



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

Daniel Francisco Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS IMPRESSOS EM PAPEL A PARTIR DE
TINTA DE GRAFITE MODIFICADA COM MAGNETITA PARA A
DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS**

Florianópolis
2022

Daniel Francisco Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS IMPRESSOS EM PAPEL A PARTIR DE
TINTA DE GRAFITE MODIFICADA COM MAGNETITA PARA A
DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

Florianópolis

2022

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

Pereira, Daniel Francisco

Desenvolvimento de eletrodos impressos em papel a partir de tinta de grafite modificada com magnetita para a determinação de vitaminas / Daniel Francisco Pereira ; orientador, Almir Spinelli, 2022.

83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Eletroanalítica. 3. Voltametria. 4. Eletrodo impresso descartável. 5. Vitaminas. I. Spinelli, Almir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Daniel Francisco Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS IMPRESSOS EM PAPEL A PARTIR DE
TINTA DE GRAFITE MODIFICADA COM MAGNETITA PARA A
DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Iolanda Cruz Vieira, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Eduardo Zapp, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Blumenau (UFSC)

Prof. Daniel Lazaro Gallindo Borges, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química pelo Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Giovanni Finoto Caramori, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Almir Spinelli, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA), laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Almir Spinelli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar a vida. Aos meus pais, Marlene e João, por terem me acompanhado nessa longa jornada. Aos meus irmãos Pedro e João, por estarem ao meu lado sempre me apoiando.

Ao professor Dr. Almir Spinelli, pela orientação dada na realização deste trabalho e também pelos conselhos que levarei para a vida. Aos meus colegas de trabalho do GEPEEA: Edinho, Caio, Everton, Rayane, Marília, Markus, Franciele, Kelline, Francisco, João, Eduardo, pelas dicas, pela amizade e pelo trabalho duro. Aos meus amigos: Pedro, Gabriel, Allison, Luísa e André pelo companheirismo.

Aos integrantes da banca examinadora por aceitarem o convite de participarem da defesa. Ao LCME pelas imagens de microscopia eletrônica. Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt e ao aluno Allison Thomé pela contribuição com as medidas de espectrometria de fluorescência. E por fim, à Universidade Federal de Santa Catarina, CAPES, CNPq e FAPESC pelo suporte financeiro.

“At the simplest level, only people who know they do not know everything will be curious enough to find things out.” – Virginia Postrel

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um novo eletrodo descartável impresso sobre substrato de papel produzido a partir de uma tinta à base de grafite e verniz e modificado com nanopartículas de magnetita. O objetivo foi aplicá-lo no desenvolvimento de dois métodos: um para a quantificação de vitamina B2 e outro para a quantificação de vitamina B6, ambos em amostras de suplementos alimentares comerciais. A composição verniz:grafite da tinta condutora foi otimizada, assim como a proporção de nanopartículas de magnetita, com o objetivo de fornecer uma melhor resposta analítica e garantir uma rápida transferência eletrônica na superfície do eletrodo. O eletrodo foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica. A voltametria de onda quadrada foi utilizada para o estudo do comportamento eletroquímico das vitaminas sobre o eletrodo e para otimizar os parâmetros experimentais (como natureza do eletrólito de suporte, pH e parâmetros da técnica voltamétrica). Picos voltamétricos foram registrados em $-0,5$ e $+0,8$ V (vs. pseudo-referência de grafite), em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0), referentes às reações de oxidação das vitaminas B2 e B6, respectivamente. A janela de potencial para a vitamina B2 foi de $-0,8$ a $+0,3$ V (vs. pseudo-referência de grafite) e para a vitamina B6 foi de $+0,3$ a $+1$ V (vs. pseudo-referência de grafite) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . O pH 2,0 e a solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram selecionados na etapa de otimização da vitamina B2. Para a vitamina B6, o pH selecionado foi de 4,0 e o eletrólito de suporte foi a solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para a determinação da vitamina B2, foram empregados os seguintes parâmetros da técnica: frequência de aplicação dos pulsos de 30 Hz, amplitude de pulso de 80 mV e degrau de potencial de 2 mV. Para a vitamina B6, os parâmetros foram: frequência de aplicação dos pulsos de 80 Hz, amplitude de pulso de 60 mV e incremento de potencial de 5 mV. As correntes de pico variaram linearmente com a concentração de vitamina B2 na faixa de 2,0 a $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$), e na faixa de 0,20 a $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$) para a vitamina B6. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,308 e $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para a vitamina B2 e de 29,5 e $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para a vitamina B6. Dessa forma, cada método foi capaz de determinar a concentração de uma vitamina nas amostras de suplementos vitamínicos comerciais. Para a comparação dos resultados obtidos por voltametria de onda quadrada, foi usada a técnica da espectrometria de fluorescência. Os testes estatísticos usados foram o teste *t* de Student e o teste F, concluindo que, com nível de confiança de 95%, não houve diferenças significativas na exatidão e na precisão de ambos os métodos.

Palavras-chave: Vitamina B2. Vitamina B6. Eletrodo impresso descartável. Eletrodo de papel. Magnetita. Suplemento alimentar. Voltametria.

ABSTRACT

This work describes the development of a new disposable printed screen electrode over a paper substrate and manufactured from a conductive ink based on varnish and graphite powder with magnetite nanoparticles. The objective was to apply it in the development of two methods: one for the quantification of vitamin B2 and the other for the determination of vitamin B6, both in commercial dietary supplements. The proportion varnish:graphite and the proportion of magnetite nanoparticles were optimized to ensure a faster electronic transfer on the surface of the electrode. The electrode was characterized by scanning electron microscopy, electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. The square wave voltammetry was used to study the electrochemical behavior of the vitamins on the electrode and optimize the experimental parameters (such as nature of the support electrolyte, pH and technique parameters). Voltammetric peaks were registered in -0.5 and $+0.8$ V for vitamin B2 and B6, respectively, in 0.1 mol L^{-1} B-R buffer solution (pH 2.0), referring to vitamin B2 and B6 redox reactions. The potential window for vitamin B2 was -0.8 to $+0.3$ V and for vitamin B6 was $+0.3$ to $+1.0$ V with scan speed of 100 mV s^{-1} . The support electrolyte was selected and the pH optimized: for vitamin B2 was selected 0.1 mol L^{-1} B-R buffer solution with pH of 2.0 and for vitamin B6, 0.1 mol L^{-1} McIlvaine buffer solution with pH of 4.0. For the determination of vitamin B2, the following technique parameters were used: 30 Hz for pulse frequency, 80 mV for pulse amplitude and 2 mV for potential step. For vitamin B6, the parameters were: 80 Hz for frequency of pulse application, 60 mV for pulse amplitude and 5 mV for potential step. The peak currents varied linearly with the vitamin B2 concentration with linear range from 2.0 to $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0.999$), and linear range from 0.2 to 2 mmol L^{-1} ($R^2 = 0.999$) for vitamin B6. The detection and quantification limits were 0,308 and $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, for vitamin B2 and 29.5 and $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, for vitamin B6. Thus, it was possible to quantify both vitamins in samples of vitamin commercial dietary supplements. It was used fluorescence spectrometry technique as a comparative method. The statistical tests used were Student's t test and the F test, concluding that, with a 95% confidence level, there were no significant difference in precision and accuracy for both methods.

Keywords: Vitamin B2. Vitamin B6. Disposable screen-printed electrode. Paper electrode. Magnetite. Dietary supplements. Voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Estrutura espinélio cúbico de face centrada da magnetita. (B) Ampliação de um octaedro e um tetraedro adjacente compartilhando um átomo de oxigênio. As esferas maiores identificadas por Fe^{tet} e Fe^{oct} representam átomos de ferro em arranjo tetraédrico e octaédrico, respectivamente. Esferas menores são os átomos de oxigênio.....	28
Figura 2 – Representação da estrutura química da riboflavina, FMN e FAD.....	32
Figura 3 – Processo redox envolvendo a parte isoaloxazina.....	33
Figura 4 – Representação das estruturas químicas da vitamina B6.....	35
Figura 5 – Reações de oxidação para a piridoxina.....	35
Figura 6 – Representação esquemática do processo de produção dos eletrodos a partir da tinta condutora feita em laboratório.....	40
Figura 7 – Estudo da proporção de verniz:grafite usado na preparação da tinta condutora. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre os eletrodos produzidos com as distintas proporções de verniz:grafite: (a) 65:35, (b) 70:30 e (c) 75:25. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico de barras ($n = 8$).	44
Figura 8 – Espectrograma de impedância eletroquímica para as diferentes proporções de tinta. Em (a) a proporção 65:35, em (b) 75:25, e em (c), 70:30. O estudo foi feito com frequência entre 0,1 e 50000 Hz em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	45
Figura 9 – Estudo da proporção de magnetita na produção dos eletrodos. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos fabricados (a) sem magnetita e com as proporções de (b) 0,1, (c) 0,5, (d) 1,0, (e) 2,0 e (f) 3,0 % utilizando a sonda redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico de barras ($n = 8$).....	46
Figura 10 – Imagens de SEM e EDS para a tinta na (A e C) ausência de magnetita e na (B e D) presença de 1,0% de magnetita.	48
Figura 11 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para a (a) ausência e (b) presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de vitamina B2 em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de onda quadrada para a (a) ausência e (b) presença de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de vitamina B6 em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	49
Figura 12 – Reações de oxidação da vB2 em duas etapas em meio aquoso e pH 2.....	49
Figura 13 – Reações de oxidação da vB6 em duas etapas em meio aquoso.	50

Figura 14 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 0,1 mmol L ⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ nos valores de pH de (a) 2,0, (b) 3,0, (c) 4,0, (d) 5,0, (e) 6,0 e (f) 7,0. (B) Gráfico de barras para a variação de corrente nos diferentes valores de pH (n = 3). (C) Gráfico de potencial <i>versus</i> pH.....	51
Figura 15 – (A e B) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2,0 mmol L ⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ nos valores de pH de (a) 2,0, (b) 3,0, (c) 4,0, (d) 5,0, (e) 6,0, (f) 7,0, (g) 8,0, (h) 9,0 e (i) 10,0. (C) Gráfico de barras para a variação de corrente nos diferentes valores de pH, para os dois picos observados (n = 3). (D) Gráfico de potencial da corrente obtida pelo primeiro pico voltamétrico <i>versus</i> corrente.	52
Figura 16 – Gráficos de barras comparando os eletrólitos de suporte solução tampão McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ e solução tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ para (A) a vB2 0,1 mmol L ⁻¹ (n = 3) e (B) a vB6 2,0 mmol L ⁻¹ (n = 3).....	53
Figura 17 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 20 μmol L ⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 para as diferentes frequências de aplicação dos pulsos de potencial: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 Hz. Outros parâmetros mantidos constantes: <i>a</i> = 50 mV e Δ <i>E</i> s = 2 mV. (B) Gráfico de barras de corrente vs. frequência (n = 3).....	54
Figura 18 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 20 μmol L ⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 para as diferentes amplitudes de pulso de potencial: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 mV. Outros parâmetros mantidos constantes: <i>f</i> = 30 Hz e Δ <i>E</i> s = 2 mV. (B) Gráfico de barras de corrente vs. amplitude (n = 3).	55
Figura 19 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 20 μmol L ⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L ⁻¹ pH 2,0 para os diferentes degraus de potencial: (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7 e (h) 8 mV. Outros parâmetros mantidos constantes: <i>f</i> = 30 Hz e <i>a</i> = 80 mV. (B) Gráfico de barras de corrente vs. Δ <i>E</i> s (n = 3).....	56
Figura 20 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2 mmol L ⁻¹ em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0 para os diferentes degraus de potencial: (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7 e (h) 8 mV. Outros parâmetros constantes: <i>f</i> = 50 Hz e <i>a</i> = 50 mV. (B) Gráfico de barras de corrente vs. Δ <i>E</i> s (n = 3).....	57
Figura 21 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2 mmol L ⁻¹ em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0 para as frequências: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60,	

(g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 Hz.. Outros parâmetros constantes: $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV.	
(B) Gráfico de barras de corrente vs. f ($n = 3$).....	58
Figura 22 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2 mmol L^{-1} em solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 para as amplitudes de pulso de potencial: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 mV. Outros parâmetros constantes: $f = 80$ Hz e $\Delta E_s = 5$ mV. (B) Gráfico de barras de corrente vs. f ($n = 3$).....	58
Figura 23 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de vB2 sobre o eletrodo descartável: (a) branco; (b) 2,0; (c) 4,0; (d) 6,0; (e) 8,0; (f) 10,0; (g) 12,0; (h) 14,0; (i) 16,0; (j) 18,0; (k) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0; $f = 30$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Curva de calibração para a vB2 ($n = 3$).....	59
Figura 24 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB2: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0; (d) 8,0; (e) 10,0; (f) 12,0; (g) 14,0 e (h) 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração ($n = 3$). 62	
Figura 25 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de vB6 sobre o eletrodo descartável: (a) branco; (b) 0,20; (c) 0,39; (d) 0,58; (e) 0,77; (f) 0,95; (g) 1,13; (h) 1,31; (i) 1,48; (j) 1,65; (k) 1,82; (l) 2,0 mmol L^{-1} em solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0; $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV. (B) Curva de calibração para a vB6 ($n = 3$).....	63
Figura 26 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB6: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0; (d) 8,0; (e) 10,0; (f) 12,0; (g) 14,0 e (g) 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração ($n = 3$). 64	
Figura 27 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de cápsulas, e (c-f) amostra somado a solução padrão de vB2 de 4,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de cápsula. $f = 30$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.	66
Figura 28 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de líquido sublingual, e (c-f) amostra somado a solução padrão de vB2 de 4,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de líquido sublingual. $f = 30$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.67	
Figura 29 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB2: (a) amostra de cápsula e (b-e) amostra somado a solução padrão de vB2 de 2,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição padrão para a amostra de cápsula.	68
Figura 30 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB2: (a) amostra de líquido sublingual e (b-e) amostra somado a solução padrão de vB2 de 2,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição padrão para a amostra de líquido sublingual. ($n = 3$).	68
Figura 31 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de cápsula, e (c-e) amostra somado a solução padrão de vB6 de 0,4 a 1,2 mmol L^{-1} em solução tampão	

McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de cápsula.; $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV.	70
Figura 32 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de líquido sublingual, e (c-e) amostra somado a solução padrão de vB6 de 0,4 a 1,2 mmol L ⁻¹ em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de líquido sublingual.; $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV.	71
Figura 33 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB6: (a) amostra de cápsula e (b-d) amostra somado a solução padrão de vB6 de 4,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição padrão para a amostra de cápsula.	72
Figura 34 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB6: (a) amostra de líquido sublingual e (b-d) amostra somado a solução padrão de vB6 de 2,0 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de líquido sublingual. (n =3).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características analíticas obtidas pela curva de calibração de vB2 e estudos de repetibilidade.	60
Tabela 2 – Comparação da performance de eletrodos para a determinação de vB2 publicados na literatura.	61
Tabela 3 – Características analíticas obtidas pela curva de calibração de vB6 e estudos de repetibilidade.	63
Tabela 4 – Comparação da performance de eletrodos para a determinação de vB6 publicados na literatura.	64
Tabela 5 – Resultados obtidos para quantificação de vB2 nas amostras de cápsula e líquido sublingual pelo método voltamétrico e pelo espectrométrico.	69
Tabela 6 – Resultados obtidos para quantificação de vB6 nas amostras de cápsula e líquido sublingual pelo método voltamétrico e pelo espectrométrico.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔE_s – incremento de potencial

a – coeficiente angular

CPE – (do inglês, *carbon paste electrode*) – eletrodo de pasta de carbono

EDS – (do inglês *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) – espectroscopia de raios X por dispersão em energia

EIS – (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) – espectroscopia de impedância eletroquímica

E_p – potencial de pico

ePAD – (do inglês, *electrochemical paper-based analytical device*) – dispositivo analítico eletroquímico baseado em papel

Fe₃O₄ NPs – nanopartículas de magnetita

GCE – (do inglês, *glassy carbon electrode*) – eletrodo de carbono vítreo

I_p – corrente de pico

LOD – (do inglês, *limit of detection*) – limite de detecção

LOQ – (do inglês, *limit of quantitation*) – limite de quantificação

NDA – (do inglês *Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies*) – Painel em produtos dietéticos, nutrição e alergias

R_{ct} – (do inglês, *resistance to charge transfer*) – resistência a transferência de carga

RSD – (do inglês, *relative standard deviation*) – desvio padrão relativo

SD – (do inglês, *standard deviation*) – desvio padrão

SEM – (do inglês, *scanning electron microscopy*) – microscopia eletrônica de varredura

SPCE – (do inglês, *screen printed carbon electrode*) – eletrodo impresso de carbono

SPE – (do inglês, *screen printed electrode*) – eletrodo impresso

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

v – velocidade de variação de potencial

vB2 – vitamina B2, ou riboflavina

vB6 – vitamina B6, ou piridoxina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1	ELETRODOS IMPRESSOS	21
2.1.1	Eletrodos baseados em papel.....	24
2.1.2	Tintas condutoras	25
2.2	NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	27
2.3	VITAMINAS.....	29
2.3.1	Vitamina B2 (riboflavina).....	31
2.3.2	Vitamina B6 (piridoxina).....	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	39
4.2	PREPARAÇÃO DA TINTA CONDUTORA	39
4.3	PRODUÇÃO DOS ELETRODOS DESCARTÁVEIS	40
4.4	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	41
4.5	INSTRUMENTAÇÃO	41
4.5.1	Medidas eletroquímicas.....	41
4.5.2	Medidas de microscopia eletrônica	42
4.5.3	Medidas de espectrometria de fluorescência.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	PREPARAÇÃO DA TINTA DE GRAFITE	44
5.1.1	Otimização da proporção verniz:grafite	44
5.1.2	Otimização da quantidade de magnetita usada na modificação do eletrodo .	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA TINTA CONDUTORA	47

5.3	COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DAS VITAMINAS B2 E B6.....	48
5.4	ESTUDO DO pH E NATUREZA DO ELETRÓLITO DE SUPORTE	50
5.5	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA ELETROANALÍTICA..	53
5.5.1	Otimização dos parâmetros da técnica para a vB2	54
5.5.2	Otimização dos parâmetros da técnica para a vB6	56
5.6	CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	59
5.6.1	Curva de calibração para a vB2	59
5.6.2	Curva de calibração para a vB6.....	62
5.7	DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES	65
5.7.1	Determinação de vB2.....	65
5.7.2	Determinação de vB6.....	70
6	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido durante o período de agosto de 2019 a dezembro de 2021, durante a pandemia do novo coronavírus. Por esta razão, o projeto original não pôde ser executado na sua integralidade. Mesmo assim, métodos eletroanalítico e espectrométricos foram desenvolvidos para a determinação das vitaminas B2 e B6.

A eletroanalítica acompanha o progresso tecnológico. Assim, temos hoje um número expressivo de técnicas, materiais, eletrodos, tecnologias e etc., para uso em eletroanalítica. Isso se deve ao trabalho que os pesquisadores vêm fazendo pelo progresso científico. Neste contexto, esse trabalho se coloca na posição de respeitar o passado e continuar ideias e métodos promissores.

O trabalho se apoia nas vantagens do uso das técnicas eletroanalíticas como seu baixo custo, rapidez operacional e portabilidade dos equipamentos para o desenvolvimento de um método igualmente vantajoso. A forma com que o eletrodo selecionado (eletrodo impresso de papel e grafite) foi produzido permitiu a fácil modificação de seu material. Utilizando diferentes modificadores é possível criar sensores para diferentes objetivos de forma simples e rápida.

Uma constante preocupação na analítica é a detectabilidade e seletividade das medidas. Visando suprir essa demanda e com base na literatura estudada, o projeto utilizou nanopartículas de magnetita para aprimorar o eletrodo - uma modificação simples e que se mostrou efetiva nos testes realizados.

Com o objetivo de evitar efeitos de memória, onde a resposta analítica é alterada em virtude de uma medida anterior feita com o mesmo sensor, o eletrodo desenvolvido é descartado a cada varredura. O processo de produção é de baixo custo e gera dezenas de dispositivos por batelada, o que permite que o dispositivo seja descartável.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um eletrodo descartável impresso sobre substrato de papel produzido a base de tinta condutora de verniz e grafite e modificado com magnetita. O trabalho descreve também o uso deste dispositivo em dois métodos: um para a quantificação de vitamina B2 e outro para a quantificação de vitamina B6, ambos em amostras comerciais de suplementos alimentares.

Os analitos selecionados são necessários para o funcionamento normal do organismo humano, tornando sua quantificação essencial. As amostras comerciais de suplementos

alimentares usadas no projeto foram escolhidas de modo a tornar a determinação mais objetiva, sem necessidade de uma etapa de tratamento de amostra.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ELETRODOS IMPRESSOS

A tecnologia de impressão em tela, originada na China antiga, desde a década de 60 vem sendo usada para a impressão de circuitos eletrônicos e desde a década de 80 para fabricação de eletrodos para células solares. As primeiras aplicações analíticas surgiram a partir de meados da década de 80, com sensores de gases e desde então houve um rápido desenvolvimento da tecnologia para produção desses dispositivos analíticos (OGATA et al., 1986). Os eletrodos impressos (SPE, do inglês, *screen-printed electrode*) vêm sendo empregados na eletroanalítica para elaboração de métodos com objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade das análises (TROJANOWICZ, 2016).

Hoje, os eletrodos impressos podem ser adquiridos de forma comercial, porém, o desenvolvimento de metodologias para a fabricação desses eletrodos traz características interessantes. O baixo custo, a simplicidade na modificação, a versatilidade dos materiais e de *design*, a automação do processo para produção em massa entre outras características justificam a elaboração dessas metodologias (HAYAT; MARTY, 2014; PRADELA-FILHO et al., 2020a).

De forma geral, um SPE consiste em um substrato inerte no qual três eletrodos, incluindo o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o contra eletrodo são impressos por um método de impressão em tela. Comumente, a fabricação de SPEs é feita pela deposição de uma tinta condutora sobre um substrato sólido apropriado e o uso de uma máscara para definir o *design* e a geometria do eletrodo. Quando o eletrodo é fabricado sobre substrato de papel, se dá o nome de ePAD (do inglês, *electrochemical paper-based analytical device*) (PRADELA-FILHO et al., 2020b).

Em relação aos eletrodos sólidos usados em células eletroquímicas convencionais, os SPEs permitem a redução do volume da amostra, a portabilidade, além de tornarem a análise mais barata. Além disso, problemas comuns nos eletrodos sólidos, como a existência de efeitos de memória e a necessidade de um procedimento de limpeza e renovação da superfície, podem ser solucionados com o uso de SPEs descartáveis. Assim, para análises *on-site*, se vê necessário abandonar as células eletroquímicas convencionais e explorar o desenvolvimento de dispositivos portáteis (HAYAT; MARTY, 2014).

Os SPEs podem ser modificados facilmente para suprir as necessidades da análise. Adicionando as substâncias modificadoras diretamente à tinta é possível alterar o eletrodo em batelada. Mas também é possível modificar o eletrodo por deposição eletroquímica ou por *drop-coating* (ANTUÑA-JIMÉNEZ et al., 2020). Um exemplo de modificação é a adição de nanopartículas metálicas permitindo que o eletrodo exiba características como alta área superficial e melhor condutividade elétrica. Dessa forma, a modificação do SPE leva a uma velocidade de transferência eletrônica mais favorável e maior sensibilidade na detecção (BEITOLLAHI et al., 2020).

Os SPEs têm sido utilizados como sensores portáteis, como por exemplo, em análises ambientais, de controle de qualidade, determinando analitos como metais tóxicos, poluentes orgânicos dentre outros.

Smith *et al.* produziram um sensor eletroquímico baseado em papel capaz de determinar Cd(II) e Pb(II) em amostras de água de torneira fortificada. O método de fabricação consiste em aplicação de camadas de cera e tinta de carbono e de Ag/AgCl, usando uma impressora de cera e uma impressora de tinta sólida em folhas para fotografia e folhas usadas em cromatografia. Os autores determinaram um LOD de 20,4 e 52,8 ppb para Pb(II) e Cd(II), respectivamente (SMITH et al., 2019).

Sensores eletroquímicos com base em papel impressos com nanotubos de carbono foram desenvolvidos por da Costa *et al.* para a determinação de Fe²⁺ e dopamina. Para a produção dos eletrodos, primeiro uma tinta de nanotubos de carbono era impressa diretamente sobre o papel, formando uma rede condutora. Uma barreira hidrofóbica era adicionada para limitar a área do eletrodo. Esse procedimento permitiu a produção de um sensor eletroquímico simples e efetivo. A faixa linear para a curva de calibração para o Fe²⁺ foi de 10 a 200 μmol L⁻¹ e para a dopamina de 10 a 100 μmol L⁻¹ (DA COSTA et al., 2015).

Nantaphol, Chailapakul e Siangproh desenvolveram um dispositivo a base de papel para a determinação de colesterol. O eletrodo de referência e o contra eletrodo foram impressos sobre papel e uma impressora de cera foi usada para limitar a área do eletrodo. Com a ajuda de uma fita adesiva, esse conjunto foi colado ao eletrodo de trabalho, um eletrodo de diamante dopado com boro modificado com nanopartículas de prata. A faixa linear para a curva de calibração foi de 0,39 mg dL⁻¹ a 270,69 mg dL⁻¹, com limite de detecção de 0,25 mg dL⁻¹ (NANTAPHOL; CHAILAPAKUL; SIANGPROH, 2015).

Foi desenvolvido um sensor eletroquímico a base de papel para a detecção *on site* de bisfenol A por Jammeli *et al.* A área do eletrodo foi delimitada usando cera, aplicada por uma

impressora apropriada. Os três eletrodos convencionais foram impressos em papel por uma impressora de tela, onde o eletrodo de referência foi impresso usando uma tinta de Ag/AgCl para a primeira camada e a segunda, negro de fumo. Os outros dois eletrodos foram impressos usando uma tinta de negro de fumo. A tinta foi fabricada misturando uma tinta comercial baseada em grafite e negro de fumo. Duas faixas lineares foram determinadas pelos autores: de 0,1 a 0,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção foi de 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (JEMMELI et al., 2020).

Govindasamy *et al.* produziram um SPE modificado com nanofitas de óxido de grafeno (do inglês, *graphene oxide nanoribbons*) para a determinação sensível de metil paration. Para a modificação, depois de realizar ciclos entre $-1,0$ e $+1,2$ V em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , (pH = 7) e preanodizar aplicando $+2,0$ V por 300 s na mesma solução, adicionou-se uma dispersão de 5 μL das nanofitas de óxido de grafeno na superfície do eletrodo, deixando secar em temperatura ambiente. Em seguida 2,0 μL de nafion 0,5% foram depositados na superfície do eletrodo. A faixa linear alcançada usando esse eletrodo foi de 100 nmol L^{-1} a 100 mmol L^{-1} , com limite de detecção de 0,5 nmol L^{-1} , sendo aplicado com sucesso na determinação em amostras de brócolis, tangerina, tomate e beterraba (GOVINDASAMY et al., 2017).

Jirasirichote *et al.* fabricaram um SPE usando óxido de grafeno e nanopartículas de ouro para a determinação de carbofurano, um pesticida do grupo dos carbamatos. A faixa linear obtida foi de 1 até 250 mmol L^{-1} usando a técnica de voltametria de pulso diferencial e obtendo limites de detecção e de quantificação de 0,22 e 0,72 mmol L^{-1} , respectivamente. Os eletrodos impressos foram fabricados por técnica de impressão em tela sobre substrato de policloreto de vinila. Uma pasta de Ag/AgCl foi impressa em tela sobre o PVC para formar o eletrodo de referência e então seco a 55 °C por uma hora. Uma mistura de óxido de grafite e pasta de carbono foi impressa em tela sobre o PVC seco para formar os eletrodos de trabalho e contra eletrodo, e foram também aquecidos a 55 °C por uma hora. O eletrodo foi modificado com nanopartículas de ouro por *drop casting* e o eletrodo foi deixado secar a temperatura ambiente (JIRASIRICHOTE et al., 2017).

Pradela-Filho *et al.* produziram sensores eletroquímicos descartáveis em substrato de papel ou PET. Os eletrodos foram preparados com uma mistura de verniz e pó de grafite. Para o eletrodo feito em papel, a detecção de dopamina foi realizada na faixa linear de 15 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 4,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; na determinação de catecol, os autores obtiveram a faixa linear de 10 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na

determinação de hidroquinona, os autores obtiveram a faixa linear de 10 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 5,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para o estriol, o eletrodo foi aplicado com faixa linear de 0,1 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (PRADELA-FILHO et al., 2020a).

Um dispositivo eletroquímico foi desenvolvido por Freitas *et al.* para a determinação de melatonina em amostras biológicas. O dispositivo produzido era composto por um eletrodo autoadesivo baseado em uma mistura de verniz e grafite como material condutor impresso sobre PET. A faixa linear obtida pelos autores foi de 10,0 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados mostraram uma aplicação válida do dispositivo para a determinação de melatonina em amostras biológicas (FREITAS et al., 2021).

Khairy *et al.* usaram um SPE modificado com nanoplaquetas de óxido de níquel (NiO) para a quantificação de paration. A faixa linear obtida com o NiO-SPE foi de 0,1 a 30 mmol L^{-1} , com limite de detecção de 0,024 mmol L^{-1} . A técnica eletroanalítica utilizada foi a voltametria de pulso diferencial, em que o paration foi detectado usando NiO-SPE em $-1,0\text{ V}$ (*vs.* Ag/AgCl). O eletrodo impresso foi fabricado com impressora de impressão em tela usando um estêncil apropriado. (KHAIRY; AYOUB; BANKS, 2018).

Recentemente, diversos artigos de revisão foram publicados referenciando trabalhos envolvendo sensores eletroquímicos baseados em papel. Lee *et al.* publicaram um artigo de revisão mostrando a fabricação e *design* de biosensores eletroquímicos e suas aplicações (LEE et al., 2018). Noviana *et al.* publicaram um artigo revisando dispositivos analíticos baseados em papel para determinação de drogas. Os autores incluem também a fabricação e aplicação de eletrodos para análises eletroquímicas (NOVIANA et al., 2020). Uma revisão reuniu uma série de trabalhos envolvendo sensores eletroquímicos baseados em papel dobrável. Colozza *et al.* revisaram trabalhos envolvendo esses biosensores nas mais diversas matrizes, como soro sanguíneo, urina, amostras farmacêuticas, saliva etc. (COLOZZA et al., 2021). Gebretsadik *et al.* publicaram um artigo de revisão mostrando as formas de fabricação e aplicação de sensores eletroquímicos para diagnóstico clínico, controle de qualidade alimentício e monitoramento ambiental (GEBRETSADIK et al., 2019).

2.1.1 Eletrodos baseados em papel

O papel é um dos substratos mais comuns em dispositivos microfluídicos em razão da sua porosidade, taxa de absorção de líquidos e afinidade das fibras por diferentes analitos.

Outras características envolvem seu baixo custo e a produção em larga escala. O primeiro dispositivo de diagnóstico baseado em papel comercializado foi desenvolvido nos anos 50 para a detecção semiquantitativa de glicose na urina. A motivação inicial para o desenvolvimento de novos dispositivos para diagnóstico baseados em papel era prover baixo custo, descartabilidade e facilidade de uso para pessoas vivendo em áreas afastadas (LEE et al., 2018; NILGHAZ et al., 2016).

Os sensores eletroquímicos de papel foram feitos inicialmente em 2D, ou seja, permitindo a determinação do analito em um único recipiente. Com a passar do tempo, sensores com *design* 3D foram sendo criados, permitindo operações mais complexas. A diferença principal entre os sensores 2D e 3D se dá pela forma que os eletrodos estão dispostos: em um sensor 2D, os três eletrodos convencionais são fabricados em um único pedaço de papel, comumente com uma zona circular hidrofóbica, enquanto os sensores 3D apresentam configuração de origami, dobrando o papel, onde um eletrodo pode ser construído em um segmento do papel diferente dos outros (KILLARD, 2017; LEE et al., 2018).

A vantagem de um sensor 3D sobre o 2D é sua homogeneidade na dispersão sobre o papel, a qual permite que as espécies se movimentem livremente na vertical e na horizontal, ocupando toda a superfície do papel. O 2D leva vantagem quanto a facilidade de fabricação e de operação (LIU; SU; DING, 2016).

2.1.2 Tintas condutoras

Segundo a norma brasileira, NBR 15156, tinta é “produto líquido, pastoso ou em pó, com propriedades de formar película após secagem ou cura, composto por uma mistura formada de resinas, pigmentos, solventes, cargas e aditivos.” Ou seja, para ser considerada uma tinta, é necessário que o produto seja uma mistura de uma (1) resina, que se trata de um veículo ligante não volátil que confere à tinta coesão e adesão; (2) pigmentos, componente sólido finamente dividido, que tem como principais finalidades conferir cor, opacidade e propriedades anticorrosivas; (3) solvente, que tem a finalidade de solubilizar o veículo e ajustar a viscosidade para aplicação; e (4) cargas e aditivos, sólidos finamente divididos, utilizados com a finalidade, entre outras, de conferir propriedades específicas à película (ABNT, 2004).

Na linha do tempo, antes do carbono ser usado para formar eletrodos impressos, foram feitas tentativas de usá-lo na polarografia como eletrodo gotejante de carbono para uso

em faixas de potenciais nas quais o eletrodo de mercúrio não era efetivo. Como resultado dessas tentativas, Ralph Norman Adams, em 1958, propôs o eletrodo de pasta de carbono, formado a partir de grafite e óleo mineral (ADAMS, 1958). A grande vantagem em relação aos tubos de grafite se mostrava na versatilidade de se adicionar outros compostos à pasta de carbono, gerando modificações apropriadas para diferentes análises. Desde 1958 até hoje, a pasta de carbono tem se tornado o material mais popular para a preparação de eletrodos, sensores e detectores. Tal posição se deve às características físico-químicas e eletroquímicas do substrato de carbono (ŠVANCARA et al., 2009).

Da pasta de carbono à tinta de carbono, houve a necessidade de se descentralizar as análises químicas do laboratório, justificada por exemplo pelo seu uso na análise de poluentes em ambientes naturais e rápido diagnóstico em hospitais. Dessa forma, as tintas condutoras foram elaboradas em conjunto com os SPEs.

Recentemente, diversos trabalhos foram publicados na literatura descrevendo a produção de tintas condutoras com objetivo de fabricação de eletrodos descartáveis. Orzari *et al.* desenvolveram um dispositivo de papel para detecção de dopamina, serotonina e glicose por eletroquímica. O trabalho relata a preparação da tinta condutora pela mistura em centrífuga assimétrica de pó de grafite e verniz automotivo (ORZARI et al., 2019).

Kant *et al.* produziram uma tinta de nanopartículas de prata para produção de eletrodos em papel para aplicação em eletroquímica. Os autores testaram diferentes solventes para diluição das nanopartículas de prata estabilizadas em polivinil pirrolidona (PVP). A tinta foi usada para imprimir em papel de fotografia usando uma impressora de escritório. O eletrodo foi explorado como contraeletrodo com a sonda redox $K_3[Fe(CN)_6]$ por voltametria cíclica. Os autores também demonstraram o seu uso como eletrodo de trabalho na determinação de nitrato (KANT et al., 2020).

Moço *et al.* descrevem o desenvolvimento de uma tinta condutora de carbono e outra de prata para a produção de eletrodos em vinil para a detecção do RNA do HIV. O eletrodo de referência foi produzido pela aplicação da tinta de prata sobre o plástico e os eletrodos de trabalho e contraeletrodo foram produzidos com a tinta de carbono. A tinta de carbono foi modificada com 4-aminotiofenol e nanopartículas de ouro. Para determinar o design dos eletrodos, uma máscara adesiva foi colada no vinil antes da aplicação das tintas (MOÇO et al., 2021).

Uma revisão recente descreve sensores eletroquímicos impressos a partir de tintas condutoras. Os autores Moya *et al.* reúnem uma série de artigos que descrevem o uso de tintas

distintas, como tintas de nanotubos de carbono, polianilina, prata, politiofeno tetraetilenoglicol, ouro, grafeno entre outros (MOYA et al., 2017).

2.2 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Dentro da nanotecnologia, os materiais são partículas e interfaces com dimensões na ordem de 1 a 100 nanômetros. Esse mundo tem fascinado estudiosos no último século, especialmente no desenvolvimento de novos materiais para modificação de eletrodos, justificado pela melhor performance que esses dispositivos exibem (MERKOÇI, 2007; WANG; HU, 2009).

A importância dos nanomateriais na eletroquímica se justifica pelas suas propriedades específicas que são exibidas em escala nanométrica, porém não necessariamente são apresentadas pelo material macroscópico de origem. Essas propriedades incluem elevada área superficial, alta seletividade, atividade catalítica e propriedades ópticas únicas (CAMPBELL; COMPTON, 2010).

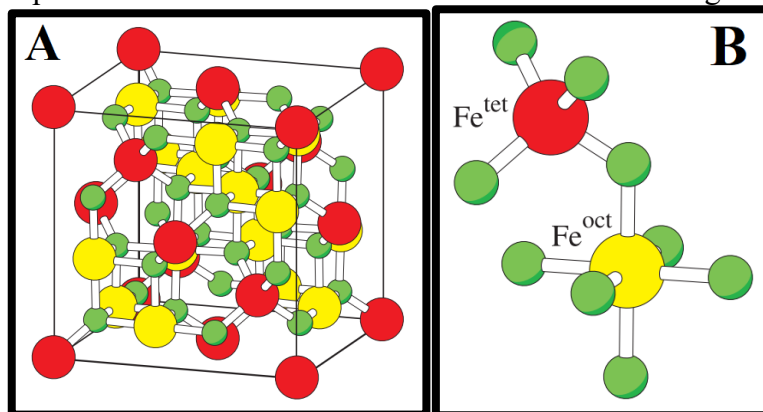
Uma das áreas de maior atuação das nanopartículas é na eletrocatalise; campo da catalise que envolve reações de transferência eletrônica na interface entre um catalisador e um eletrólito. Essa área é especialmente importante no desenvolvimento de células de combustível e baterias, métodos eletrossintéticos e, também, em sensores na química eletroanalítica (KLEIJN et al., 2014).

Entre os materiais utilizados para modificação de eletrodos, as nanopartículas metálicas se encontram entre os mais comuns (HERNÁNDEZ-SANTOS; GONZÁLEZ-GARCÍA; GARCÍA, 2002). Nanomateriais magnéticos exibem propriedades magnéticas diferenciadas, como o superparamagnetismo e alta suscetibilidade magnética. Além destas características, as nanopartículas magnéticas apresentam ainda alta área superficial, baixa toxicidade, biocompatibilidade e fácil separação sob campos magnéticos (XU et al., 2014).

As nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 NPs), chamadas de magnetita, são as nanopartículas metálicas mais populares. Isso porque esse nanomaterial apresenta uma série de características interessantes para aplicações industriais, comerciais e até na bioengenharia. São aplicadas também na biomedicina, agricultura e meio ambiente (ALI et al., 2016).

A magnetita é formada por Fe(II) e Fe(III), ou $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, que possui uma estrutura cúbica de face centrada e pertence ao grupo do espinélio inverso, com os átomos de ferro ocupando os sítios tetraédricos e octaédricos, conforme a Figura 1.

Figura 1 – (A) Estrutura espinélio cúbica de face centrada da magnetita. (B) Ampliação de um octaedro e um tetraedro adjacente compartilhando um átomo de oxigênio. As esferas maiores identificadas por Fe^{tet} e Fe^{oct} representam átomos de ferro em arranjo tetraédrico e octaédrico, respectivamente. Esferas menores são os átomos de oxigênio.



Fonte: Adaptado de FRIÁK, SCHINDLMAYR e SCHEFFLER, 2007.

A temperatura ambiente, os íons Fe^{2+} ocupam metade dos sítios octaédricos, enquanto que os íons Fe^{3+} estão igualmente divididos entre os sítios octaédricos restantes e tetraédricos. O posicionamento antiparalelo dos spins dos elétrons de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} e as diferentes intensidades dos momentos magnéticos fazem com que haja um fraco momento magnético resultante, o que ocasiona um magnetismo permanente nas partículas de Fe_3O_4 , classificando-as como ferrimagnéticas (ALI et al., 2016; S.F. HASANY et al., 2013).

Alguns trabalhos utilizando nanopartículas de magnetita como modificador em eletrodos já foram publicados em nosso grupo de pesquisa. Piovesan e colaboradores (2018) empregaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de magnetita dispersas em quitosana como um sensor eletroquímico para a determinação de paration em amostras alimentícias por voltametria de onda quadrada. Os autores obtiveram uma faixa linear de 0,34 a 4,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação de 0,187 e 0,567 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Foi concluído que a presença das nanopartículas de magnetita levou a uma menor resistência interfacial, explicada pelo seu efeito eletrocatalítico (PIOVESAN et al., 2018).

Da Silveira, Piovesan e Spinelli (2017) usaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de magnetita na detecção voltamétrica de estriol. A curva de calibração obtida mostrou boa linearidade de 0,86 a 32,0 ppm, com limites de detecção e quantificação de 0,79 e 2,41 ppm, respectivamente. O eletrodo foi aplicado com sucesso na análise de amostras farmacêuticas e de urina simulada. Os autores reportaram que, com o uso do eletrodo modificado, houve um aumento de quatro vezes na corrente de pico anódico para

o estriol em relação ao eletrodo não modificado (DA SILVEIRA; PIOVESAN; SPINELLI, 2017).

Ainda em nosso grupo de pesquisa, Santana *et al.* (2017) modificaram um eletrodo de carbono vítreo com um filme de nanopartículas de magnetita sobre um filme de nanopartículas de ouro ambas estabilizadas em cloreto de 4-picolinum silsesquioxano para a detecção de bisfenol A. A faixa linear obtida pelos autores foi de 20 a 1400 nmol L⁻¹, com limite de detecção de 7,0 nmol L⁻¹. O eletrodo foi usado com sucesso na determinação de bisfenol A em amostras de plástico comercial. Os autores associam o aumento da corrente anódica a maior área superficial do eletrodo modificado e a boa condutividade elétrica promovida pelas nanopartículas metálicas (SANTANA *et al.*, 2017).

Moreira, Maranhão e Spinelli (2018) desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de magnetita e o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazol para a determinação de estrona por voltametria de onda quadrada. Duas faixas lineares foram obtidas: de 4,0 a 9,0 e de 9,0 a 100,0 μmol L⁻¹. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,47 e 4,0 μmol L⁻¹, respectivamente. O eletrodo modificado foi aplicado com sucesso na determinação de estrona em amostras de carne suína. A modificação melhorou as propriedades do eletrodo de pasta de carbono, aumentando a sensibilidade e favorecendo aspectos termodinâmicos da reação da estrona (MOREIRA; DE ANDRADE MARANHÃO; SPINELLI, 2018).

Além disso, é descrito na literatura uma série de trabalhos envolvendo o aumento do sinal eletroquímico pela modificação de eletrodos por magnetita. George, Antony e Mathew descrevem o uso de nanopartículas metálicas na modificação de sensores e biosensores. Os autores justificam seu uso na modificação de eletrodos pela alta condutividade desse material e aumento na área superficial do eletrodo (GEORGE; ANTONY; MATHEW, 2018). Ahmadi *et al.* descrevem a aplicação de nanopartículas magnéticas em métodos eletroanalíticos. Segundo os autores, a modificação com nanopartículas de magnetita fornecem uma grande área superficial para capturar analitos de forma seletiva (AHMADI *et al.*, 2021).

2.3 VITAMINAS

O termo vitamina foi proposto em 1912 pelo bioquímico polonês Casimir Funk, quando sugeriu que os micronutrientes encontrados nos alimentos que preveniam diversas doenças eram aminas. Hoje, o termo vitamina é usado para designar compostos químicos

essenciais em pequenas quantidades para o funcionamento normal do metabolismo. A grande maioria das vitaminas não é sintetizada pelo corpo e elas devem ser obtidas a partir da dieta. A deficiência de vitaminas é motivo de uma série de problemas de saúde (BRUNETTI, 2016).

Hoje em dia, são reconhecidas 13 vitaminas na nutrição humana. As vitaminas hidrossolúveis são a vitamina C e as oito vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 e B12). As vitaminas lipossolúveis são A, D, E e K. Muitas vitaminas não têm uma estrutura química específica, mas são formadas por grupos, chamados de vitâmeros (LOVANDER et al., 2018).

Várias vitaminas do grupo B são coenzimas para enzimas que funcionam no catabolismo para a produção de energia para o organismo. A deficiência clínica dessas vitaminas resulta num defeito bioquímico, que se manifesta como uma doença com sintomas característicos. Outras vitaminas não possuem sintomas tão acentuados. A suplementação vitamínica pode beneficiar alguns indivíduos, evidenciando que alguma deficiência poderia existir (GEORGE F. M. BALL, 2006).

As causas da deficiência nutricional vitamínica são várias: ingestão inadequada, absorção pobre, utilização inadequada, aumento da necessidade, aumento da excreção e aumento do catabolismo. A capacidade de armazenamento das vitaminas é também um fator; algumas vitaminas podem estar armazenadas por semanas e outras até por anos (GEORGE F. M. BALL, 2006).

O mercado mundial de suplementos e vitaminas é de quase 110 bilhões de dólares. No Brasil, de janeiro a novembro de 2019 e para o mesmo período de 2020, a venda de vitaminas teve um crescimento de 66% no faturamento. Este crescimento pode ser explicado pela preocupação quanto à imunidade, relacionada à pandemia do novo coronavírus (KILYOS, 2020; GUIA DA FARMÁCIA, 2021).

Com um mercado crescente, a busca por novas metodologias para a determinação de vitaminas se vê fundamental. Mesmo que os métodos empregados hoje tenham uma sensibilidade alta, aspectos como velocidade, custo e portabilidade são mais interessantes nas partes comercial e industrial. É nessa lacuna que os métodos eletroanalíticos, especificamente usando SPEs, se destacam e têm sua popularidade justificada.

Em nosso grupo de pesquisa, alguns trabalhos foram publicados envolvendo o tema vitaminas. Em um trabalho (2020), desenvolvemos uma estratégia para determinação de vitamina B12 com um eletrodo de diamante dopado com boro. A faixa linear foi de 0,25 a 5,0

$\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $86,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Foi determinada vitamina B12 em amostras de pasta de dente e de suplementos (PEREIRA et al., 2020).

Sá e colaboradores (2015) desenvolveram uma metodologia para a determinação de vB2 usando eletrodos de filme de bismuto. A curva de calibração obtida por voltametria de onda quadrada de redissolução adsortiva exibiu comportamento linear de $0,3$ a $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $1,0$ a $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a vB2, com limites de detecção de 100 nmol L^{-1} . Os autores aplicaram com sucesso o eletrodo na determinação de vB2 em produtos farmacêuticos (SÁ et al., 2015).

Kreft, de Braga e Spinelli (2012) estudaram a eletroquímica da vitamina B12 sobre a superfície do eletrodo de filme de bismuto. A faixa linear obtida pelos autores foi de $0,100$ a $1,000 \mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $33,0 \text{ nmol L}^{-1}$. O eletrodo foi usado com sucesso na determinação de vitamina B2 em amostras farmacêuticas (KREFT; DE BRAGA; SPINELLI, 2012).

2.3.1 Vitamina B2 (riboflavina)

A riboflavina (6,7-dimetil-9-(D-1-ribitol)-isoaloxazina), também conhecida como vitamina B2 (vB2), é uma vitamina do complexo B solúvel em água fundamental no metabolismo de aminoácidos. Na dieta, está presente naturalmente como riboflavina livre e, principalmente, nas suas formas biologicamente ativas, a mononucleótido de flavina (do inglês, *flavin mononucleotide*, FMN) e a dinucleótido de flavina-adenina (do inglês, *flavin adenine dinucleotide*, FAD). A vB2 pode ser encontrada em uma grande variedade de alimentos, como carnes, leite, ovos, peixes, nozes, certas frutas e verduras, cogumelos, queijos e etc (HUANG et al., 2021; STANKOVIĆ et al., 2016; SUWANNASOM et al., 2020; TURCK et al., 2017).

Sua deficiência, arriboflavinose, é normalmente acompanhada de outras deficiências nutricionais. Os sintomas em humanos não são específicos e incluem: dor de garganta, hiperemia e edema das membranas faríngea e da mucosa oral, queilite, glossodínia, dermatite seborreia e lesões na pele. Nenhum efeito adverso pelo consumo excessivo de vB2 em alimentos ou suplementos foi reportado (TURCK et al., 2017).

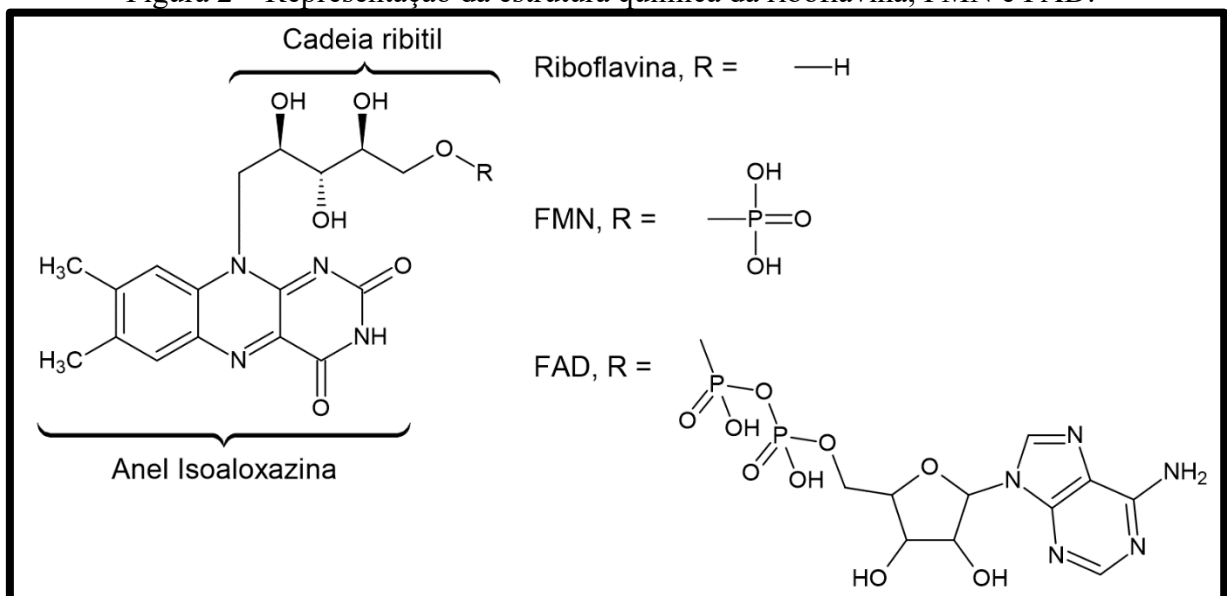
O consumo médio diário recomendado de vB2 definido pelo Painel em Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias (NDA, do inglês *Panel on Dietetic Products, Nutrition and*

Allergies) é de 1,3 mg para adultos, sendo que para mulheres grávidas, a recomendação é de 1,6 mg durante a gestação e 1,8 mg durante a lactação (TURCK et al., 2017).

Por ser formada pelo anel isoaloxazina, ela é classificada como uma flavina. A vB2 é a forma biologicamente disponível de flavinas. As flavinas estão envolvidas em um grande número de fenômenos biológicos. Elas são parte principal no metabolismo aeróbico através da catálise de dehidrogenações de dois elétrons de vários substratos e participa na transferência de um elétron de diversos centros metálicos através de seus estados de radicais livres (MASSEY, 2000).

Como outras flavinas, o anel isoaloxazina presente na estrutura química da vB2, conforme mostrado na Figura 2 é responsável pela sua fluorescência e propriedades redox. O processo redox da flavina é termodinamicamente reversível e na riboflavina estão envolvidos dois elétrons no seu mecanismo eletroquímico (SÁ et al., 2015).

Figura 2 – Representação da estrutura química da riboflavina, FMN e FAD.

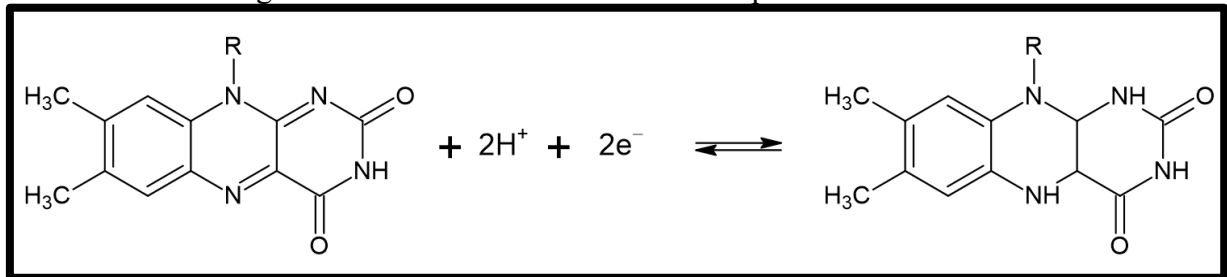


Fonte: Adaptado de Massey, 2000.

A vB2 tem a capacidade de participar de reações químicas com transferência de dois ou de um elétron. Na maior parte das vezes, ela é reduzida, processo que pode ocorrer de duas maneiras. Na primeira, através da transferência de dois elétrons por um substrato que é hidrogenado, gerando uma flavina reduzida. A flavina pode então ser reoxidada por outro substrato. A segunda maneira é através da transferência um elétron, com a geração de um intermediário semiquinona (QIJIN et al., 2001; SÁ et al., 2015; SOUZA et al., 2005).

Os estudos eletroquímicos envolvendo flavinas em meio aquoso tamponado indicaram que a redução ocorre em uma etapa. Nessa etapa, são transferidos dois prótons e dois elétrons, como mostrado na Figura 3, num processo voltamétrico observável e de interesse analítico (MASSEY, 2000).

Figura 3 – Processo redox envolvendo a parte isoaloxazina.



Fonte: Adaptado de Qijin *et. al.*, 2001.

Um estudo de revisão recente reúne uma série de trabalhos de distintos autores com a finalidade de detecção de riboflavina em amostras farmacêuticas, alimentares, fluidos biológicos e multivitamínicos. São relatados trabalhos utilizando cromatografia líquida de alta performance com detecção por espectrometria de massa, espectrofotometria, espectrofluorimetria. Também são mencionados trabalhos utilizando polarografia, eletroforese, ensaio enzimático e ensaios biológicos (GUL *et al.*, 2014).

O eletrodo de pasta de carbono foi utilizado como substrato por diversos trabalhos, incluindo a modificação do eletrodo com lauril sulfato de sódio usando o pico de oxidação (TIGARI *et al.*, 2019); zeólito de Co²⁺-Y usando o pico de oxidação (NEZAMZADEH-EJHIEH; POULADSAZ, 2014); tetrafenilporfirina de manganês(III) usando o pico de redução (KHALOO *et al.*, 2016); dióxido de manganês usando o pico de oxidação (MEHMETI *et al.*, 2016) e líquido iônico usando o pico de oxidação (ZAREI, EBRAHIM, MOHAMMAD REZA JAMALI, 2018).

Muitos trabalhos utilizam eletrodo de carbono vítreo como substrato, sendo relatados eletrodos modificados para determinação de vB2 baseados em dopagem com filmes de poli(3,4-etilenodioxítiofeno)(PEDOT) usando o pico de oxidação (NIE *et al.*, 2013); nanotubos de politiofeno usando o pico de oxidação (HAJIAN *et al.*, 2014); metalosilicatos nanocristalinos usando o pico de oxidação (KAUR; SRIVASTAVA, 2014); grafeno usando o pico de redução (BAGOJI; NANDIBEWOR, 2016); nanocompósito de hexacianoferrato com óxido de zinco e manganês usando o pico de oxidação (SELVARAJAN; SUGANTHI;

RAJARAJAN, 2018); nanocompósito de óxido de grafeno com óxido de estanho usando o pico de oxidação (SRIRAMPRAHA et al., 2018) e nanopartículas de ouro distribuídas em malha orgânica de melamina usando o pico de redução (ARUL et al., 2021).

Westmacott e colaboradores desenvolveram um método para a determinação simultânea de vitamina B1, B2 e B6 usando um eletrodo impresso de carbono não modificado. As faixas lineares obtidas foram de 15 a 110 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os limites de detecção foram de 3,5, 0,1, 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a vitamina B1, vB2 e vB6, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso na determinação das três vitaminas em produtos farmacêuticos (WESTMACOTT et al., 2018).

Zribi e colaboradores prepararam um compósito híbrido baseado em uma matriz de carbono funcionalizada em flocos de sulfeto de molibdênio e óxido de molibdênio e aplicaram na modificação de um eletrodo impresso de carbono. A faixa linear obtida pelos autores foi de 2 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e seu limite de detecção foi de 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

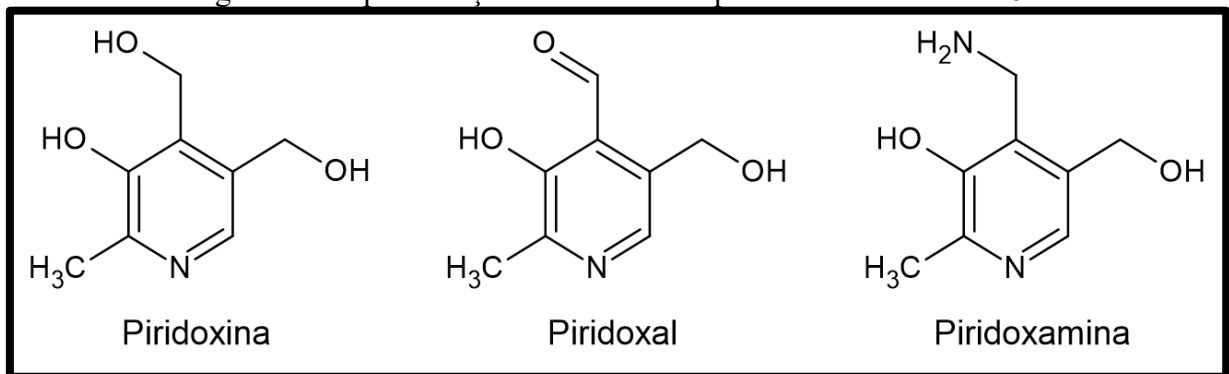
Outros trabalhos envolvendo sensores eletroquímicos para a determinação de vB2 podem ser encontrados na recente revisão realizada por Cioates (2020) (NEGUT CIOATES, 2020).

2.3.2 Vitamina B6 (piridoxina)

A vitamina B6 é representada por seis estruturas que se convertem entre si. A piridoxina (4,5-Bis(hidroximetil)-2-metilpiridin-3-ol) foi a primeira a ser descoberta e as outras estruturas incluem a piridoxamina e o piridoxal, onde o CH_2OH na posição 4 da piridoxina é trocado por CH_2NH_2 ou $\text{C}=\text{O}$, como mostrado na Figura 4. As outras formas são as formas fosforiladas, que são metabolicamente ativas. Elas agem como cofatores de enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, reações de um carbono, glicogenólise e gluconeogênese, síntese do grupo heme, formação de niacina, e também no metabolismo de lipídeos, síntese de neurotransmissores e ação hormonal (BRESSION et al., 2016; LOVANDER et al., 2018).

Neste trabalho, a piridoxina será referida como vitamina B6 (vB6). Ela é essencial ao organismo e, assim como seus vitâmeros, sendo encontrada em uma variedade de alimentos, como carne vermelha, frango, peixe, legumes, banana, nozes e cereais (CALDERÓN-OSPINA; NAVA-MESA, 2020; VROLIJK et al., 2017).

Figura 4 – Representação das estruturas químicas da vitamina B6.



Fonte: Adaptado de Hernández, Ribero e Goicoechea, 2003.

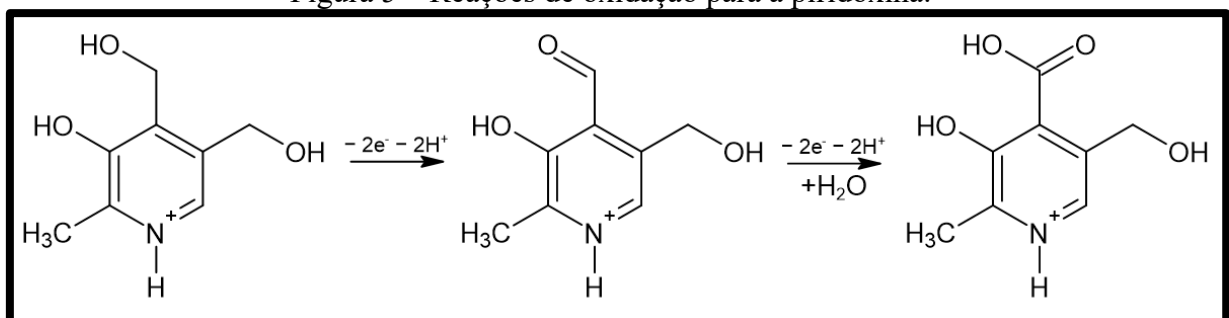
Os sintomas associados a deficiência de vitamina B6 incluem eczema, dermatite seborreica, quilose, glossite, estomatite angular, anemia microcítica hipocrômica, hiperirritabilidade e crises convulsivas. Porém, os sintomas mais comuns para sua deficiência são anemia e problemas neurológicos (BRESSION et al., 2016).

Uma toxicidade severa associada a vB6 é considerada em doses acima de 500 mg dia⁻¹, e sintomas neurológicos fracos podem ser observados em doses acima de 100 mg dia⁻¹ se ocorrer por longos períodos (BRESSION et al., 2016).

O consumo diário médio recomendado de vB6 pelo NDA é de 1,7 mg para homens adultos e 1,6 mg para mulheres adultas. Durante a gravidez, a recomendação do consumo aumenta para 1,8 mg e durante a lactação para 1,7 mg (BRESSION et al., 2016).

Em meio aquoso, a oxidação da piridoxina ocorre em duas etapas: na primeira etapa há a formação do aldeído (piridoxal) e na etapa final há a formação do ácido carboxílico (ácido 4-piridoxílico), como mostrado na Figura 5. Em cada etapa, estão envolvidos dois elétrons e dois prótons (GONZALEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011; HERNÁNDEZ; RIBERO; GOICOECHEA, 2003; PORTO et al., 2019).

Figura 5 – Reações de oxidação para a piridoxina.



Adaptado de Hernández, Ribero e Goicoechea, 2003.

Na literatura, são relatados diversos métodos para a detecção de vB6 em amostras farmacêuticas e fluídos biológicos, principalmente por espectrofotometria (IBRAHIM et al., 2017), espectrometria de massa (NÚEZ-VERGARA et al., 2001), espectrofluorimetria (GARCÍA et al., 2001), muitas vezes acoplados a cromatografia gasosa (NÚEZ-VERGARA et al., 2001) ou cromatografia líquida de alta performance (DINÇ; KÖKDİL; ONUR, 2000; HASHEM; EL-SAYED, 2018). Também foram reportados métodos por eletroforese capilar (CHEN et al., 2000; RIBEIRO et al., 2016) e quimiluminescência (ALWARTHAN; A. ALY, 1998).

É possível encontrar trabalhos utilizando eletrodos de pasta de carbono modificados na determinação de vB6 pelo pico de oxidação. As modificações incluem a incorporação de complexo de vanadil(IV)-Salen (TEIXEIRA et al., 2004), nanotubos de carbono modificados com filme de poli(arginina) (TIGARI; MANJUNATHA, 2019), éteres coroa (DESAI; KOTKAR; SRIVASTAVA, 2008), nanoestruturas de ouro (MOTAGHEDIFARD et al., 2016) e hexacianoferrato de cobalto(II) (MEKONNEN et al., 2014).

Utilizando o substrato de carbono vítreo, diversos autores descrevem a determinação de vB6 pelo pico de oxidação. As modificações do eletrodo incluem nanotubos de carbono de paredes múltiplas (QU; WU; HU, 2004), 4,4'-diaminobenzofenona (TABANLIGIL CALAM, 2021), nafion (FARAG et al., 2019) e filme de poli(azul de metileno)(TAN; ZIE; YAO, 2004) (HERNÁNDEZ; RIBERO; GOICOECHEA, 2003).

Outros trabalhos incluindo diferentes eletrodos podem ser encontrados na literatura. A determinação de vB6 em amostras de suplementos, produtos farmacêuticos e urina foi feita utilizando eletrodo de diamante dopado com boro não modificado (KUZMANOVIĆ et al., 2016) e com pré-tratamento catódico (ALPAR et al., 2017), ambos pelo pico de oxidação.

Uma recente revisão traz uma série de trabalhos para a detecção de vB6 utilizando sensores eletroquímicos com nanomateriais incorporados. São abordados diversos tipos de nanomateriais usados na fabricação de sensores, incluindo nanopartículas de óxidos, nanotubos de carbono, grafenos e etc. Dentre as diversas técnicas voltamétricas estudadas, a voltametria de onda quadrada mostrou uma larga faixa de concentração para se trabalhar. Os autores também ressaltam que, por se tratar de uma biomolécula, o desenvolvimento de sensores descartáveis e miniaturizados para a determinação de vB6 está em alta demanda (SANTHY et al., 2020).

Beitollahi e Garkani Nejad determinaram vB6 utilizando um eletrodo impresso de carbono modificado com nanocompósito de óxido de grafeno com magnetita funcionalizada

em óxido de silício. A faixa linear obtida pelos autores foi de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,90 \text{ mmol L}^{-1}$, com limite de detecção de $0,52 \mu\text{mol L}^{-1}$ por voltametria de pulso diferencial pelos picos de oxidação. Os autores determinaram com sucesso a nível traço vB6 em amostras biológicas (BEITOLLAHI; GARKANI NEJAD, 2018).

Nejad e colaboradores desenvolveram eletrodos impressos de grafite modificados com nanoflores de Co(II,III) dopados com íons de lantânio para a determinação de vB6 pelos picos de oxidação. A faixa linear obtida no estudo foi de $1,0$ a $600 \mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados satisfatórios foram obtidos quando o eletrodo foi aplicado em amostras de urina (NEJAD et al., 2019).

Um método para detecção de vB6 baseado em eletrodos descartáveis impressos foi desenvolvido por Brunetti e Desimoni. Os autores estimaram uma faixa linear de $2,0$ a $72 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, usando os picos de oxidação. O método foi aplicado com sucesso em amostras de suplementos multivitamínicos, energéticos e cereais matinais (BRUNETTI; DESIMONI, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos eletrodos de papel descartáveis a partir de tintas à base de grafite modificados com magnetita para serem empregados na determinação de vitaminas em produtos de suplementação alimentar através de metodologias simples e de baixo custo baseadas em técnicas eletroanalíticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma tinta condutora à base de grafite e verniz;
- Produzir eletrodos descartáveis de papel à base da tinta preparada;
- Otimizar e avaliar a proporção da tinta usando uma sonda eletroquímica Fe^{2+}/Fe^{3+} pela técnica da voltametria cíclica e da espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Modificar a tinta usando magnetita e otimizar sua proporção;
- Estudar o comportamento eletroquímico das vitaminas B2 e B6 frente ao eletrodo descartável de papel;
- Otimizar os parâmetros experimentais, tais quais pH, eletrólito de suporte, técnica voltamétrica, de modo a se obter a máxima resposta analítica para as vitaminas;
- Construir a curva de calibração para as vitaminas B2 e B6;
- Determinar os parâmetros analíticos como faixa linear, limites de detecção e quantificação;
- Quantificar a concentração de vitamina B2 e B6 em amostras de suplementos alimentares;
- Avaliar a exatidão dos dados obtidos pelo eletrodo descartável pela comparação com os resultados obtidos pelo método comparativo.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico, adquiridos da Sigma-Aldrich. As soluções aquosas foram preparadas a partir de água ultrapura, filtrada pelo sistema Milli-Q (Millipore, EUA), com resistividade de 18,2 M Ω cm. As soluções estoque de vB2 e vB6 foram preparadas nas concentrações de 1,0 e 10,0 mmol L⁻¹ em água, respectivamente. As nanopartículas de magnetita foram adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich e possuíam diâmetro médio de 30 nm. O grafite em pó utilizado foi comprado da Sigma-Aldrich e possuía diâmetro médio das partículas de 1 a 2 μ m.

A solução estoque de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] foi preparada na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ e de KCl na concentração de 1 mol L⁻¹, ambas em água ultrapura.

Foram testadas como eletrólito de suporte as soluções tampão Britton-Robinson (B-R) (H₃BO₃/CH₃COOH/H₃PO₄) e McIlvaine (ácido cítrico/KH₂PO₄) ambas com concentração de 0,1 mol L⁻¹. Os valores de pH foram ajustados com NaOH 6,0 mol L⁻¹ ou HCl 1,0 mol L⁻¹.

4.2 PREPARAÇÃO DA TINTA CONDUTORA

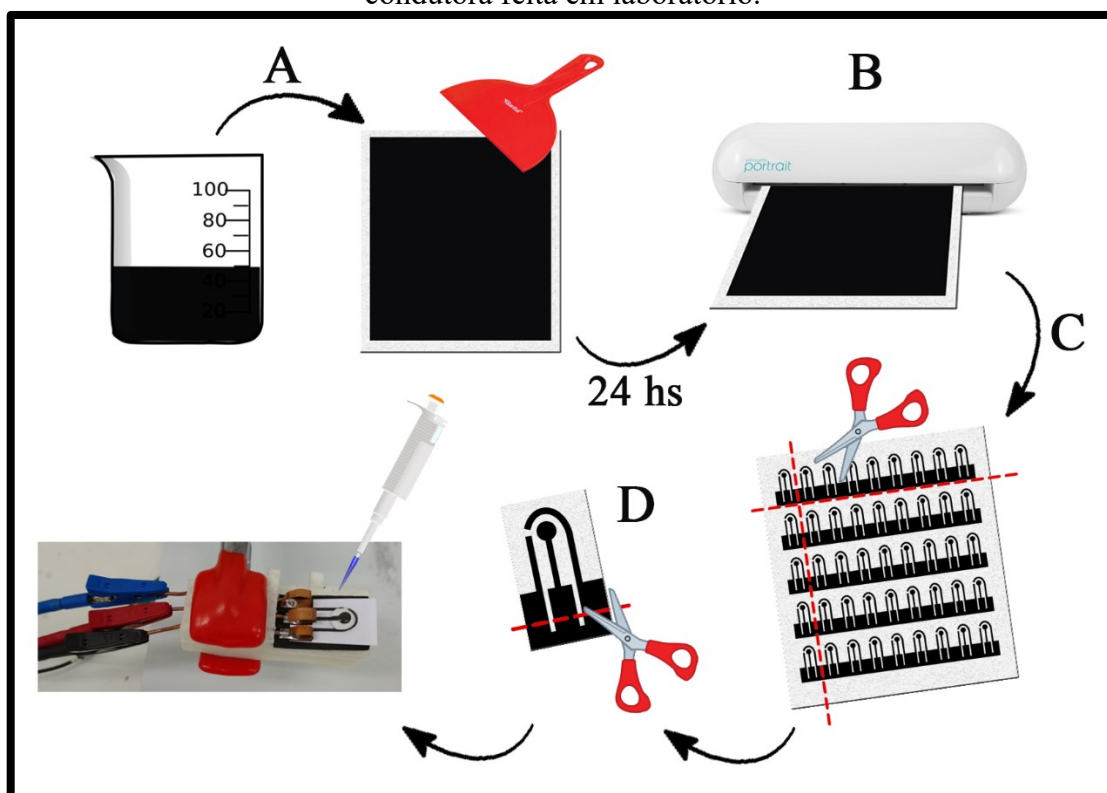
Os eletrodos foram produzidos com tinta condutora de grafite preparada em laboratório. A tinta foi preparada com a mistura de verniz automotivo PU Alto Brilho Lazzudur 6100 (Sherwin-Williams®) e grafite em pó (tamanho das partículas de 1 a 2 μ m).

As quantidades de grafite e verniz foram pesadas, assim como as de nanopartículas de magnetita usadas na modificação. Para a modificação, o grafite e as nanopartículas de magnetita (com diâmetro médio de 30 nm) foram macerados com almofariz e pistilo por 5 minutos. O pó resultante foi misturado manualmente ao verniz por 10 minutos com a ajuda de uma espátula de plástico. Para a produção da tinta sem modificação, o pó de grafite foi misturado ao verniz por 10 minutos com uma espátula de plástico.

4.3 PRODUÇÃO DOS ELETRODOS DESCARTÁVEIS

Os eletrodos foram produzidos em laboratório em batelada conforme é ilustrado na Figura 6. A tinta condutora foi dispersa em folhas adesivas (Pimaco Autoadesivos Ltda.) com a ajuda de uma espátula de plástico (A). As folhas foram deixadas para secar à temperatura ambiente por no mínimo 24 horas. Após este tempo, os eletrodos foram cortados com uma impressora de recorte Silhouette Portrait 2 (Silhouette America, Inc.) usando o *software* Silhouette Studio 4.3 (B). Após o corte, as folhas adesivas foram coladas em papel A4 (Report Suzano Premium) de gramatura de 75 g m^{-2} (C). Os eletrodos foram recortados da folha individualmente conforme foram sendo usados (D).

Figura 6 – Representação esquemática do processo de produção dos eletrodos a partir da tinta condutora feita em laboratório.



Fonte: O autor.

O *design* dos eletrodos foi elaborado com o auxílio do *software* CorelDRAW Graphics Suite 2017, seguindo o padrão de eletrodos impressos comerciais, com os três eletrodos convencionais em um só dispositivo: eletrodo de trabalho de grafite (área geométrica de $0,088 \pm 0,001 \text{ cm}^2$), contra eletrodo e eletrodo de pseudo-referência de grafite.

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Com o objetivo de avaliar a performance do eletrodo desenvolvido, foram adquiridas amostras de suplementos alimentares de forma comercial. Duas amostras de suplementação vitamínica foram estudadas: cápsulas B-complex Vitaminlife® (LP Farmacêutica Ltda., Brasil) e líquido sublingual B complex Sundown® (Rexall Sundown, Inc., EUA).

Para a determinação de vB2 em cápsulas, as mesmas foram abertas no dia da análise e 0,250 g (1 cápsula) de seu conteúdo foi pesado e solubilizado com 50,0 mL de água ultrapura. Uma alíquota de 1,0 mL foi diluída em 4,0 mL de eletrólito de suporte. Para a análise voltamétrica, 100 µL dessa solução foram gotejados no eletrodo com a ajuda de uma micropipeta.

Para a determinação de vB6 em cápsulas, 0,250 g de seu conteúdo foi pesado e solubilizado em 10,0 mL do eletrólito de suporte. Para a análise voltamétrica, 100 µL dessa solução foram gotejados no eletrodo descartável com a ajuda de uma micropipeta.

Para a determinação de vB2 em amostras de líquido sublingual, foi feita a diluição de 1,0 mL do líquido em 50,0 mL de água ultrapura. Uma alíquota de 1,0 mL dessa solução foi diluída em 9,0 mL do eletrólito de suporte. Para a análise voltamétrica, 100 µL foram gotejados no eletrodo com uma micropipeta.

Para a determinação de vB6 em amostras de líquido sublingual, foi diluído 0,5 mL do líquido em 10,0 mL de eletrólito de suporte. Para a análise voltamétrica foram gotejados 100 µL no eletrodo descartável usando uma micropipeta.

Foi usado o método da adição de padrão para a avaliação do desempenho do eletrodo quanto a determinação de vB2 e vB6 nas amostras comerciais.

4.5 INSTRUMENTAÇÃO

4.5.1 Medidas eletroquímicas

A caracterização do eletrodo descartável de papel foi feita por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*), realizada em um potenciostato/galvanostato portátil PalmSens3 (Palm Instruments BV, Holanda) acoplado ao um computador com o software PSTrace (versão 5.4) para a aquisição e processamento dos dados. Os espectros de IES foram obtidos em eletrólito de suporte KCl

0,10 mol L⁻¹ contendo K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 1,0 mmol L⁻¹. O estudo foi feito com faixa de frequência de 0,1 a 50000 Hz, em circuito aberto e amplitude de 1 mV.

Para a realização das análises foi utilizado o eletrodo descartável de papel desenvolvido contendo os três eletrodos convencionais feitos de grafite e verniz.

A repetibilidade da corrente intra-dia e inter-dia foram feitas com uma solução padrão contendo 10 µmol L⁻¹ de vB2 em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ pH 2,0 ou 0,1 mmol L⁻¹ de vitamina B6 em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹. Para o estudo de repetibilidade intra-dia, 6 medidas foram feitas no mesmo dia e o desvio padrão relativo foi calculado. Para o estudo da repetibilidade inter-dia, as 6 medidas foram feitas em dias diferentes e o desvio padrão relativo foi calculado.

4.5.2 Medidas de microscopia eletrônica

Para a caracterização morfológica das nanopartículas de magnetita na tinta de grafite, foi conduzida a técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) utilizando um microscópio JSM-6390 (JEOL, Japão) com tensão elétrica de aceleração de 8 kV. Os eletrodos foram fabricados como descrito, porém ao invés de utilizar a impressora de recorte, quadrados de 1,0 cm² foram recortados para a análise.

Para a caracterização química da superfície, empregou-se a técnica de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS, do inglês *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) utilizando o mesmo microscópio JSM-6390 (JEOL, Japão) com tensão elétrica de aceleração de 8 kV. Foram usados os mesmos eletrodos usados na SEM.

As análises de SEM e EDS foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME – UFSC).

4.5.3 Medidas de espectrometria de fluorescência

A técnica de espectrometria de fluorescência foi utilizada como método comparativo aos dados obtidos com o eletrodo descartável de papel para a determinação de vB2 e vB6. Para a construção das curvas de calibração e de adição de padrão, os espectros das amostras de vB2 em água ultrapura foram obtidos com excitação em 440 nm e emissão máxima em 526 nm. Para os espectros das amostras de vB6 em água ultrapura, a excitação foi feita em 328 nm, com excitação máxima de 393 nm. Para ambas as amostras, a análise foi executada em

um espectrofluorímetro Cary Eclipse (VARIAN, Estados Unidos), com célula de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm e fendas de excitação e emissão do monocromador de 2,5 nm.

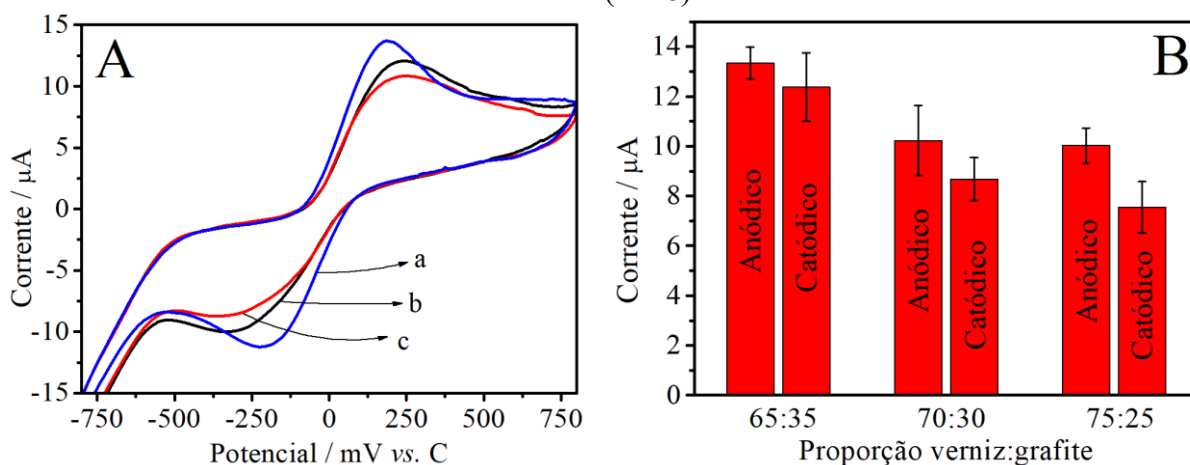
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARAÇÃO DA TINTA DE GRAFITE

5.1.1 Otimização da proporção verniz:grafite

A fim de se garantir que a tinta de grafite seja apropriada para o seu propósito, foi avaliada a proporção entre verniz e grafite na sua produção. Eletrodos foram fabricados com as seguintes proporções verniz:grafite: 65:35, 70:30 e 75:25. Os eletrodos foram testados com sonda redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por voltametria cíclica. Os voltamogramas obtidos podem ser observados na Figura 7A abaixo.

Figura 7 – Estudo da proporção de verniz:grafite usado na preparação da tinta condutora. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre os eletrodos produzidos com as distintas proporções de verniz:grafite: (a) 65:35, (b) 70:30 e (c) 75:25. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico de barras ($n = 8$).



O eletrodo que mostrou maior sinal analítico foi aquele com a proporção 65:35, seguido de 70:30 e 75:25, como ilustrado pelo gráfico em barras na Figura 7B. Uma maior quantidade de grafite em relação ao verniz fornece uma maior condutividade do material, permitindo uma maior velocidade de transferência eletrônica. Esta afirmação foi confirmada por espectroscopia de impedância eletroquímica.

Em relação a separação dos picos (ΔE_p), o valor diminuiu conforme a proporção de grafite aumentou, de 580 para 435 mV. Isso se deve ao aumento da condutividade pela maior

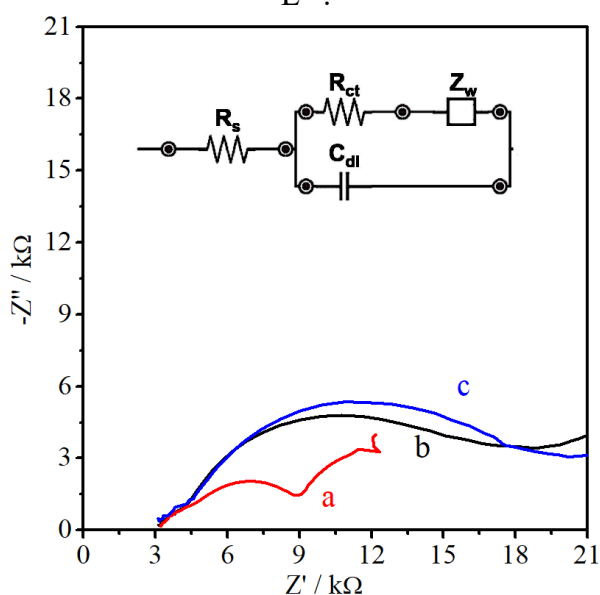
quantidade de grafite, facilitando a transferência eletrônica do processo redox. Valores de ΔE_p muito acima do valor ideal de 59,2 mV para reações reversíveis são atribuídos a alta resistência a transferência de carga encontrada usando tintas feitas em laboratório e corrobora com resultados encontrados em trabalhos publicados na literatura (ARAÚJO et al., 2020; FREITAS et al., 2021).

Com a técnica da espectroscopia de impedância eletroquímica é possível avaliar as interações que ocorrem na passagem de corrente durante a reação redox na interface eletrodo-solução. O parâmetro usado foi a resistência a transferência de carga (R_{ct} , do inglês *resistance to charge transfer*), que avalia a facilidade com que os elétrons migram na interface. Quanto menor a R_{ct} , maior é a capacidade de transferência eletrônica entre o material e a sonda redox. Na EIS, o diâmetro do semicírculo fornecido pelos diagramas de Nyquist é equivalente ao R_{ct} da reação redox sobre a superfície do eletrodo.

A Figura 8 apresenta os gráficos de Nyquist ($-Z''$ vs. Z'), obtidos usando a sonda $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L⁻¹. O menor valor de R_{ct} foi obtido com o eletrodo fabricado com tinta na proporção 65:35, com 2713 Ω e as outras proporções tiveram valores semelhantes, 11,90 e 13,34 k Ω para 70:30 e 75:25, respectivamente. O valor do R_{ct} foi obtido utilizando o circuito elétrico mostrado no *inset* da Figura 8, calculado pelo *fitting* gerado pelo programa PSTrace.

Figura 8 – Espectrograma de impedância eletroquímica para as diferentes proporções de tinta.

Em (a) a proporção 65:35, em (b) 75:25, e em (c), 70:30. O estudo foi feito com frequência entre 0,1 e 50000 Hz em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹.

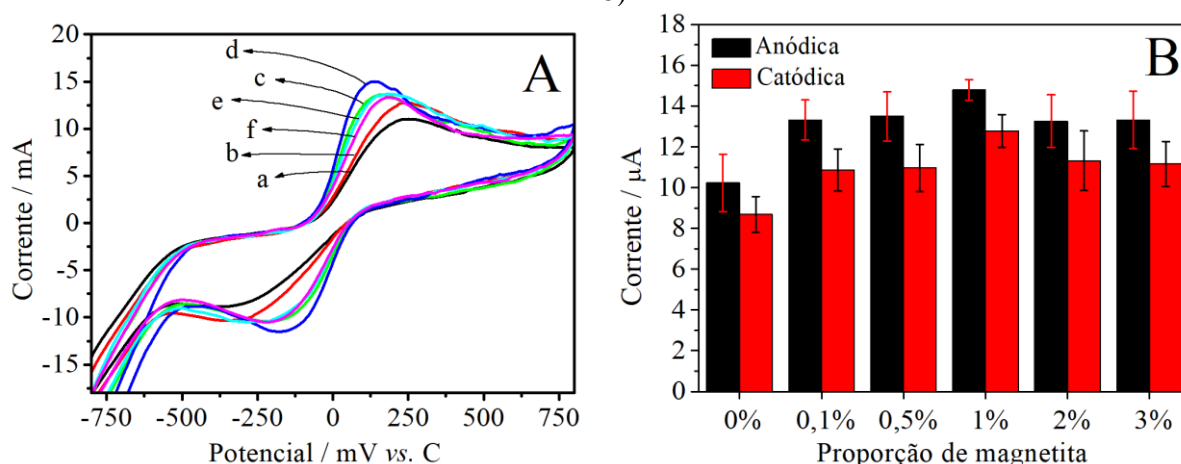


Além dos experimentos eletroquímicos, foi preciso levar em consideração os aspectos físicos da tinta. A conveniência na aplicação, a integridade física e a reprodutibilidade do filme foram outros aspectos a serem considerados na hora da seleção da composição da tinta. A tinta na proporção 65:35 se mostrou muito viscosa, dificultando a sua aplicação na formação do filme na folha adesiva, além de se tornar quebradiça quando seca e o corte ser irregular, piorando sua integridade física; motivo este que levou diversos eletrodos a serem descartados antes de serem utilizados. Por este motivo, a proporção 70:30 foi selecionada para os testes seguintes tendo em vista seu bom desempenho eletroanalítico e excelentes características físicas.

5.1.2 Otimização da quantidade de magnetita usada na modificação do eletrodo

Diferentes proporções de magnetita foram usadas na preparação dos eletrodos. Os eletrodos foram então testados por voltametria cíclica com a sonda redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 9 exibe os resultados obtidos.

Figura 9 – Estudo da proporção de magnetita na produção dos eletrodos. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos fabricados (a) sem magnetita e com as proporções de (b) 0,1, (c) 0,5, (d) 1,0, (e) 2,0 e (f) 3,0 % utilizando a sonda redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico de barras ($n = 8$).



As maiores correntes observadas foram obtidas com os eletrodos produzidos na proporção de 1,0% de magnetita, como exibido no gráfico de barras da Figura 9B. Além disso, a estimativa do desvio padrão obtido por esses eletrodos foi a menor. A separação dos

picos (ΔE_p) para a proporção de 1,0% foi de 290 mV, enquanto que no eletrodo sem a modificação foi de 435 mV. As propriedades condutoras da magnetita podem explicar o aumento da corrente e a diminuição do ΔE_p , uma vez que facilitam a transferência eletrônica no processo redox.

O valor da corrente, a estimativa do desvio padrão e a separação dos picos voltamétricos foram usados para avaliar a qualidade da modificação. Por esse motivo, a proporção de 1,0% foi usada nos testes seguintes para a modificação dos eletrodos, com aumento de cerca de 45% da corrente em relação à corrente obtida na ausência de modificação para o pico anódico e de 47% para o pico catódico.

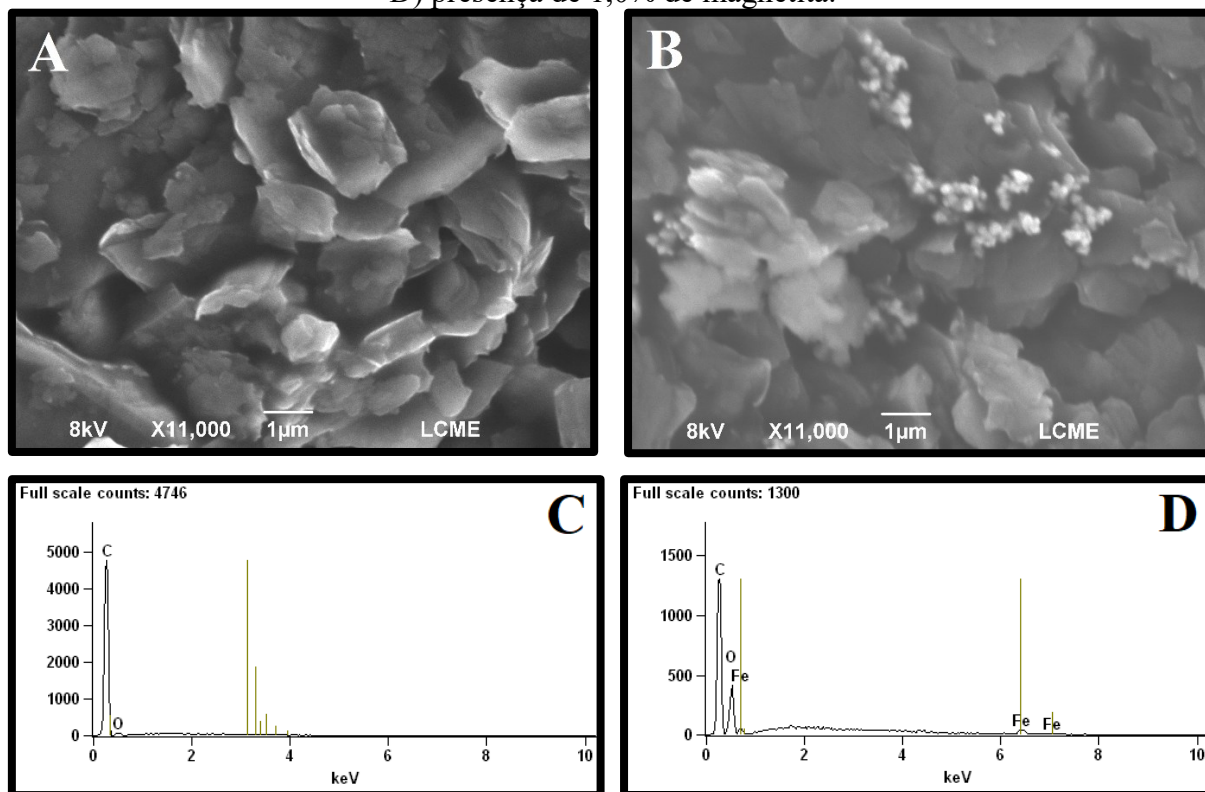
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA TINTA CONDUTORA

Foram também realizadas análises de SEM e EDS para caracterizar a dispersão de magnetita na tinta condutora. Como relatado anteriormente na seção de procedimento experimental, a tinta foi preparada com pó de grafite e verniz, além da modificação com magnetita.

A Figura 10A apresenta a imagem de SEM gerada para a tinta na ausência de modificação com magnetita, onde as partículas de pó de grafite formam flocos dispersos na matriz de verniz de forma uniforme. Na Figura 10B, após a adição de nanopartículas de magnetita, a imagem de SEM gerada mostra as estruturas cristalinas de magnetita formando alguns agregados distribuídos pela superfície da tinta. Apesar da tinta ter sido homogeneizada, a acumulação de partículas de magnetita é comum pela sua natureza magnética, fazendo que as partículas se atraiam entre si (MATTIOLI; CERVINI; CAVALHEIRO, 2020).

As imagens de EDS na Figura 10C e na Figura 10D evidenciam a diferença de composição química entre a tinta sem e com a modificação. O espectro de EDS da tinta não modificada mostra um intenso pico que corresponde a energia de ligação de C (0,2 keV) e um pico menor que corresponde ao do O (0,5 keV), ambos relacionados a presença de grafite na tinta condutora. O espectro de EDS da tinta modificada com magnetita mostrou picos de energia de ligação de Fe (0,7, 6,2 e 7,1 keV) e O (0,5 keV), que correspondem ao Fe_3O_4 , como evidenciado pela literatura (DHAR et al., 2021).

Figura 10 – Imagens de SEM e EDS para a tinta na (A e C) ausência de magnetita e na (B e D) presença de 1,0% de magnetita.



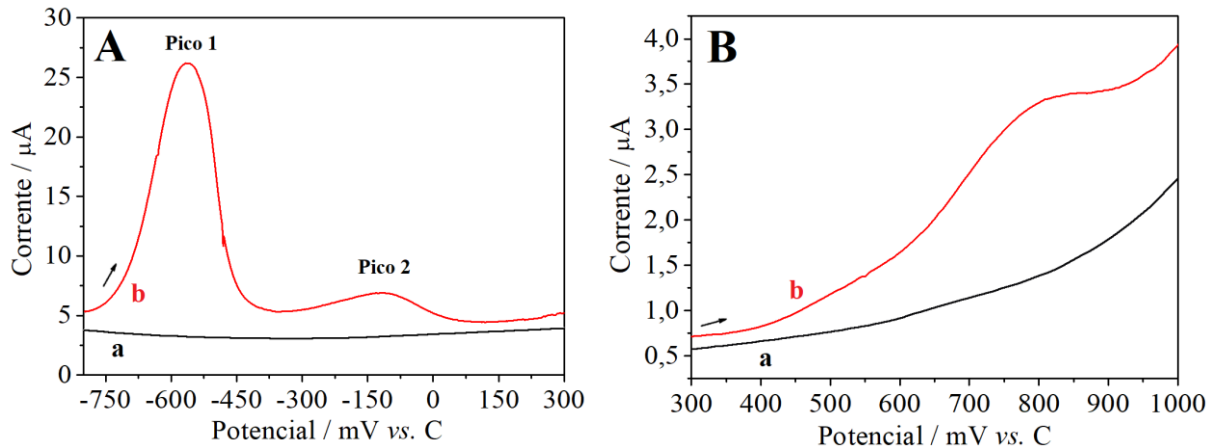
Além disso, a composição do eletrodo modificado com magnetita apresentou uma porcentagem de elementos de 4,5% de Fe, 28,0% de O e 67,6% de C, de acordo com o espectro pontual de EDS.

5.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DAS VITAMINAS B2 E B6

O comportamento eletroquímico da vB2 e vB6 sobre o eletrodo impresso foi investigado usando a voltametria de onda quadrada. Apesar da voltametria cíclica fornecer mais dados qualitativos, o sinal da vitamina B6 não foi numericamente suficiente para formular uma avaliação.

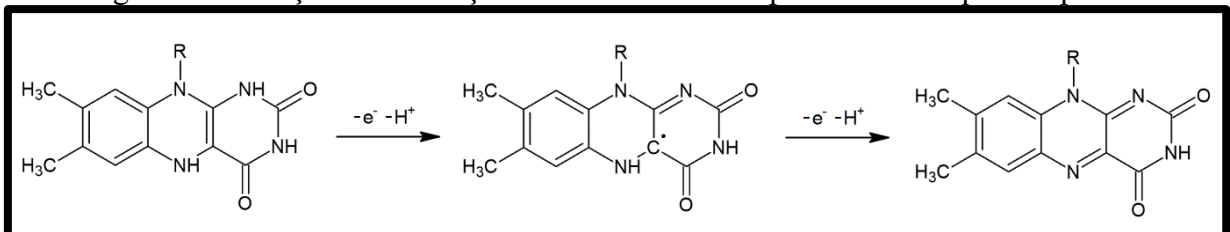
Os voltamogramas resultantes podem ser observados na Figura 11A e Figura 11B, utilizando soluções padrão de vB2 $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e vB6 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). A janela de potencial para a vB2 foi de $-0,8$ a $+0,3 \text{ V}$ e para a vB6 foi de $+0,3$ a $+1,0 \text{ V}$ com $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 11 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para a (a) ausência e (b) presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de vitamina B2 em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de onda quadrada para a (a) ausência e (b) presença de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de vitamina B6 em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



O mecanismo eletroquímico de oxidação da vB2 em meio aquoso pode ocorrer em duas etapas: a primeira transferência eletrônica é quase-reversível e forma a semi-quinona (pico 1), seguida da transferência do segundo elétron para formar a flavina completamente oxidada (pico 2). A reação pode ser observada na Figura 12 (MIRCESKI; SMARZEWSKA; GUZIEJEWSKI, 2016). Entretanto, essa reação pode acontecer em uma etapa por meio de um processo de transferência de dois elétrons e dois prótons, exibindo somente um pico de oxidação, como ilustrado na Figura 3, na Seção 2.3.1 (BAILEY; SCHULTZ, 2016). Os parâmetros da técnica e as propriedades da solução vão determinar se a reação acontece em uma etapa ou duas (BAILEY; SCHULTZ, 2016; MIRCESKI; SMARZEWSKA; GUZIEJEWSKI, 2016). Visando a determinação sensível de vB2, decidiu-se estudar o pico 1 nos estudos posteriores, visto que apresentou maior intensidade de corrente.

Figura 12 – Reações de oxidação da vB2 em duas etapas em meio aquoso e pH 2.



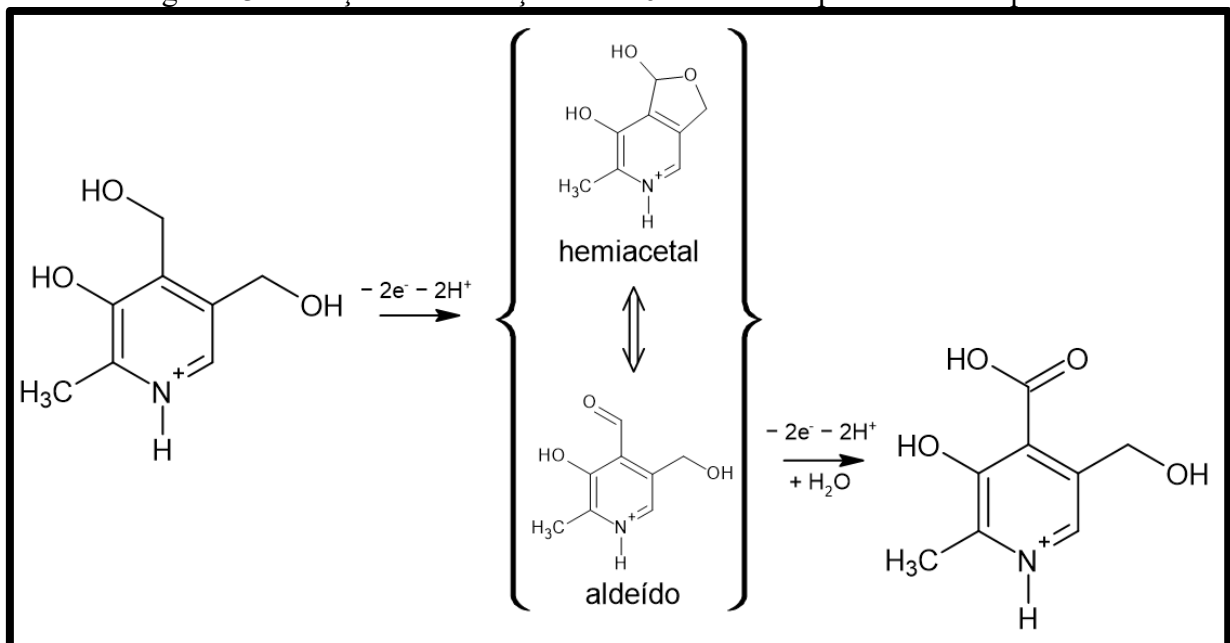
Fonte: Adaptado de Pineda, 2000.

Para a vB6, podem ocorrer duas etapas no seu mecanismo eletroquímico de oxidação: na primeira etapa, a formação do aldeído, numa transferência de dois prótons e dois

elétrons, e na segunda etapa, a formação de ácido carboxílico, com a transferência de dois prótons e dois elétrons (KUZMANOVIĆ et al., 2016).

Nesse estudo foi observado somente um pico para a vB6, correspondendo a primeira oxidação. Isso pode ser explicado pela formação da forma hemiacetal: abaixo do pH 5 (pKa ~ 5) o piridoxal existe na forma de hemiacetal e somente uma pequena quantidade na forma de aldeído livre. Com a desprotonação do nitrogênio do anel, a forma aldeído livre passa a corresponder 20% das espécies. Como entre as duas formas somente a forma aldeído livre é eletroativa, explica-se porque somente um pico foi obtido (HERNÁNDEZ; RIBERO; GOICOECHEA, 2003; PINEDA et al., 2000). A Figura 13 exibe as reações mencionadas.

Figura 13 – Reações de oxidação da vB6 em duas etapas em meio aquoso.



Fonte: Adaptado de Pineda, 2000.

5.4 ESTUDO DO pH E NATUREZA DO ELETRÓLITO DE SUPORTE

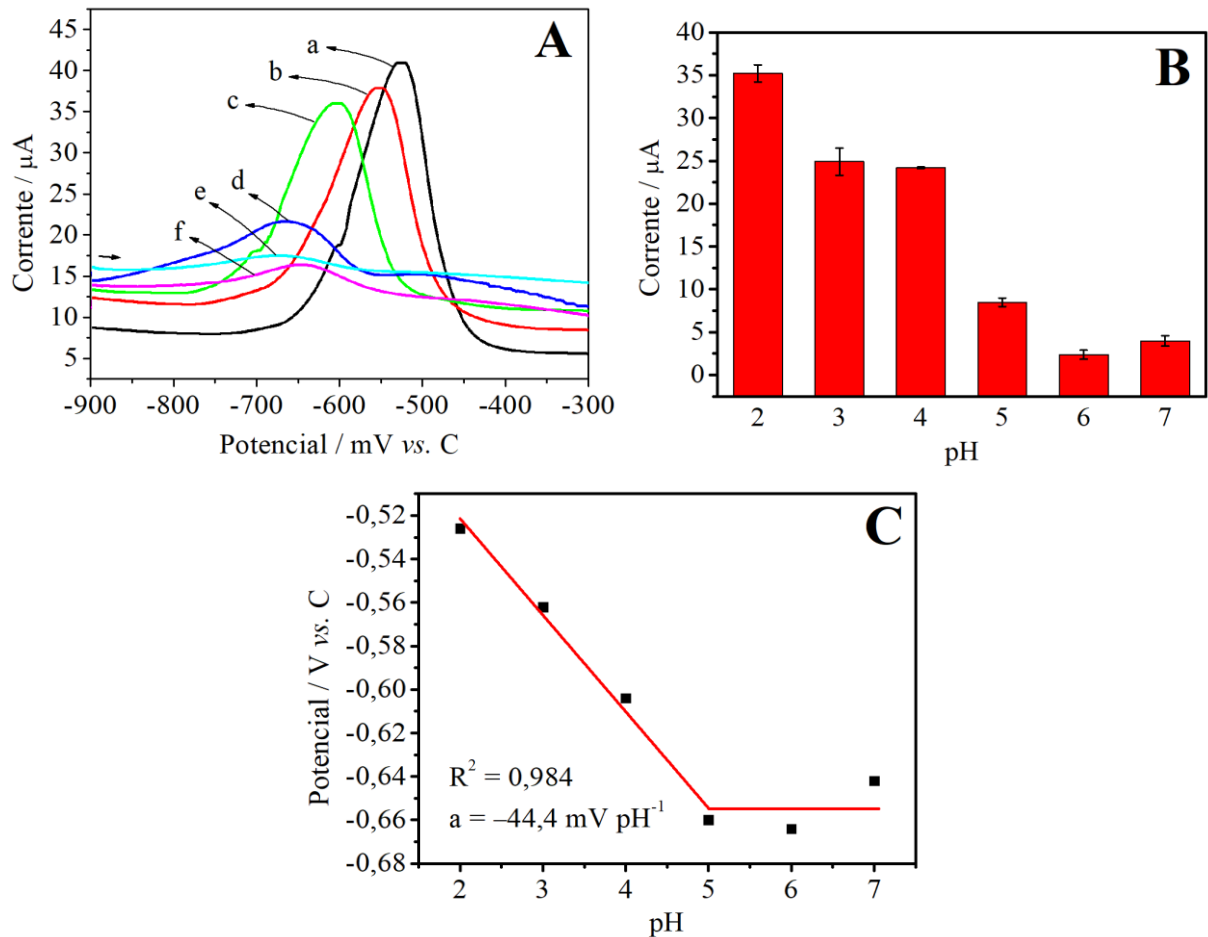
Também foram investigadas a influência do pH do eletrólito de suporte e sua natureza sobre a resposta eletroquímica dos analitos. Para a vB2, a resposta de corrente e de potencial de pico foram avaliadas no intervalo de pH de 2,0 a 7,0 utilizando solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹, com pH ajustado previamente. Os voltamogramas obtidos para a vB2 estão dispostos na Figura 14A.

A Figura 14B destaca como o valor da corrente de pico se comporta com a variação do pH do eletrólito de suporte. Conforme o pH aumentou de 2,0 até 5,0, o potencial de pico se

deslocou para valores mais negativos, indicando a transferência de prótons na reação. Do pH 2,0 até o 5,0, o deslocamento linear do potencial (Figura 14C) foi igual a $-44,4 \text{ mV pH}^{-1}$. Usando o coeficiente angular da equação de Nernst ($dE_p/dpH = 0,0592 \text{ m/n}$, onde m é o número estequiométrico de prótons e n o de elétrons), a razão m/n calculada foi de aproximadamente 0,75, o que resulta em uma estequiometria 3:4 de próton:elétron, diferente daquela estimada pelas reações da Figura 3 e Figura 12. Essa diferença pode ser explicada pela baixa condutividade do eletrodo.

O valor máximo de corrente de pico foi obtido usando solução tampão no pH 2,0 e os valores acima de pH 7,0 não exibiram corrente mensurável.

Figura 14 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos valores de pH de (a) 2,0, (b) 3,0, (c) 4,0, (d) 5,0, (e) 6,0 e (f) 7,0. (B) Gráfico de barras para a variação de corrente nos diferentes valores de pH ($n = 3$). (C) Gráfico de potencial *versus* pH.

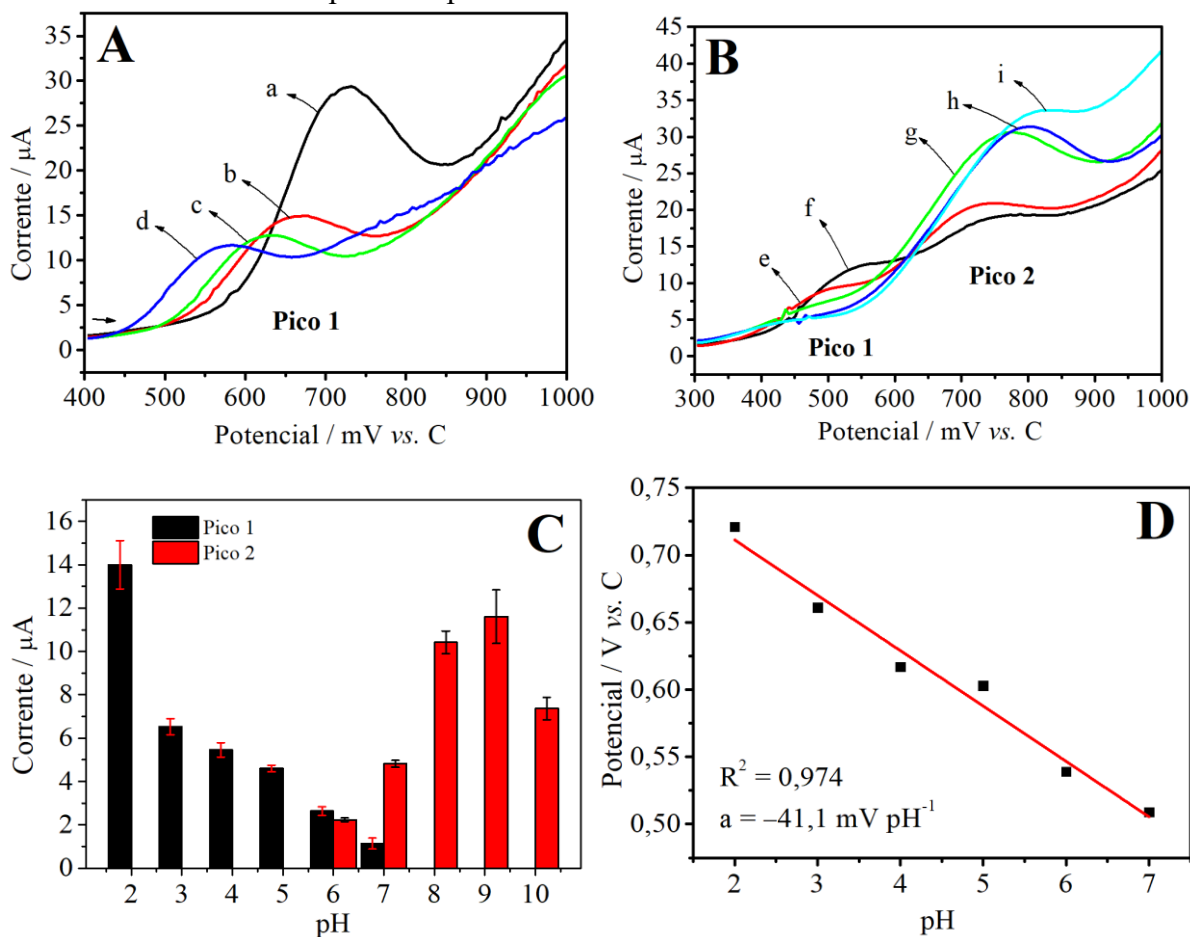


Os voltamogramas referentes a vB6 estão dispostos na Figura 15A e Figura 15B. Para a vB6, a resposta de corrente de pico foi avaliada nos pHs de 2,0 a 10,0 em solução

tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte, com pH ajustado previamente. O valor máximo de corrente de pico foi obtido em pH 2,0, como ilustrado no gráfico da Figura 15C.

A partir de pH 5,0, um outro pico começa a aparecer no voltamograma. O pico 2 corresponde a oxidação do aldeído livre, formando ácido carboxílico, conforme é mostrado na Figura 13.

Figura 15 – (A e B) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos valores de pH de (a) 2,0, (b) 3,0, (c) 4,0, (d) 5,0, (e) 6,0, (f) 7,0, (g) 8,0, (h) 9,0 e (i) 10,0. (C) Gráfico de barras para a variação de corrente nos diferentes valores de pH, para os dois picos observados ($n = 3$). (D) Gráfico de potencial da corrente obtida pelo primeiro pico voltamétrico *versus* corrente.



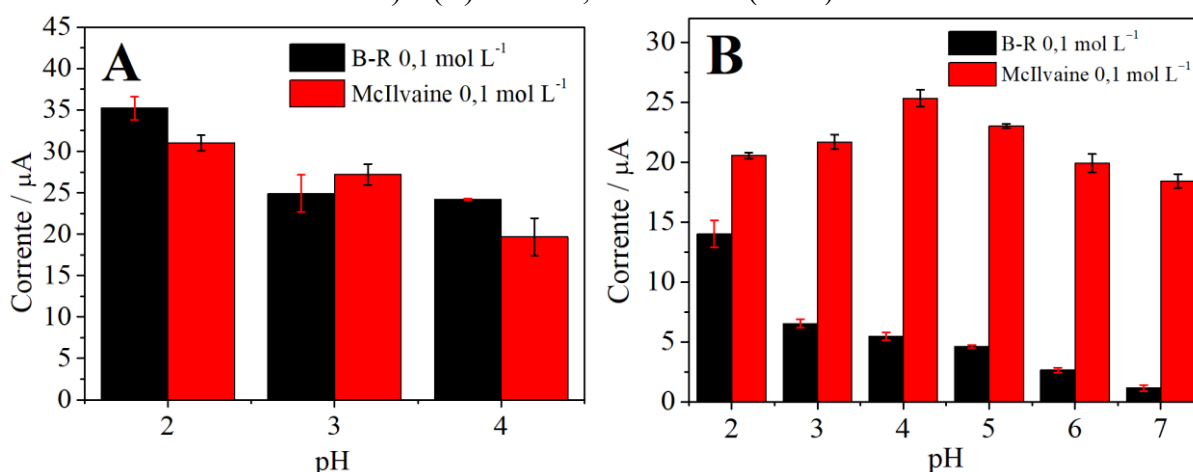
O deslocamento do potencial do pico 1 foi linear para toda a faixa de pH entre 2,0 e 7,0 (Figura 15D). Esse deslocamento foi igual a $-41,1 \text{ mV pH}^{-1}$. Usando o coeficiente angular da equação de Nernst ($dE_p/dpH = 0,0592 \text{ m/n}$, onde m é o número estequiométrico de prótons e n o de elétrons), a razão m/n calculada foi de aproximadamente 0,69, o que resulta em uma estequiometria 2:3 de próton:elétron, diferente daquela estimada pela reação

mostrada pela Figura 5. Essa diferença pode ser explicada pela baixa condutividade associada ao eletrodo.

A natureza do eletrólito de suporte também foi analisada; além da solução tampão B-R, a solução tampão McIlvaine também foi testada para ambas as vitaminas. Os valores de corrente de pico obtidos usando solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte foram comparados com aqueles obtidos com solução tampão B-R e a comparação pode ser vista na Figura 16.

Para a vB2, a solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 2,0 foi aquela que mostrou maior corrente de pico (Figura 16A), enquanto que para a vB6, a solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0 que demonstrou maior corrente de pico (Figura 16B). Para os próximos estudos, esses parâmetros foram considerados.

Figura 16 – Gráficos de barras comparando os eletrólitos de suporte solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para (A) a vB2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ($n = 3$) e (B) a vB6 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($n = 3$).



5.5 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA TÉCNICA ELETROANALÍTICA

A otimização da técnica eletroanalítica garante que o perfil voltamétrico e a intensidade de corrente sejam os mais adequados para o sistema em estudo. O objetivo da otimização é desenvolver uma metodologia mais sensível e mais seletiva.

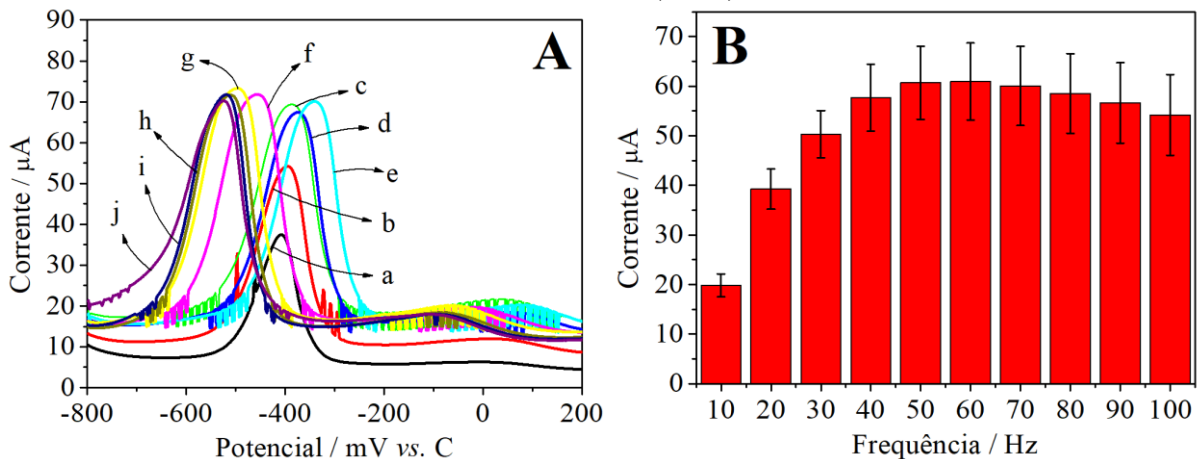
A voltametria de onda quadrada é uma técnica de pulso baseada na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. Na SWV, a curva corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais na forma de escada, sendo a altura do degrau ΔE_s (incremento de potencial) e de pulsos de potencial com certa

amplitude (a) e frequência (f). As correntes elétricas são medidas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido pela diferença entre as intensidades de corrente, apresentado excelente sensibilidade e alta rejeição de correntes capacitivas (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

5.5.1 Otimização dos parâmetros da técnica para a vB2

A intensidade da corrente de pico depende da frequência de aplicação dos pulsos de potencial. Dessa forma, se procurou variar somente a frequência e definir o valor mais adequado para as análises posteriores. Variou-se a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f) de 10 a 100 Hz mantendo fixos os demais parâmetros em $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. Então, os resultados obtidos estão apresentados na Figura 17.

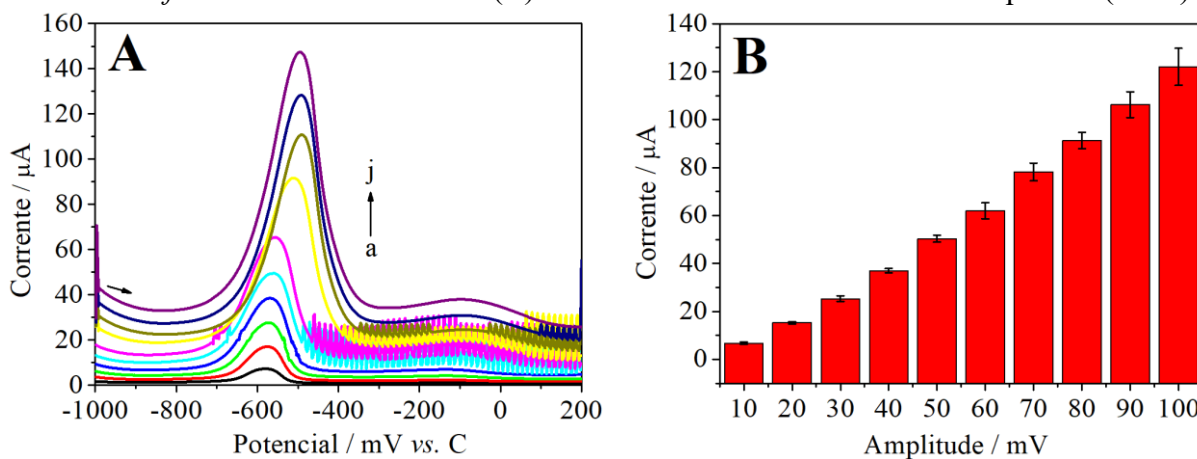
Figura 17 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 para as diferentes frequências de aplicação dos pulsos de potencial: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 Hz. Outros parâmetros mantidos constantes: $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Gráfico de barras de corrente vs. frequência ($n = 3$).



O ganho significativo de corrente foi obtido até a frequência de 50 Hz (Figura 17B). Com o objetivo de conseguir maior sensibilidade e melhor reprodutibilidade, a frequência de 30 Hz foi escolhida para os experimentos posteriores; apesar de maiores frequências conferirem maior corrente de pico, o desvio padrão se mostrou um parâmetro mais importante.

O próximo parâmetro otimizado foi a amplitude de pulso (a). Os outros parâmetros foram mantidos constantes enquanto a amplitude variou de 10 a 100 mV. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

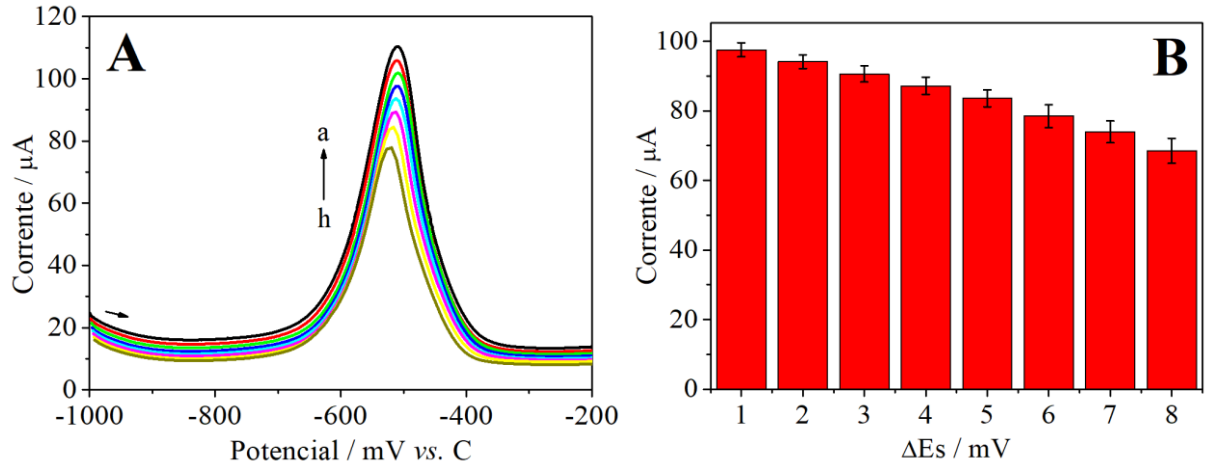
Figura 18 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 para as diferentes amplitudes de pulso de potencial: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 mV. Outros parâmetros mantidos constantes: $f = 30 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Gráfico de barras de corrente vs. amplitude ($n = 3$).



A corrente de pico se mostrou diretamente proporcional a amplitude de pulso de potencial. O valor de amplitude de 80 mV foi selecionado por compreender um valor de corrente de pico alto e baixa estimativa de desvio padrão.

Outro parâmetro otimizado foi o incremento de potencial (ΔE_s). Os outros parâmetros foram mantidos constantes e o degrau de potencial variou de 1 a 8 mV. Os resultados são mostrados na Figura 19.

Figura 19 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB2 $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 para os diferentes degraus de potencial: (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7 e (h) 8 mV. Outros parâmetros mantidos constantes: $f = 30 \text{ Hz}$ e $a = 80 \text{ mV}$. (B) Gráfico de barras de corrente vs. ΔE_s ($n = 3$).



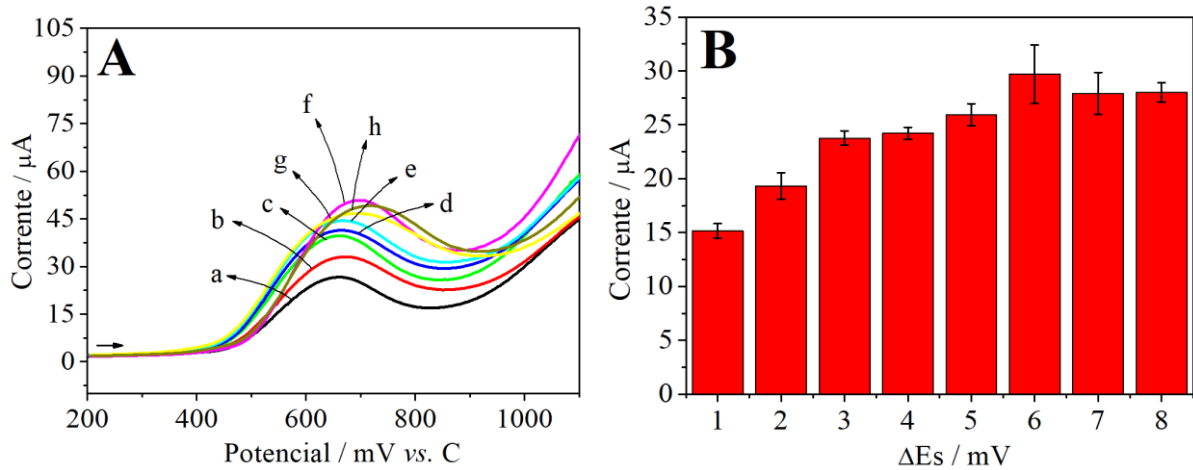
Houve uma pequena diminuição linear de corrente de pico com o aumento do incremento de potencial. Isso acontece, pois, o aumento do incremento de potencial significa aumento da velocidade de varredura. Velocidades muito altas resultam em tempos de medida muito curtos e a corrente capacitiva pode não ter decaído aos níveis desejados. O valor escolhido para os próximos experimentos foi de 2 mV de degrau de potencial.

Para a vB2, os valores dos parâmetros da técnica selecionados foram $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

5.5.2 Otimização dos parâmetros da técnica para a vB6

Para o estudo de otimização dos parâmetros da técnica para a vB6, o incremento de potencial foi variado de 1 a 8 mV e foram mantidos constantes os outros parâmetros ($f = 50 \text{ Hz}$ e $a = 50 \text{ mV}$). Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 20.

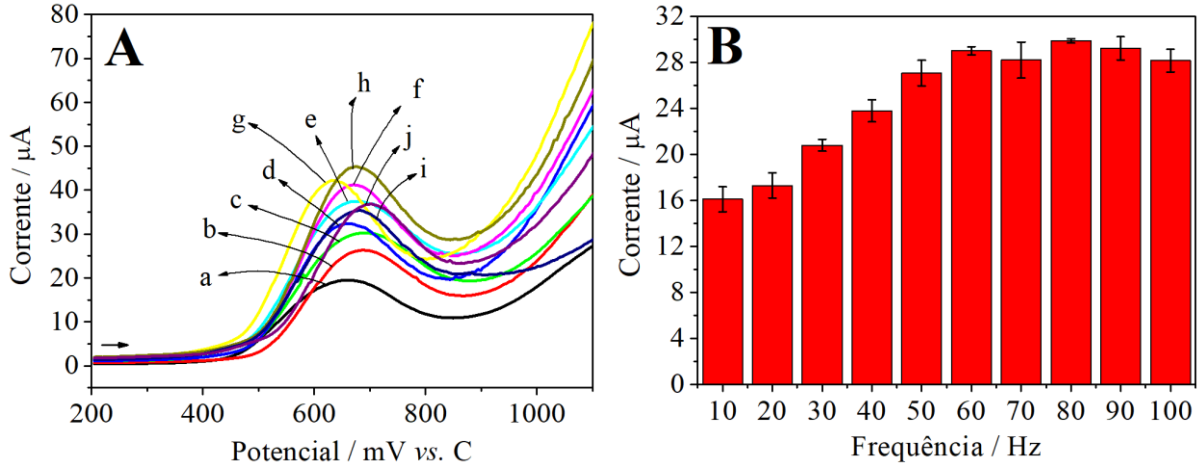
Figura 20 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2 mmol L^{-1} em solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 para os diferentes degraus de potencial: (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, (e) 5, (f) 6, (g) 7 e (h) 8 mV. Outros parâmetros constantes: $f = 50 \text{ Hz}$ e $a = 50 \text{ mV}$. (B) Gráfico de barras de corrente vs. ΔE_s ($n = 3$).



A corrente de pico foi aumentando com o aumento do degrau de potencial, com o maior valor para $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. Também ocorreu um alargamento do pico, o que é indesejável. Deve existir um balanço entre a intensidade de corrente e o perfil voltamétrico. O valor selecionado para as análises posteriores foi de 5 mV pois forneceu um valor alto de corrente de pico e sua estimativa de desvio padrão foi baixa.

O próximo parâmetro a ser estudado foi a frequência de aplicação dos pulsos de potencial. Seu valor foi variado de 10 a 100 Hz, com os outros parâmetros mantidos constantes ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$). Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 21.

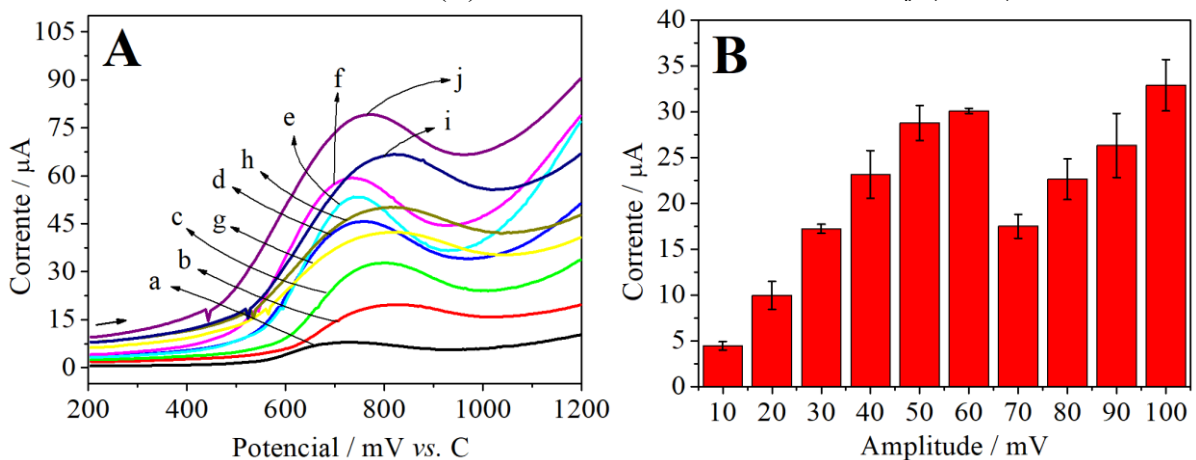
Figura 21 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2 mmol L^{-1} em solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 para as frequências: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 Hz.. Outros parâmetros constantes: $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. (B) Gráfico de barras de corrente vs. f ($n = 3$).



A corrente de pico aumentou com o aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potencial. O valor de frequência selecionado foi de 80 Hz, apresentando o maior valor de corrente de pico estudado. Esse valor foi usado para os próximos estudos.

O próximo parâmetro estudado foi a amplitude dos pulsos de potencial. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 22.

Figura 22 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para vB6 2 mmol L^{-1} em solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 para as amplitudes de pulso de potencial: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) 70, (h) 80, (i) 90 e (j) 100 mV. Outros parâmetros constantes: $f = 80 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. (B) Gráfico de barras de corrente vs. f ($n = 3$).



O valor da corrente de pico é enormemente influenciado pela amplitude dos pulsos de potencial. O valor de 60 mV foi selecionado por fornecer um valor de corrente de pico alto e uma estimativa do desvio padrão baixa.

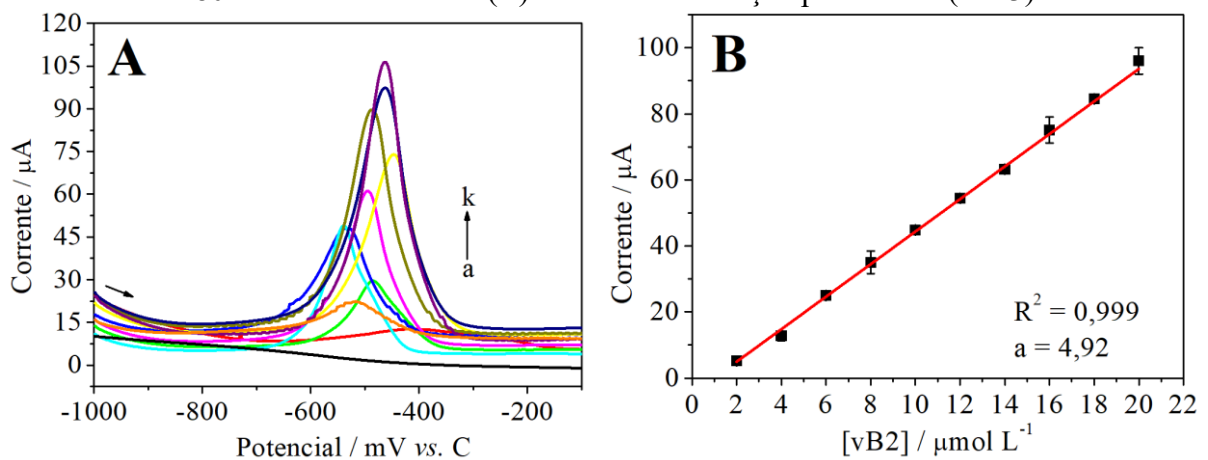
Para a vB6, os valores dos parâmetros da técnica selecionados foram $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV.

5.6 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

5.6.1 Curva de calibração para a vB2

Com as condições experimentais otimizadas, a curva de calibração pode ser construída. Soluções com concentrações de 2,0 até 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de vB2 foram preparadas e utilizadas para obtenção dos voltamogramas de onda quadrada da Figura 23A. É observado um pico voltamétrico em $-0,475$ V cuja intensidade de corrente aumenta proporcionalmente de forma linear com a concentração de vB2 no intervalo estudado, como indicado pelo coeficiente de determinação de 0,999, muito próximo da unidade. A variação que o potencial sofre nas diferentes concentrações é resultado do uso do pseudo-eletrodo de referência pelo eletrodo descartável.

Figura 23 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de vB2 sobre o eletrodo descartável: (a) branco; (b) 2,0; (c) 4,0; (d) 6,0; (e) 8,0; (f) 10,0; (g) 12,0; (h) 14,0; (i) 16,0; (j) 18,0; (k) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} pH 2,0; $f = 30$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (B) Curva de calibração para a vB2 ($n = 3$).



A regressão linear pode ser expressa de acordo com a função: $I_{sw} = 4,92 [vB2] - 4,91(\pm 0,46)$, onde I_{sw} é a corrente de pico em μA , e $[vB2]$ é a concentração de vB2 em $\mu mol L^{-1}$ sendo apresentada na Figura 23B.

O limite de detecção (do inglês, *limit of detection* – LOD) representa o mais baixo resultado que pode ser distinguido de um branco. É o ponto no qual a análise se torna possível. O limite de quantificação (do inglês, *limit of quantitation* – LOQ) é a mais baixa concentração que o analito pode ser detectado com confiabilidade (IUPAC, 1989). Estes dois parâmetros podem ser calculados a partir da curva de calibração pelas expressões a seguir, com nível de confiança de 95%:

$$LOD = 3,3 \frac{SD}{a} \qquad LOQ = 10 \frac{SD}{a}$$

Onde: SD (do inglês, *standard deviation*) corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear e a se refere ao coeficiente angular da reta. Os valores usados nos cálculos são mostrados na Tabela 1. Caso o valor do LOQ calculado seja menor que o primeiro ponto da curva de calibração, seu valor se torna o primeiro ponto da curva.

Os valores obtidos para LOD empregando o eletrodo impresso foram 308 nmol L^{-1} . O LOQ foi considerado o primeiro ponto da curva de calibração, ou seja, $2,0 \mu mol L^{-1}$.

Tabela 1 – Características analíticas obtidas pela curva de calibração de vB2 e estudos de repetibilidade.

Característica Analítica	Valor
Faixa linear ($\mu mol L^{-1}$)	2,0 – 20,0
Coefficiente de determinação	0,999
Coefficiente angular ($\mu A L mol^{-1}$)	4,92
Desvio padrão do coeficiente angular ($\mu A L mol^{-1}$)	0,04
Coefficiente linear (μA)	- 4,91
Desvio padrão do coeficiente linear (μA)	0,46
Limite de detecção ($nmol L^{-1}$)	308
Limite de quantificação ($\mu mol L^{-1}$)	2,0
Repetibilidade da corrente (intra-dia) (%) ^{a,b}	3,37
Repetibilidade da corrente (inter-dia) (%) ^{a,b}	8,01

^a Desvio padrão relativo, ^b n = 6.

Outro parâmetro medido foi a repetibilidade da corrente intra-dia e inter-dia. O desvio padrão relativo das medidas de repetibilidade da corrente intra-dia foi de 3,37% e de repetibilidade de corrente inter-dia foi de 8,01%.

Foi feita uma comparação com trabalhos publicados na literatura relatando o desempenho analítico do eletrodo para a determinação de vB2. A Tabela 2 dispõe os resultados encontrados pelos autores comparados a este trabalho. O LOD obtido por este estudo é próximo aos outros estudos, demonstrando a sensibilidade do dispositivo na detecção de vB2.

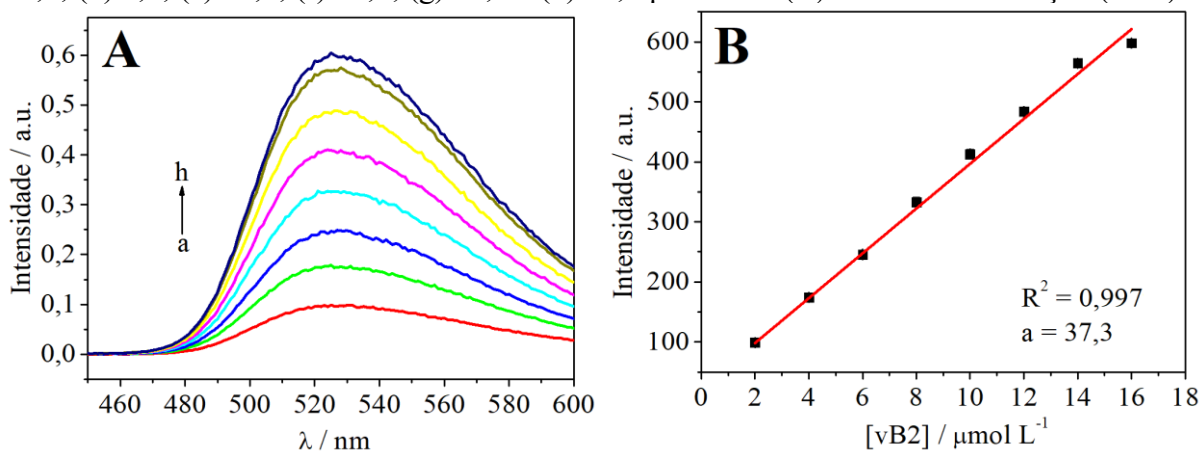
Tabela 2 – Comparação da performance de eletrodos para a determinação de vB2 publicados na literatura.

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD (nmol L^{-1})	Referência
Co^{2+} -Y ^a /CPE	CV	1,7 – 34	710	Nezamzadeh-Ejhieh <i>et al.</i> , 2014
SLSM ^b /CNTPE	CV	2,0 – 200	92,5	Tigari <i>et al.</i> , 2019
MnO_2 /CPE	DPV	0,02 – 9	15	Mehmeti <i>et al.</i> , 2016
PEDOT ^c /ClO ₄ ⁻ /GCE	CV	0,15 – 300	80	Nie <i>et al.</i> , 2013
SPE	CV	0,27 – 53	266	Westmacott <i>et al.</i> , 2018
2D-MoS ₂ -MoO ₃ CC ^d /SPE	LSV	2 – 40	1500	Zribi <i>et al.</i> , 2021
Fe ₃ O ₄ NPs/ePAD	SWV	2 – 20	308	Este trabalho

^a Co^{2+} -Y: zeólito de cobalto e ítrio, ^b SLSM: eletrodo de nanotubos de pasta de carbono modificado com lauril sulfato de sódio, ^c filme de poli(3,4-etilenodioxítiofeno), ^d tecido de carbono funcionalizado com nanofolhas de MoS₂ bidimensional e MoO₃.

A técnica da espectrometria de fluorescência foi usada para comparação dos resultados obtidos pela técnica voltamétrica. Assim, foi construída uma curva de calibração com o método de espectrometria de fluorescência pela leitura de diferentes concentrações de solução padrão de vB2 em água. Os espectros são mostrados na Figura 24A, onde a emissão máxima da vB2 se mostra em 526 nm. A faixa linear foi de 2,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 24 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB2: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0; (d) 8,0; (e) 10,0; (f) 12,0; (g) 14,0 e (h) 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração (n=3).

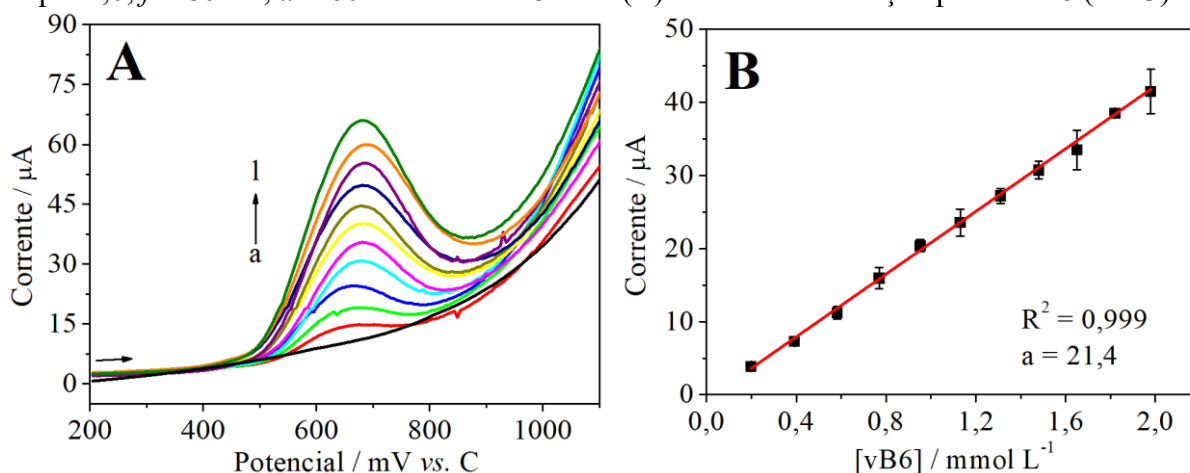


O LOD para a vB2 pelo método de espectrometria de fluorescência foi de 407 nmol L^{-1} , calculado com as mesmas expressões usadas anteriormente. O LOQ foi o primeiro ponto da curva de calibração, 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

5.6.2 Curva de calibração para a vB6

Utilizando as condições experimentais otimizadas anteriormente, a curva de calibração para a vB6 pode ser construída. Foram preparadas soluções com concentrações no intervalo de 0,2 a 2,0 mmol L^{-1} de vB6 para a obtenção dos voltamogramas mostrados na Figura 25A. O pico voltamétrico é observado em + 0,670 V e sua intensidade aumenta proporcionalmente com a concentração da solução de vB6 no intervalo estudado. A regressão linear mostrou um coeficiente de determinação de 0,999, indicando a proporcionalidade entre os valores de corrente e concentração.

Figura 25 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de vB6 sobre o eletrodo descartável: (a) branco; (b) 0,20; (c) 0,39; (d) 0,58; (e) 0,77; (f) 0,95; (g) 1,13; (h) 1,31; (i) 1,48; (j) 1,65; (k) 1,82; (l) 2,0 mmol L⁻¹ em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0; $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV. (B) Curva de calibração para a vB6 ($n = 3$).



A regressão linear pode ser expressa de acordo com a função: $I_{sw} = 21,4 [\text{vB6}] - 0,643 (\pm 0,192)$, onde I_{sw} é a corrente de pico em μA , e $[\text{vB6}]$ é a concentração de vB2 em mol L^{-1} sendo apresentada na Figura 25B.

O LOD foi calculado pela mesma expressão utilizada na seção anterior e foram usados os valores da Tabela 3. O valor obtido para o LOD empregando o eletrodo modificado foi $29,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. O LOQ considerado é o primeiro ponto da curva de calibração, $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 3 – Características analíticas obtidas pela curva de calibração de vB6 e estudos de repetibilidade.

Característica Analítica	Valor
Faixa linear (mmol L^{-1})	0,2 – 2,0
Coefficiente de determinação	0,999
Coefficiente angular ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	21,4
Desvio padrão do coeficiente angular ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	0,2
Coefficiente linear (μA)	-0,643
Desvio padrão do coeficiente linear (μA)	0,192
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	29,5
Limite de quantificação (mmol L^{-1})	0,2
Repetibilidade da corrente (intra-dia) (%) ^{a,b}	1,66
Repetibilidade da corrente (inter-dia) (%) ^{a,b}	6,97

^a Desvio padrão relativo, ^b $n = 6$.

Outro parâmetro medido foi a repetibilidade da corrente intra-dia e inter-dia. O desvio padrão relativo das medidas de repetibilidade da corrente intra-dia foi de 1,66% e de repetibilidade de corrente inter-dia foi de 6,97%.

O LOD encontrado pelo presente estudo se encontra próximo aos LODs descritos por trabalhos encontrados na literatura, como mostrado na Tabela 4, indicando uma boa performance analítica para o eletrodo descartável utilizado.

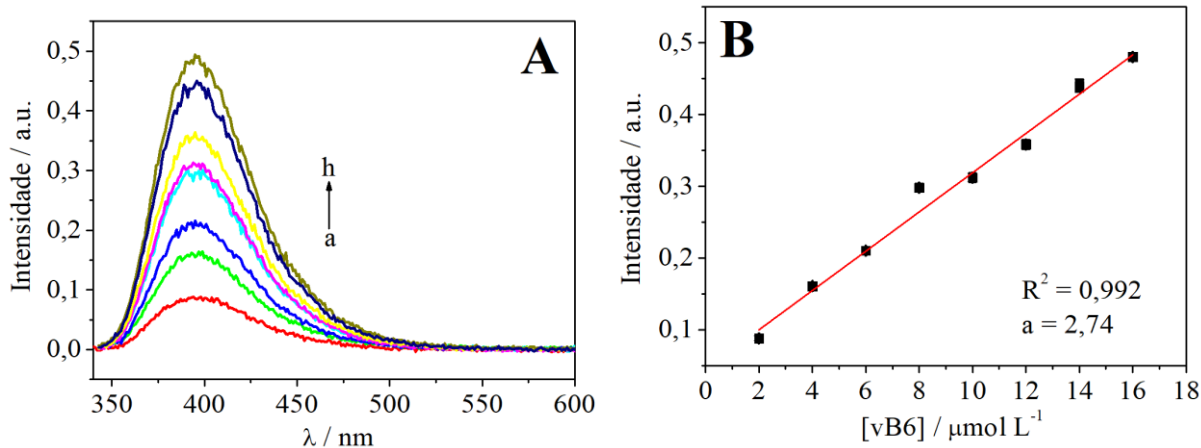
Tabela 4 – Comparação da performance de eletrodos para a determinação de vB6 publicados na literatura.

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
[VO(Salen)] ^a /CPE	LSV	450 – 3300	37	Teixeira <i>et al.</i> , 2004
44-DABP ^b /GC	CV	15 – 2210	4,70	Calam <i>et al.</i> , 2021
Nafion®/GCE	DPV	7,5 – 200	2,2	Farag <i>et al.</i> , 2019
PMBE ^c /GCE	CV	59,1 – 6088	7,9	Tan <i>et al.</i> , 2004
La ³⁺ /Co ₃ O ₄ NFs ^d /GSPE	CV	1,0 – 600	0,4	Nejad <i>et al.</i> , 2019
SPE	CV	11,8 – 473	2,3	Westmacott <i>et al.</i> , 2018
Fe ₃ O ₄ NPs/ePAD	SWV	200 – 2000	29,5	Este trabalho

^a N,N-etileno-bis(salicilideneiminato)oxovanádio(IV); ^b 4,4'-diaminobenzofenona; ^c filme de poli(azul de metileno); ^d nanoflores de La³⁺/Co₃O₄.

Para comparação da técnica voltamétrica, foi construída uma curva de calibração com a técnica de espectrometria de fluorescência pela leitura de diferentes concentrações de solução padrão de vB6 em água. Os espectros são mostrados na Figura 26A, onde a emissão máxima da vB6 acontece em 393 nm. A faixa linear foi de 2,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 26 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB6: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 6,0; (d) 8,0; (e) 10,0; (f) 12,0; (g) 14,0 e (g) 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração (n = 3).



O LOD e o LOQ para a curva de calibração para a vB6 pelo método de espectrometria de fluorescência foram de 1,07 e 3,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, calculados com as mesmas expressões usadas anteriormente.

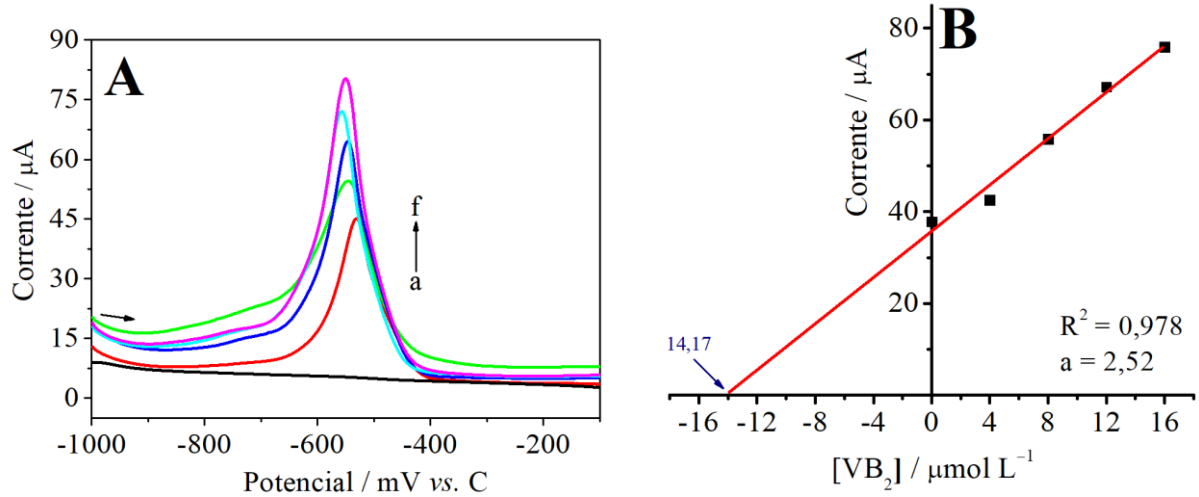
5.7 DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES

5.7.1 Determinação de vB2

O eletrodo impresso foi aplicado na determinação de vB2 em amostras de dois suplementos alimentares: cápsulas de suplemento de vitamina B e suplemento vitamínico líquido sublingual. O objetivo de testar o eletrodo na determinação de amostras é demonstrar sua aplicabilidade. O método empregado para a determinação dessas amostras foi a adição de padrão, conhecido por diminuir efeitos de matriz.

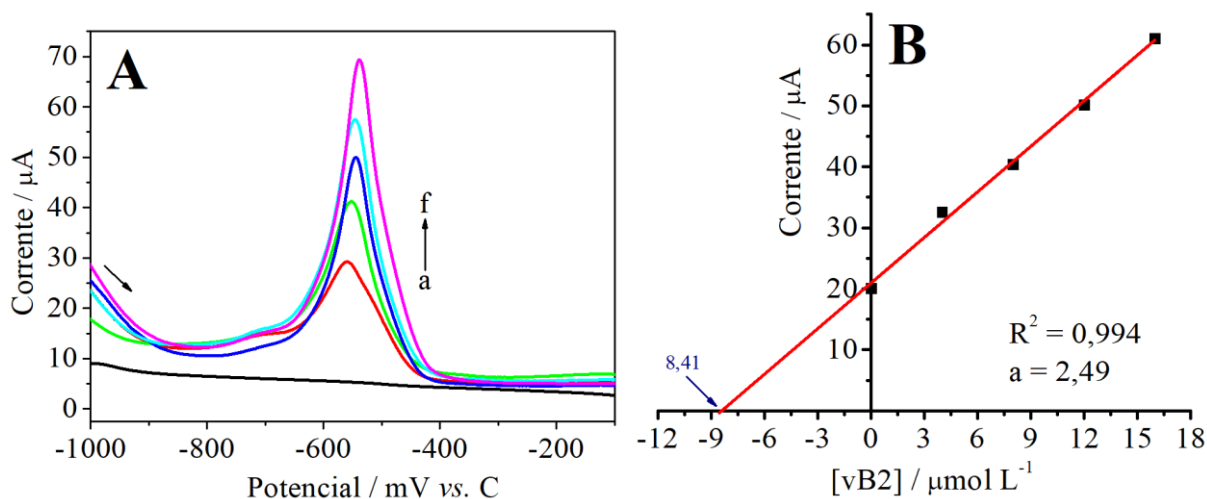
Para as amostras de cápsulas, os voltamogramas de onda quadrada de uma das replicatas podem ser observados na Figura 27A, contendo o branco (curva a), a amostra (curva b) e a amostra somado à solução padrão de vB2 (curvas c-f). É possível observar que a corrente de pico aumentou linearmente conforme aumentou a concentração de vB2. Dessa forma, a curva de adição de padrão pode ser construída e é mostrada na Figura 27B. Pela extrapolação da curva de adição de padrão é possível obter o valor de 14,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de vB2 na alíquota. Considerando a diluição feita na preparação da amostra (Seção 4.4), foi calculado o valor de 3,54 μmol ou 1,33 mg de vB2 por cápsula.

Figura 27 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de cápsulas, e (c-f) amostra somado a solução padrão de vB2 de 4,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} pH 2,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de cápsula. $f = 30$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.



A Figura 28A contém os voltamogramas de onda quadrada de uma das replicatas para a amostra de líquido sublingual, contendo o branco (curva a), a amostra (curva b) e a amostra somado a solução padrão de vB2 (curvas c-f). A corrente de pico é linearmente proporcional a concentração de vB2. Dessa forma, a curva de adição de padrão foi construída e é mostrada na Figura 28B. Pela extrapolação da curva de adição de padrão é possível obter o valor de 8,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de vB2 na alíquota. Considerando a diluição feita na preparação da amostra (Seção 4.4), foi calculado o valor de 4,25 μmol ou 1,60 mg por mililitro de amostra de líquido sublingual.

Figura 28 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de líquido sublingual, e (c-f) amostra somado a solução padrão de vB2 de 4,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} pH 2,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de líquido sublingual. $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

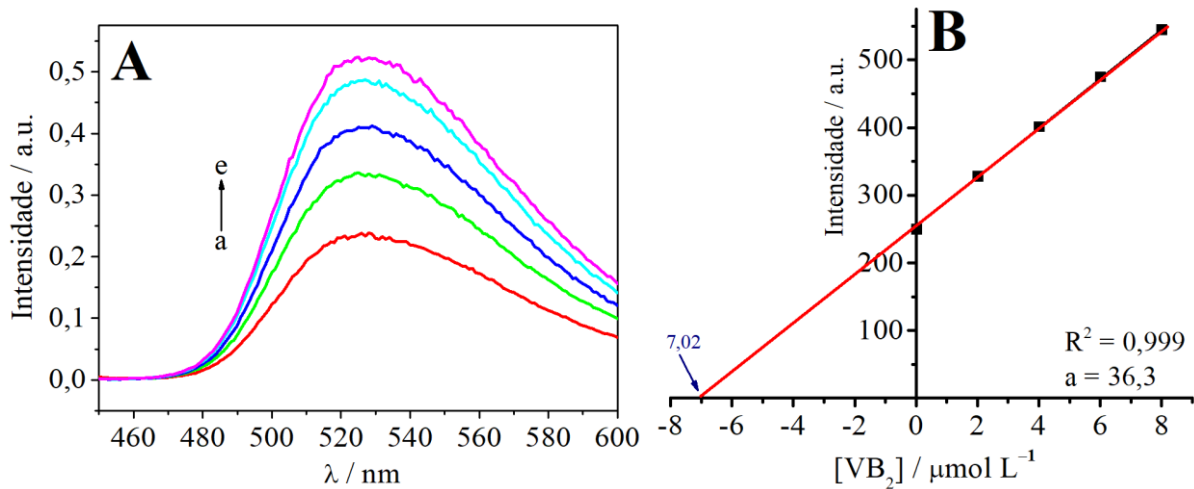


A inclinação da curva de adição de padrão ($2,52$ e $2,49 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, Figura 28B) foi diferente daquela obtida pela curva de calibração ($4,92 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, Figura 23B), indicando que existe interferência dos componentes da matriz na determinação de vB2. Esse efeito pode estar relacionado aos excipientes da amostra (dióxido de silício e amido) que, por ocuparem sítios ativos na superfície do eletrodo, diminuem a sensibilidade em relação a vB2. Nesse sentido, o uso da curva de adição de padrão é recomendado para a minimização desses efeitos.

O método proposto foi comparado a um segundo com o objetivo de averiguar a sua exatidão. Para a quantificação das amostras foi usado o método da adição de padrão.

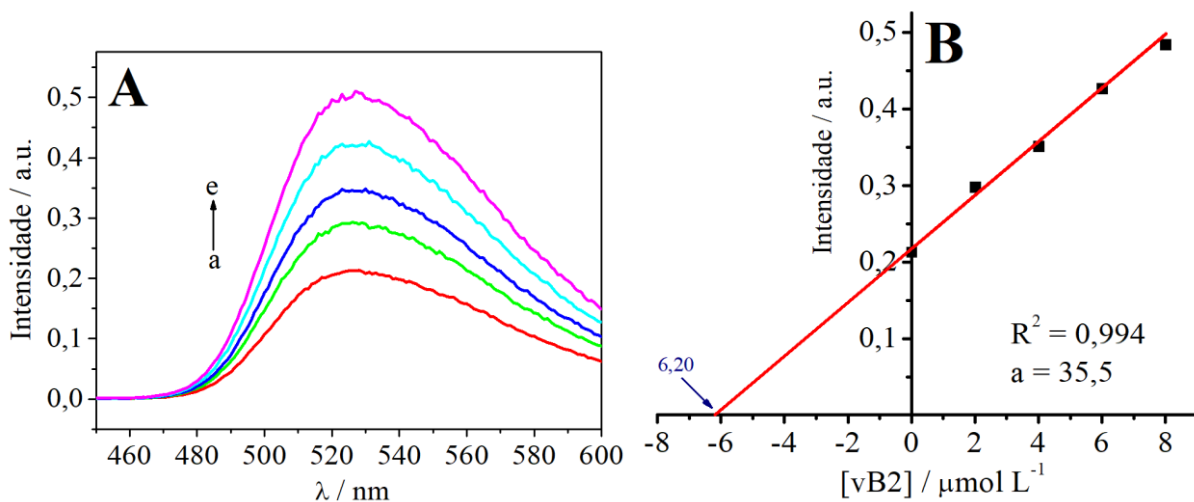
Para a amostra de cápsulas da vB2, os espectros de fluorescência e curva de adição de padrão podem ser observados na Figura 29. Pela extrapolação da curva de adição de padrão, foi encontrada uma concentração de $7,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ na alíquota. Considerando a diluição é possível obter o valor de $3,70 \mu\text{mol}$ ou $1,39 \text{ mg}$ por cápsula.

Figura 29 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB2: (a) amostra de cápsula e (b-e) amostra somado a solução padrão de vB2 de 2,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição padrão para a amostra de cápsula.



Para a amostra de líquido sublingual da vB2, os espectros de fluorescência e a curva de adição de padrão são mostrados na Figura 30. Pela extrapolação da curva de adição de padrão é possível obter o valor de concentração de $6,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ na alíquota. Considerando a diluição, é encontrado o valor de $4,38 \mu\text{mol}$ ou $1,65 \text{ mg}$ por mililitro de líquido sublingual.

Figura 30 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB2: (a) amostra de líquido sublingual e (b-e) amostra somado a solução padrão de vB2 de 2,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição padrão para a amostra de líquido sublingual. ($n = 3$).



A Tabela 5 apresenta a síntese dos resultados obtidos pelos métodos voltamétrico e espectrométrico, bem como os testes t e F para comparação. As equações utilizadas para o cálculo dos testes são (LEITE, 2002):

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_a \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad F = \frac{SD_{maior}^2}{SD_{menor}^2}$$

Onde: \bar{x}_1 é o valor médio das amostras obtido pelo método voltamétrico; \bar{x}_2 é o valor médio das amostras obtido pelo método comparativo; S_a é a estimativa do desvio padrão agregado; SD é o desvio padrão amostral e n é o número de repetições.

Para a amostra de cápsula, a concentração de vB2 determinada pelo método voltamétrico foi de 1,31 mg cápsula⁻¹ (n = 3, RSD = 5,10%), enquanto que de acordo com o método espectrométrico foi de 1,28 (n = 3, RSD = 7,50%). Para a amostra de líquido sublingual, a concentração de vB2 determinada pelo método voltamétrico foi de 1,60 mg mL⁻¹ (n = 3, RSD = 1,16%), enquanto que o método espectrométrico encontrou 1,70 mg mL⁻¹ (n = 3, RSD = 4,41%).

Tabela 5 – Resultados obtidos para quantificação de vB2 nas amostras de cápsula e líquido sublingual pelo método voltamétrico e pelo espectrométrico.

Amostra	Cápsula		Líquido Sublingual	
Valor rotulado	1,3 (mg cápsula ⁻¹)		1,7 (mg mL ⁻¹)	
Técnica	SWV	Fluorescência	SWV	Fluorescência
Valor medido^a	1,31 ± 0,07	1,28 ± 0,10	1,60 ± 0,02	1,70 ± 0,07
E_r (%)^b		+2,34		-5,88
t_{calculado}^c		0,23		0,80
F_{calculado}^d		2,06		16,26

^a n = 3. ^b E_r = erro relativo entre as técnicas. ^c t_{crítico} = 2,78. ^d F_{crítico} = 19,00.

O teste F foi aplicado para comparar a precisão entre os resultados obtidos pelo método voltamétrico e espectrométrico. Os valores de F calculado são exibidos na Tabela 5. Para as amostras, os valores de F calculado foram inferiores ao F_{crítico} (19,00 para 2 graus de liberdade com 95% de confiança), indicando que não houve diferença significativa entre a precisão dos dados obtidos por ambos os métodos.

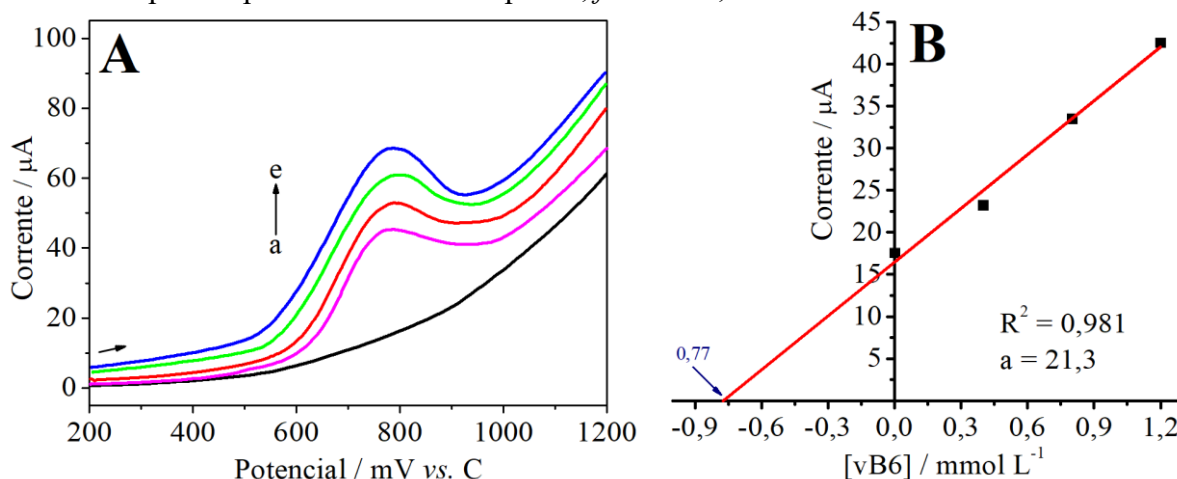
Para a comparação das médias fornecidas pelos métodos, foi aplicado o teste t de Student. O valor de t tabelado é obtido a partir da tabela de distribuição de Student para (n₁ + n₂ - 2) graus de liberdade e nível de confiança de 95%. Os valores de t para as amostras são encontrados na Tabela 5. Todos os valores de t_{calculado} foram inferiores ao valor de t_{crítico}, indicando que não houve diferença significativa entre as médias obtidas pelos dois métodos.

5.7.2 Determinação de vB6

O eletrodo impresso foi também aplicado na determinação de vB6 nas amostras dos dois suplementos alimentares: cápsulas de suplemento de vitamina B e suplemento vitamínico líquido sublingual. Foi usado o método da adição de padrão para a determinação de vB6 nas amostras.

Para as amostras de cápsulas, os voltamogramas de onda quadrada de uma das replicatas podem ser observados na Figura 31A, contendo o branco (curva a), a amostra (curva b) e a amostra somado a solução padrão de vB6 (curvas c-e). É possível observar que a corrente de pico aumentou linearmente conforme aumentou a concentração de vB6. Dessa forma, a curva de adição de padrão pôde ser construída e é mostrada na Figura 31B. Pela extrapolação da curva de adição de padrão é possível obter o valor de $0,77 \text{ mmol L}^{-1}$ de vB6 no eletrodo. Considerando a diluição feita na preparação da amostra (Seção 4.4), foi calculado o valor de $7,72 \text{ } \mu\text{mol}$ ou $1,31 \text{ mg}$ de vB6 por cápsula.

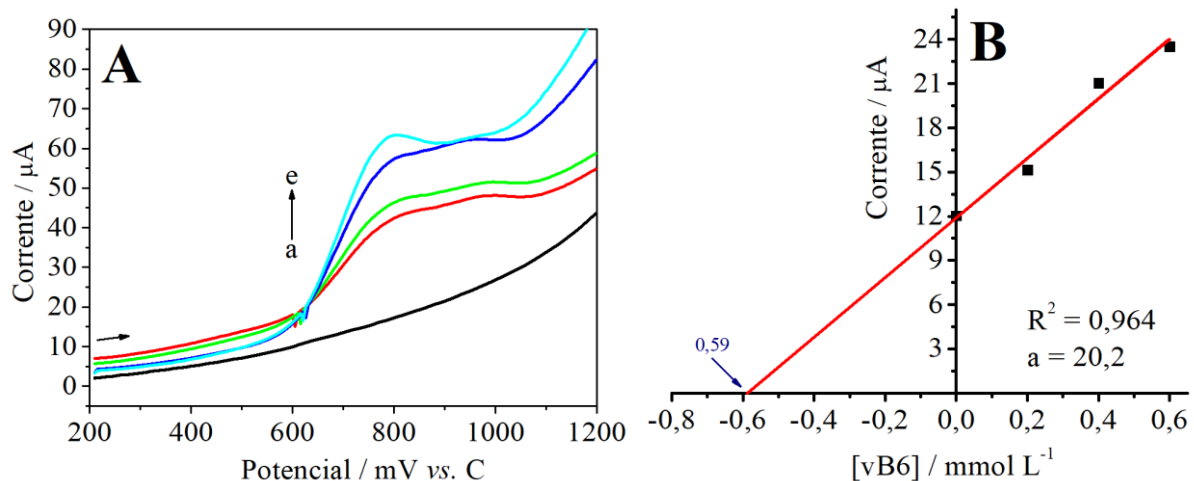
Figura 31 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de cápsula, e (c-e) amostra somado a solução padrão de vB6 de $0,4$ a $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH $4,0$, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de cápsula.; $f = 80 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.



Os voltamogramas de onda quadrada de uma das replicatas para as amostras de líquido sublingual podem ser observados na Figura 32A, contendo o branco (curva a), a amostra (curva b) e a amostra somado a solução padrão de vB6 (curvas c-e). É possível observar que a corrente de pico aumentou linearmente conforme aumentou a concentração de vB6. Dessa forma, a curva de adição de padrão pôde ser construída e é mostrada na Figura

32B. Pela extrapolação da curva de adição de padrão é possível obter o valor de 0,59 mmol L⁻¹ de vB6 no eletrodo. Considerando a diluição feita na preparação da amostra (Seção 4.4), foi calculado o valor de 11,8 μmol ou 1,99 mg de vB6 por mililitro.

Figura 32 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para: (a) branco, (b) amostra de líquido sublingual, e (c-e) amostra somado a solução padrão de vB6 de 0,4 a 1,2 mmol L⁻¹ em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0, empregando o eletrodo descartável. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de líquido sublingual.; $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV.

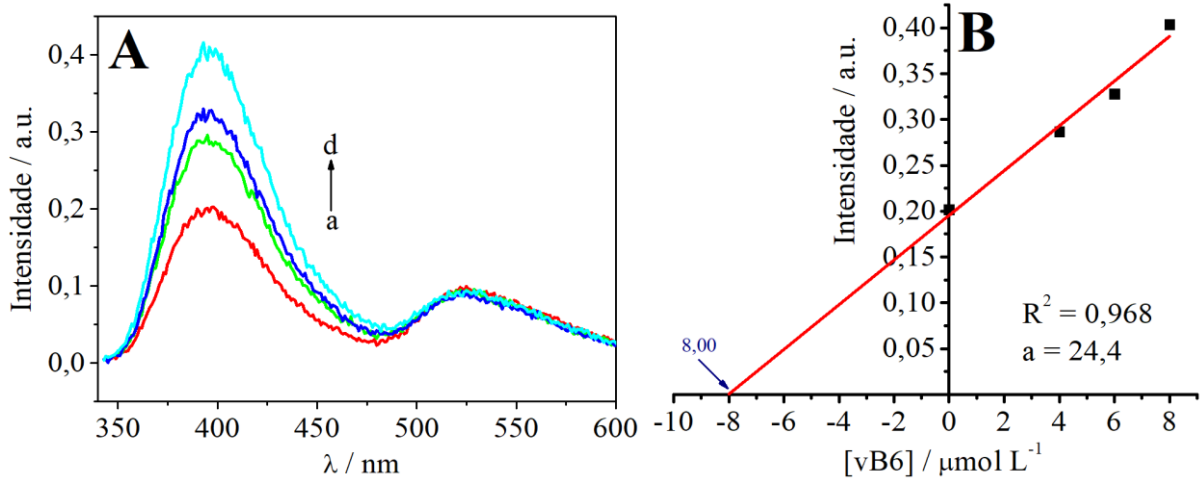


A inclinações das curvas de adição de padrão (21,3 e 20,2 mmol L⁻¹) foram bem similares àquela obtida pela curva de calibração (21,4 mmol L⁻¹), indicando que não houve interferência pelos componentes da matriz na determinação de vB6 pelo método voltamétrico.

O método voltamétrico foi comparado a um segundo método com o objetivo de averiguar sua exatidão. Para a determinação das amostras foi usado o método da adição de padrão.

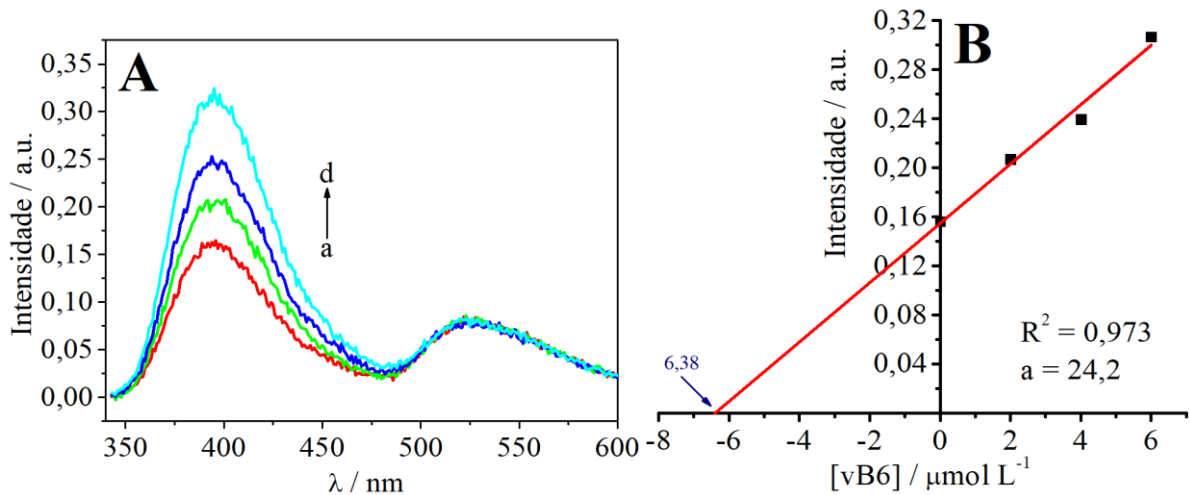
Para a amostra de cápsulas, os espectros de fluorescência e curva de adição de padrão podem ser observados na Figura 33A. Pela extrapolação da curva de adição de padrão na Figura 33B, foi encontrada uma concentração de 8,00 μmol L⁻¹ na alíquota. Levando em consideração a diluição da amostra, foi calculado o valor de 8,75 μmol ou 1,48 mg por cápsula.

Figura 33 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB6: (a) amostra de cápsula e (b-d) amostra somado a solução padrão de vB6 de 4,0 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição padrão para a amostra de cápsula.



Para a amostra de líquido sublingual, os espectros de fluorescência e a curva de adição de padrão podem ser observados na Figura 34A. Pela extrapolação da curva de adição de padrão na Figura 34B, foi encontrada uma concentração de 6,38 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na alíquota. Considerando a diluição é possível obter o valor de 12,9 μmol ou 2,19 mg por cápsula.

Figura 34 – (A) Espectros de fluorescência para solução padrão de vB6: (a) amostra de líquido sublingual e (b-d) amostra somado a solução padrão de vB6 de 2,0 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura. (B) Curva de adição de padrão para a amostra de líquido sublingual. ($n = 3$).



Os resultados do método voltamétrico e espectrométrico foram sintetizados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados obtidos para quantificação de vB6 nas amostras de cápsula e líquido sublingual pelo método voltamétrico e pelo espectrométrico.

Amostra	Cápsula		Líquido Sublingual	
	Técnica		Técnica	
Valor rotulado	1,3 (mg/cápsula)		2,0 (mg/mL)	
Técnica	SWV	Fluorescência	SWV	Fluorescência
Valor medido^a	1,35 ±0,194	1,43 ±0,131	1,82 ±0,124	2,19 ±0,111
E_r (%)^b		-5,59		-16,9
t_{calculado}^c		0,30		1,93
F_{calculado}^d		2,19		1,24

^a n = 3. ^b E_r = erro relativo entre as técnicas. ^c t_{crítico} = 2,78. ^d F_{crítico} = 19,00.

O teste F foi usado para fazer a comparação da precisão entre os resultados obtidos pelo método voltamétrico e o espectrométrico. Os valores de F calculado são exibidos na Tabela 6. Para ambas as amostras, os valores de F calculado foram inferiores ao F_{crítico} (19,00 para 2 graus de liberdade com 95% de confiança), indicando que não houve diferença significativa entre a precisão dos dados obtidos.

Para a comparação das médias fornecidas pelos métodos, foi aplicado o teste *t* de Student. Os valores de *t* para as amostras são encontrados na Tabela 6. Todos os valores de *t*_{calculado} foram inferiores ao valor de *t*_{crítico}, indicando que não houve diferença significativa entre as médias obtidas pelos dois métodos.

6 CONCLUSÃO

Foi produzido um novo eletrodo descartável a base de grafite em substrato de papel e modificado com magnetita para a determinação das vitaminas B2 e B6 em amostras de suplementos alimentares comerciais. Uma tinta foi desenvolvida com verniz e grafite para a manufatura dos eletrodos descartáveis. A superfície dos eletrodos foi caracterizada por SEM, EIS e CV, comprovando que a modificação com magnetita foi efetuada e ofereceu uma vantagem analítica ao detector, tornando a análise mais sensível.

A metodologia para a quantificação de vitaminas B2 e B6 foi desenvolvida através da técnica de voltametria de onda quadrada usando os seguintes parâmetros: $f = 30$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV para a vB2 em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) e $f = 80$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV para a vB6 em solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0). Posteriormente, as curvas de calibração foram construídas na faixa de concentração de 2,0 até 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$) e LOD de 308 nmol L⁻¹ para a vB2 e 0,2 a 2,0 mmol L⁻¹ ($R^2 = 0,999$) e LOD de 29,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a vB6.

Amostras de suplementação alimentar foram quantificadas quanto a concentração de vB2 e vB6 e os resultados foram comparados àqueles obtidos pelo método de espectrometria de fluorescência. A comparação entre os métodos foi feita usando as ferramentas estatísticas teste *t* de Student e teste F. Para ambas as amostras e as vitaminas, não houve diferença significativa em relação a precisão e exatidão entre os valores obtidos pelos dois métodos.

Os LODs obtidos para o eletrodo de papel se mostraram próximos àqueles obtidos por outros autores para eletrodos populares. Levando em consideração as características do eletrodo de papel como descartabilidade e alta portabilidade, o eletrodo é qualificado como um excelente sensor *in situ*.

Dessa forma, todos os objetivos estabelecidos foram cumpridos. A determinação de vB2 e vB6 nas amostras selecionadas pelo eletrodo descartável foi satisfatória, colocando o método como perspectiva para determinação de novos analitos.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Pintura industrial - Terminologia. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, ABNT NBR 15156, 2004.
- ADAMS, Ralph N. Carbon Paste Electrodes. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 30, n. 9, p. 1576, 1958.
- AHMADI, Mazaher; GHOORCHIAN, Arash; DASHTIAN, Kheibar; KAMALABADI, Mahdie; MADRAKIAN, Tayyebah; AFKHAMI, Abbas. Application of magnetic nanomaterials in electroanalytical methods: A review. **Talanta**, v. 225, n. November 2020, p. 121974, 2021.
- ALI, Attarad; ZAFAR, Hira; ZIA, Muhammad; UL HAQ, Ihsan; PHULL, Abdul Rehman; ALI, Joham Sarfraz; HUSSAIN, Altaf. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49–67, 2016.
- ALPAR, Nurcan; PINAR, Pınar Talay; YARDIM, Yavuz; ŞENTÜRK, Zühre. Voltammetric Method for the Simultaneous Determination of Melatonin and Pyridoxine in Dietary Supplements Using a Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 29, n. 7, p. 1691–1699, 2017.
- ALWARTHAN, Abdulrahman A.; A. ALY, Fatima. Chemiluminescent determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical samples using flow injection. **Talanta**, v. 45, n. 6, p. 1131–1138, 1998.
- ANTUÑA-JIMÉNEZ, Daniel; GONZÁLEZ-GARCÍA, María Begoña; HERNÁNDEZ-SANTOS, David; FANJUL-BOLADO, Pablo. Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing. **Biosensors**, v. 10, n. 2, p. 1–22, 2020.
- ARAÚJO, Diele A. G.; CAMARGO, Jéssica R.; PRADELA-FILHO, Lauro A.; LIMA, Ana P.; MUÑOZ, Rodrigo A. A.; TAKEUCHI, Regina M.; JANEGITZ, Bruno C.; SANTOS, André L. A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid. **Microchemical Journal**, v. 158, n. July, p. 105297, 2020.
- ARUL, P.; GOWTHAMAN, N. S. K.; NARAYANAMOORTHY, E.; ABRAHAM JOHN, S.; HUANG, Sheng-Tung. Synthesis of homogeneously distributed gold nanoparticles built-in metal free organic framework: Electrochemical detection of riboflavin in pharmaceutical and human fluids samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 887, p. 115143, 2021.
- BAGOJI, Atmanand M.; NANDIBEWOOR, Sharanappa T. Redox Behavior of Riboflavin and Its Determination in Real Samples at Graphene Modified Glassy Carbon Electrode. **Physical Chemistry Communications**, v. 3, n. 2, p. 65–76, 2016.
- BAILEY, Matthew R.; SCHULTZ, Zachary D. SERS speciation of the electrochemical oxidation-reduction of riboflavin. **Analyst**, v. 141, n. 17, p. 5078–5087, 2016.
- BALL, George F. M. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability.. 1. ed. Boca

Raton: CRC Press, 2006.

BEITOLLAHI, H.; GARKANI NEJAD, F. Voltammetric determination of vitamin B6 (pyridoxine) at a graphite screen-printed electrode modified with graphene oxide/Fe₃O₄@SiO₂ nanocomposite. **Russian Chemical Bulletin**, v. 67, n. 2, p. 238–242, 2018.

BEITOLLAHI, Hadi; MOHAMMADI, Sayed Zia; SAFAEI, Mohadeseh; TAJIK, Somayeh. Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: A review. **Analytical Methods**, v. 12, n. 12, p. 1547–1560, 2020.

BRESSON, Jean-Louis et al. Dietary Reference Values for vitamin B6. **EFSA Journal**, v. 14, n. 6, 2016.

BRUNETTI, Barbara. Recent Advances in Electroanalysis of Vitamins. **Electroanalysis**, v. 28, n. 9, p. 1930–1942, 2016.

BRUNETTI, Barbara; DESIMONI, Elio. Voltammetric determination of vitamin B6 in food samples and dietary supplements. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 2, p. 155–160, 2014.

CALDERÓN-OSPINA, Carlos Alberto; NAVA-MESA, Mauricio Orlando. B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 5–13, 2020.

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

CHEN, Gang; DING, Xianghuan; CAO, Zhiguang; YE, Jiannong. Determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations for health-caring purposes by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 408, n. 1–2, p. 249–256, 2000.

COLOZZA, Noemi; CARATELLI, Veronica; MOSCONE, Danila; ARDUINI, Fabiana. Origami Paper-Based Electrochemical (Bio)Sensors: State of the Art and Perspective. **Biosensors**, v. 11, n. 9, p. 328, 2021.

DA COSTA, Tallis H.; SONG, Edward; TORTORICH, Ryan P.; CHOI, Jin-Woo. A Paper-Based Electrochemical Sensor Using Inkjet-Printed Carbon Nanotube Electrodes. **ECS Journal of Solid State Science and Technology**, v. 4, n. 10, p. S3044–S3047, 2015.

DA SILVEIRA, Jonas Pires; PIOVESAN, Jamille Valéria; SPINELLI, Almir. Carbon paste electrode modified with ferrimagnetic nanoparticles for voltammetric detection of the hormone estradiol. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 22–30, 2017.

DESAI, Purvi B.; KOTKAR, Rahul M.; SRIVASTAVA, Ashwini K. Electrochemical behaviour of pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) at carbon paste electrode modified with crown ethers. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, p. 1067–1075, 2008.

DHAR, Palash Kumar; SAHA, Prianka; HASAN, Md. Kamrul; AMIN, Md. Khairul; HAQUE, Md. Rezaul. Green synthesis of magnetite nanoparticles using Lathyrus sativus peel extract and evaluation of their catalytic activity. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 3,

p. 100117, 2021.

DINÇ, Erdal; KÖKDİL, Gamze; ONUR, Feyyaz. A comparison of matrix resolution method, ratio spectra derivative spectrophotometry and HPLC method for the determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 6, p. 915–923, 2000.

FARAG, Amir Shaaban; PRAVCOVÁ, Kateřina; ČESLOVÁ, Lenka; VYTRÁS, Karel; SÝS, Milan. Simultaneous Determination of Caffeine and Pyridoxine in Energy Drinks using Differential Pulse Voltammetry at Glassy Carbon Electrode Modified with Nafion®. **Electroanalysis**, v. 31, n. 8, p. 1511–1516, 2019.

FREITAS, Rafaela C.; ORZARI, Luiz O.; FERREIRA, Luís M. C.; PAIXÃO, Thiago R. L. C.; COLTRO, Wendell K. T.; VICENTINI, Fernando C.; JANEGITZ, Bruno C. Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 897, n. March, p. 115550, 2021.

GARCÍA, L.; BLÁZQUEZ, S.; SAN ANDRÉS, M. P.; VERA, S. Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 2, p. 193–199, 2001.

GEBRETSADIK, Tesfay; BELAYNEH, Tilahun; GEBREMICHAEL, Sosina; LINERT, Wolfgang; THOMAS, Madhu; BERHANU, Tarekegn. Recent advances in and potential utilities of paper-based electrochemical sensors: Beyond qualitative analysis. **Analyst**, v. 144, n. 8, p. 2467–2479, 2019.

GEORGE, Jaise Mariya; ANTONY, Arun; MATHEW, Beena. Metal oxide nanoparticles in electrochemical sensing. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 358, 2018.

GONZALEZ-RODRÍGUEZ, J.; SEVILLA, J. M.; PINEDA, T.; BLÁZQUEZ, M. A comparative study of the electrochemical properties of vitamin b-6 related compounds at physiological pH. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 47, n. 7, p. 835–845, 2011.

GOVINDASAMY, Mani; UMAMAHESWARI, Rajaji; CHEN, Shen-Ming; MANI, Veerappan; SU, Chaochin. Graphene Oxide Nanoribbons Film Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Real-Time Detection of Methyl Parathion in Food Samples. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 164, n. 9, p. B403–B408, 2017.

GUIA DA FARMÁCIA. Vitaminas tem alta de 66% no faturamento, e a vitamina C cresceu 137%. São Paulo, 2021. Disponível em: <https://guiadafarmacia.com.br/vitaminas-tem-alta-de-66-no-faturamento-e-a-vitamina-c-cresceu-137/>. Acesso em: 18 ago. 2021.

GUL, Wajiha Nasheed; ANWAR, Zubair; QADEER, Kiran; PERVEEN, Shaheen; AHMAD, Iqbal. Methods of analysis of riboflavin (vitamin B2): a review Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Methods of Analysis of Riboflavin (Vitamin B 2): A Review. **RADS - Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 2, n. 2, p. 10–21, 2014.

HAIJIAN, Ali; RAFATI, Amir Abbas; AFRAZ, Ahmadreza; NAJAFI, Mojgan. Electrosynthesis of high-density polythiophene nanotube arrays and their application for sensing of riboflavin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 199, p. 150–155, 2014.

HASHEM, Hisham; EL-SAYED, Heba M. Quality by design approach for development and

validation of a RP-HPLC method for simultaneous determination of co-administered levetiracetam and pyridoxine HCl in prepared tablets. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 55–63, 2018.

HAYAT, Akhtar; MARTY, Jean Louis. Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 6, p. 10432–10453, 2014.

HERNÁNDEZ-SANTOS, David; GONZÁLEZ-GARCÍA, María Begoña; GARCÍA, Agustín Costa. Metal-nanoparticles based electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 14, n. 18, p. 1225–1235, 2002.

HERNÁNDEZ, Silvia R.; RIBERO, Gustavo G.; GOICOECHEA, Héctor C. Enhanced application of square wave voltammetry with glassy carbon electrode coupled to multivariate calibration tools for the determination of B6 and B12 vitamins in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v. 61, n. 5, p. 743–753, 2003.

HUANG, Lei; TIAN, Shulin; ZHAO, Wenhao; LIU, Ke; GUO, Jinhong. Electrochemical vitamin sensors: A critical review. **Talanta**, v. 222, p. 121645, 2021.

IBRAHIM, Maha M.; ELZANFALY, Eman S.; EL-ZEINY, Mohamed B.; RAMADAN, Nesreen K.; KELANI, Khadiga M. Spectrophotometric determination of meclizine hydrochloride and pyridoxine hydrochloride in laboratory prepared mixtures and in their pharmaceutical preparation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 178, p. 234–238, 2017.

JEMMELI, Dhouha; MARCOCCIO, Eleonora; MOSCONE, Danila; DRIDI, Cherif; ARDUINI, Fabiana. Highly sensitive paper-based electrochemical sensor for reagent free detection of bisphenol A. **Talanta**, v. 216, p. 120924, 2020.

JIRASIRICHOTE, Apapond; PUNRAT, Eakkasit; SUEA-NGAM, Akkapol; CHAILAPAKUL, Orawon; CHUANUWATANAKUL, Suchada. Voltammetric detection of carbofuran determination using screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles and graphene oxide. **Talanta**, v. 175, n. July, p. 331–337, 2017.

KANT, Tushar; SHRIVAS, Kamlesh; GANESAN, Vellaichamy; MAHIPAL, Yugal Kishor; DEVI, Rama; DEB, Manas Kanti; SHANKAR, Ravi. Flexible printed paper electrode with silver nano-ink for electrochemical applications. **Microchemical Journal**, v. 155, n. 104687, p. 104687, 2020.

KAUR, Balwinder; SRIVASTAVA, Rajendra. Nanocrystalline metallosilicate modified electrodes for the simultaneous, sensitive, and selective determination of riboflavin, rutin, and pyridoxine. **Electroanalysis**, v. 26, n. 5, p. 1078–1089, 2014.

KHAIRY, Mohamed; AYOUB, Haytham A.; BANKS, Craig E. Non-enzymatic electrochemical platform for parathion pesticide sensing based on nanometer-sized nickel oxide modified screen-printed electrodes. **Food Chemistry**, v. 255, p. 104–111, 2018.

KHALOO, Shokooh Sadat; MOZAFFARI, Shahla; ALIMOHAMMADI, Parisa; KARGAR, Hadi; ORDOOKHANIAN, Joliet. Sensitive and Selective Determination of Riboflavin in Food and Pharmaceutical Samples Using Manganese (III) Tetraphenylporphyrin Modified Carbon Paste Electrode. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 10, p. 2272–

2283, 2016.

KILLARD, Anthony J. Disposable sensors. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 57–62, 2017.

KLEIJN, Steven E. F.; LAI, Stanley C. S.; KOPER, Marc T. M.; UNWIN, Patrick R. Electrochemistry of nanoparticles. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 14, p. 3558–3586, 2014.

KREFT, Gabriel L.; DE BRAGA, Otoniel C.; SPINELLI, Almir. Analytical electrochemistry of vitamin B 12 on a bismuth-film electrode surface. **Electrochimica Acta**, v. 83, p. 125–132, 2012.

KUZMANOVIĆ, Darko; KHAN, Muslim; MEHMETI, Eda; NAZIR, Ruqia; AMAIZAH, Naser Ramdan R.; STANKOVIĆ, Dalibor M. Determination of pyridoxine (Vitamin B6) in pharmaceuticals and urine samples using unmodified boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 64, p. 184–189, 2016.

KILYOS. Mercado de suplementos: números e projeções. São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.kilyos.com.br/mercado-de-suplementos-numeros-e-projecoes/> Acesso em: 18 ago. 2021.

LEE, Vivian Bee Chin; MOHD-NAIM, Noor Faizah; TAMIYA, Eiichi; AHMED, Minhaz Uddin. Trends in paper-based electrochemical biosensors: From design to application. **Analytical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 7–18, 2018.

LIU, Shuopeng; SU, Wenqiong; DING, Xianting. A review on microfluidic paper-based analytical devices for glucose detection. **Sensors (Switzerland)**, v. 16, n. 12, p. 1–17, 2016.

LOVANDER, Matthew D.; LYON, Jacob D.; PARR, Daniel L.; WANG, Junnan; PARKE, Brenna; LEDDY, Johna. Review-electrochemical properties of 13 vitamins: A critical review and assessment. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 165, n. 2, p. G18–G49, 2018.

MASSEY, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, n. 4, p. 283–296, 2000.

MATTIOLI, Isabela A.; CERVINI, Priscila; CAVALHEIRO, Éder T. G. Screen-printed disposable electrodes using graphite-polyurethane composites modified with magnetite and chitosan-coated magnetite nanoparticles for voltammetric epinephrine sensing: a comparative study. **Microchimica Acta**, v. 187, p. 318, 2020.

MEHMETI, Eda; STANKOVIĆ, Dalibor M.; CHAIYO, Sudkate; ŠVORC, Lubomir; KALCHER, Kurt. Manganese dioxide-modified carbon paste electrode for voltammetric determination of riboflavin. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 5, p. 1619–1624, 2016.

MEKONNEN, Alemu; SAINI, R. C.; TADESE, Abraha; PAL, Rishi. Square wave voltammetric determination of pyridoxine in pharmaceutical preparations using cobalthexacyanoferrate modified carbon paste electrode. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 544–551, 2014.

MERKOÇI, Arben. Nanobiomaterials in electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 19, n. 7–8, p. 739–741, 2007.

MIRCESKI, Valentin; SMARZEWSKA, Sylwia; GUZIEJEWSKI, Dariusz. Measuring the Electrode Kinetics of Vitamin B2 at a Constant Time Window of a Square Wave Voltammetric Experiment. **Electroanalysis**, v. 28, n. 2, p. 385–393, 2016.

MOÇO, Anna C. R. et al. Carbon ink-based electrodes modified with nanocomposite as a platform for electrochemical detection of HIV RNA. **Microchemical Journal**, v. 170, n. 106739, 2021.

MOREIRA, Fernanda; DE ANDRADE MARANHÃO, Tatiane; SPINELLI, Almir. Carbon paste electrode modified with Fe₃O₄ nanoparticles and BMI.PF₆ ionic liquid for determination of estrone by square-wave voltammetry. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1303–1313, 2018.

MOTAGHEDIFARD, Mohammadhassan; BEHPOUR, Mohsen; GHOREISHI, Sayed Mahdi; HONARMAND, Ebrahim. Electro-deposition of gold nanostructures on carbon paste electrode: a platform with signal amplification for voltammetric study and determination of pyridoxine (vitamin B6). **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 52, n. 5, p. 477–487, 2016.

MOYA, Ana; GABRIEL, Gemma; VILLA, Rosa; JAVIER DEL CAMPO, F. Inkjet-printed electrochemical sensors. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 29–39, 2017.

NANTAPHOL, Siriwan; CHAILAPAKUL, Orawon; SIANGPROH, Weena. A novel paper-based device coupled with a silver nanoparticle-modified boron-doped diamond electrode for cholesterol detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 136–143, 2015.

NEGUT CIOATES, Catalina. Review—Electrochemical Sensors Used in the Determination of Riboflavin. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037558, 2020.

NEJAD, Fariba Garkani; BEITOLLAHI, Hadi; TAJIK, Somayeh; JAHANI, Shohreh. La³⁺-doped Co₃O₄ nanoflowers modified graphite screen printed electrode for electrochemical sensing of vitamin B₆. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 6, n. 1, p. 69–79, 2019.

NEZAMZADEH-EJHIEH, Alireza; POULADSAZ, Pouya. Voltammetric determination of riboflavin based on electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon paste electrodes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 2146–2152, 2014.

NIE, Tao; XU, Jing Kun; LU, Li Min; ZHANG, Kai Xin; BAI, Ling; WEN, Yang Ping. Electroactive species-doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films: Enhanced sensitivity for electrochemical simultaneous determination of vitamins B₂, B₆ and C. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 244–250, 2013.

NILGHAZ, Azadeh; GUAN, Liyun; TAN, Weirui; SHEN, Wei. Advances of Paper-Based Microfluidics for Diagnostics - The Original Motivation and Current Status. **ACS Sensors**, v. 1, n. 12, p. 1382–1393, 2016.

NOVIANA, Eka; CARRÃO, Daniel Blascke; PRATIWI, Rimadani; HENRY, Charles S. Emerging applications of paper-based analytical devices for drug analysis: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1116, p. 70–90, 2020.

NÚEZ-VERGARA, Luis J.; SQUELLA, J. A.; STURM, J. C.; BAEZ, H.; CAMARGO, Cristián. Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas

chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5–6, p. 929–938, 2001.

OGATA, Tadashi; FUJITSU, Satoru; MIYAYAMA, Masaru; KOUMOTO, Kunihiro; YANAGIDA, Hiroaki. CO₂ gas sensor using β -Al₂O₃ and metal carbonate. **Journal of Materials Science Letters**, v. 5, n. 3, p. 285–286, 1986.

ORZARI, Luiz Otávio; CRISTINA DE FREITAS, Rafaela; APARECIDA DE ARAUJO ANDREOTTI, Isabela; GATTI, Alexandre; JANEGITZ, Bruno Campos. A novel disposable self-adhesive inked paper device for electrochemical sensing of dopamine and serotonin neurotransmitters and biosensing of glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 138, p. 111310, 2019.

PEREIRA, Daniel F.; SANTANA, Edson R.; PIOVESAN, Jamille V.; SPINELLI, Almir. A novel electrochemical strategy for determination of vitamin B12 by Co(I/II) redox pair monitoring with boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 105, p. 107793, 2020.

PINEDA, T.; SEVILLA, J. M.; ROMÁN, A. J.; BLÁZQUEZ, M. Electrooxidation of pyridoxal (PL) on a polycrystalline gold electrode in alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 492, n. 1, p. 38–45, 2000.

PIOVESAN, Jamille V.; HADDAD, Vinícius F.; PEREIRA, Daniel F.; SPINELLI, Almir. Magnetite nanoparticles/chitosan-modified glassy carbon electrode for non-enzymatic detection of the endocrine disruptor parathion by cathodic square-wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 823, p. 617–623, 2018.

PORTO, Laís Sales; DA SILVA, Daniela Nunes; SILVA, Maria Cristina; PEREIRA, Arnaldo César. Electrochemical Sensor Based on Multi-walled Carbon Nanotubes and Cobalt Phthalocyanine Composite for Pyridoxine Determination. **Electroanalysis**, v. 31, n. 5, p. 820–828, 2019.

PRADELA-FILHO, Lauro A.; ANDREOTTI, Isabela A. A.; CARVALHO, Jefferson H. S.; ARAÚJO, Diele A. G.; ORZARI, Luiz O.; GATTI, Alexandre; TAKEUCHI, Regina M.; SANTOS, André L.; JANEGITZ, Bruno C. Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 305, p. 127433, 2020. a.

PRADELA-FILHO, Lauro A.; NOVIANA, Eka; ARAÚJO, Diele A. G.; TAKEUCHI, Regina M.; SANTOS, André L.; HENRY, Charles S. Rapid Analysis in Continuous-Flow Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. **ACS Sensors**, v. 5, p. 274–281, 2020. b.

QIJIN, Wan; NIANJUN, Yang; HAILI, Zhang; XINPIN, Zou; BIN, Xu. Voltammetric behavior of vitamin B2 on the gold electrode modified with a self-assembled monolayer of L-cysteine and its application for the determination of vitamin B2 using linear sweep stripping voltammetry. **Talanta**, v. 55, n. 3, p. 459–467, 2001.

QU, Wanyun; WU, Kangbing; HU, Shengshui. Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B 6) by use of a chemically-modified glassy carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 631–635, 2004.

RIBEIRO, Michelle M. A. C.; FREITAS, Jhonys M.; MUÑOZ, Rodrigo A. A.; DO LAGO,

Claudimir L.; RICHTER, Eduardo M. Fast determination of diphenhydramine, pyridoxine, and 8-chlorotheophylline by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 8, n. 22, p. 4432–4437, 2016.

S.F. HASANY; ABDURAHMAN, N. H.; SUNARTI, A. R.; JOSE, R. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Chemical Synthesis and Applications Review. **Current Nanoscience**, v. 9, p. 561–575, 2013.

SÁ, Éder S.; DA SILVA, Paulo S.; JOST, Cristiane L.; SPINELLI, Almir. Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B2 (riboflavin). **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 209, p. 423–430, 2015.

SANTANA, Edson R.; DE LIMA, Camila A.; PIOVESAN, Jamille V.; SPINELLI, Almir. 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.

SANTHY, A.; SARASWATHYAMMA, Beena; PARVATHY KRISHNAN, A.; LUSCIOUS, Limi. Nanomaterials incorporated electrochemical sensors for the monitoring of pyridoxine: A mini review. **Materials Today: Proceedings**, v. 46, p. 2998–3004, 2020.

SELVARAJAN, S.; SUGANTHI, A.; RAJARAJAN, M. A facile synthesis of ZnO/Manganese hexacyanoferrate nanocomposite modified electrode for the electrocatalytic sensing of riboflavin. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 121, p. 350–359, 2018.

SMITH, Suzanne; MADZIVHANDILA, Phophi; NTULI, Letta; BEZUIDENHOUT, Petrone; ZHENG, Haitao; LAND, Kevin. Printed Paper–Based Electrochemical Sensors for Low-Cost Point-of-Need Applications. **Electrocatalysis**, v. 10, n. 4, p. 342–351, 2019.

SOUZA, Ana Carolina Santos De; FERREIRA, Carmen Veríssima; JUCÁ, Marilena Bezerra; AOYAMA, Hiroshi; CAVAGIS, Alexandre D. Martins; PEPPELENBOSCH, Maikel P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 887–891, 2005.

SOUZA, Djenaine De; MACHADO, Sergio A. S.; AVACA, Luis A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81–89, 2003.

SRIRAMPURABHA, R.; DIVAGAR, M.; PONPANDIAN, N.; VISWANATHAN, C. Tin Oxide/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite-Modified Electrode for Selective and Sensitive Detection of Riboflavin. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 11, p. B498–B507, 2018.

STANKOVIĆ, Dalibor M.; KUZMANOVIĆ, Darko; MANOJLOVIĆ, Dragan; KALCHER, Kurt; ROGLIĆ, Goran. Electroanalytical Approach for Vitamin B 12 Quantification Based on Its Oxidation at Boron Doped Diamond Electrode. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 7, p. B348–B351, 2016.

SUWANNASOM, Nittiya; KAO, Ijad; PRUSS, Axel; GEORGIEVA, Radostina; BÄUMLER, Hans. Riboflavin: The health benefits of a forgotten natural vitamin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.

ŠVANCARA, Ivan; VYTRÁS, Karel; KALCHER, Kurt; WALCARIUS, Alain; WANG, Joseph. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the

50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 21, n. 1, p. 7–28, 2009.

TABANLIGIL CALAM, Tuğba. A novel, efficient and sensitive method for the simultaneous determination of riboflavin (vitamin B2) and pyridoxine hydrochloride (vitamin B6) in food and pharmacological samples using an electrochemical sensor based on 4,4'-diamino benzophenone. **Microchemical Journal**, v. 169, 2021.

TAN, Liang; ZIE, Qingji; YAO, Shouzhuo. Electrochemical and spectroelectrochemical studies on pyridoxine hydrochloride using a poly(methylene blue) modified electrode. **Electroanalysis**, v. 16, n. 19, p. 1592–1597, 2004.

TEIXEIRA, Marcos F. S.; MARINO, Glimaldo; DOCKAL, Edward R.; CAVALHEIRO, Éder T. G. Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B6) at a carbon paste electrode modified with vanadyl(IV)-Salen complex. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, n. 1, p. 79–85, 2004.

TIGARI, Girish; MANJUNATHA, J. G. Electrochemical Preparation of Poly(arginine)-Modified Carbon Nanotube Paste Electrode and its Application for the Determination of Pyridoxine in the Presence of Riboflavin: An Electroanalytical Approach. **Journal of Analysis and Testing**, v. 3, n. 4, p. 331–340, 2019.

TIGARI, Girish; MANJUNATHA, Jamballi G.; RARIL, Chenthatill; HAREESHA, Nagarajappa. Determination of Riboflavin at Carbon Nanotube Paste Electrodes Modified with an Anionic Surfactant. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 7, p. 2168–2173, 2019.

TROJANOWICZ, Marek. Impact of nanotechnology on design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 22–47, 2016.

TURCK, Dominique et al. Dietary Reference Values for riboflavin. **EFSA Journal**, v. 15, n. 8, 2017.

VROLIJK, Misha F.; OPPERHUIZEN, Antoon; JANSEN, Eugène H. J. M.; HAGEMAN, Geja J.; BAST, Aalt; HAENEN, Guido R. M. M. The vitamin B6 paradox: Supplementation with high concentrations of pyridoxine leads to decreased vitamin B6 function. **Toxicology in Vitro**, v. 44, p. 206–212, 2017.

WANG, Fang; HU, Shengshui. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 165, n. 1–2, p. 1–22, 2009.

WESTMACOTT, K. L.; CREW, A.; DORAN, O.; HART, J. P. A novel electroanalytical approach to the measurement of B vitamins in food supplements based on screen-printed carbon sensors. **Talanta**, v. 181, n. October 2017, p. 13–18, 2018.

XU, Jia Kun; ZHANG, Fang Fang; SUN, Jing Jing; SHENG, Jun; WANG, Fang; SUN, Mi. Bio and nanomaterials based on Fe₃O₄. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21506–21528, 2014.

ZAREI, EBRAHIM, MOHAMMAD REZA JAMALI, Jaber Bagheri. Electrochemical determination of riboflavin by an ionic liquid modified carbon paste electrode as a sensitive sensor. **Anal. Bioanal. Electrochem**, v. 10, n. 6, p. 642–657, 2018.