Em ambas as modificações, o principal objetivo foi explorar a forte interação dos taninos com estas macromoléculas e investigar o efeito dessa modificação na sensibilidade dos eletrodos. Nos parágrafos a seguir serão descritas algumas das propriedades destes polímeros.

A CMC é um biopolímero derivado da celulose, solúvel em água e que possui uma cadeia linear, conforme apresentado na Figura 6. A estrutura consiste em unidades repetidas de D-glucose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) e substituídas por grupos carboximetílicos (PIGMAN; HORTON, 1970). É obtida pelo tratamento da celulose com hidróxido de sódio aquoso, seguido pela reação com cloroacetato de sódio. É vendido comercialmente na forma sólida do sal de carboximetilcelulose de sódio. A forma sólida da CMC é bastante estável, no entanto, quando em solução pode permitir a proliferação de fungos, se estocadas por muito tempo (SZORCSIK et al., 2006).

Figura 6. Estrutura da unidade dimérica da carboximetilcelulose (sal de sódio).

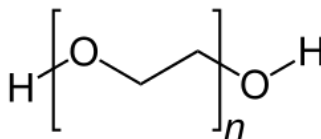


Adaptado de (SZORCSIK et al., 2006).

Muitos polissacarídeos, tais como a celulose, CMC e quitosana, são agentes de adsorção bastante usados em processos industriais e na remediação, especialmente, devido à facilidade de obtenção, à grande produção mundial e ao seu baixo custo (CMC \sim R\$ 6,00 kg^{-1} e quitosana \sim R\$ 12,00 kg^{-1}) (GECOL; ERGICAN; MIAKATSINDILA, 2005). Estes materiais podem formar complexos com íons metálicos através de seus sítios básicos de Lewis (por exemplo, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$), presentes nas suas estruturas. A seletividade entre os sítios de coordenação encontrados na CMC e na quitosana, bem como as constantes de formação dos complexos obtidos, são comparáveis com aquelas obtidas para EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético R\$ 300,00 kg^{-1} , grau analítico) (SKOOG et al., 2006). Neste trabalho, a CMC foi utilizada como agente estabilizante para a síntese das AuNPs. O uso deste material como agente estabilizante de NPs metálicas ainda é muito pouco reportado na literatura.

O PEG é um homopolímero sintético, linear, cuja fórmula molecular é $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ (Figura 7), onde n é o número médio de grupos de óxido de etileno presentes na molécula, chamado grau de polimerização. É um polímero levemente higroscópico, solúvel em água, em acetona, em etanol e em hidrocarbonetos aromáticos, insolúvel em éter e hidrocarbonetos alifáticos. Uma designação numérica, apresentada junto ao nome geralmente indica sua massa molar média, sendo encontrado comercialmente de 200 a alguns milhões de gramas por mol. Em massas molares menores que 600 g mol^{-1} o PEG é um líquido incolor, bastante viscoso à temperatura ambiente. Em massas acima desse valor se apresenta em forma de pó ou flocos.

Figura 7. Estrutura monomérica da molécula de PEG.



Os PEGs líquidos, de baixa massa molar, podem ser diretamente utilizados como solventes, com ou sem a adição de água. Algumas características importantes têm tornado o PEG um material de grande interesse tecnológico, dentre elas o fato de ser biodegradável, estável a ácidos, bases e altas temperaturas (NAIK; DORAISWAMY, 1998; GUO et al., 2002; CHEN et al., 2004), com aplicação em diversas áreas biotecnológicas e médicas além de ser biocompatível em solução aquosa, com potencial para aplicação como meio de cultura de tecidos e preservação de órgãos. O PEG tem sido também utilizado como meio alternativo de separação de sistemas aquosos bifásicos, na formação de complexos com moléculas tensoativas (surfactantes) para fins industriais, e desempenha um papel importante como componente básico na produção de poliésteres e poliuretanos, entre outras aplicações (HUDDLESTON et al., 1999; DROZDOWSKI et al., 2002; CHEN et al., 2005).

Outra aplicação interessante, que vem sendo estudada desde os anos 90, é o uso de PEG na dieta alimentar de algumas espécies de ruminantes (GETACHEW et al., 2000). Sua principal finalidade é romper a ligação entre o tanino e as diversas proteínas presentes no trato, fazendo com que o primeiro seja expulso do trato gastrointestinal, deixando a proteína livre para ser digerida e absorvida pelo organismo. Isso ocorre porque a interação tanino-PEG é maior que a interação tanino-proteína. Ainda, além de expor uma maior concentração de proteínas para serem digeridas, o PEG evita possíveis intoxicações pelo excesso de tanino, uma vez que este fica complexado ao polímero. Dessa forma, o uso de PEG minimiza os efeitos adversos dos taninos na fermentação de rúmen e enriquece nutricionalmente a alimentação de animais que tem dietas ricas em taninos. Os resultados mostraram ainda que quase 100% do PEG fornecido aos animais é excretado pelas fezes, demonstrando então que o complexo PEG-tanino não é absorvido pelo organismo em nenhuma etapa da digestão.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver novos eletrodos quimicamente modificados para serem empregados na quantificação de taninos em amostras complexas, através de metodologias eletroanalíticas sensíveis, de baixo custo e sem que haja necessidade de tratamento das amostras.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas no polímero carboximetilcelulose;
- Preparar eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas metálicas e/ou polímeros;
- Estudar o comportamento eletroquímico dos compostos modelo de taninos condensados e hidrolisáveis: catequina e ácido tânico, respectivamente;
- Avaliar o aumento de sensibilidade dos eletrodos quimicamente modificados em relação aos eletrodos sem modificação;
- Otimizar os parâmetros experimentais (pH, eletrólito suporte, quantidade de modificador), de modo a se obter a máxima resposta eletroanalítica para a catequina e o ácido tânico;
- Realizar a seleção da técnica eletroanalítica mais sensível, bem como otimizar seus parâmetros experimentais;
- Obter as curvas de calibração para a catequina e o ácido tânico;
- Determinar parâmetros analíticos como faixa linear e limites de detecção e quantificação;
- Estudar a precisão das metodologias propostas através de ensaios de repetibilidade intradia e interdia;
- Determinar as concentrações de taninos condensados e hidrolisáveis, separadamente, em amostras de extratos vegetais e de cervejas, pelo método de adição de padrão;
- Avaliar o efeito de matriz sobre a resposta eletroquímica dos taninos nas amostras analisadas;
- Expressar a exatidão das metodologias eletroanalíticas através de testes de adição e recuperação e pela comparação dos resultados com os obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu.

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes usados são de grau analítico e foram empregados sem purificação prévia. As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida com o sistema Milli-Q (Millipore, EUA) com resistividade de 18,2 M Ω cm. As soluções estoque de catequina e de ácido tânico foram preparadas na concentração de 5,0 mmol L⁻¹ em etanol. As soluções de menor concentração foram preparadas mediante diluição. Cinco soluções tampão (0,2 mol L⁻¹) foram testadas como eletrólito suporte, são elas: Britton-Robinson (B-R) (H₃BO₃/CH₃COOH/H₃PO₄), acetato (CH₃COOH/CH₃COONa), Clark-Lubs (KCl/HCl), fosfato (H₃PO₄/NaH₂PO₄.H₂O) e McIlvaine (Na₂HPO₄/C₆H₈O₇). O pH das soluções foi ajustado com soluções de HCl ou NaOH (0,5 mol L⁻¹). As soluções estoque e as soluções tampão foram armazenadas sob refrigeração (~5 °C) por no máximo 90 dias.

As amostras de taninos condensados foram preparadas e fornecidas pela Acquaquímica Ltda (Estância Velha/RS, Brasil). Para a extração, cascas de Acácia (*Acacia mearnsii* De Wild) foram submetidas, em água, a alta temperatura e pressão (T = 105 °C; p = 2,5 kgf cm⁻²). Três diferentes amostras (denominadas A, B e C) foram obtidas. O extrato concentrado de cada amostra foi mantido sob refrigeração (~5 °C) por no máximo 15 dias. Em seguida, 1,0 mL de cada um dos extratos concentrados foi dissolvido em 1000 mL de água ultrapura. Por fim, 100,0, 15,0 e 20,0 μ L dos extratos diluídos de A, B e C, respectivamente, foram adicionados, um de cada vez, na célula eletroquímica para a realização das medidas.

Para a quantificação dos taninos hidrolisáveis, foram usadas amostras de cerveja de cinco diferentes marcas (denominadas amostras 1, 2, 3, 4 e 5). Todas as amostras foram de cervejas industrializadas, do tipo Pilsen e foram adquiridas no comércio local (Florianópolis - Brasil). Para os ensaios de quantificação, um volume de 1,0 mL de cada amostra, sem nenhum tratamento prévio, foi adicionado à célula eletroquímica contendo 9,0 mL de solução tampão.

3.2 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro estabilizadas em carboximetilcelulose (AuNPs-CMC) foram preparadas pela adição de 10,0 μL de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,1 mol L^{-1} em 5,0 mL de solução aquosa de CMC 0,25% ($\text{MM} = 250.000 \text{ g mol}^{-1}$). A mistura foi agitada vigorosamente por 5 min a temperatura ambiente ($\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Em seguida, ainda sob agitação, adicionou-se 400,0 μL de solução aquosa de borohidreto de sódio (NaBH_4) 20,0 mmol L^{-1} , recentemente preparada. Manteve-se a agitação por 30 min e a dispersão obtida foi guardada sob refrigeração ($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Caracterizou-se as AuNPs-CMC por espectroscopia UV-vis, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e potencial zeta (ξ). Os espectros UV-vis foram obtidos usando um espectrofotômetro Agilent Cary 60 (Agilent Technologies, EUA), operando em temperatura ambiente na faixa de comprimento de onda de 300 a 800 nm. Utilizou-se uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Para as análises de TEM, 5,0 μL da dispersão contendo as AuNPs-CMC foram gotejadas sobre uma rede milimétrica de cobre recoberta com carbono que em seguida foi mantida sob temperatura ambiente por 24 h, para secagem completa. As amostras foram analisadas com um microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução modelo JEM-2100 (JEOL, Japão), operando a 100 kV. Por fim, estimou-se o tamanho médio (diâmetro) das nanopartículas utilizando o *software* ImageJ, pela contagem de 300 partículas aleatoriamente escolhidas nas imagens que foram obtidas. As medidas de potencial zeta foram realizadas usando uma célula de quartzo e um analisador de potencial zeta modelo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Inglaterra).

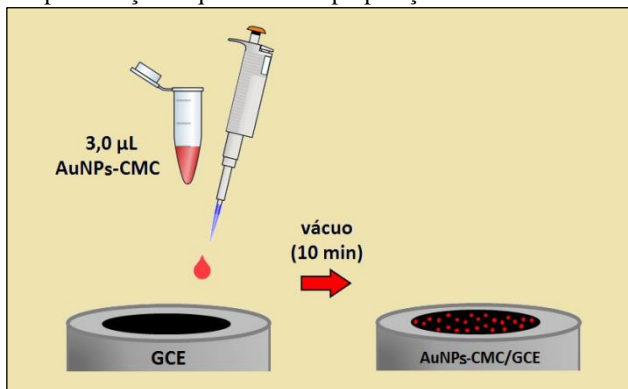
3.3 Preparação e caracterização dos EQM

3.3.1 GCE modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs-CMC/GCE)

O eletrodo modificado com nanopartículas de ouro foi preparado utilizando um substrato de carbono vítreo (GCE) com diâmetro de $2,0 \pm 0,1 \text{ mm}$. O substrato foi manualmente polido com uma dispersão aquosa de alumina 0,03 μm durante 2 min. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água destilada e mantido no ultrassom em recipiente contendo etanol por 3 min para remoção total da alumina. Após, gotejou-se 3,0 μL

da dispersão de AuNPs-CMC sobre a superfície do GCE e o solvente (água) foi evaporado a vácuo até secagem completa do filme (cerca de 10 min). O procedimento de preparação do AuNPs-CMC/GCE está representado na Figura 8.

Figura 8. Representação esquemática da preparação do AuNPs-CMC/GCE.



Fonte: elaborado pela autora.

A espessura do filme de AuNPs-CMC sobre o GCE foi estimada através de medidas de perfilometria, usando um perfilômetro de contato modelo Dektak XT (Bruker, EUA). A morfologia do filme foi analisada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG) usando um microscópio JEOL JSM-6701F (JEOL, Japão) e microscopia de força atômica (AFM), usando um microscópio PicoSPM (Molecular Imaging Corporation, EUA) operando no modo de contato. Para estas análises, foram gotejados 10,0 µL da dispersão contendo AuNPs-CMC sobre uma placa de carbono vítreo (área = 1,0 cm² e espessura = 1 mm), a qual foi mantida sob vácuo por 24 h.

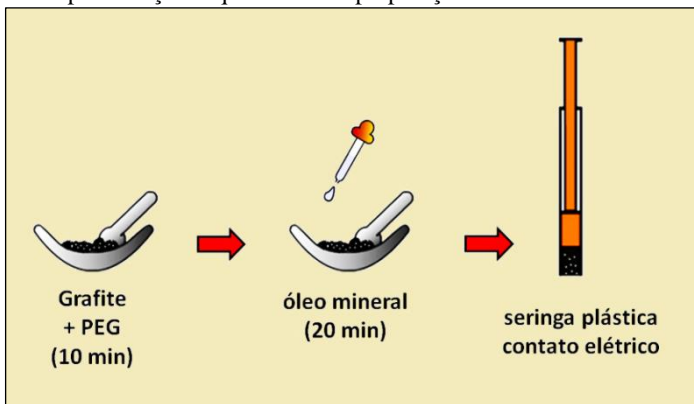
Realizou-se a caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados usando as técnicas de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). As medidas de CV foram feitas em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ contendo K₃[Fe(CN)₆] 1,0 mmol L⁻¹ no intervalo de potencial entre -0,3 e +0,8 V, variando a velocidade de varredura de 10 a 200 mV s⁻¹. Os experimentos de EIS foram feitos usando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N (Eco Chemie, Holanda) com módulo FRA de impedância. Os espectros de EIS foram obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1) 5,0 mmol L⁻¹ usando o modo

circuito aberto, 5 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1 a 100.000 Hz.

3.3.2 CPE modificado com poli(etilenoglicol) (PEG/CPE)

O PEG/CPE foi preparado pela maceração manual de 20,0 mg (10% m/m) de PEG e 150,0 mg (75% m/m) de grafite em pó durante 10 min, a fim de obter uma dispersão uniforme do polímero no grafite em pó. Em seguida, adicionou-se 30,0 mg (15% m/m) de óleo mineral e macerou-se por 20 min para obtenção da pasta. Compactou-se a pasta modificada numa seringa plástica com volume de 1,0 mL e um fio de cobre foi inserido para obtenção do contato elétrico. Para fins de comparação, foram preparados pelo mesmo procedimento eletrodos de pasta de carbono modificados com nanopartículas de Fe_3O_4 (diâmetro médio de 50 nm), as quais foram adquiridas comercialmente. A Figura 9 ilustra a preparação do PEG/CPE. Entre as medidas, poliu-se manualmente os eletrodos sobre uma folha de papel, a fim de se obter uma superfície renovada. Para fins de comparação, foram preparados eletrodos com diferentes quantidades de PEG: 5, 10, 15 e 20% m/m. Um CPE sem modificação também foi preparado. Os eletrodos de pasta de carbono, modificados ou não, foram armazenados a seco e em temperatura ambiente pelo período máximo de 90 dias.

Figura 9. Representação esquemática da preparação do PEG/CPE.



Fonte: elaborado pela autora.

O PEG/CPE foi também caracterizado por técnicas eletroquímicas e morfológicas. As medidas de CV e EIS foram realizadas em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ contendo K₃[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] 1,0 mmol L⁻¹ (1:1), usando um potenciostato modelo PalmSens3 (Palm Instruments BV, Holanda). Os espectros de EIS foram obtidos em potencial de circuito aberto, utilizando uma amplitude de 5 mV e uma faixa de frequência de 0,1 a 50.000 Hz.

A caracterização morfológica da superfície do PEG/CPE foi realizada empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG), usando um microscópio JEOL JSM-6701F (JEOL, Japão).

3.4 Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram realizadas em temperatura ambiente (± 25 °C) usando um potenciostato modelo EmStat2 (Palm Instruments BV, Holanda) interfaceado a um computador com o *software* PSTrace (versão 4.6) para aquisição e processamento dos dados. Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional com capacidade para 10,0 mL, contendo como eletrodo de trabalho os eletrodos de carbono vítreo ou de pasta de carbono, como eletrodo de referência, Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e como eletrodo auxiliar uma placa de platina. As medidas de voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) foram feitas em 10,0 mL de solução tampão (B-R, acetato, Clark-Lubs, fosfato ou McIlvaine). Mediu-se o pH de todas as soluções usando um pHmetro modelo HI 2221 (HANNA Instruments, EUA). As medidas de CV foram feitas na faixa de potencial entre 0,0 e +0,8 V, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Otimizou-se os parâmetros de SWV e DPV e construiu-se as curvas de calibração mediante a leitura de sucessivas adições de solução padrão do composto modelo (catequina ou ácido tânico). Para realizar as determinações e os ensaios de adição e recuperação, foi usado o método de adição de padrão, no qual sucessivas adições de solução padrão do composto modelo foram feitas sobre as amostras. Após cada adição, a solução da célula era agitada e, retirada a agitação, os voltamogramas eram registrados.

3.5 Método comparativo

Como método comparativo para a quantificação dos taninos condensados nos extratos vegetais e taninos hidrolisáveis nas amostras de cerveja, utilizou-se o método colorimétrico descrito por Singleton e Rossi (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em um tubo de ensaio foram adicionados: a) 2,35 mL de água ultrapura; b) 100,0 µL de amostra (ou volumes diferentes de solução estoque de catequina ou ácido tânico) e c) 150,0 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 6 min de incubação, adicionou-se 450,0 µL de solução aquosa de Ca_2CO_3 20% (m/v). Em seguida, mantiveram-se as amostras em temperatura ambiente ($\pm 25,0$ °C) e sob ausência de luz pelo período de 2 h. Por fim, foram efetuadas leituras de absorvância em 765 nm. Para a quantificação de taninos condensados e hidrolisáveis utilizou-se as curvas de calibração da catequina e do ácido tânico, respectivamente. As medidas de absorvância foram feitas em um espectrofotômetro da Agilent, modelo Cary 60 (Agilent Technologies, EUA), usando uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo do trabalho está dividido em duas partes: na primeira, serão apresentados os resultados obtidos no estudo e determinação de taninos condensados utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs-CMC/GCE); e na segunda parte dos resultados, serão apresentados os estudos com taninos hidrolisáveis, os quais foram realizados empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com poli(etilenoglicol) (PEG/CPE). Em ambas as partes também serão descritas e discutidas detalhadamente a preparação e caracterização dos detectores utilizados.

4.1 Estudos com taninos condensados

4.1.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

As AuNPs estabilizadas no polímero carboximetilcelulose (CMC) foram preparadas pela redução do ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Após 15 s da adição do agente redutor (borohidreto de sódio) a mistura passou da coloração amarela (cor da solução contendo íons Au^{3+}) para vermelha, indicando a formação de AuNPs. Essa mudança de coloração é ilustrada na Figura 10.

A reação química que ocorre entre o borohidreto de sódio e o ácido tetracloroáurico é a descrita na Equação 1. Durante essa reação é observada claramente a liberação de gás, que evidencia a formação do H_2 no estado gasoso.

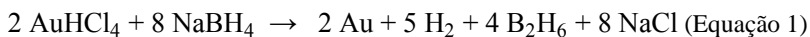
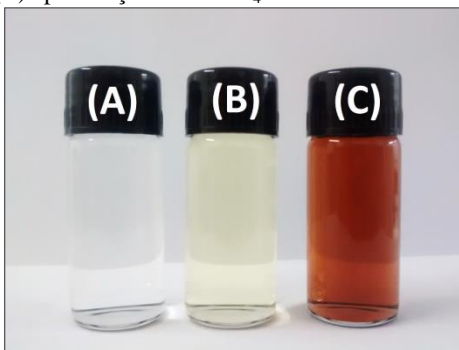
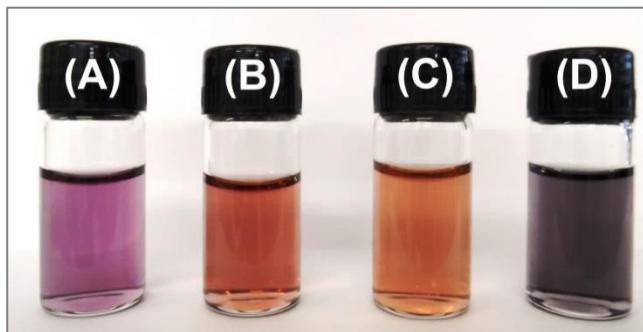


Figura 10. (A) Solução aquosa de CMC; (B) após adição de 10,0 μL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e (C) após adição de NaBH_4 .



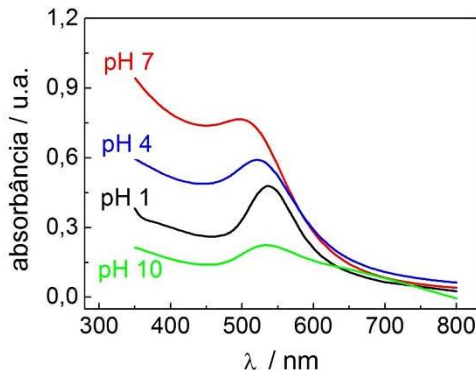
Nas sínteses das AuNPs realizadas neste trabalho utilizou-se como agente estabilizante a carboximetilcelulose (CMC), a qual é um polímero linear bastante solúvel, derivado da celulose e que apresenta pK_a em torno de 4,0 (FENGEL; WEGENER, 1989). Dessa forma, a CMC pode estabilizar as AuNPs tanto por impedimento estérico entre suas cadeias, como por repulsão eletrostática, dependendo do pH do meio. Sendo assim, para compreender de forma mais detalhada o mecanismo de estabilização das AuNPs na CMC, foram realizadas sínteses usando soluções de CMC com pH ajustado em diferentes valores, a saber: 1,0, 4,0, 7,0 e 10,0. Estes foram ajustados com soluções de HCl ou NaOH 0,5 mol L^{-1} . A Figura 11 apresenta a foto das dispersões obtidas em cada uma das sínteses. Nota-se uma alteração bastante visível na coloração das dispersões, provocada apenas pela mudança de pH do meio aquoso contendo a CMC.

Figura 11. Fotografia digital das dispersões de AuNPs estabilizadas em CMC sintetizadas em diferentes valores de pH: (A) pH 1,0; (B) pH 4,0; (C) pH 7,0 e (D) 10,0.



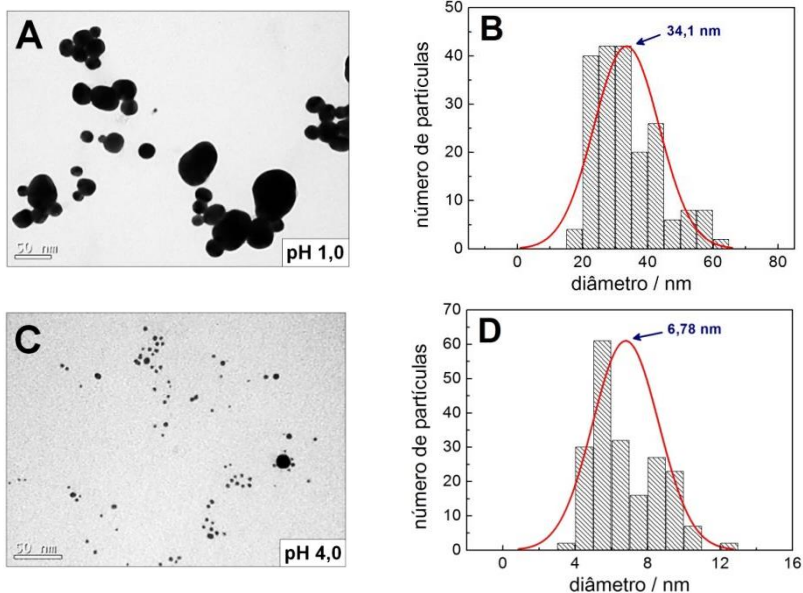
Todas as quatro dispersões de AuNPs-CMC foram caracterizadas por medidas de espectroscopia UV-vis, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e potencial zeta (ξ). A Figura 12 mostra os espectros UV-vis obtidos num intervalo de comprimento de onda de 350 a 800 nm. Todos os espectros apresentaram uma banda bem definida próxima a 520 nm, a qual é característica da ressonância plasmônica da superfície (banda SPR) de partículas de ouro (TURKEVICH; GARTON; STEVENSON, 1954; TOMA et al., 2005). No entanto, observou-se que o comprimento de onda de máxima absorvância ($\lambda_{\text{máx}}$) sofre leve deslocamento em função do pH do meio, sendo que no pH 7,0 tem-se o menor $\lambda_{\text{máx}}$ e no pH 1,0 o maior $\lambda_{\text{máx}}$. Todos os valores obtidos para $\lambda_{\text{máx}}$ são apresentados na Tabela 2.

Figura 12. Espectros UV-vis para AuNPs estabilizadas em CMC com diferentes valores de pH.



As imagens obtidas por TEM (Figura 13) mostram que todas as AuNPs tem formato majoritariamente esférico. No entanto, apenas nos pH 4,0 e 7,0 elas encontram-se bem dispersas no polímero, sem sinais significativos de agregação. Por outro lado, nos pH 1,0 e 10,0 é possível observar nanopartículas com tamanhos maiores e também grandes agregados contendo elevado número de partículas. Além disso, obteve-se a distribuição de tamanhos para as partículas obtidas em cada síntese, sendo que o tamanho médio estimado para as partículas (diâmetro) variou de 5,3 (em pH 7,0) a 34,1 nm (em pH 1,0), conforme mostrado nos histogramas da Figura 13. Cabe destacar aqui, que os valores médios dos diâmetros corroboram com os resultados obtidos pela análise de espectroscopia UV-vis e com dados publicados na literatura, os quais indicam que quanto maior a partícula, maior o comprimento de onda de absorvância máxima referente à sua banda de ressonância plasmônica (TOMA; SILVA; ANAISSI, 2005).

Figura 13. (A, C, E e G) Imagens de TEM para AuNPs obtidas em diferentes valores de pH; (B, D, F e H) histogramas de distribuição do diâmetro médio das AuNPs para os pH 1, 4, 7 e 10, respectivamente.



Continuação da Figura 13:

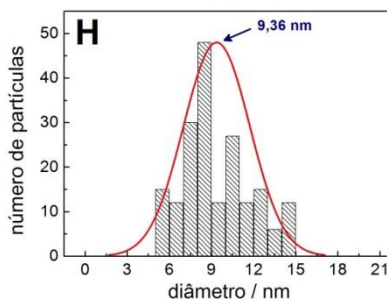
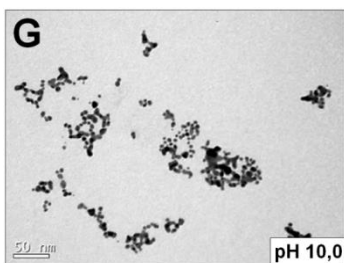
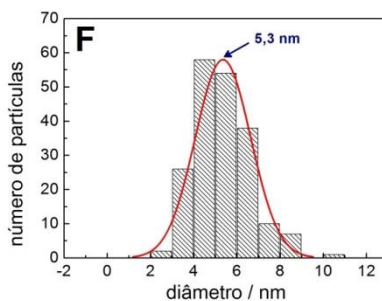
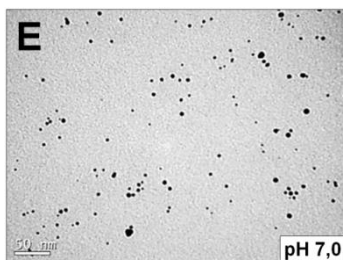


Tabela 2. Resultados obtidos na caracterização das AuNPs-CMC.

pH da síntese	$\lambda_{\text{máx}}$ SPR (nm)	Diâmetro médio (nm)	ξ (mV)
1,0	535	34,1	-1,52
4,0	522	6,78	-31,06
7,0	504	5,30	-45,40
10,0	534	9,36	-49,30

Foram realizadas também medidas de potencial zeta (ξ) das nanopartículas presentes em cada uma das dispersões, de modo a investigar a sua carga superficial. O potencial zeta consiste na medida da carga elétrica superficial média das partículas e é entendida como uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática entre elas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a sua estabilidade (HUNTER, 1993). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 2, juntamente com os demais resultados.

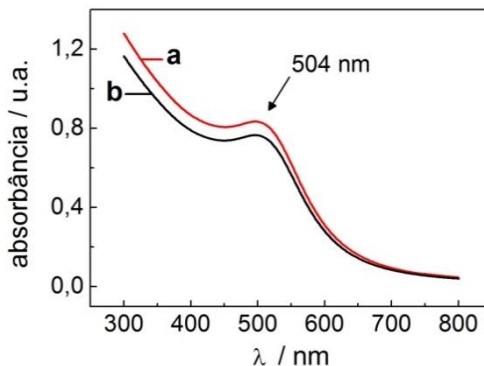
Conclui-se que à medida que o pH do meio aumenta, ocorre aumento na magnitude da carga elétrica negativa na superfície das

partículas. Isso ocorre porque com o aumento do pH acima de ~4,0 a CMC sofre desprotonação, apresentando cargas negativas em suas cadeias, sendo que quanto maior o pH, maior a magnitude dessa carga formada. Da mesma forma, observa-se que quanto maior o valor da carga negativa das partículas maior é a repulsão entre elas, o que impede a sua agregação e posterior aumento de tamanho. Por isso, nota-se que quando o potencial zeta é relativamente elevado, as partículas apresentam menor tamanho, se encontram bem dispersas e são altamente estáveis, como observado nas AuNPs obtidas em pH 7,0. Todavia, na síntese obtida em pH 10,0, embora o potencial zeta seja o maior de todos (mais negativo), as partículas apresentam tamanho intermediário e formam grandes aglomerados. Isso ocorre porque, nesse caso, a estabilização eletrostática é favorecida, no entanto a estabilização estérica, dada pelo impedimento espacial entre as cadeias poliméricas é pequena, uma vez que em valores de pH maiores que 9,0 ocorre grande diminuição na viscosidade da CMC, resultante da elevada carga negativa e consequente repulsão entre as cadeias (HIRATA; SOUZA; PESSOA, 1993).

Na síntese efetuada em pH 1,0, a CMC encontra-se em sua forma neutra, o que é evidenciado pelo pequeno valor de ζ obtido. Nesse caso, a repulsão que ela proporciona entre as partículas é pequena, fazendo com que elas facilmente se agreguem e formem partículas maiores.

Por fim, optou-se por utilizar as AuNPs obtidas em pH 7,0, as quais apresentaram menor tamanho e, portanto, poderiam fornecer resultados mais promissores na modificação dos eletrodos. Além disso, estas dispersões foram as que se mantiveram mais estáveis ao longo dos dias. Constatação esta, feita primeiramente pelo aspecto visual, e também confirmada por espectroscopia UV-vis, conforme mostrado na Figura 14, em que a banda de ressonância plasmônica permaneceu inalterada após 7 dias, demonstrando que a dispersão das AuNPs-CMC é bastante estável. Mesmo após esse período de tempo, não se observou mudanças na coloração dessa dispersão.

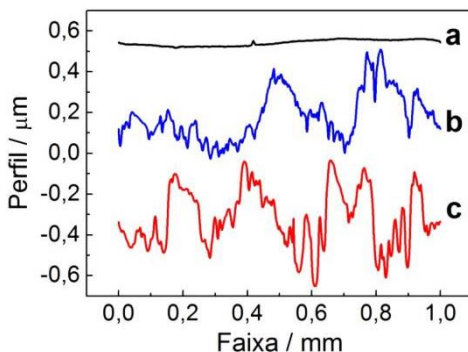
Figura 14. Espectros UV-vis para AuNPs estabilizadas em CMC (a) 3 horas após a síntese e (b) 7 dias após a síntese.



4.1.2 Caracterização morfológica e eletroquímica do AuNPs-CMC/GCE

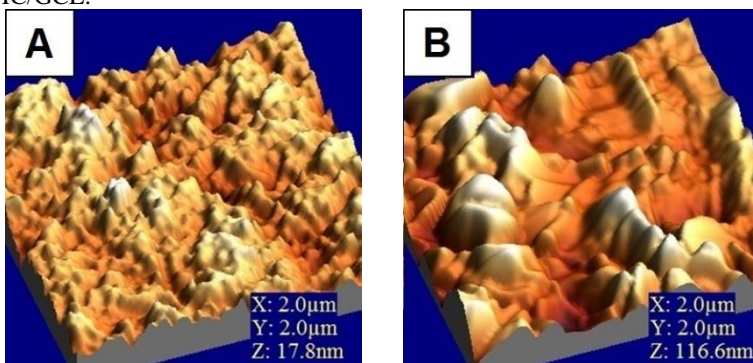
A espessura do filme de AuNPs-CMC sobre o substrato de carbono vítreo foi determinada pela técnica de perfilometria. Na análise de perfilometria do GCE (Figura 15, curva a) observa-se uma superfície com poucas irregularidades. No perfil do filme de CMC (Figura 15, curva b) observa-se um aumento significativo na irregularidade superficial, sendo que a espessura deste filme foi estimada em $0,27 \mu\text{m}$ (270 nm). Um pequeno aumento na rugosidade também foi observado na análise do filme de AuNPs-CMC (Figura 15, curva c), sendo que a espessura média do filme com a adição das NPs aumentou para $0,31 \mu\text{m}$ (310 nm). Esse aumento foi relativamente pequeno, pois o diâmetro das AuNPs é extremamente menor do que o tamanho das cadeias poliméricas da CMC. Assim a presença das AuNPs não afeta significativamente a espessura do filme.

Figura 15. Gráficos de perfilometria das superfícies do (a) GCE; (b) filme de CMC e (c) filme de AuNPs-CMC.



As imagens de microscopia de força atômica (AFM) (Figura 16) também revelam grande diferença entre a morfologia do GCE e do GCE modificado com a dispersão de AuNPs-CMC. Na Figura 16A, que corresponde ao GCE sem modificação, é possível visualizar estruturas pequenas com altura máxima de 17,8 nm. Por outro lado, após a modificação (Figura 16B) a superfície passou a apresentar estruturas maiores com altura máxima de cerca 116,6 nm, indicando o recobrimento da superfície e formação de alguns aglomerados maiores.

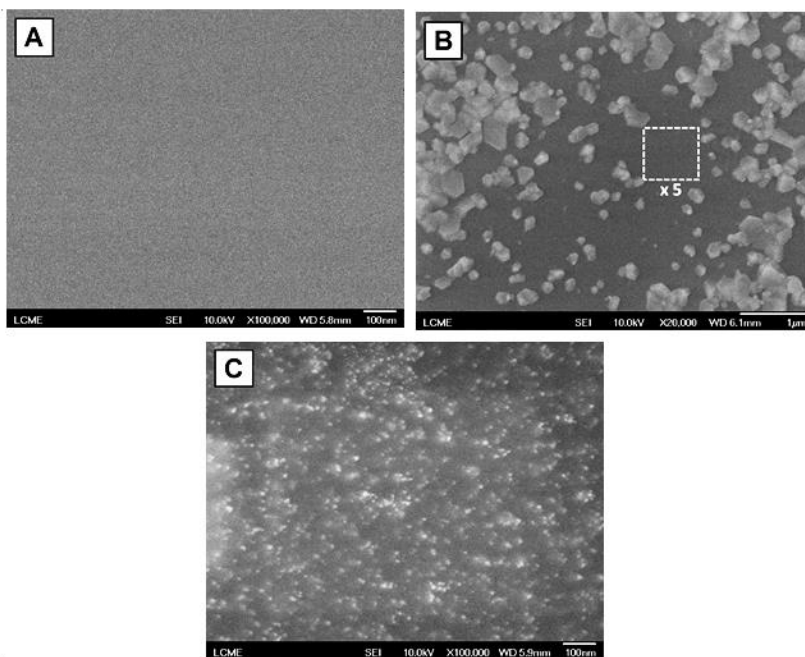
Figura 16. Microscopias de força atômica para (A) GCE e (B) AuNPs-CMC/GCE.



Avaliou-se também a morfologia do filme de AuNPs-CMC sobre o GCE por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG). Na Figura 17 são mostradas as micrografias da superfície

do substrato antes (imagem A) e após a modificação (imagens B e C). No GCE sem modificação, não se observou nenhuma irregularidade aparente, o que é esperado para esse tipo de eletrodo. Entretanto, após a modificação, foi possível observar alteração significativa na morfologia da superfície: as imagens mostram uma superfície irregular com certa rugosidade e algumas estruturas maiores em diferentes formatos, as quais correspondem ao filme depositado. Ampliando uma pequena região da micrografia B, obteve-se a imagem C, na qual é possível notar, dispersas entre os aglomerados maiores, as partículas de ouro com diâmetros inferiores a 10 nm. Esta observação comprova que, apesar da formação de alguns agregados, grande parte das partículas permanece em tamanho “nano” sobre a superfície do GCE, mesmo após a secagem do filme. Tais resultados corroboram com as análises de perfilometria e de AFM, descritas anteriormente.

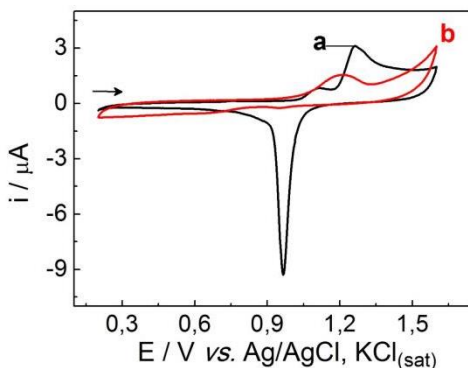
Figura 17. Micrografias de SEM-FEG (A) GCE; (B) filme de AuNPs-CMC e (C) região da imagem (B), ampliada 5 vezes.



A caracterização eletroquímica da superfície do AuNPs-CMC/GCE foi realizada por voltametria cíclica em solução de H_2SO_4

0,5 mol L⁻¹. O voltamograma obtido para o eletrodo modificado foi comparado ao obtido com um eletrodo de ouro, ambos estão apresentados na Figura 18. Através dos perfis voltamétricos é possível confirmar a presença de ouro sobre a superfície do eletrodo, pelo sinal referente à formação de seus óxidos em aproximadamente 1,2 V. No entanto, em estudos posteriores, quando foram utilizadas soluções tampão B-R e/ou fosfato 0,2 mol L⁻¹ para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica, nenhum sinal correspondente a oxidação do ouro foi visível. Esse resultado pode ser devido a natureza do solvente, o pH da solução e também pela concentração imensamente pequena de ouro na superfície do carbono vítreo.

Figura 18. Voltamogramas cíclicos para (a) eletrodo de ouro e (b) AuNPs-CMC/GCE em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A área eletroativa, tanto do eletrodo sem modificação quanto do eletrodo modificado, foi estimada também pela técnica de voltametria cíclica usando como sonda redox K₃[Fe(CN)₆] 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹. Os voltamogramas do K₃[Fe(CN)₆] obtidos em diferentes velocidades de varredura são mostrados na Figura 19A. De acordo com a equação de Randles-Sevcik, para T = 25 °C:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 \text{ A D}^{1/2} n^{3/2} \nu^{1/2} c \quad (\text{Equação 2})$$

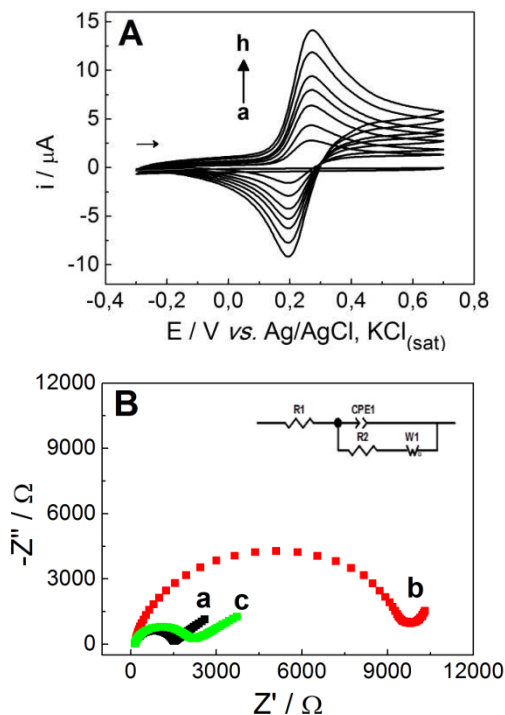
Onde: i_p é a corrente de pico (em amperes); A é a área eletroativa do eletrodo (cm²); D é o coeficiente de difusão da espécie K₃[Fe(CN)₆] em solução aquosa ($6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), n é o número de mol de elétrons transferidos na reação redox (n = 1), ν é a velocidade de variação do potencial (V s⁻¹), e c é a concentração da espécie K₃[Fe(CN)₆] (mol

cm^{-3}), a área pode ser calculada a partir do coeficiente angular do gráfico de i_p versus $v^{1/2}$ (BARD; FAULKNER, 2001). Os valores obtidos para o GCE e o AuNPs-CMC/GCE foram 0,015 e 0,035 cm^2 , respectivamente. Esse aumento de cerca de 2,3 vezes na área eletroativa demonstra que o eletrodo foi modificado eficientemente pelo filme de AuNPs-CMC. Um resultado similar foi obtido por Silva e colaboradores, usando um sensor modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em hidrocloreto de polialilamina (PAH) (SILVA et al., 2015).

Utilizando o AuNPs-CMC/GCE, a separação entre os potenciais dos picos de oxidação e redução para o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ variou de 64,0 mV (para $v < 50 \text{ mV s}^{-1}$) até 76,0 mV (para $v > 100 \text{ mV s}^{-1}$). Esses resultados são compatíveis com os valores esperados para uma reação redox reversível onde ocorre a transferência de 1,0 mol de elétrons, indicando que o sensor AuNPs-CMC/GCE responde adequadamente e pode ser utilizado em experimentos eletroquímicos.

Com o objetivo de obter mais informações com relação a interface eletrodo-solução e a resistência a transferência de carga (R_{tc}), foram realizadas também medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, nas quais utilizou-se $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ como espécie redox. A Figura 19B mostra os gráficos de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') para (a) GCE, (b) CMC/GCE e (c) AuNPs-CMC/GCE. Os valores de R_{tc} obtidos foram: GCE (1516 Ω), CMC/GCE (9540 Ω) e AuNPs-CMC/GCE (2089 Ω). Observa-se que a deposição do filme de CMC sobre o GCE (Figura 19B-b) provoca um aumento significativo na R_{tc} devido à baixa condutividade do filme de CMC. Por outro lado, com a deposição do filme de AuNPs-CMC (Figura 19B-c) uma notável diminuição no valor de R_{tc} é observada, podendo ser explicada pela excelente propriedade condutora das AuNPs. Neste último caso, a R_{tc} é um pouco maior do que para o GCE sem modificação, pelo fato da CMC também estar presente no filme modificador (CAMPBELL; COMPTON, 2010; YIN; QIN, 2013).

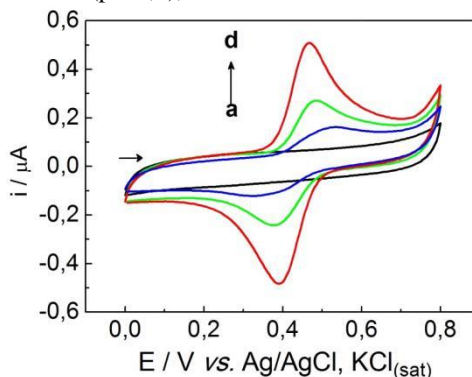
Figura 19. (A) Voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L^{-1} sobre GCE/AuNPs-CMC em KCl 0,5 mol L^{-1} (a) branco, (b-h) $\nu = 10$ a 200 $mV s^{-1}$; (B) Espectroscopia de impedância eletroquímica para (a) GCE, (b) CMC/GCE e (c) AuNPs-CMC/GCE.



4.1.3 Comportamento eletroquímico da catequina sobre diferentes eletrodos

O comportamento eletroquímico da catequina sobre diferentes eletrodos foi estudado por voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos para catequina 50,0 $\mu mol L^{-1}$ em solução tampão B-R 0,2 mol L^{-1} (pH 3,0) sobre cada um dos eletrodos foram obtidos aplicando-se uma varredura de potencial de 0,0 a +0,8 V seguido da varredura reversa de +0,8 a 0,0 V, com $\nu = 50,0 mV s^{-1}$, como mostrado na Figura 20.

Figura 20. Voltamogramas cíclicos para (a) branco; (b) GCE; (c) CMC/GCE e (d) AuNPs-CMC/GCE na presença de catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

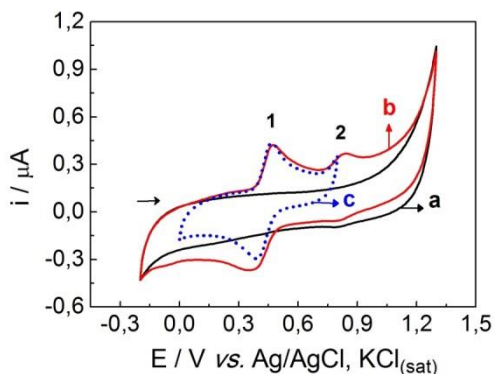


Conforme esperado, no voltamograma do AuNPs-CMC/GCE na ausência de catequina, nenhum sinal redox foi observado (Figura 20a). Por outro lado, após adição de catequina, um sinal redox quase-reversível foi observado para os três eletrodos. Sobre o GCE os picos de oxidação e de redução apresentam potencial de +0,52 e +0,34 V, com correntes de 0,080 e 0,078 μA , respectivamente (Figura 20b). Este comportamento foi similar ao já descrito por outros autores (JANEIRO; BRETT, 2004). Em outro trabalho, foi demonstrado que o grupo catecol do anel B (Figura 1) é mais facilmente oxidado que o grupo resorcinol do anel A. Além disso, os grupos fenólicos do anel B são sítios mais alcalinos (CREN-OLIVÉ et al., 2002). Dessa forma, o pico anódico é atribuído a oxidação do grupo catecol do anel B, levando a formação da *orto*-quinona correspondente, via reação eletroquímica quase-reversível que envolve a transferência de 2,0 mols de prótons e 2,0 mols de elétrons. O sinal catódico, por sua vez, corresponde a redução da *orto*-quinona formada na varredura direta. Muitos trabalhos reportam o mecanismo detalhado para esta reação (CREN-OLIVÉ et al., 2002; JANEIRO; BRETT, 2004). Sobre o GCE contendo o filme de CMC (Figura 20c) a separação entre os potenciais de pico de oxidação e de redução (ΔE_p) sofreu leve diminuição, indicando uma pequena melhoria na reversibilidade da reação. Observou-se também um aumento de cerca de duas vezes nos valores de corrente de pico, que pode ser causado pelo aumento da concentração de catequina sobre a superfície do eletrodo, devido a maior adsorção na CMC. Por fim, avaliando a resposta da catequina sobre o AuNPs-CMC/GCE (Figura 20d), observou-se um

deslocamento do potencial de pico de oxidação para um valor menos positivo e do potencial de redução para um valor mais positivo. O valor de ΔE_p foi de 70,0 mV, indicando que a reação apresenta uma maior reversibilidade sobre esta superfície. Além disso, os valores de corrente de pico foram cerca de quatro vezes maiores quando comparados ao eletrodo sem modificação. Considerando que a área eletroativa calculada para o sensor AuNPs-CMC/GCE foi apenas duas vezes maior que para o GCE, o aumento das correntes de pico não é atribuído somente ao aumento de área superficial ativa, mas também devido ao efeito catalítico das AuNPs-CMC na oxi-redução da catequina.

Para investigar a presença de outros processos redox ampliou-se a janela de variação de potencial para o intervalo de $-0,2$ a $+1,3$ V. Utilizou-se os demais parâmetros semelhantes aos da Figura 20. Como anteriormente, nenhum sinal foi observado na ausência de catequina (Figura 21a). Na presença de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catequina, (Figura 21b), dois picos de oxidação bem definidos foram observados em $+0,52$ V (pico 1) e $+0,83$ V (pico 2). Dois sinais de redução também são aparentes na varredura reversa: o primeiro em $+0,80$ V e o segundo em $+0,36$ V. Uma vez que a reação referente ao pico 2 não é completamente reversível, optou-se por limitar a janela de variação de potencial no intervalo de $0,0$ a $+0,8$ V (Figura 21c) e utilizar a resposta quase-reversível correspondente ao pico 1 como sinal analítico para os experimentos seguintes. Além disso, o produto da reação do pico 2 adsorve fortemente sobre o eletrodo, bloqueando a superfície e diminuindo significativamente a resposta em ciclos seguidos. Por outro lado, usando apenas o sinal do pico 1, não se observou adsorção do produto da reação sobre a superfície do eletrodo, pois o sinal se manteve constante quando foram realizados ciclos seguidos. Dessa forma, não foi necessário realizar etapa de limpeza do eletrodo entre as medidas.

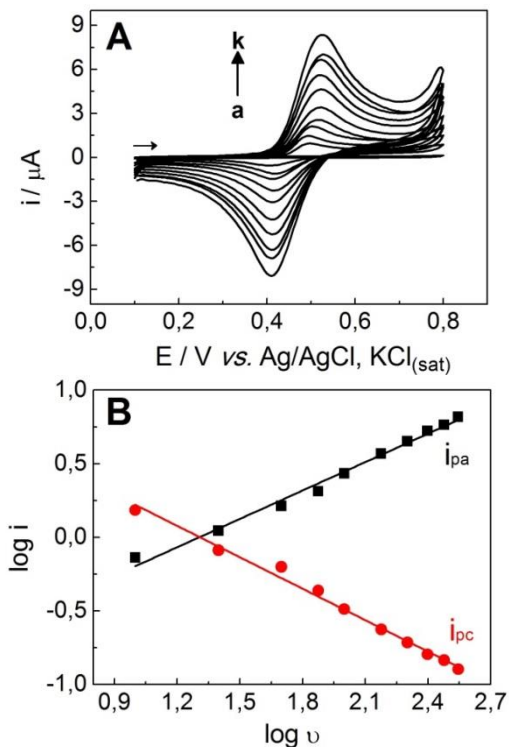
Figura 21. Voltamogramas cíclicos sobre o AuNPs-CMC/GCE em (a) branco; (b e c) catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



4.1.4 Efeito da velocidade de varredura

Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 a 350 mV s^{-1}) em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), sobre o AuNPs-CMC/GCE. As curvas obtidas estão apresentadas na Figura 22A.

Figura 22. (A) Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (a) branco; (b-k) $\nu = 10$ a 350 mV s^{-1} ; (B) gráfico $\log i_p$ vs. $\log \nu$.

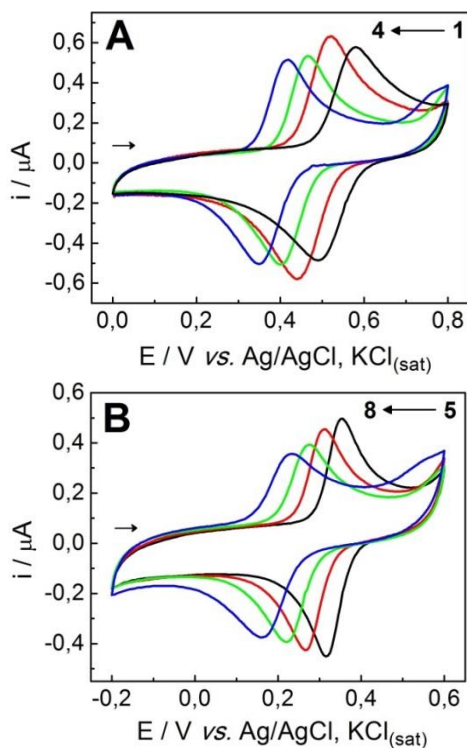


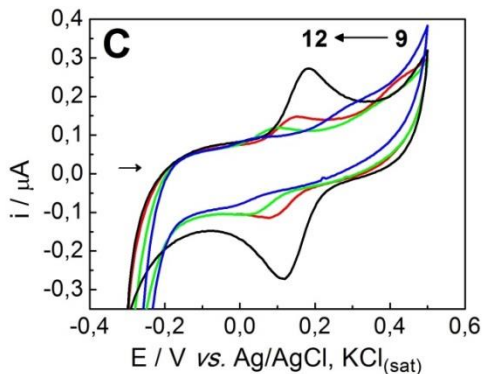
As correntes dos picos de oxidação e redução aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$) (gráfico não mostrado), indicando que as reações de oxidação e de redução são processos controlados por difusão. O valor do coeficiente angular do gráfico $\log i_p$ versus $\log \nu$ (Figura 22B) foi de 0,64 para a oxidação e $-0,71$ para a redução, confirmando, pelos valores encontrados na literatura, que a etapa limitante da velocidade da reação é de fato a difusão, mas ocorre também uma pequena contribuição da etapa de adsorção (BARD; FAULKNER, 2001).

4.1.5 Influência do pH, da natureza e da concentração do eletrólito suporte

A influência da natureza e do pH do eletrólito suporte sobre a resposta eletroquímica da catequina também foi investigada. Primeiramente as respostas de corrente e potencial de pico foram avaliadas no intervalo de pH de 1,0 a 12,0, utilizando solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, com pH ajustado previamente. Os voltamogramas obtidos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em cada um dos pHs são apresentados na Figura 23.

Figura 23. Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (A) pH 1,0 a 4,0; (B) pH 5,0 a 8,0; (C) pH 9,0 a 12,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.





A Figura 24A mostra mais claramente como as correntes de pico variam em função do pH do eletrólito suporte. Observou-se que os maiores valores de correntes de pico de oxidação e de redução foram obtidos em pHs mais ácidos. Selecionou-se os pH 2,0, 3,0 e 4,0 para realizar a otimização da natureza do eletrólito. Além disso, os potenciais de pico de oxidação e de redução (E_{po} e E_{pr}) deslocaram-se linearmente para valores menos positivos com o aumento do pH, conforme ilustra a Figura 24B. O coeficiente angular do gráfico E_p vs. pH foi de $-47,0 \text{ mV pH}^{-1}$ para a oxidação e $-46,0 \text{ mV pH}^{-1}$ para a redução. Tais valores são consistentes com o mecanismo da reação descrito na literatura (Figura 25), o qual propõem a transferência de 2,0 mols de prótons e 2,0 mols de elétrons. Resultados similares para o comportamento da catequina em soluções com pH entre 2,0 e 12,0 também já foram descritos na literatura (JANEIRO; BRETT, 2004; YANG et al., 2009).

Figura 24. Variação (A) da corrente de pico anódica e catódica e (B) dos potenciais de pico de oxidação e de redução em função do pH do eletrólito suporte; demais parâmetros semelhantes à figura anterior.

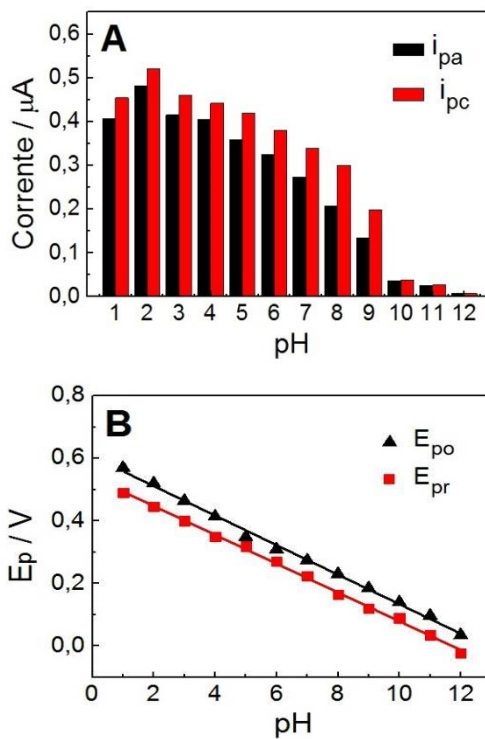
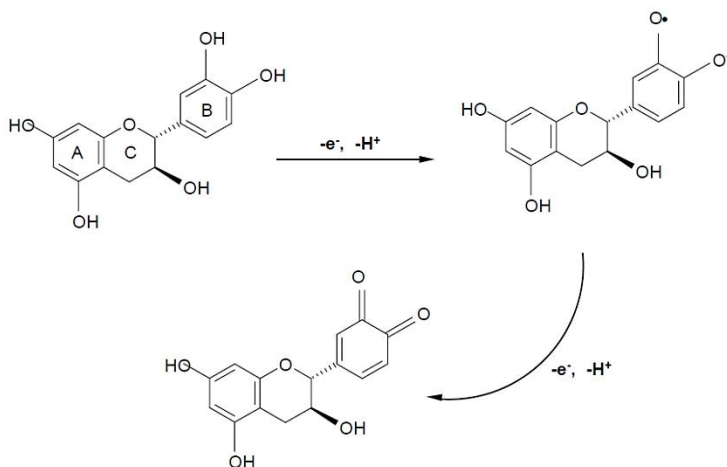
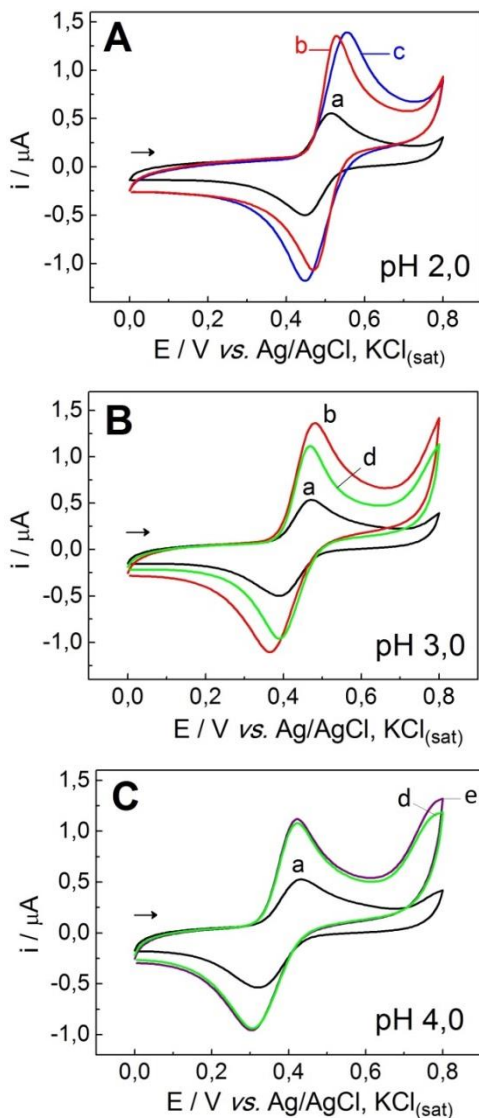


Figura 25. Mecanismo de oxidação da catequina.

Fonte: JANEIRO; BRETT, 2004.

Cinco diferentes soluções tampão foram testadas como eletrólitos suporte nos pH 2,0, 3,0 e 4,0. A escolha do eletrólito adequado para cada pH foi baseada na faixa tamponante de cada uma das soluções tampão. Todas as soluções estavam na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 26 apresenta os voltamogramas para a catequina em cada um dos eletrólitos e pH.

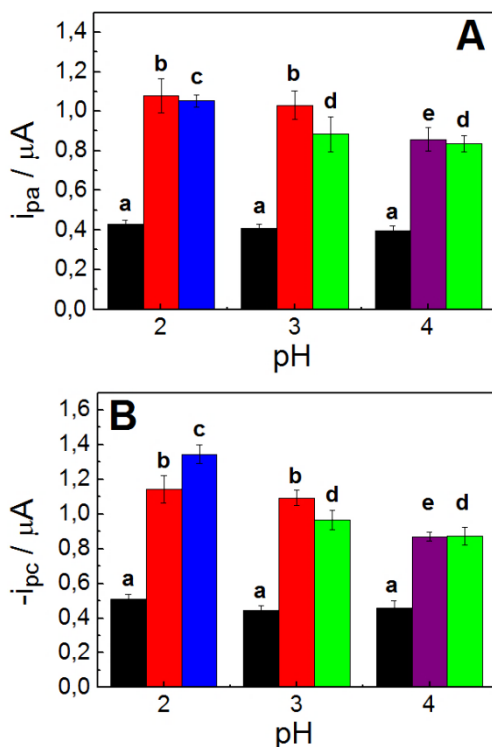
Figura 26. Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em (A) pH 2,0; (B) pH 3,0 e (C) pH 4,0. Sendo: a – B-R, b – fosfato, c – Clark-Lubs, d – McIlvaine e e – acetato; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Os valores de correntes de pico de oxidação e redução dos voltamogramas da Figura 26 são apresentados nos gráficos de barras da

Figura 27, para uma melhor visualização. Observa-se que os melhores valores são obtidos nas soluções tampão fosfato e Clark-Lubs, ambos em pH 2,0. Por outro lado, avaliando-se os potenciais de picos anódico e catódico observou-se que na solução tampão fosfato o sistema apresenta maior reversibilidade (menor ΔE_p). Assim, o eletrólito suporte selecionado para as análises posteriores foi solução tampão fosfato em pH 2,0.

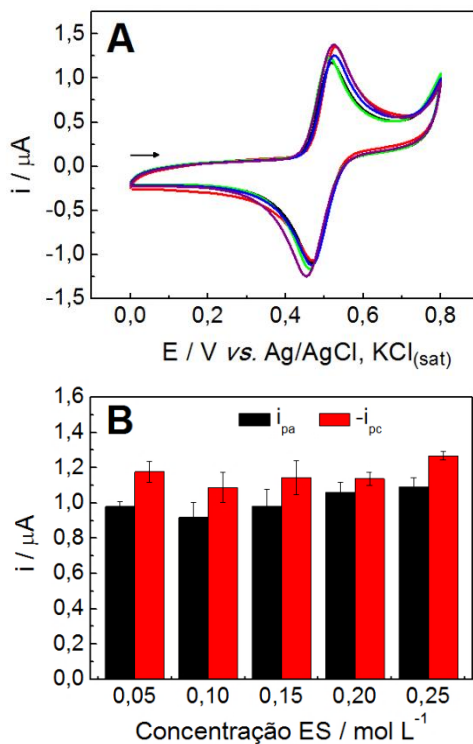
Figura 27. Respostas (A) de corrente anódica e (B) de corrente catódica em função do pH e da natureza do eletrólito suporte; a – B-R, b – fosfato, c – Clark-Lubs, d – McIlvaine e e – acetato, $n = 3$.



Um último estudo com relação ao eletrólito suporte foi realizado a fim de avaliar a influência da concentração do eletrólito suporte (ES) sobre a resposta do detector. A faixa investigada foi de 0,05 a 0,25 mol L^{-1} (Figura 28). No entanto, não se observou alteração significativa nos valores de correntes de pico para a resposta redox da catequina. Sendo

assim, optou-se por continuar utilizando nos estudos posteriores o tampão fosfato na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 28. (A) Voltamogramas cíclicos para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em diferentes concentrações de solução tampão fosfato pH 2,0: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; (B) Respostas de correntes anódica e catódica em função da concentração do eletrólito suporte, $n = 3$.

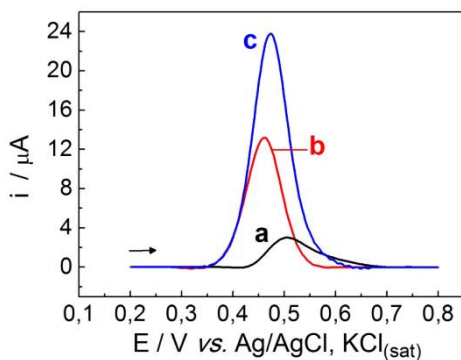


4.1.6 Escolha da técnica e otimização dos parâmetros experimentais

Foram investigadas diferentes técnicas eletroanalíticas com o objetivo de avaliar a magnitude do sinal eletroanalítico na oxidação-redução da catequina. Avaliou-se as respostas das voltmetrias linear (LSV), de pulso diferencial (DPV) e de onda quadrada (SWV). Os parâmetros de cada técnica foram ajustados de modo a se obter a mesma velocidade de varredura durante todas as medidas.

Na Figura 29 são mostrados os voltamogramas obtidos utilizando as três técnicas. Observa-se que o voltamograma da curva c (SWV) fornece maior resposta, pois apresenta maior valor de corrente de pico para uma mesma concentração de catequina, quando comparado às demais técnicas. Este resultado era esperado, pois as técnicas de DPV e LSV nesse caso fornecem só os valores de correntes de oxidação, uma vez que a variação de potencial é feita apenas no sentido positivo, enquanto que a corrente resultante obtida na SWV é a diferença das correntes de oxidação e de redução e, como estas possuem sinais opostos, a corrente resultante será sempre maior que os valores de i_{pa} e i_{pc} separados (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Nesse caso da catequina, como o processo é quase-reversível e ocorrem as duas reações (oxidação e redução) este efeito é observado. Dessa forma, a etapa seguinte de otimização da metodologia foi direcionada para o uso da SWV como técnica eletroanalítica.

Figura 29. Voltamogramas para catequina $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o AuNPs-CMC/GCE: (a) LSV, (b) DPV e (c) SWV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Em seguida foi realizada a otimização dos parâmetros experimentais da técnica de SWV. Esse procedimento é de extrema importância para se obter um maior valor de corrente resultante, o que implica no aumento da sensibilidade da metodologia. Dessa forma, foram avaliadas as respostas de corrente resultante mediante a variação da frequência de pulso (f), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude de pulso (a). Para a escolha da condição ideal de trabalho, observou-se o

perfil voltamétrico que exibisse o melhor compromisso entre a intensidade de corrente resultante e a resolução dos picos.

O estudo para otimização dos parâmetros da SWV foi realizado em triplicata numa solução de catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Os intervalos estudados foram: $f = 10$ a 100 Hz ; $a = 10$ a 100 mV e $\Delta E_s = 2$ a 10 mV . Os voltamogramas de uma das replicatas e as variações das respostas de corrente resultante em função dos valores de f , a e ΔE_s são mostradas nas Figura 30 a 32. Os valores destacados com uma seta correspondem aos escolhidos para os experimentos posteriores, foram eles: $f = 80 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

Figura 30. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a-k: $f = 10$ a 100 Hz); (B) dependência da corrente resultante com a variação da frequência ($a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$) para catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $n = 3$.

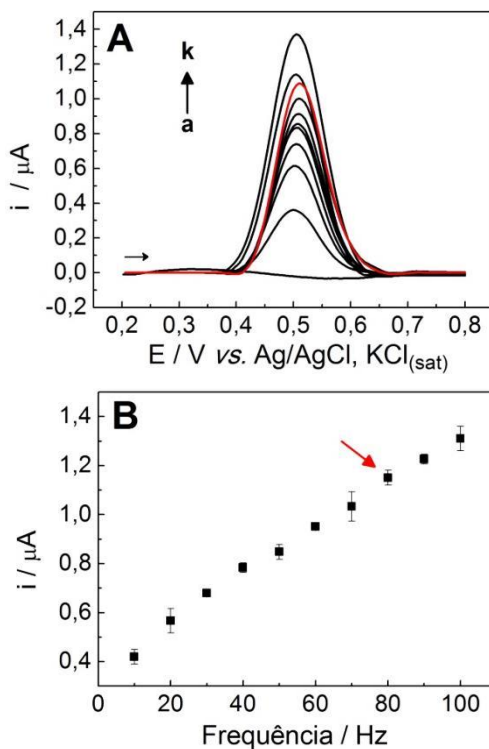


Figura 31. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a-k: $a = 10$ a 100 mV); (B) dependência da corrente resultante com a variação da amplitude ($f = 80$ Hz e $\Delta E_s = 5$ mV) para catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $n = 3$.

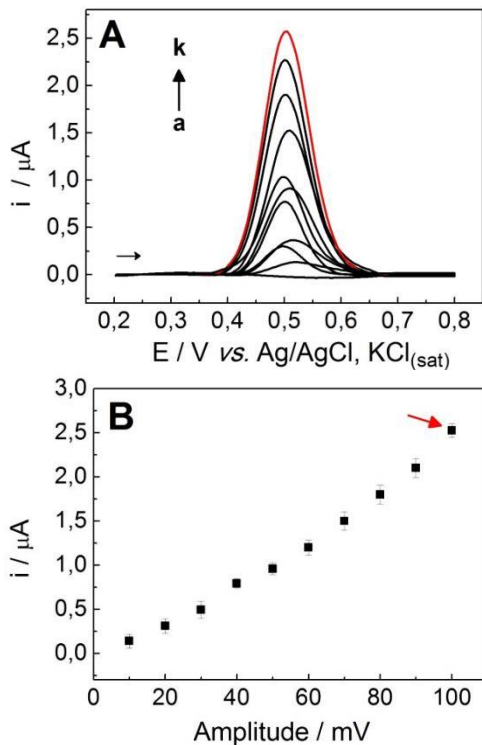
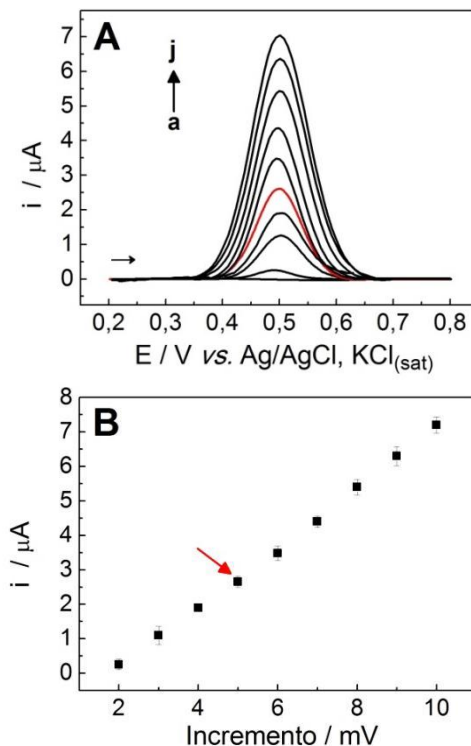


Figura 32. (A) Voltamogramas de onda quadrada (a-j: $\Delta E_s = 2$ a 10 mV); (B) dependência da corrente resultante com a variação do incremento ($f = 80$ Hz e $a = 100$ mV) para catequina $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), $n = 3$.



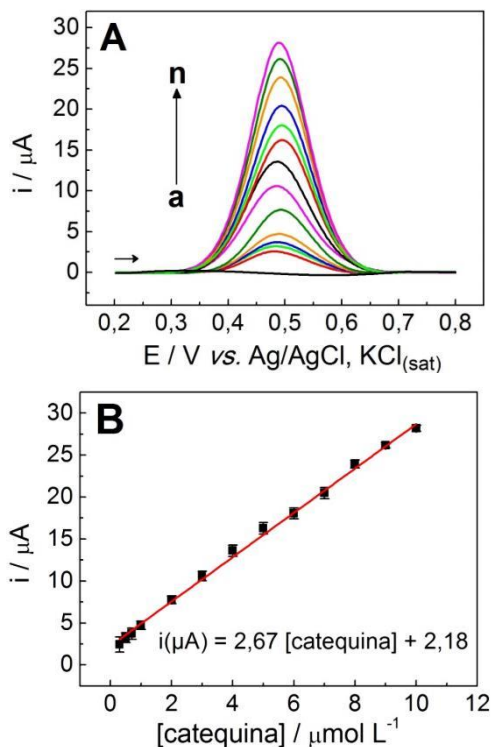
4.1.7 Curva de calibração e características analíticas

Empregando as condições experimentais otimizadas, a curva de calibração foi obtida mediante adições de diferentes alíquotas de solução padrão de catequina à solução do eletrólito suporte. A Figura 33A mostra os voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina. É observado um pico bem definido em $+0,48$ V, cuja intensidade de corrente aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de catequina no intervalo de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de determinação de 0,997 (Figura 33B). Para concentrações maiores que $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ não foi observado

aumento significativo da resposta, indicando que ocorre a saturação da superfície do eletrodo acima desta concentração.

As características analíticas extraídas da curva de calibração são apresentadas na Tabela 3. A curva de calibração pode ser expressa de acordo com a equação $i (\mu\text{A}) = 2,18 + 2,67 [\text{catequina}] / \mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando as seguintes expressões, que correspondem ao nível de confiança de 99%: $\text{LD} = 3,3 \text{ DP}/a$ e $\text{LQ} = 10 \text{ DP}/a$, onde DP corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear e a é o coeficiente angular da reta. Os valores obtidos para LD e LQ foram 0,274 e 0,831 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 33. (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina: (a) branco (b) 0,3, (c) 0,5, (d) 0,7, (e) 1,0, (f) 2,0, (g) 3,0, (h) 4,0, (i) 5,0, (j) 6,0, (k) 7,0, (l) 8,0, (m) 9,0 e (n) 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AuNPs-CMC/GCE em solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 2,0); $f = 80 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$; (B) Curva de calibração para a catequina, $n = 5$.



Para fins de comparação, foram obtidas também curvas de calibração para a catequina usando um eletrodo de carbono vítreo não modificado (Figura 34) e um eletrodo de ouro (Figura 35), nas mesmas condições usadas na Figura 33. As características analíticas destas duas curvas de calibração também foram resumidas na Tabela 3.

Figura 34. (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina: (a) branco (b) 1,0, (c) 2,0, (d) 3,0, (e) 4,0, (f) 5,0, (g) 6,0, (h) 7,0, (i) 8,0, (j) 9,0 e (k) 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre GCE em solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 2,0); $f = 80$ Hz, $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV; (B) Curva de calibração, $n = 5$.

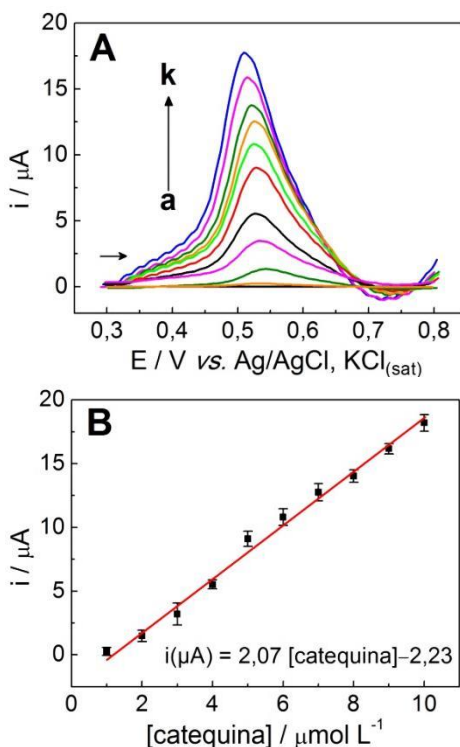
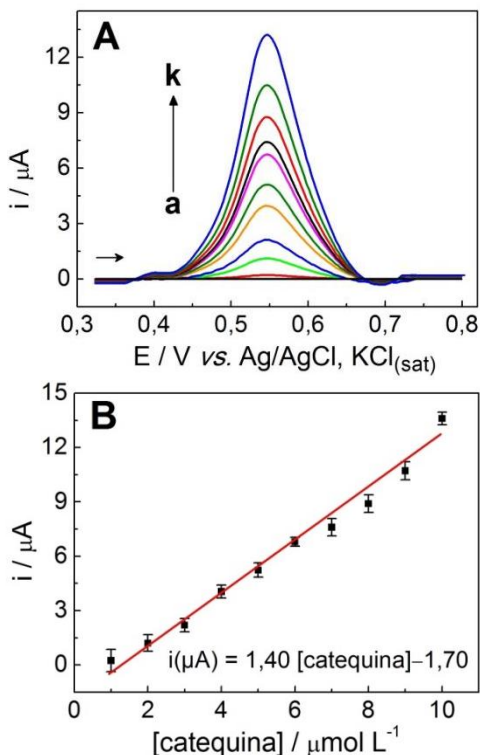


Figura 35. (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de catequina: (a) branco (b) 1,0, (c) 2,0, (d) 3,0, (e) 4,0, (f) 5,0, (g) 6,0, (h) 7,0, (i) 8,0, (j) 9,0 e (k) 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre eletrodo de ouro em solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 2,0); $f = 80$ Hz, $a = 100$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV; (B) Curva de calibração, $n = 5$.



A equação de regressão linear obtida utilizando o GCE sem modificação foi: $i (\mu\text{A}) = 2,07 [\text{catequina}] - 2,23$. A equação de regressão linear obtida usando o eletrodo de ouro foi: $i (\mu\text{A}) = 1,4 [\text{catequina}] - 1,7$. Os valores LD e LQ obtidos com o GCE foram 0,67 e 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, e para o eletrodo de ouro, os valores correspondentes foram: LD = 0,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LQ = 2,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados indicam que o AuNPs-CMC/GCE é de fato mais sensível do que o GCE e também do que o eletrodo de ouro em relação à detecção eletroquímica de catequina.

Tabela 3. Parâmetros analíticos das curvas de calibração para catequina usando diferentes detectores.

Parâmetro analítico	AuNPs- CMC/GCE	GCE	Au
Potencial de pico (V)	0,48	0,52	0,54
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,3 – 10,0	1,0 – 10,0	1,0 – 10,0
Coefficiente de determinação (R^2)	0,997	0,993	0,991
Coefficiente angular ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	2,670	2,07	1,40
Desvio padrão coeficiente angular ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	0,041	0,055	0,067
Coefficiente linear (μA)	2,177	-2,23	-1,70
Desvio padrão do coeficiente linear (μA)	0,222	0,419	0,399
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,274	0,67	0,94
Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,831	2,04	2,86
Repetibilidade de i (intradia) (%) a,b	2,36	—	—
Repetibilidade de i (interdia) (%) a,b	3,79	—	—

^a Desvio padrão relativo

^b n = 5

4.1.8 Repetibilidade e estabilidade

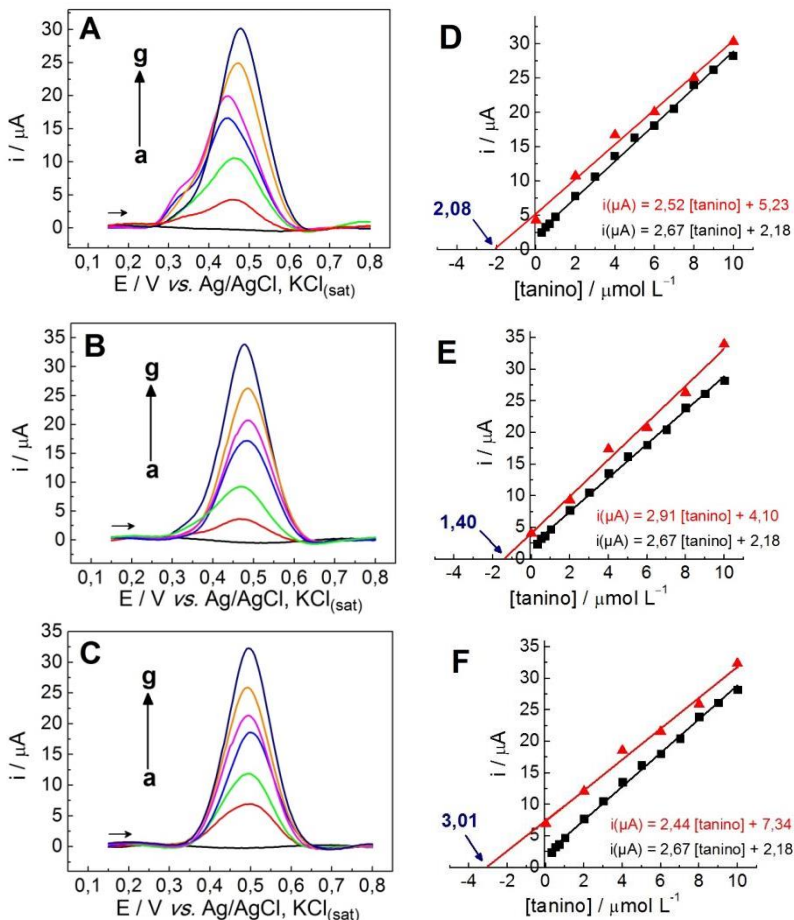
A repetibilidade da resposta de corrente resultante obtida com o AuNPs-CMC/GCE foi estimada em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) contendo catequina na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, usando as condições otimizadas. O desvio padrão relativo (DPR) dos valores de corrente resultante de medidas realizadas no mesmo dia, com o mesmo filme (repetibilidade intradia) foi de 2,4% ($n = 5$), o que significa uma boa precisão entre as respostas obtidas com o sensor. A repetibilidade interdia da resposta do sensor foi avaliada através de cinco medidas em dias consecutivos, sendo renovado o filme a cada dia. Utilizaram-se as mesmas condições experimentais anteriores e um DPR de 3,8% foi obtido ($n = 5$). A dispersão de AuNPs-CMC foi mantida sob refrigeração ($\sim 5 \text{ }^\circ\text{C}$) por cerca de 4 meses. Durante esse período, novos filmes foram preparados com a mesma dispersão. O DPR da resposta analítica (corrente resultante) para a catequina $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando diferentes filmes foi menor que 7,0%, indicando a boa repetibilidade do

filme de AuNPs-CMC. Assim, é possível afirmar que o sensor AuNPs-CMC/GCE tem grande potencial para ser aplicado na quantificação de catequina com excelentes valores de repetibilidade. A aplicação analítica do sensor foi efetuada e os resultados obtidos são apresentados no tópico a seguir.

4.1.9 Aplicação analítica do AuNPs-CMC/GCE

Com o objetivo de testar a aplicabilidade do método proposto, utilizou-se o sensor AuNPs-CMC/GCE para quantificar taninos condensados em três diferentes amostras de extratos de plantas. As soluções das amostras foram preparadas conforme descrito na Seção 3.1 e diluídas para concentrações compatíveis com a faixa de trabalho da curva de calibração. As Figura 36 A, B e C mostram os voltamogramas de onda quadrada para as amostras A, B e C, respectivamente. As curvas (a) representam a resposta do eletrólito suporte, as curvas (b) são as respostas das amostras de taninos e as demais curvas (c-g) representam sucessivas adições de solução padrão de catequina. Os voltamogramas das três amostras exibem um pico bem definido em aproximadamente +0,48 V, o qual aumenta linearmente com o aumento da concentração de catequina. As Figura 36 D, E e F mostram a curva de calibração da catequina (em preto) e as curvas de adição de padrão (em vermelho) para cada amostra. As equações de regressão linear para as curvas de adição de padrão foram: amostra A ($i = 2,52[\text{tanino}] + 5,23$); amostra B ($i = 2,91[\text{tanino}] + 4,09$) e amostra C ($i = 2,44[\text{tanino}] + 7,34$), onde i é a corrente de pico (μA) e $[\text{tanino}]$ é a concentração de taninos ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Pode ser observado que para as três amostras o coeficiente angular da curva de adição de padrão é muito semelhante ao coeficiente angular da curva de calibração, indicando que nesses casos não houve efeito de matriz na determinação dos taninos nas amostras complexas.

Figura 36. (A, B e C) Voltamogramas de onda quadrada para as amostras A, B e C, respectivamente, sendo (a) brancos, (b) amostras e (c-g) sucessivas adições de solução padrão de catequina. (D, E e F) curvas de calibração (em preto) e curvas de adição de padrão (em vermelho) para as três amostras.



Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a concentração de taninos condensados encontrada em cada amostra está apresentada na Tabela 4, bem como os valores obtidos utilizando o método comparativo de Folin-Ciocalteu. Os valores obtidos pelas duas metodologias são bastante próximos, revelando a exatidão dos resultados obtidos usando o sensor AuNPs-CMC/GCE.

Tabela 4. Determinação de taninos em extratos de plantas.

Amostra	Taninos ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		ER (%) ^b
	Método proposto ^a	Método comparativo ^a	
A	2,12 \pm 0,05	2,20 \pm 0,04	-3,63
B	1,36 \pm 0,09	1,44 \pm 0,07	-5,55
C	2,97 \pm 0,08	2,86 \pm 0,08	3,84

^a n = 3.

^b Erro relativo = [(método proposto - método comparativo)/método comparativo] \times 100.

A precisão dos dados obtidos foi avaliada aplicando o teste F. Para as três amostras, o valor de F obtido para a determinação dos taninos condensados usando os dois métodos foi menor que o valor de F teórico (19,0) para o nível de confiança de 95%, indicando que não há diferença significativa entre a precisão dos dados obtidos pelos dois métodos.

A exatidão das respostas fornecidas pelo sensor AuNPs-CMC/GCE para a determinação de taninos condensados foi avaliada de duas maneiras: através de experimentos de adição e recuperação e também por comparação dos dados obtidos com os fornecidos pelo método comparativo. As recuperações de adições de solução estoque de catequina variaram no intervalo de 97,8 a 113,8% para a amostra A, entre 90,0 e 114,3% para a amostra B e entre 95,1 e 115,0% para a amostra C (conforme pode ser observado na Tabela 5). Esses resultados indicam que o sensor proposto é adequado para tais aplicações. As concentrações de taninos obtidas foram também comparadas com os valores fornecidos pelo método de Folin-Ciocalteu. O teste t pareado foi aplicado para essa finalidade. O valor de t calculado (3,86) foi menor que o valor de t teórico (4,30) para o nível de confiança de 95%, indicando que não há diferença significativa entre os dados obtidos pelos métodos eletroquímico e colorimétrico.

Tabela 5. Recuperação de catequina em amostras de taninos usando o eletrodo proposto.

Amostra	Catequina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		% Recuperação ^a
	Adicionada	Recuperada	
A	2,00	2,17	108,5
	4,00	4,55	113,8
	6,00	5,87	97,8
	8,00	7,85	98,1
	10,00	9,94	99,4
B	2,0	1,80	90,0
	4,0	4,57	114,3
	6,0	5,75	95,8
	8,0	7,63	95,4
	10,0	10,26	102,6
C	2,0	1,96	98,0
	4,0	4,60	115,0
	6,0	5,83	97,2
	8,0	7,61	95,1
	10,0	10,26	102,6

^aRecuperação = (valor recuperado/valor adicionado) \times 100.

Após investigar a aplicação e comprovar o ótimo desempenho do AuNPs-CMC/GCE para a quantificação de taninos condensados nas amostras dos extratos vegetais, o mesmo não foi testado em amostras com outros compostos que poderiam interferir nos resultados obtidos, ou ainda numa mistura de taninos condensados e hidrolisáveis. Por outro lado, para estudar a detecção eletroanalítica de taninos hidrolisáveis optou-se por preparar um segundo EQM, o qual foi empregado somente na determinação de ácido tânico em amostras de cervejas. A sua preparação, caracterização e aplicação estão descritos nos subitens a seguir.

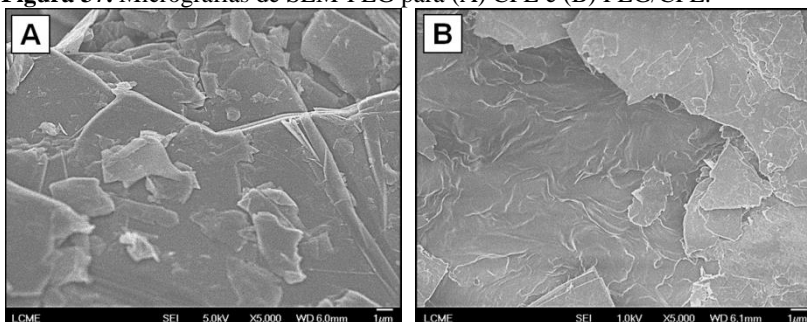
4.2 Estudos com taninos hidrolisáveis

Nesta parte do trabalho, o objetivo foi estudar a contribuição do polímero PEG na modificação de um eletrodo de pasta de carbono. Foi avaliada a sensibilidade do sensor modificado, quando aplicado para a determinação do ácido tânico, que foi utilizado como composto modelo para taninos hidrolisáveis. Como descrito anteriormente, o polímero PEG apresenta forte interação com moléculas de taninos, e assim o objetivo foi promover maior interação das moléculas de ácido tânico com a superfície do eletrodo sólido, resultando no aumento da intensidade do sinal analítico obtido.

4.2.1 Caracterização morfológica e eletroquímica dos eletrodos

As morfologias do CPE e do PEG/CPE foram estudadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com emissão em campo (SEM-FEG). A Figura 37 mostra as micrografias da superfície sem modificação (imagem A) e com 10% (m/m) de PEG (imagem B). Observa-se que o CPE sem modificação exibe as folhas de grafite dispersas de maneira irregular. O tamanho médio das folhas de grafite foi estimado na escala de micrômetros. Na imagem B, as folhas de grafite apareceram completamente envolvidas pelo PEG, indicando a presença do polímero modificador entre as camadas grafíticas em toda a extensão da amostra. Nesse caso, presume-se que o PEG pode desempenhar o papel de facilitador na transferência de elétrons entre as camadas de grafite e assim melhorar a transferência eletrônica sobre o dispositivo.

Figura 37. Micrografias de SEM-FEG para (A) CPE e (B) PEG/CPE.



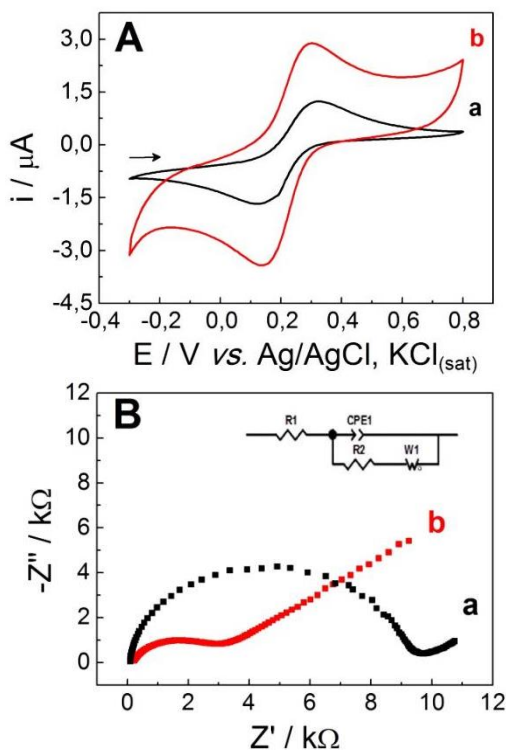
A caracterização eletroquímica da superfície do PEG/CPE foi realizada utilizando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A Figura 38A mostra os voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre a superfície do CPE (curva a) e do PEG/CPE (curva b), ambas as medidas foram realizadas em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de variação de potencial de 50 mV s^{-1} . Sobre os dois eletrodos, observa-se um par redox bem definido, com potenciais de oxidação e de redução em aproximadamente $0,32$ e $0,13 \text{ V}$, respectivamente. Como pode ser observado claramente nos voltamogramas, quando o PEG é adicionado à matriz de grafite, há um aumento considerável nas correntes de pico para o par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Há também um aumento na corrente capacitiva e na largura dos picos em comparação com o eletrodo sem modificação. Tais mudanças na resposta voltamétrica obtida sobre o eletrodo modificado foram atribuídas à maior capacidade de adsorção dos íons $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ sobre o eletrodo e a maior facilidade de transferência de elétrons entre as camadas do grafite, ambas as propriedades proporcionadas pela presença do polímero.

Os eletrodos também foram submetidos a medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) em frequências entre $0,1 \text{ Hz}$ e 50 kHz em potencial de circuito aberto, para avaliar a resistência a transferência de carga interfacial (R_{tc}). Os diagramas de Nyquist para os dois eletrodos são apresentadas na Figura 38B. A análise das curvas revelou uma diferença significativa na R_{tc} apresentada pelos dois eletrodos. Os dados das curvas foram analisados segundo o circuito equivalente de Randles (inserido na Figura 38B) onde R_2 e $CPE1$ são a impedância da transferência de carga faradaica na interface eletrodo-solução (R_{tc}) e a capacitância paralela da dupla camada elétrica, respectivamente. R_1 é a resistência ôhmica da solução

do eletrólito, ao passo que a região linear corresponde à impedância de Warburg (W1) na região de baixa frequência (AL-ZAHRANI et al., 2016).

O semicírculo claramente menor para o PEG/CPE em frequências mais altas indica a redução significativa no valor de R_{tc} do CPE após a inserção de PEG na matriz. Os valores de R_{tc} calculados para CPE e PEG/CPE foram 9,50 e 2,95 $k\Omega$, respectivamente. Pode-se antecipar que o PEG atua como facilitador na transferência de elétrons entre as camadas de grafite. Além disso, a redução considerável no valor de R_{tc} também explica a incorporação bem sucedida de PEG na matriz grafítica, corroborando com as imagens de microscopia.

Figura 38. (A) Voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$ sobre (a) CPE e (b) PEG/CPE em KCl 0,5 mol L^{-1} , $v = 50$ mV s^{-1} . (B) Diagramas de Nyquist para (a) CPE e (b) PEG/CPE.



A área eletroativa dos eletrodos de pasta de carbono foi estimada com o objetivo de avaliar a contribuição da modificação com o PEG sobre área superficial final do eletrodo. Utilizou-se a técnica de voltametria cíclica e uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas do $K_3Fe(CN)_6$ obtidos em diferentes velocidades de varredura sobre o PEG/CPE e o CPE são mostrados na Figura 39A e Figura 40A, respectivamente. De acordo com a equação de Randles-Sevcik (Equação 2, página 74), as áreas eletroativas foram calculadas a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de i versus $v^{1/2}$ (Figura 39B e Figura 40B).

Figura 39. (A) Voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) sobre PEG/CPE, (a - g) = $v = 10$ a 300 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de i vs. $v^{1/2}$.

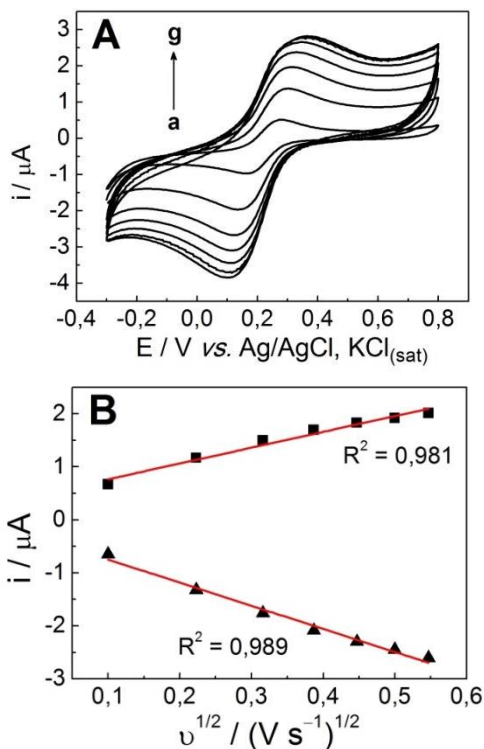
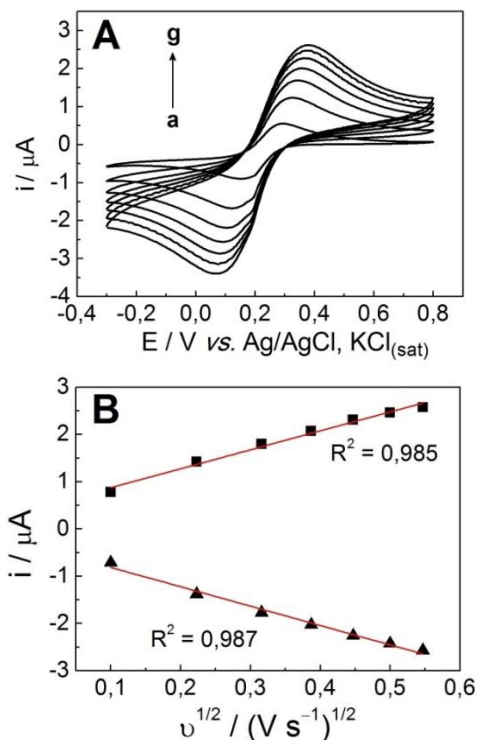


Figura 40. (A) Voltamogramas cíclicos para $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) sobre CPE, (a - g) = $\nu = 10$ a 300 mV s^{-1} ; (B) Gráfico de i vs. $\nu^{1/2}$.



Os valores obtidos para as áreas eletroativas foram de $0,0054$ e $0,0048 \text{ cm}^2$, para o CPE e o PEG/CPE, respectivamente. Estes valores demonstram que a modificação com PEG não promove alteração significativa na área eletroativa do eletrodo.

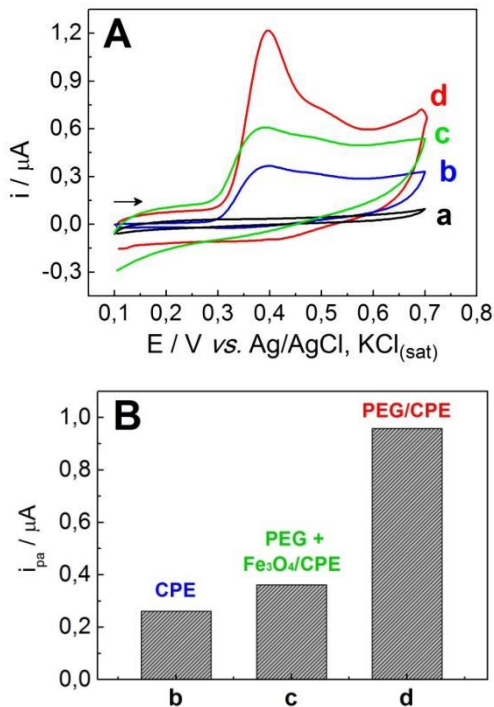
4.2.2 Comportamento eletroquímico do ácido tânico sobre diferentes eletrodos

A resposta eletroquímica do ácido tânico foi inicialmente estudada em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). Os voltamogramas cíclicos para o ácido tânico sobre diferentes eletrodos são apresentados na Figura 41A. O potencial foi aplicado de $0,1$ a $0,7 \text{ V}$,

retornando em seguida para 0,1 V. Como pode ser observado, nenhum processo redox é observado na ausência de ácido tânico (curva a). Sobre o CPE (curva b), o ácido tânico exibiu, na varredura direta, um sinal de oxidação próximo de 0,4 V com intensidade de corrente de 0,26 μA . No entanto, sobre o PEG/CPE, a corrente de pico de oxidação apresentou um aumento significativo de 3,5 vezes (0,96 μA). Na varredura reversa, não houve sinal de redução para ambos os eletrodos, indicando que a reação do ácido tânico é um processo irreversível nessas condições, o que é consistente com dados já publicados na literatura. O aumento de corrente para a oxidação do ácido tânico no PEG-CPE é atribuído à boa capacidade de adsorção exibida pelo PEG, que proporciona que mais moléculas de ácido tânico sejam adsorvidas na superfície do eletrodo e dessa forma ocorra um aumento na corrente de oxidação. O mecanismo redox do ácido tânico foi descrito por alguns autores e consiste na oxidação irreversível de um ou mais grupos $-\text{OH}$ presentes na sua estrutura (WAN et al., 2007; VU et al., 2013; VU et al., 2015).

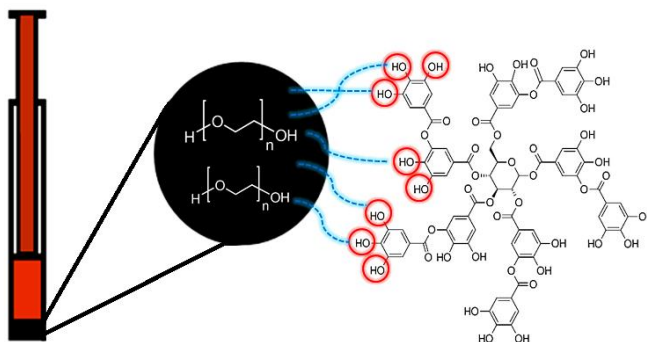
Além disso, foi preparado também um eletrodo de pasta de carbono modificado com a mesma proporção de PEG juntamente com nanopartículas de Fe_3O_4 . A resposta para o ácido tânico sobre esse eletrodo está apresentada na curva c, na qual se observa um pequeno aumento na corrente de oxidação em relação ao eletrodo sem modificação. Aumento este muito aquém do obtido com o eletrodo contendo somente PEG, o que não justifica a utilização das nanopartículas de Fe_3O_4 neste trabalho. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do Fe_3O_4 ser um material com condutividade elétrica mais baixa ($10^2 - 10^3 \text{ S cm}^{-1}$) quando comparado ao grafite ($10^4 - 10^5 \text{ S cm}^{-1}$), dificultando nesse caso, a transferência eletrônica sobre a superfície do eletrodo (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003; PAVOSKI, 2014).

Figura 41. (A) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre diferentes eletrodos: (a) branco, (b) CPE, (c) PEG- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CPE}$ e (d) PEG/CPE, em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Respostas de corrente anódica do ácido tânico para cada um dos eletrodos.



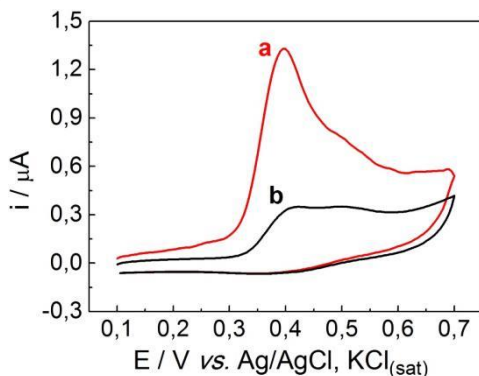
A Figura 42 ilustra a interação das moléculas de ácido tânico com a superfície do PEG/CPE, destacando as ligações de hidrogênio entre os grupamentos $-\text{OH}$ do tanino e as moléculas de PEG, presentes na composição do eletrodo. Essa forte interação, como descrito anteriormente, é responsável pelo considerável aumento do sinal analítico, justificando assim o uso desse polímero como agente modificador durante a preparação da pasta de carbono.

Figura 42. Representação esquemática da interação do ácido tânico com a superfície do PEG/CPE.



Ao realizar ciclos voltamétricos sucessivos sobre o PEG/CPE, observou-se que as correntes anódicas para uma mesma concentração de ácido tânico diminuem significativamente com o aumento do número de ciclos, conforme mostrado na Figura 43, a qual apresenta os voltamogramas de dois ciclos seguidos. Essa supressão do sinal analítico ocorre porque o produto da oxidação formado na varredura direta bloqueia parte da superfície do eletrodo, impedindo dessa forma que, no ciclo seguinte, as moléculas de ácido tânico que se encontram em solução consigam adsorver na superfície do eletrodo para sofrer a transferência eletrônica. Comportamento semelhante já foi apontado por outros autores que também estudaram a oxidação do ácido tânico (XU, 2009). Dessa forma, apenas o primeiro ciclo voltamétrico foi utilizado em todos os estudos seguintes.

Figura 43. Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o PEG/CPE em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, sendo (a) 1º ciclo e (b) 2º ciclo.



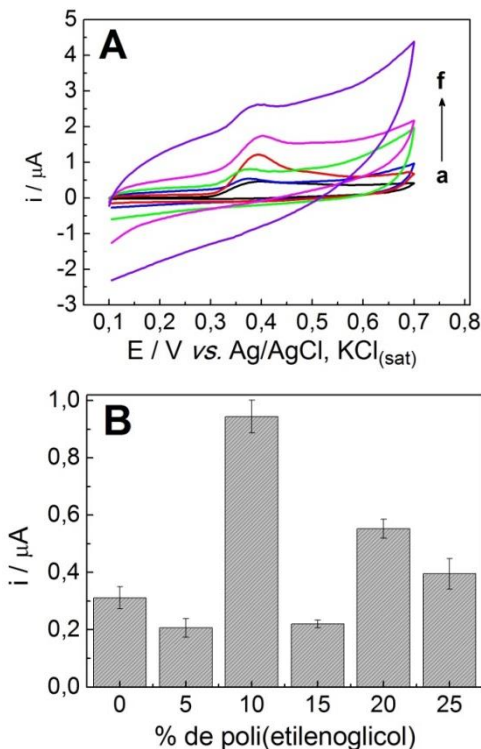
4.2.3 Otimização dos parâmetros experimentais

A seguir serão descritos detalhadamente todos os parâmetros experimentais que foram otimizados para o desenvolvimento de uma metodologia para aplicação do PEG/CPE na determinação eletroanalítica de ácido tânico.

4.2.3.1 Proporção de PEG

Para avaliar o efeito da quantidade de polímero modificador na resposta eletroquímica do ácido tânico, foram preparados eletrodos de pasta de carbono com diferentes percentagens de PEG, a saber: 5, 10, 15, 20 e 25% (m/m). O estudo foi realizado em triplicata utilizando voltametria cíclica e as curvas obtidas para uma replicata estão apresentadas na Figura 44A. O gráfico da Figura 44B mostra mais claramente os valores médios de corrente de oxidação para o ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre os eletrodos com diferentes percentagens de PEG. A partir dos resultados, observou-se que o melhor perfil voltamétrico associado à maior corrente de pico anódico é obtido utilizando o CPE modificado com 10% de PEG. Acima dessas percentagens, a corrente capacitiva aumenta significativamente, o que é atribuído à baixa condutividade do polímero. Assim, o CPE com 10% de PEG foi selecionado para a otimização da metodologia analítica.

Figura 44. (A) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sobre o CPE modificado com diferentes proporções de PEG: (a, b, c, d, e, f) = 0, 5, 10, 15, 20, 25% de PEG, respectivamente. (B) Resposta de corrente anódica para o ácido tânico em função da quantidade de PEG, $n = 3$.



4.2.3.2 Natureza e pH do eletrólito suporte

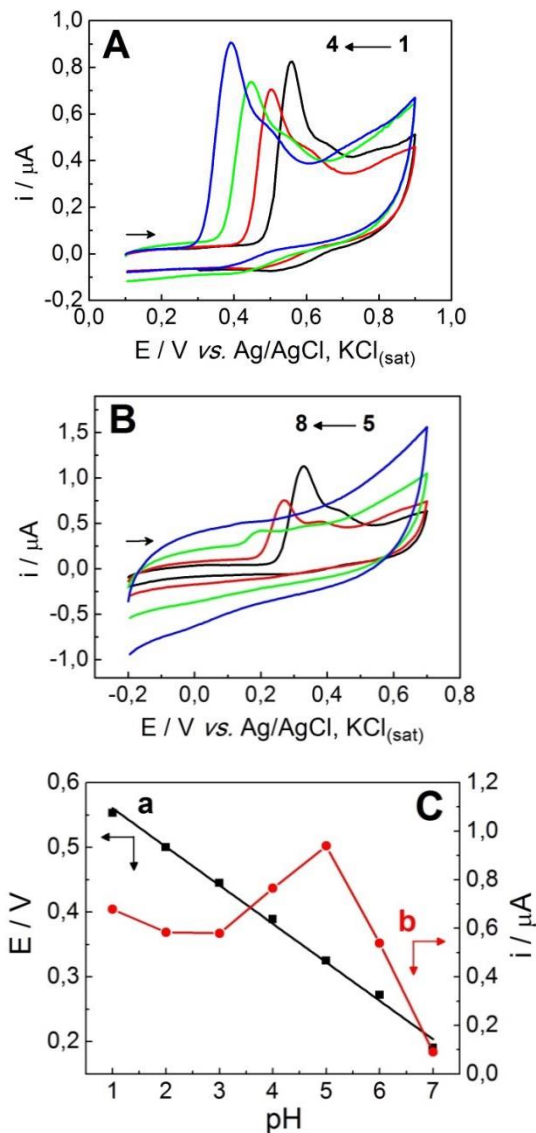
A escolha do eletrólito suporte e do pH são fatores importantes nas análises eletroanalíticas, visto que o comportamento eletroquímico das moléculas estudadas pode ser influenciado pelas demais espécies do meio em que se encontra (AGOSTINHO et al., 2004). Dessa forma, inicialmente foi investigada a influência do pH do eletrólito sobre a resposta do ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para isso, foi utilizada solução tampão B-R com valores de pH ajustados com soluções de HCl ou NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) em valores de 1,0 a 12,0. A Figura 45 mostra nos gráfico A e B os voltamogramas cíclicos para o ácido tânico $10,0 \mu\text{mol}$

L^{-1} sobre o PEG/CPE em solução tampão B-R com diferentes valores de pH. As medidas foram realizadas no intervalo de potencial de 0,1 a 0,9 V, para pH de 1,0 a 4,0 e -0,2 a 0,7 V, para pH de 5,0 a 8,0. Em valores de pH superiores a 8,0 nenhum sinal redox foi observado e por isso optou-se por não apresentar as curvas obtidas.

A Figura 45C apresenta os valores de potencial de pico de oxidação e de corrente de pico anódico em função do pH do eletrólito suporte. Nota-se que o potencial de pico de oxidação (E_{po}) desloca-se com o aumento do pH da solução para valores menos positivos (Figura 45C, curva a). O valor do coeficiente angular da reta obtida ($-59,4 \text{ mV pH}^{-1}$) é muito próximo ao valor característico para processos que envolvem o mesmo número de prótons e elétrons, o qual é dito como $-59,2 \text{ mV pH}^{-1}$ (BARD; FAULKNER, 2001).

O pH do eletrólito também exerce forte influência sobre a corrente de pico anódico (i_{pa}) do ácido tânico, como pode ser observado na curva b da Figura 45C. Observa-se um comportamento crescente dos valores de i_{pa} do pH 2,0 até pH 5,0 e em meios com pH acima de 5,0 ocorre um decréscimo considerável nas respostas de corrente. Sendo assim, por apresentar os maiores valores de i_{pa} aliados a voltamogramas com boa definição, os valores de pH 4,0 e 5,0 foram escolhidos para serem utilizados no estudo seguinte.

Figura 45. Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o PEG/CPE em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (A) pH 1,0 a 4,0; (B) pH 5,0 a 8,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (C) Respostas de potencial (a) e de corrente (b) de pico de oxidação em função do pH do eletrólito suporte.



Em seguida, a influência da composição do eletrólito suporte sobre a resposta eletroquímica do ácido tânico também foi estudada. Para isso utilizou-se três soluções diferentes: tampão B-R ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$), tampão acetato ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) e tampão McIlvaine ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), ambas na concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e com pH ajustado com HCl ou NaOH para os valores de 4,0 e 5,0.

A Figura 46 exhibe os voltamogramas obtidos utilizando as diferentes soluções tampão. As informações de corrente e de potencial de pico obtidas a partir de cada uma das curvas foram resumidas na Tabela 6. Nota-se que os valores de potencial de pico não sofrem grande variação em função da natureza do eletrólito. Os valores de corrente de pico, por sua vez, são afetados mais intensamente. Os resultados obtidos sugerem que dentre os eletrólitos estudados, o mais indicado é a solução tampão B-R em pH 5,0, por proporcionar um maior valor de corrente referente a oxidação do ácido tânico ($0,940 \mu\text{A}$) quando comparado às demais soluções testadas. Dessa forma, nos estudos a seguir o eletrólito usado foi sempre solução tampão B-R em pH 5,0.

Figura 46. Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o PEG/CPE em diferentes soluções tampão $0,2 \text{ mol L}^{-1}$: (a) B-R, (b) acetato e (c) McIlvaine ajustados em (A) pH 4,0; (B) pH 5,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

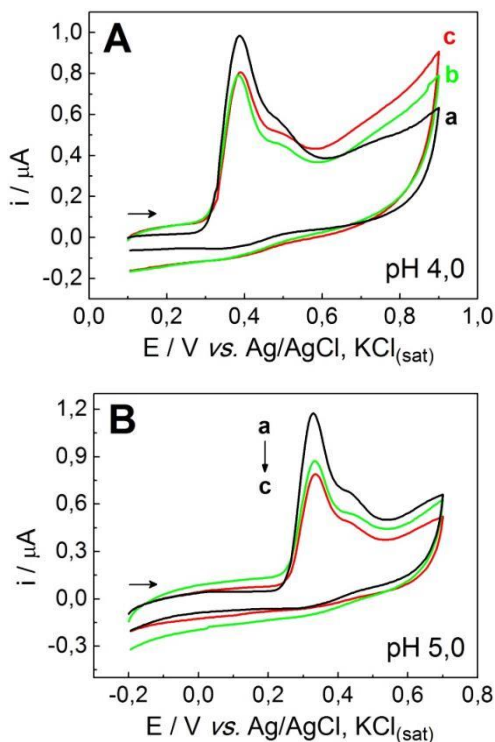


Tabela 6. Valores de corrente de pico anódico (i_{pa}) e de potencial de pico de oxidação (E_{po}) em diferentes eletrólitos suporte.

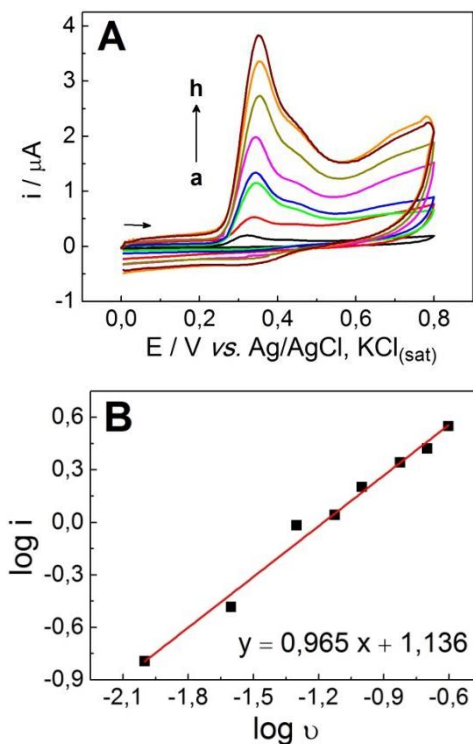
pH	Eletrólito suporte	$i_{\text{pa}} / \mu\text{A}$	$E_{\text{po}} / \text{mV}$
4,0	a) B-R	0,718	0,385
	b) Acetato	0,563	0,390
	c) Mc-Ilvaine	0,513	0,390
5,0	a) B-R	0,940	0,325
	b) Acetato	0,606	0,332
	c) Mc-Ilvaine	0,626	0,334

4.2.3.3 *Influência da velocidade de varredura*

O comportamento eletroquímico do ácido tânico sobre o PEG/CPE foi investigado por voltametria cíclica em solução tampão B-R (pH 5,0) em velocidades de varredura de 10 a 250 mV s^{-1} . A Figura 47A exibe os voltamogramas obtidos no intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 V.

Em todas as análises obtiveram-se voltamogramas cíclicos com apenas um sinal de oxidação, indicando que a oxidação do ácido tânico é um processo irreversível em todas as velocidades de varredura estudadas. Além disso, observa-se que os valores de corrente de pico aumentam à medida que ocorre um acréscimo na velocidade de varredura, e nota-se também um leve deslocamento do potencial de pico de oxidação para valores mais positivos, o que é um comportamento típico de processos irreversíveis. No gráfico da Figura 47B obteve-se a relação logarítmica de i e v , sendo que a equação de regressão linear da reta ($\log i = 0,965 \log v + 1,136$) indica que a oxidação do ácido tânico é um processo cuja etapa determinante da velocidade é a adsorção. Isso significa que a etapa mais lenta de todo o processo de oxidação é a adsorção das moléculas de ácido tânico sobre a superfície do PEG/CPE. Isto está de acordo com dados relatados na literatura para a determinação analítica de ácido tânico usando outros eletrodos modificados (WAN et al., 2007; VU et al., 2013; VU et al., 2015).

Figura 47. (A) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) (a - h) = $10 - 250 \text{ mV s}^{-1}$; (B) $\log i$ vs. $\log v$.



Após observar que a velocidade da reação de oxidação é determinada pela etapa de adsorção das moléculas no eletrodo, foi estudada uma etapa de pré-concentração, a qual é descrita com maiores detalhes no item a seguir.

4.2.3.4 Efeito da etapa de pré-concentração

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do PEG/CPE para a detecção do ácido tânico, avaliou-se a possibilidade de aplicar uma etapa de pré-concentração precedente à medida eletroquímica. Nesta etapa, o eletrodo é deixado imerso por determinado tempo na solução da célula eletroquímica que contém o eletrólito suporte e o ácido tânico. Ao

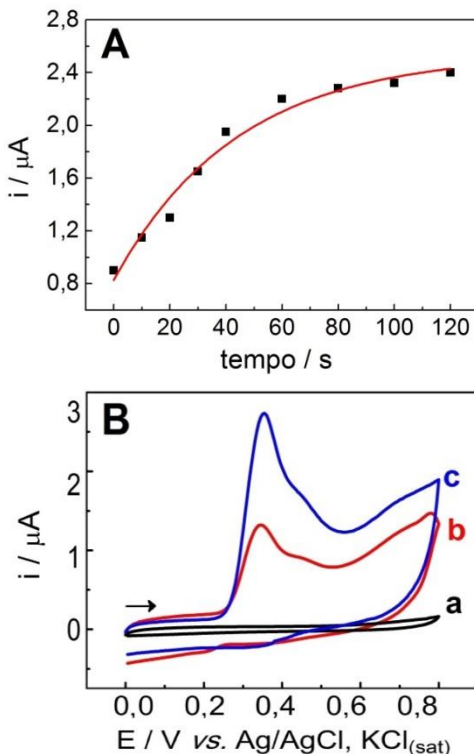
longo desse tempo, uma quantidade maior de moléculas de ácido tânico adsorve na superfície do PEG/CPE e por isso ocorre aumento na resposta analítica e consequente melhoria na sensibilidade do detector.

A Figura 48A mostra as respostas de corrente de pico de oxidação quando o eletrodo é submetido a diferentes tempos de pré-concentração ($t_{pc} = 10-120$ s). Observa-se uma variação crescente nos valores de corrente em função do tempo até aproximadamente 60 s. Para tempos maiores que 60 s o aumento na resposta não é grande o suficiente para justificar o maior tempo de espera durante essa etapa.

Na Figura 48B são apresentados os voltamogramas cíclicos para o ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) sendo que a curva b foi obtida sem pré-concentração e a curva c, após 60 s de pré-concentração. Nota-se um aumento grande no sinal analítico (aproximadamente 2,4 vezes) o que justifica o emprego dessa etapa antecedente às medidas eletroquímicas.

Avaliou-se ainda a aplicação de diferentes valores de potencial durante a etapa de pré-concentração. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, pois os valores de corrente foram sempre menores que os obtidos sem a aplicação de potencial (dados não mostrados). Dessa forma, a etapa de pré-concentração consistiu apenas em manter o eletrodo imerso na célula eletroquímica por 60 s, sem aplicação de potencial elétrico. Essa etapa foi empregada anterior a todas as medidas subsequentes.

Figura 48. Respostas de corrente de pico anódico em função do tempo de pré-concentração; (B) Voltamogramas cíclicos para ácido tânico $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) (a) branco, (b) sem pré-concentração e (c) com 60 s de pré-concentração.



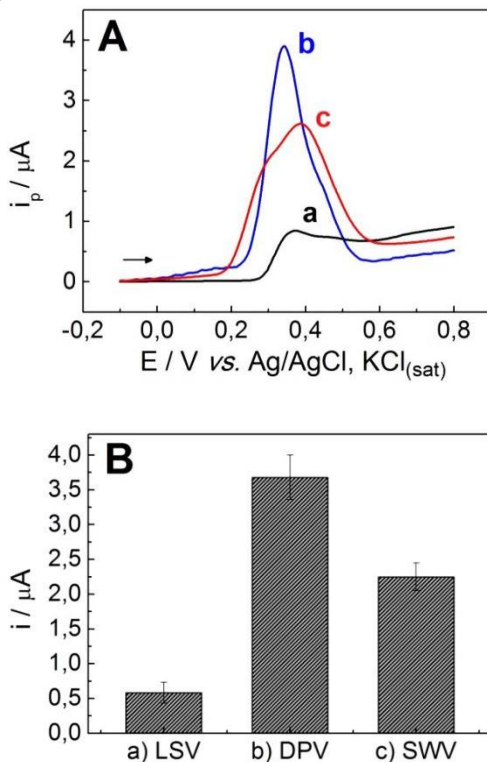
4.2.4 Escolha e otimização dos parâmetros da técnica eletroanalítica

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia sensível para a detecção de ácido tânico, foram investigadas diferentes técnicas eletroanalíticas: voltmetria de varredura linear (LSV), voltmetria de onda quadrada (SWV) e voltmetria de pulso diferencial (DPV). Foi avaliada a resposta de corrente obtida para a concentração de ácido tânico de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R (pH 5,0).

A Figura 49A apresenta os voltamogramas obtidos com as três técnicas para uma das replicatas, sendo que em ambas as técnicas foi usada a mesma velocidade de varredura (100 mV s^{-1}). Observa-se

claramente que a curva que apresenta um sinal analítico mais intenso é a obtida por voltametria de pulso diferencial (curva b). Na Figura 49B podem ser observados os valores médios de corrente de pico para cada uma das técnicas.

Figura 49. Voltamogramas (a) linear, (b) de pulso diferencial e (c) de onda quadrada para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$; (B) Respostas de corrente anódica para o ácido tânico usando diferentes técnicas eletroanalíticas, $n = 3$.

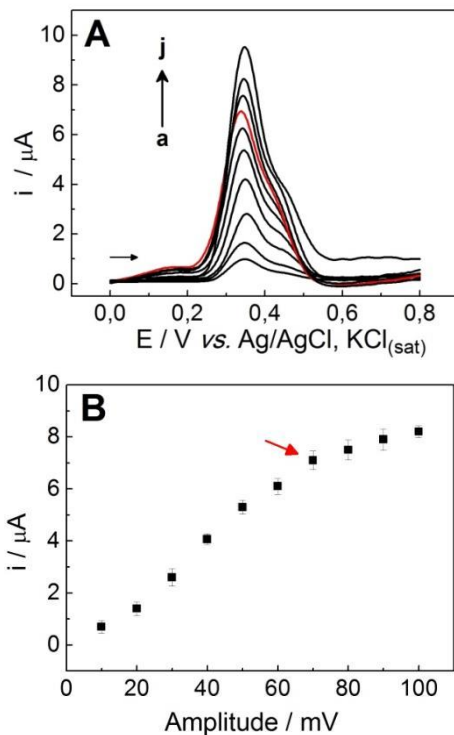


Portanto, em busca de propor uma metodologia com maior sensibilidade analítica, optou-se por utilizar a técnica de DPV para os estudos de quantificação do ácido tânico, os quais são descritos mais detalhadamente nos próximos itens. Assim, fez-se necessário a otimização dos parâmetros utilizados na DPV, são eles: amplitude dos pulsos de potencial (E_{pulso}), velocidade de variação de potencial (ν) e

tempo de duração do pulso (t_{pulso}). A otimização desses parâmetros garante uma melhor resposta de intensidade de corrente, assim como um melhor perfil voltamétrico. Estas características podem resultar numa metodologia com maior sensibilidade e seletividade.

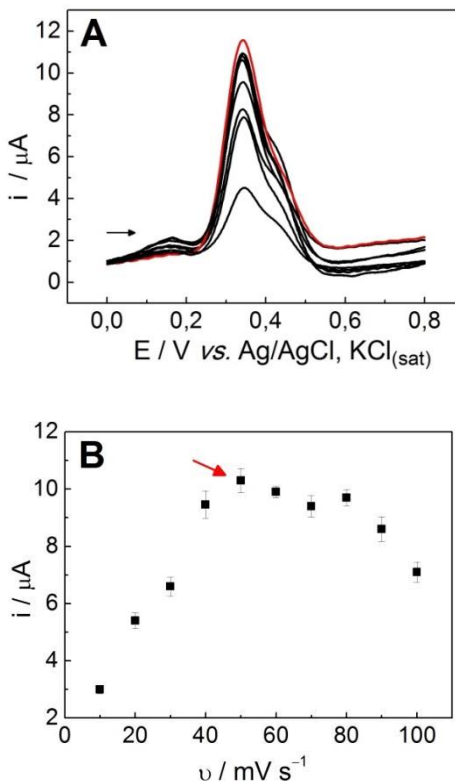
As intensidades das correntes de pico são dependentes da amplitude de pulso e do tempo em que o pulso é aplicado. Um aumento na amplitude pode acarretar tanto o aumento da corrente de pico como também um alargamento deste, o que é indesejável. Assim, deve haver um compromisso entre a intensidade de corrente e o perfil voltamétrico do pico (THOMAS e HENZE, 2001). A Figura 50A mostra os voltamogramas de DPV obtidos empregando diferentes valores de amplitude de pulso, mantendo fixos a velocidade ($v = 30 \text{ mV s}^{-1}$) e o tempo de pulso ($t_{\text{pulso}} = 2 \text{ ms}$). Observa-se um aumento gradativo nos valores de corrente de pico em função do aumento da amplitude, conforme indicado na Figura 50B. Por fim, optou-se por usar para a amplitude o valor de 70 mV, pois este proporciona uma boa intensidade de corrente aliado a um perfil voltamétrico satisfatório.

Figura 50. (A) Voltamogramas de pulso diferencial para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), (a - j) = $E_{\text{pulso}} = 10,0 - 100,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 2,0 \text{ ms}$, $v = 30,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$; (B) Gráfico de i vs. E_{pulso} , $n = 3$.



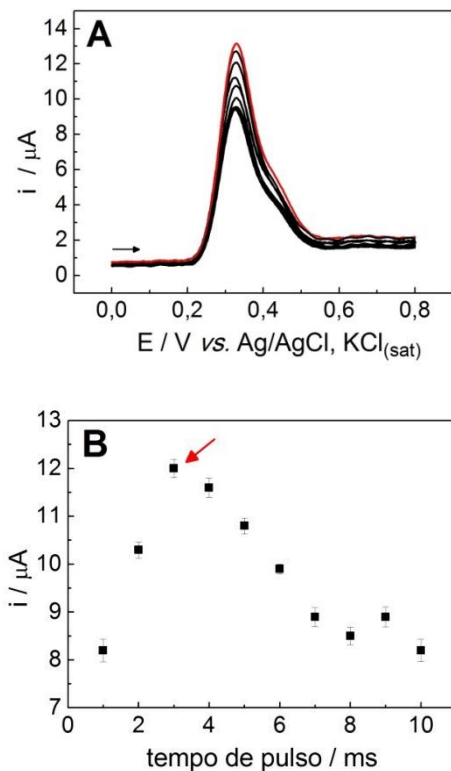
A velocidade de variação do potencial também é um parâmetro importante que afeta a resposta eletroquímica. Na DPV esse parâmetro normalmente assume valores baixos, se comparada a CV e a SWV, pois é necessário que a rampa de potencial sofra variações drásticas durante o tempo de aplicação do pulso (WANG, 1985). Sendo assim, variou-se a velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} , mantendo fixos os demais parâmetros ($E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$ e $t_{\text{pulso}} = 2,0 \text{ ms}$). Os voltamogramas resultantes de uma replicata são apresentados na Figura 51A e os valores médios de corrente de pico em função da velocidade são mostrados na Figura 51B. Nota-se que o sinal mais intenso foi obtido empregando a velocidade de variação de potencial de $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ e este, portanto, foi o valor selecionado.

Figura 51. (A) Voltamogramas de pulso diferencial para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $\nu = 10,0 - 100,0 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 2,0 \text{ ms}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$; (B) Gráfico de i vs. ν , $n = 3$.



A Figura 52 apresenta os resultados para o estudo do tempo de duração do pulso, em que foi mantido $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$ e $\nu = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$. Selecionou-se o tempo de 3,0 ms para os estudos posteriores, por este ter proporcionado a melhor resposta de corrente e também um ótimo perfil voltamétrico.

Figura 52. (A) Voltamogramas de pulso diferencial para ácido tânico $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), $t_{\text{pulso}} = 1,0 - 10,0 \text{ ms}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$; (B) Gráfico de i vs. t_{pulso} , $n = 3$.



Dessa forma, após otimizar os três parâmetros da técnica eletroanalítica, foi investigada a performance analítica do PEG/CPE para diferentes concentrações de ácido tânico. Tal estudo é descrito no tópico a seguir.

4.2.5 Curva de calibração e características analíticas

Empregando as condições otimizadas já descritas, a curva de calibração para o ácido tânico foi construída utilizando a técnica de DPV. Os parâmetros da DPV foram os seguintes: $E_{\text{inicial}} = 0,0 \text{ V}$; $E_{\text{final}} = 0,8$; amplitude de pulso = $0,07 \text{ V}$; tempo de pulso = $3,0 \text{ ms}$; velocidade

de varredura = 50,0 mV s⁻¹; t_{pc} = 60 s. A Figura 53A exibe os voltamogramas de uma replicata para diferentes concentrações de ácido tânico, nos quais é possível observar um sinal intenso em 0,34 V. As correntes de pico para a oxidação do ácido tânico sobre o PEG/CPE foram lineares em função da concentração de 0,08 a 2,1 μmol L⁻¹ (Figura 53B) com a equação de regressão linear dada por: $i (\mu\text{A}) = 11,40 [\text{AT}] + 1,04$ ($R^2 = 0,996$) onde i é a corrente de pico resultante em μA e [AT] é a concentração de ácido tânico em μmol L⁻¹.

O desvio padrão do coeficiente linear (Sb) e a inclinação (B) da curva de calibração foram 0,251 μA e 11,40 μA L μmol⁻¹, respectivamente. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações: LD = 3,3 Sb/B e LQ = 10 Sb/B. Os valores de LD e LQ obtidos a partir dos dados da curva de calibração foram 72,65 nmol L⁻¹ e 220,17 nmol L⁻¹, respectivamente.

Para fins de comparação, uma curva de calibração também foi construída usando um CPE não modificado e empregando as mesmas condições experimentais (Figura 54). Neste caso, a equação de regressão linear obtida foi: $i (\mu\text{A}) = 6,68 [\text{AT}] + 0,09$. Os valores LD e LQ obtidos foram 161,0 e 488,0 nmol L⁻¹, respectivamente. Estes resultados indicam que o PEG melhorou o desempenho do eletrodo, tornando o detector mais sensível e, portanto, mais adequado para a determinação de ácido tânico.

Figura 53. Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de ácido tânico sobre o PEG/CPE: (a) branco, (b) 0,08, (c) 0,1, (d) 0,3, (e) 0,5, (f) 0,7, (g) 0,9, (h) 1,1, (i) 1,3, (j) 1,5, (k) 1,7, (l) 1,9 e (m) 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,2 mol L^{-1} (pH 5,0); $E_{\text{pulso}} = 70,0$ mV, $t_{\text{pulso}} = 3,0$ ms, $\nu = 50,0$ mV s^{-1} , $t_{\text{pc}} = 60$ s; (B) Curva de calibração para o ácido tânico ($n = 5$).

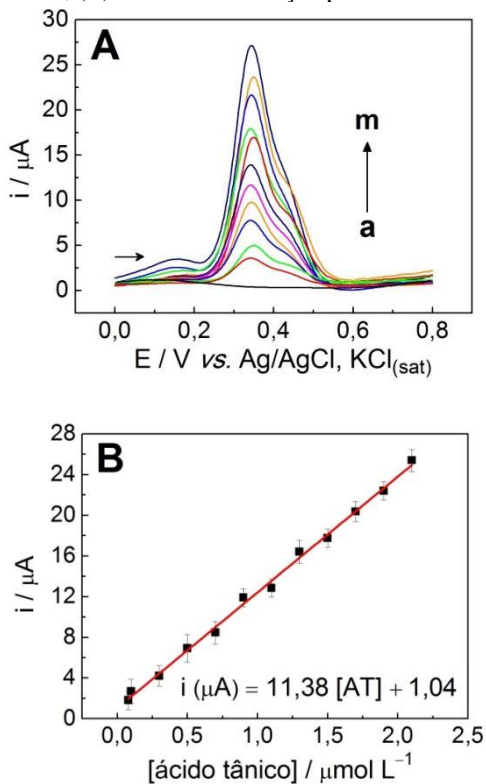
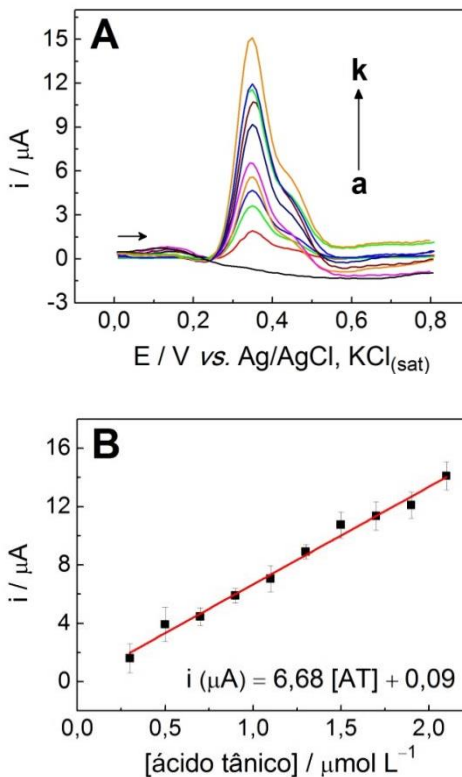


Figura 54. Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de ácido tânico sobre o CPE: (a) branco, (b) 0,3, (c) 0,5, (d) 0,7 (e) 0,9, (f) 1,1, (g) 1,3, (h) 1,5, (i) 1,7, (j) 1,9 e (k) 2,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,2 mol L^{-1} (pH 5,0); $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 3,0 \text{ ms}$, $\nu = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$; (B) Curva de calibração para o ácido tânico ($n = 5$).



Todas as características analíticas das curvas de calibração usando o PEG/CPE e o CPE estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características analíticas da curva de calibração para ácido tânico usando o PEG/CPE e o CPE.

Características analíticas	PEG/CPE	CPE
Potencial de pico (V)	0,34	0,34
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,08 – 2,1	0,3 – 2,1
Coefficiente de determinação - R^2	0,996	0,990
Coefficiente angular ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	11,40	6,68
Desvio padrão coeficiente angular ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	0,207	0,245
Coefficiente linear (μA)	1,04	0,09
Desvio padrão do coeficiente linear (μA)	0,251	0,326
Limite de detecção (nmol L^{-1})	72,65	161,0
Limite de quantificação (nmol L^{-1})	220,17	488,0
Repetibilidade de i (intradia) (%) ^{a,b}	3,18 – 4,56	—
Repetibilidade de i (interdia) (%) ^{a,b}	4,97 – 7,12	—

^a Desvio padrão relativo

^b $n = 5$

Com o objetivo de comparar o desempenho do PEG/CPE, foram listados na Tabela 8 uma série de trabalhos relatando o desempenho analítico de EQM aplicados na determinação de ácido tânico. Observa-se que a faixa linear obtida com o PEG/CPE é maior quando comparada a de alguns dos trabalhos reportados na literatura. No entanto, o LD obtido neste trabalho é um dos maiores já relatados. Todavia, a maior simplicidade na preparação, o baixo custo dos materiais necessários à confecção e a excelente performance do PEG/CPE na determinação de ácido tânico em amostras complexas, como será descrito no tópico a seguir, tornam este eletrodo um dispositivo com enorme potencial para tal finalidade quando comparado aos demais.

Tabela 8. Comparação do desempenho de diferentes eletrodos para determinação de ácido tânico.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
SWCNTs/GCE ^a	DPV	0,05–1,0	0,008	(WAN et al., 2007)
PPCPE ^b	LSV	0,02–1,0	0,01	(XU et al., 2009)
ITO/MPTS/AHMP-AuNPs ^c	Amperometria	2,0–16,0	0,02	(RAJ; REVIN; JOHN, 2013)
PrTu/GCE ^d	DPV	2,0–42,0	0,6	(YILMAZ et al., 2016)
NiHCF-AFCNT/GCE ^e	DPV	10,0–170,0	1,0	(TSAI et al., 2014)
Sensor microbiano	Potenciometria	25,0–1025,0	8,0	(ZHAO et al., 1998)
Si-gel/CPE	DPV	0,001–1,0	0,0003	(VU et al., 2013)
Pre-PGE ^f	DPV	0,005–0,5	0,0015	(VU et al., 2015)
PEG-CPE	DPV	0,08–2,1	0,072	Este trabalho.

^a SWCNTs: do inglês: *single-wall carbon nanotubes*

^b PPCPE: do inglês: *porous pseudo-carbon paste electrode*

^c ITO/MPTS/AHMP-AuNPs: do inglês: *indium tin oxide electrode modified with (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTS) and 4-amino-6-hydroxy-2-mercaptopyrimidine capped gold nanoparticles (AHMP-AuNPs)*

^d PrTu: do inglês: *1-benzoyl-3-(pyrrolidine) thiourea*

^e NiHCF-AFCNT: do inglês: *glassy carbon electrode modified with nickel hexacyanoferrate on amino functionalized carbon nanotubes*

^f Pre-PGE: do inglês: *pretreated pencil graphite electrode*

4.2.6 Repetibilidade da resposta eletroanalítica e estabilidade do eletrodo

A precisão das medidas analíticas pode ser avaliada por meio de ensaios de repetibilidade, nos quais se analisa o quanto duas ou mais medidas estão em concordância quando estas são repetidas em condições definidas (RIBANI et al., 2004). A repetibilidade da corrente de oxidação para o ácido tânico sobre o PEG/CPE foi estimada em três níveis de concentração, contidas na faixa linear da curva de calibração,

são eles: 0,3, 1,1 e 1,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estes três níveis foram denominados nível 1, 2 e 3, respectivamente. O desvio padrão relativo (DPR) das correntes de pico das medidas sucessivas realizadas no mesmo dia usando um único eletrodo, com a superfície renovada após cada medida, foi de 4,56%, 3,27% e 3,18% para os níveis 1, 2 e 3, respectivamente. Para estimar a repetibilidade interdia, foram analisadas as medidas feitas em cinco dias consecutivos, utilizando o mesmo eletrodo modificado. Os valores de DPR obtidos nesse estudo para os níveis 1, 2 e 3 foram de 7,12%, 5,07% e 4,97%, respectivamente. Os valores de DPR obtidos para os ensaios intradia e interdia indicam excelente repetibilidade dos dados fornecidos pelo PEG/CPE.

Para estudar a estabilidade do PEG/CPE, avaliou-se a resposta do mesmo medindo-se as correntes de pico para a concentração de ácido tânico de 1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em intervalos de tempo de sete dias, durante um período de noventa dias. Neste período, a resposta manteve-se superior a 92% da corrente resultante obtida na primeira medida. Após noventa dias, houve um decréscimo maior que 10% na intensidade da resposta fornecida pelo eletrodo, indicando a perda da estabilidade. Os resultados descritos indicam que o dispositivo proposto apresenta uma excelente repetibilidade e é altamente estável, podendo ser utilizado na determinação eletroanalítica de ácido tânico por um longo período de tempo.

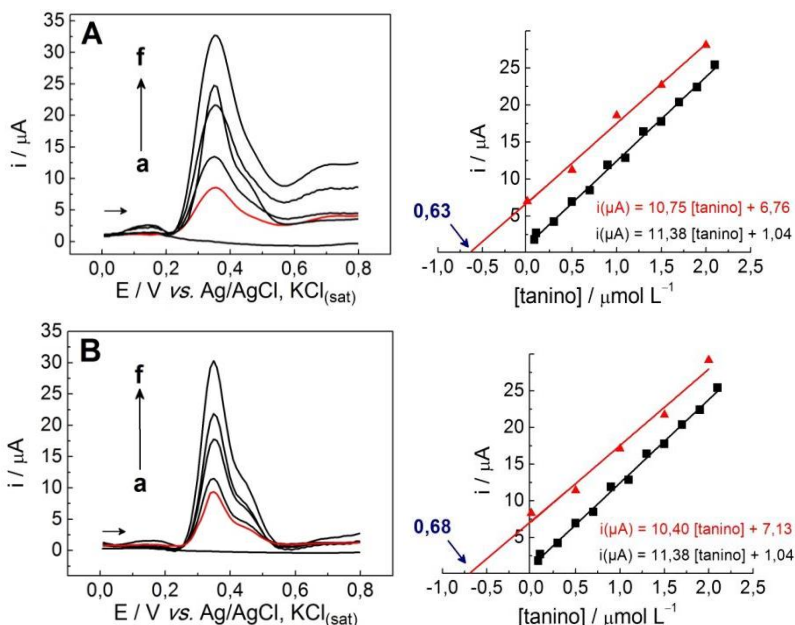
4.2.7 Aplicação analítica do PEG/CPE em amostras de cervejas

Para avaliar a aplicabilidade do eletrodo proposto, empregou-se o PEG/CPE na quantificação de ácido tânico em amostras de cervejas. Foram analisadas cinco amostras diferentes (numeradas de 1 a 5), adquiridas no comércio local e usadas sem nenhum tratamento prévio. Para os estudos de determinação da concentração de ácido tânico foi utilizado o método de adição de padrão, comumente empregado para avaliar o efeito de matriz no resultado das análises.

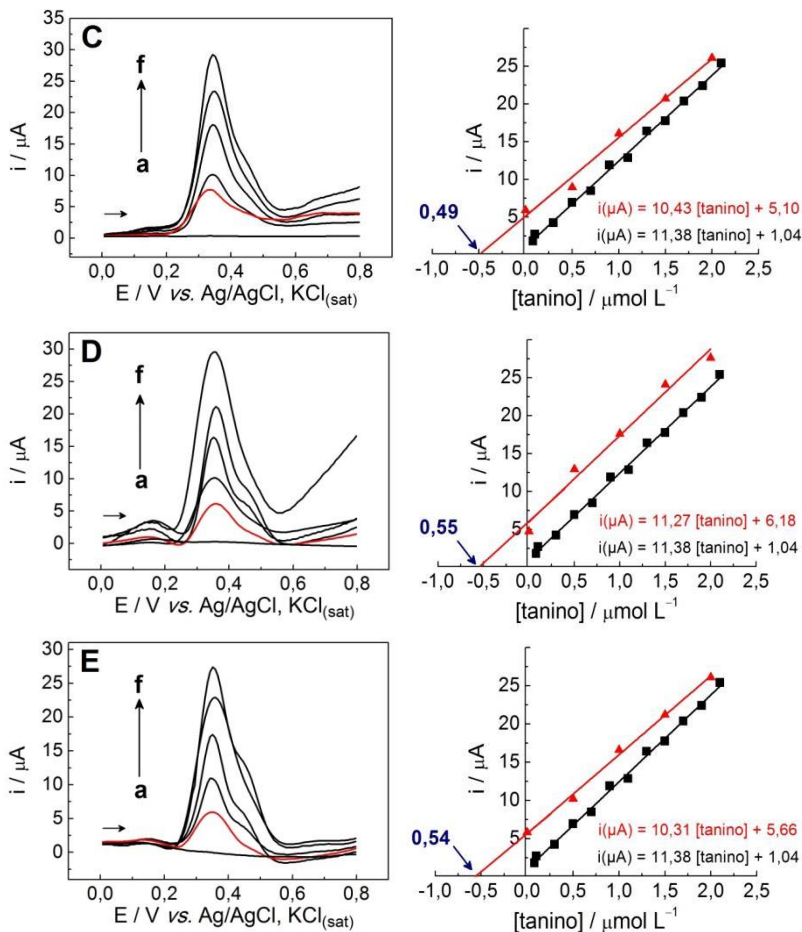
A Figura 55 mostra os voltamogramas de pulso diferencial para cada uma das amostras. As curvas (a) representam as medidas do branco (eletrólito suporte), as curvas (b) referem-se à medida das amostras e as demais curvas (c-f) referem-se às sucessivas adições de solução padrão de ácido tânico. Todas as amostras exibiram um sinal redox bem definido próximo a 0,34 V, referente à oxidação do ácido tânico. As curvas de adição de padrão foram construídas juntamente com a curva de calibração para o ácido tânico e são apresentados nos gráficos à

direita dos voltamogramas de cada amostra. Observou-se que, para todas as amostras estudadas, o coeficiente angular da curva de adição de padrão é muito parecido ao coeficiente angular da curva de calibração, indicando que não há influência da matriz das amostras sobre a resposta do ácido tânico. Dessa forma, o ácido tânico presente nessas amostras poderia ser quantificado pelo método de calibração externa, o qual também fornece resultados confiáveis e demanda um tempo muito menor nas análises, aumentando assim a frequência analítica da metodologia.

Figura 55. (A, B, C, D e E) Voltamogramas de pulso diferencial para as amostras 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. (a) branco, (b) amostras e (c-f) sucessivas adições de solução padrão de ácido tânico em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0); $E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 3,0 \text{ ms}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$. À direita, curvas de calibração (em preto) e de adição de padrão (em vermelho) para cada uma das amostras.



Continuação da Figura 55:



Todas as determinações foram realizadas em cinco replicatas ($n = 5$) e os valores foram convertidos em $\mu\text{g mL}^{-1}$. As concentrações médias de ácido tânico quantificadas em cada amostra, pelo método proposto e também pelo método comparativo (Folin-Ciocalteu), estão apresentadas na Tabela 9. Nota-se bastante similaridade entre os valores obtidos pelos dois métodos, com erros relativos menores que 7,0%, revelando a exatidão dos dados fornecidos pelo PEG/CPE.

O ácido tânico é comumente utilizado na preparação de cervejas com o objetivo de reduzir o teor proteico através da precipitação como complexos que podem ser retirados através de sedimentação ou filtração. Dessa forma, era esperado conseguir efetuar a sua detecção nas amostras comerciais usadas. A resolução RDC nº 40 da ANVISA, de 13 de setembro de 2011, aprova o uso de ácido tânico como aditivo na função de agente de clarificação/filtração para fabricação de bebidas alcoólicas. A mesma resolução prevê um limite de uso *quantum satis*, que é a quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado, desde que não altere a identidade e a genuinidade do produto (ANVISA, 2011). Nenhuma outra legislação acerca do limite máximo de ácido tânico permitido na fabricação de cervejas foi encontrada.

Em um dos trabalhos mais recentes acerca da determinação de ácido tânico em cervejas comerciais publicados na literatura, Raj e colaboradores reportaram que as concentrações encontradas variaram de 13,35 a 13,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RAJ; REVIN; JOHN, 2013). Esses valores servem apenas como uma referência para a análise dos resultados obtidos neste trabalho. No entanto, sabe-se que as concentrações podem variar bruscamente de acordo com as amostras testadas.

A precisão dos dados obtidos usando o PEG/CPE foi avaliada usando o teste F. Para as cinco amostras, o valor calculado para F foi menor que o valor de F teórico (6,38) para o nível de confiança de 95%, indicando que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

Tabela 9. Resultados obtidos na determinação de ácido tânico em amostras de cervejas.

Amostra	Concentração de ácido tânico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Erro relativo ^b (%)
	DPV ^a	UV-vis ^a	
1	11,21 \pm 0,08	10,83 \pm 0,06	3,51
2	11,72 \pm 0,09	12,25 \pm 0,05	-4,33
3	8,57 \pm 0,07	9,21 \pm 0,03	-6,94
4	9,36 \pm 0,06	10,04 \pm 0,03	-6,77
5	9,19 \pm 0,08	9,46 \pm 0,04	-2,85

^a média de 5 replicatas com a mesma amostra.

^b Erro relativo = [(método proposto - método comparativo)/método comparativo] \times 100

A exatidão dos dados obtidos usando o PEG/CPE para a determinação do ácido tânico foi analisada de duas formas: por experimentos de adição e recuperação e pela comparação com os resultados obtidos pelo método comparativo. As recuperações das adições de padrão de ácido tânico foram realizadas sobre todas as amostras e variaram do valor mínimo de 94,0% até 116,0%, como pode ser observado nos dados da Tabela 10. Estes valores de recuperação são aceitáveis, tendo em vista a faixa de concentração estudada ($\mu\text{mol L}^{-1}$), reafirmando assim, o excelente desempenho na aplicação do detector desenvolvido para a quantificação de ácido tânico em amostras de cerveja.

Tabela 10. Dados para o estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras de cerveja usando o PEG/CPE.

Amostra	Ácido tânico ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		% Recuperação ^a
	Adicionado	Recuperado	
1	0,5	0,52	104,0
	1,0	1,16	116,0
2	0,5	0,47	94,0
	1,0	1,07	107,0
3	0,5	0,49	98,0
	1,0	0,98	98,0
4	0,5	0,51	102,0
	1,0	0,96	96,0
5	0,5	0,53	106,0
	1,0	0,96	96,0

^a % recuperação = (valor recuperado/valor adicionado) \times 100.

Também para avaliar a exatidão dos dados obtidos, as concentrações de ácido tânico determinadas nas amostras usando o PEG/CPE foram comparadas com os valores obtidos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para tal foi empregado o teste t pareado. O valor de t teórico foi obtido a partir da tabela de distribuição de Student para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e nível de confiança de 95%. O valor de t calculado (1,78) foi menor que o valor de t teórico, para o nível de confiança de 95% (2,306), comprovando que não houve diferença significativa entre a exatidão dos dados do método

espectroscópico e do método eletroanalítico (LEITE, 2002; BRITO et al., 2003).

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, dois novos eletrodos quimicamente modificados foram preparados, caracterizados e aplicados na determinação eletroanalítica de taninos. Um dos eletrodos propostos foi baseado na modificação de um substrato de carbono vítreo com nanopartículas de ouro estabilizadas em carboximetilcelulose (AuNPs-CMC/GCE) e foi empregado para a quantificação de taninos condensados. O segundo, por sua vez, consistiu na preparação de um eletrodo de pasta de carbono modificado com polietilenoglicol (PEG/CPE) e foi aplicado na determinação de ácido tânico (tanino hidrolisável). Técnicas microscópicas, espectroscópicas e voltamétricas de caracterização comprovaram a eficiência nas modificações, bem como o excelente desempenho dos detectores para serem utilizados em análises eletroanalíticas.

Tendo em vista a complexidade estrutural e a grande variedade de taninos, foram selecionados dois compostos modelo, que foram utilizados como padrão para o desenvolvimento das metodologias e para a quantificação nas amostras. A catequina foi usada como modelo para taninos condensados e o ácido tânico para taninos hidrolisáveis. Inicialmente utilizou-se a técnica de voltametria cíclica para avaliar o comportamento eletroquímico das moléculas sobre os eletrodos e para otimizar os parâmetros experimentais das metodologias. Em seguida, foi selecionada, em cada caso, a técnica voltamétrica de pulso com maior sensibilidade e então, empregando tais técnicas, foram realizadas as análises quantitativas.

A curva de calibração para a catequina foi obtida em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) usando a técnica de voltametria de onda quadrada ($f = 80 \text{ Hz}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$). A resposta de corrente de pico em função da concentração de catequina foi linear no intervalo de $0,3$ a $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação calculados a partir desta curva foram $0,274$ e $0,831 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

A curva de calibração para o ácido tânico foi construída a partir de voltamogramas de pulso diferencial ($E_{\text{pulso}} = 70,0 \text{ mV}$, $t_{\text{pulso}} = 3,0 \text{ ms}$, $\nu = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$) em solução tampão B-R $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) e apresentou boa linearidade no intervalo de concentração de $0,08$ a $2,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, fornecendo limites de detecção e quantificação de $72,65$ e $220,17 \text{ nmol L}^{-1}$.

Nos dois casos, as modificações realizadas com AuNPs e PEG proporcionaram aos detectores aumento da sensibilidade na

determinação de catequina e ácido tânico, respectivamente, em comparação aos substratos sem modificação. Quando aplicados na quantificação dos taninos em amostras de extratos vegetais e cervejas, os detectores forneceram respostas precisas, exatas e apresentaram boa estabilidade ao longo das aplicações. Além disso, os eletrodos modificados propostos neste trabalho também apresentaram as seguintes características: fácil preparação, baixo tempo das análises, ausência da necessidade de etapa de purificação ou pré-tratamento das amostras, baixo custo dos equipamentos e boa repetibilidade dos resultados. Todas essas qualidades tornam o AuNPs-CMC/GCE e o PEG/CPE dispositivos altamente viáveis para serem aplicados na quantificação de taninos condensados e hidrolisáveis em diferentes amostras, permitindo seu emprego em análises de controle de qualidade entre outras áreas.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS

ACKER, S. A; BALEN, G. P. V.; BERG, D. J. V. D.; BAST, A; VIJGH, W. J. V. D. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 935–943, 1998.

AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 75, n. 1-2, p. 1–12, 1999.

AFKHAMI, A.; SOLTANI-FELEHGARI, F.; MADRAKIAN, T.; GHAEDI, H. Surface decoration of multi-walled carbon nanotubes modified carbon paste electrode with gold nanoparticles for electro-oxidation and sensitive determination of nitrite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 379–85, 2014.

AFZALI, D.; ZAREI, S.; FATHIRAD, F.; MOSTAFAVI, A. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p. 97–101, 2014.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F.V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813–817, 2004.

AL-ZAHRANI, E.; SOOMRO, M. T.; BASHAMI, R. M.; et al. Fabrication and performance of magnetite (Fe_3O_4) modified carbon paste electrode for the electrochemical detection of chlorite ions in aqueous medium. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 4, p. 4330–4341, 2016.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada-RDC nº 40, de 13 de setembro de 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acessado em: 23 jan. 2018.

APPEL, H. M.; GOVENOR, H. L.; D'ASCENZO, M.; SISKI, E.; SCHULTZ, J. C. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in

ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, p. 761–778, 2001.

AYRES, M. P.; CLAUSEN, T. P.; MACLEAN, S. F.; REDMAN, A. M.; REICHARDT, P. B. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v. 78, n. 6, p. 1696–1712, 1997.

BANU, K.; SHIMURA, T.; SADEGHI, S. Selective detection and recovery of gold at tannin-immobilized non-conducting electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 207–213, 2015.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods, fundamentals and applications**, 2 ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001.

BATE-SMITH, E. C. Astringent tannins of Acer species. **Phytochemistry**, v. 16, n. 9, p. 1421–1426, 1977.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by Paecilomyces variotii. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 191–199, 2007.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

BRUNETON, J. **Farmacognosia - Fitoquímica Plantas Medicinales**. Espanha: Editorial Acríbia S. A., 2001, p. 365–400.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241–259, 2010.

CASTRO. Rendimento de tanino em dois acessos de diferentes épocas de colheita em Viçosa - MG. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 1, n. 2, p. 29–33, 1999.

CHAUHAN, R.; SINGH, J.; SOLANKI, P. R.; MANAKA, T.; IWAMOTO, M.; BASU, T.; MALHOTRA, B. D. Label-free piezoelectric immunosensor decorated with gold nanoparticles: Kinetic analysis and biosensing application. **Sensors and Actuators B:**

Chemical, v. 222, p. 804–814, 2016.

CHEN, J.; SPEAR, S. K.; HUDDLESTON, J. G.; HOLBREY, J. D.; SWATLOSKI, R. P.; ROGERS, R. D. Application of poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems as reaction and reactive extraction media. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 17, p. 5358–5364, 2004.

CHEN, J.; SPEAR, S. K.; HUDDLESTON, J. G.; ROGERS, R. D. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. **Green Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 64–82, 2005.

CHEYNIER, V. Polyphenols in food are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 223–229, 2005.

CHUNG, K. T.; WEI, C. I.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 168–175, 1998.

CORNELL, R. M., SCHWERTMANN, U., **The Iron Oxides**, Wiley-VCH, 2^a edição, Weinheim, 2003.

COX, J., TESS, M.; CUMMINGS, T. Electroanalytical methods based on modified electrodes: a review of recent advances. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 173–224, 1996.

CREN-OLIVÉ, C.; HAPIOT, P.; PINSON, J.; ROLANDO, C. Free radical chemistry of flavan-3-ols: Determination of thermodynamic parameters and of kinetic reactivity from short (ns) to long (ms) time scale. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 47, p. 14027–14038, 2002.

DROZDOWSKI, M.; BŁASZCZAK, Z.; IWASZKIEWICZ-KOSTKA, I.; ZIOBROWSKI, P.; ANDRZEJEWSKA, E.; ANDRZEJEWSKI, M. Molecular dynamics of poly(ethylene glycol)s studied by optical Kerr effect and Brillouin spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 614, n. 1-3, p. 47–57, 2002.

DURST, R. A.; BAUMER, A. J.; MURRAY, R. W.; BUCK, R. P.; ANDRIEUX, C. P. Chemically modified electrodes: recommended

terminology and definitions. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 1491–1505, 1997.

EL-HADY, D.; EL-MAALI, N. Selective square wave voltammetric determination of (+)-catechin in commercial tea samples using beta-cyclodextrin modified carbon paste electrode. **Microchimica Acta**, v. 161, n. 1-2, p. 225–231, 2008.

FENGEL, D; WEGENER, G. **Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter: New York, 1989, p. 83-113.

FERNANDES, S. C.; BARROS OSÓRIO, R. E. H. M. DE; ANJOS, A. DOS; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1215–1223, 2008.

FRITZ, G.; SCHDLER, V.; WILLENBACHER, N.; WAGNER, N. J. Electrosteric stabilization of colloidal dispersions. **Langmuir**, v. 18, n. 16, p. 6381–6390, 2002.

GALLI, A.; SOUZA, D. DE; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105–112, 2006.

GECOL, H.; ERGICAN, E.; MIAKATSINDILA, P. Biosorbent for tungsten species removal from water: Effects of co-occurring inorganic species. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, n. 2, p. 344–353, 2005.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. **The British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 73–83, 2000.

GUO, Z.; LI, M.; WILLAUER, H. D.; HUDDLESTON, J. G.; APRIL, G. C.; ROGERS, R. D. Evaluation of polymer-Based aqueous biphasic systems as improvement for the hardwood alkaline pulping process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 10, p. 2535–2542, 2002.

HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant-extracts. **Journal of chemical ecology**, v. 13, n. 3, p. 437–449, 1987.

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins , pentagalloyl glucose and epicatechin 16 (4-->8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 16, n. 97, p. 2590–2595, 1998.

HANG, J.; SHI, L.; FENG, X.; XIAO, L. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. **Powder Technology**, v. 192, n. 2, p. 166–170, 2009.

HASHIMOTO, F.; KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NOHARA, T. C. Evaluation of tea polyphenols as anti-HIV agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 6, p. 695–700, 1996.

HASLAM, E. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2713–2721, 2007.

HERDERICH, M. J.; SMITH, P. A. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. **Australian Journal Of Grape And Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 205–214, 2005.

HIRATA, R.; SOUZA, W.J.; PESSOA, L. **Carboximetilcelulose na indústria alimentícia uma abordagem técnica**. In: Anais do simpósio sobre hidrocolóides. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 1993.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; GRIFFIN, S. T.; ROGERS, R. D. Aqueous polymeric solutions as environmentally benign liquid/liquid extraction media. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 2523–2539, 1999.

HUNTER, J. R. **Introduction to Modern Colloid Science**. Oxford University Press, 1993.

IOST, R. M.; CRESPILOHO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics.

Biosensors and Bioelectronics, v. 31, n. 1, p. 1–10, 2012.

JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, n. 1-2, p. 109–115, 2004.

JORMALAINEN, V.; HONKANEN, T.; VESAKOSKI, O.; KOIVIKKO, R. Polar extracts of the brown alga *Fucus vesiculosus* (L.) reduce assimilation efficiency but do not deter the herbivorous isopod *Idotea baltica* (Pallas). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 317, n. 2, p. 143–157, 2005.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Quantitative determination of tannin and protein in the precipitates by high-performance liquid chromatography. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1503–1505, 1995.

KHANBABAEI, K.; REE, T. V. Tannins: classification and definition. **Natural product reports**, v. 18, n. 6, p. 641–649, 2001.

LEITE, F. **Validação em análise química**, 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2002.

LEKA P. K.; LONSANE, B. K. Production application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215–260, 1997.

LIAO, X. P.; LU, Z. B.; SHI, B. Selective adsorption of vegetable tannins onto collagen fibers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 14, p. 3397–3402, 2003.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; TOLEDO, C. E. M. DE; ISLER, A. C.; MELLO, J. C. P. DE. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 135–143, 2009.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142–152, 1999.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Behavior of tannic-acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 3, p. 295–299, 1993.

MANGRICH, A. S.; DOUMER, M. E.; MALLMANN, A. S.; WOLF, C. R. Green chemistry in water treatment: use of coagulant derived from *Acacia mearnsii* tannin extracts. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2–15, 2014.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.

MAZLOUM-ARDAKANI, M.; DEGHANI-FIROUZABADI, A.; SHEIKH-MOHSENI, M. A.; BENVIDI, A.; MIRJALILI, B.-B. F.; ZARE, R. A self-assembled monolayer on gold nanoparticles modified electrode for simultaneous determination of isoproterenol and uric acid. **Measurement**, v. 62, p. 88–96, 2015.

MELO, M. A.; SANTOS, L. S. S.; CARMO GONÇALVES, M. DO; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T.; MCNABB, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-4, p. 3–19, 2003.

MITCHNICK, M. Particles Science. **Drug Development and Service. Technical Brief**, v. 1, p. 2, 2009.

MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; CAMARGO, T. P. DE; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Self-assembled monolayer of nickel(II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 1063–1068, 2009.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.

Taninos: uma abordagem da química à ecologia, **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MORISADA, S.; RIN, T.; OGATA, T.; KIM, Y.-H.; NAKANO, Y. Adsorption recovery of rhodium(III) in acidic chloride solutions by amine-modified tannin gel. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 126, n. S2, p. E34–E38, 2012.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; MANUEL DOMÍNGUEZ, J.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; CARLOS PARAJÓ, J. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 145–171, 2001.

MOURYA, P.; BANERJEE, S.; SINGH, M. M. Corrosion inhibition of mild steel in acidic solution by *Tagetes erecta* (Marigold flower) extract as a green inhibitor. **Corrosion Science**, v. 85, p. 352–363, 2014.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 3–20, 2001.

MURRAY, R. W. Chemically Modified Electrodes. **Accounts of Chemical Research**, v. 117, n. 1979, p. 135–141, 1980.

NACZK, M.; OICKLE, D.; PINK, D.; SHAHIDI, F. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: effect of pH, tannin, and protein concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2144–2148, 1996.

NAGAYAMA, K.; SHIBATA, T.; FUJIMOTO, K.; HONJO, T.; NAKAMURA, T. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae. **Aquaculture**, v. 218, n. 1-4, p. 601–611, 2003.

NAIK, S. D.; DORAISWAMY, L. K. Phase transfer catalysis: Chemistry and engineering. **AIChE Journal**, v. 44, n. 3, p. 612–646, 1998.

NASCIMENTO, V. B.; ANGES, L. Eletrodos fabricados por “Silk-Screen.” **Química Nova**, v. 21, n. 5, 1998.

NISHIZAWA, K.; NAKATA, I.; KISHIDA, A.; AYER, W. A.;

BROWNE, L. M. Some biologically active tannins of *Nuphar variegatum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2491–2494, 1990.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17–22, 2003.

PAVOSKI, G. **Estudo da obtenção de grafeno a partir de grafite e o seu uso em nanocompósitos poliolefinicos**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012–1021, 2002.

PIGMAN, W.; HORTON, D. **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. Second Edition, Vol. IIA. N.Y.: Academic Press, 1970. p. 385-433.

PONCET-LEGRAND, C.; EDELMANN, A.; PUTAUX, J. L.; CARTALADE, D.; SARNI-MANCHADO, P.; VERNHET, A. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 5, p. 687–697, 2006.

POURRAT, H., Les drogues à tanins dans la pharmacologie moderne. **Groupe Polyphénols**. Nancy. v. 10, p. 33–57, 1980.

RAJ, M. A.; REVIN, S. B.; JOHN, S. A. Synthesis, characterization and modification of functionalized pyrimidine stabilized gold nanoparticles on ITO electrode for the determination of tannic acid. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 1–10, 2013.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L. **Biodisponibilidade de zinco e ferro, valor nutricional e funcional de diferentes cultivares de feijão comum submetidos a tratamentos domésticos**. Tese Doutorado em

Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E.; ABHIJITH, K. S.; KUMAR, P. V. S.; THAKUR, M. S. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 1, p. 206–211, 2005.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003, p. 615-656.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food**, v. 80, n. 7, p. 1094–1117, 2000.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875–3883, 1991.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21–40, 2001.

SEGURA, R.; PIZARRO, J.; DÍAZ, K.; PLACENCIO, A.; GODOY, F.; PINO, E.; RECIO, F. Development of electrochemical sensors for the determination of selenium using gold nanoparticles modified electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 263–269, 2015.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações**. São Paulo: Varela; 1996.

SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; KANDA, T.; OHTAKE, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the

degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, n. 1-2, p. 206-213, 2006.

SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of Polyphenol - Protein Interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80–85, 1996.

SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) for determination of Vanillin. **Electroanalysis**, v. 27, n. 2, p. 465-472, 2015.

SINGH, B.; BHAT, T. K.; SHARMA, O. P. Biodegradation of tannic acid in an in vitro ruminal system. **Livestock Production Science**, v. 68, p. 259-262, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology Viticulture**. v.16, p. 144-158, 1965.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Editora Thomson, 8ª edição, 2006.

SOLANKI, P. R.; KAUSHIK, A.; AGRAWAL, V. V.; MALHOTRA, B. D. Nanostructured metal oxide-based biosensors. **NPG Asia Materials**, v. 3, n. 1, p. 17–24, 2011.

SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, São Paulo , v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SOUZA, M. de F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191–195, 1997.

SPENCER, C. M.; CAI, Y. A.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation-some thoughts and observations. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2397–2409, 1988.

SWANSON, A. K.; DRUEHL, L. D. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. **Aquatic Botany**, v. 73, n. 3, p. 241–253, 2002.

SZORCSIK, A.; NAGY, L.; SCOPELLITI, M.; PELLERITO, L.; SIPOS, P. Characterization of complexes formed between $[\text{Me}_2\text{Sn}(\text{IV})]^{2+}$ and carboxymethylcelluloses. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 12, p. 2083–2089, 2006.

TAN, K. W.; KASSIM, M. J. A correlation study on the phenolic profiles and corrosion inhibition properties of mangrove tannins (*Rhizophora apiculata*) as affected by extraction solvents. **Corrosion Science**, v. 53, n. 2, p. 569–574, 2011.

TAN, X.; HU, Q.; WU, J.; LI, X.; LI, P.; YU, H.; LI, X.; LEI, F. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer reduced graphene oxide and gold nanoparticles modified electrode for detection of carbofuran. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 216–221, 2015.

TAYLOR, P.; CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C.; HUANG, Y.; LIN, Y. Tannins and Human Health : A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 37–41, 1998.

THOMAS, F. G.; HENZE, G. **Introduction to voltammetric analysis: theory and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2001.

TOMA, H. E.; SILVA BONIFÁCIO, L. DA; ANAISSI, F. J. Da cor à cor inexistente: Uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 897–900, 2005.

TSAI, T. H.; YEH, P. C.; CHEN, S. M.; ALI, M. A.; AL-HEMAID, F. M. A. Effect of electrostatic interaction on electrodeposition of nickel hexacyanoferrate with functional MWCNTs and their application for the determination of persulfate and tannic acid. **Electroanalysis**, v. 26, n. 5, p. 971–979, 2014.

TURKEVICH, J.; STEVENSON P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.

Discussions of the Faraday Society, v. 11, p. 55–75, 1951.

TURKEVICH, J.; GARTON, G.; STEVENSON, P. C. The color of colloidal gold. **Journal of Colloid Science**, v. 9, p. 26–35, 1954.

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. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, n. 1-3, p. 203–211, 1999.

VU, D. L.; ERTEK, B.; ČERVENKA, L.; DILGIN, Y. Determination of tannic acid using silica gel modified carbon paste electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 9278–9286, 2013.

VU, D. L.; ERTEK, B.; DILGIN, Y.; ČERVENKA, L. Voltammetric determination of tannic acid in beverages using pencil graphite electrode. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 33, n. 1, p. 72–76, 2015.

WAN, H.; ZOU, Q.; YAN, R.; ZHAO, F.; ZENG, B. Electrochemistry and voltammetric determination of tannic acid on a single-wall carbon nanotube-coated glassy carbon electrode. **Microchimica Acta**, v. 159, n. 1–2, p. 109–115, 2007.

WANG, J.; **Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications**, VCH Deerfield Beach: Publishers, 1985.

XU, L.; HE, N.; DU, J.; DENG, Y.; LI, Z.; WANG, T. A detailed investigation for determination of tannic acid by anodic stripping voltammetry using porous electrochemical sensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 1, p. 49–53, 2009.

YANG, L. J.; TANG, C.; XIONG, H. Y.; ZHANG, X. H.; WANG, S. F. Electrochemical properties of catechin at a single-walled carbon nanotubes-cetylramethylammonium bromide modified electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 75, n. 2, p. 158–162, 2009.

YAO, Y.; ZHANG, L.; WEN, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H.; HU, D.; XU, J.; DUAN, X. Voltammetric determination of catechin using single-walled carbon nanotubes/poly(hydroxymethylated-3,4-

ethylenedioxythiophene) composite modified electrode. **Ionics**, v. 21, n. 10, p. 2927 – 2926 , 2015.

YASARAWAN, N.; THIPYAPONG, K.; SIRICHAJ, S.; RUANGPORNVISUTI, V. Fundamental insights into conformational stability and orbital interactions of antioxidant (+)-catechin species and complexation of (+)-catechin with zinc(II) and oxovanadium(IV). **Journal of Molecular Structure**, v. 1047, p. 344–357, 2013.

YILMAZ, Ü. T.; ÇALIK, E.; UZUN, D.; KARIPCIN, F.; YILMAZ, H. Selective and sensitive determination of tannic acid using a 1-benzoyl-3-(pyrrolidine) thiourea film modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 776, p. 1–8, 2016.

YIN, T.; QIN, W. Applications of nanomaterials in potentiometric sensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 79–86, 2013.

YU, A.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; HAN, D.; KNIGHT, A. R. Preparation and electrochemical properties of gold nanoparticles containing carbon nanotubes-polyelectrolyte multilayer thin films. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 25, p. 9015–9019, 2011.

YURTSEVER, M.; ŞENGİL, I. A. Biosorption of Pb(II) ions by modified quebracho tannin resin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 58–64, 2009.

ZAMAN, M. B; KHAN, A. A. Studies on the indigenous tannin-bearing plants of pakistan, **The Pakistan Journal Forestry**, v. 11, n. 2, p. 162-167, 1961.

ZELLER, W. E.; SULLIVAN, M. L.; MUELLER-HARVEY, I.; GRABBER, J. H.; RAMSAY, A.; DRAKE, C.; BROWN, R. H. Protein precipitation behavior of condensed tannins from lotus pedunculatus and trifolium repens with different mean degrees of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 1160–1168, 2015.

ZHAO, Y. B.; WEN, M. L.; LIU, S. Q.; LIU, Z. H.; ZHANG, W. D.; YAO, Y.; WANG, C. Y. Microbial sensor for determination of tannic acid. **Microchemical Journal**, v. 60, n. 3, p. 201–209, 1998.

ZHENG, X.; LIU, S.; HUA, X.; XIA, F.; TIAN, D.; ZHOU, C. Highly sensitive detection of 2,4,6-trichlorophenol based on HS- β -cyclodextrin/gold nanoparticles composites modified indium tin oxide electrode. **Electrochimica Acta**, v. 167, p. 372–378, 2015.