

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Imobilização de Corantes no Material Híbrido Acetato de Celulose-Óxido  
de Titânio: Algumas Aplicações Eletroanalíticas**

**Dissertação de Mestrado**

**Andrea Anilda Hoffmann**

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Luís Pereira Dias

Co-Orientador: Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuti

Porto Alegre, dezembro de 2006.

## **DECLARAÇÃO**

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto de Química da UFRGS entre julho de 2005 e dezembro de 2006, inteiramente por mim, Andrea Anilda Hoffmann, salvo eventuais colaborações devidamente referenciadas, sob orientação do professor Doutor Sílvio Luís Pereira Dias e co-orientação do professor Doutor Edilson Valmir Benvenuti.

---

Andrea Anilda Hoffmann

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio e Helena que não mediram esforços para a realização desse sonho e que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

“Seria impossível a um filho retribuir a seus pais toda a afável bondade, mesmo que pudesse, durante cem longos anos, carregar seu pai no ombro direito e sua mãe no esquerdo.”

S. Gautana

À Rafael, minha força e inspiração, por ser o que é e como é, expresso minha gratidão e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus.

**Aos meus pais Antônio Hoffmann e Helena Hoffmann** que sempre me apoiaram em todos os momentos. A vocês meu eterno amor e gratidão.

**Ao meu grande e eterno amor, Rafael**, a quem agradeço todo o apoio e dedicação.

Aos meus irmãos Alexandre Urbano, Guilherme, Joana Paula e Camila Maria. Vocês são muito especiais para mim, agradeço a Deus por ter a oportunidade de conviver com vocês.

Aos meus familiares que sempre estiveram ao meu lado. Em especial a minha futura sogra e amiga Ivone; e suas irmãs Zilda, Leci e Erci, e ao meu amigo Mauro pela acolhida calorosa e apoio.

Aos meus amigos de laboratório, agradeço com minha eterna amizade, vocês são especiais para mim. A minha amiga Jordana Rodrigues, muito obrigada pela ajuda e dedicação, você me ajudou muito. Em especial as minhas amigas e colegas Camila Passos, Débora F. Gay, Jaqueline C. Rodrigues, Leliz Arenas e Maria Laranjo. A Jaque, companheira desde o início dessa jornada, obrigada por tudo, te adoro e me considero tua irmã. À Débora, só posso te dizer que sou tua fã incondicional, te adoro e obrigada pelo teu apoio. A uma das pessoas mais maravilhosas e generosas que já conheci, Leliz, você foi minha companheira e é minha eterna amiga, não tenho palavras para te agradecer, só posso te oferecer minha amizade eterna e minha sincera admiração.

Ao Colégio Sinodal Ibirubá, pelo apoio e compreensão.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química.

Ao laboratório de eletroquímica e em especial a minha querida amiga Kátia R. Lemos pela acolhida calorosa, muito obrigada. Adoro você.

Ao professor Sílvio Luís Pereira Dias, meu eterno agradecimento. Obrigada pela dedicação, respeito e amizade. Ao professor Edilson Valmir Benvenuti por ter me recebido de braços abertos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade e confiança.

## LISTA DE TRABALHOS GERADOS

### Artigos Submetidos

HOFFMANN, Andrea Anilda; RODRIGUES, Jordana Roider; PAVAN, Flávio A.; BENVENUTTI, Edílson Valmir; LIMA, Éder C.; DIAS, Sílvio Luís Pereira, *Electrochemical behaviour of methylene blue immobilized on cellulose acetate with titanium dioxide and its application as an amperometric sensor*, *Electroanalysis*, 2006.

HOFFMANN, Andrea Anilda; RODRIGUES, Jordana Roider; PAVAN, Flávio A.; BENVENUTTI, Edílson Valmir; LIMA, Éder C.; DIAS, Sílvio Luís Pereira. *Cationics dyes immobilized on cellulose acetate surface modified with titanium dioxide: Factorial design and an Application as Sensor for NADH*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2007.

### Resumos de trabalhos em congressos

HOFFMANN, Andrea Anilda; BARANCELLI, Gustavo Trentini; SCOTTI, Rodrigo; BENVENUTTI, Edílson Valmir; DIAS, Sílvio Luís Pereira, *Desenvolvimento de um senso amperométrico a base de acetato de celulose e óxido de titânio para a determinação de ácido ascórbico*. **XIII Encontro de Química da Região Sul**, 2005, Florianópolis, SC. QA - 008.

HOFFMANN, Andrea Anilda; MORO, Celso Camilo; DIAS, Sílvio Luís Pereira; BENVENUTTI, Edílson Valmir; LIMA, Éder C.; RODRIGUES, Jordana Roider; SCHULTZ, E. S.; *Utilização do corante azul de metileno imobilizado na casca de pinhão para a determinação de ácido ascórbico*. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006, Águas de Lindóia, SP. EQ-040.

HOFFMANN, Andrea Anilda; RODRIGUES, Jordana Roider; PAVAN, Flávio A.; BENVENUTTI, Edílson Valmir; LIMA, Éder C.; DIAS, Sílvio Luís Pereira; *Otimização de sistemas eletroquímicos através de um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>*. **14º SBQSul – “Química na Sociedade: significados e implicações”**, 2006, Erechim, RS. QA – 70.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
<b>1. Introdução</b>	2
1.1 Objetivos	3
<b>2. Revisão bibliográfica</b>	5
2.1. Eletrodos quimicamente modificados (EQM)	5
2.2. Acetato de celulose	9
2.3. Corantes orgânicos redox como mediadores de elétrons	10
2.4. Trocadores inorgânicos	14
2.5. Ácido ascórbico	15
2.6. Técnicas eletroquímicas utilizadas para o estudo de eletrodos quimicamente modificados	16
2.6.1 Voltametria cíclica	16
2.6.2 Cronoamperometria	18
2.7. Planejamento fatorial	19
<b>3. Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a determinação de ácido ascórbico</b>	22
<b>3.1. Parte experimental</b>	22
3.1.1. Preparação da matriz Acel/TiO <sub>2</sub>	22
3.1.2. Imobilização do corante azul de metileno na matriz Acel/TiO <sub>2</sub>	22
3.1.3. Análise química	23
3.1.4. Medições eletroquímicas	23
3.1.5. Determinação de ácido ascórbico (H <sub>2</sub> AA)	25
3.1.5.1. Obtenção da curva de calibração para H <sub>2</sub> AA por cronoamperometria	25
3.1.5.2. Determinação de H <sub>2</sub> AA em pastilhas de Vitamina C (1g/tablete)	25

3.1.5.3. Determinação de H <sub>2</sub> AA pelo método iodométrico	25
3.1.6. Microscopia eletrônica de varredura – MEV	26
<b>3.2. Resultados e discussões</b>	27
3.2.1. Dispersão de TiO <sub>2</sub> na superfície de acetato de celulose	27
3.2.2. Estudos de voltametria cíclica	28
3.2.3. Influência do eletrólito suporte	32
3.2.4. Influência do pH	33
3.2.5. Efeito do pH na oxidação do H <sub>2</sub> AA	35
3.2.6. Oxidação do ácido ascórbico	37
3.2.7. Estudos cronoamperométricos	39
<b>3.3. Conclusões</b>	42
<b>4. Avaliação dos corantes Azul de Meldola e Azul de Toluidina imobilizados em Acetato de Celulose Modificada com dióxido de titânio como sensores amperométricos por planejamento fatorial</b>	44
<b>4.1. Introdução</b>	44
<b>4.2. Parte experimental</b>	47
4.2.1. Preparação da matriz Acel/TiO <sub>2</sub>	47
4.2.2. Imobilização dos corantes azul de meldola e azul de toluidina na matriz Acel/TiO <sub>2</sub>	47
4.2.3. Análise química	47
4.2.4. Medições eletroquímicas	47
4.2.5. Determinação de NADH por cronoamperometria	47
<b>4.3. Resultados e discussões</b>	49
<b>4.4. Otimização dos sistemas eletroquímicos através de um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com dois pseudopontos centrais</b>	52
<b>4.5. Determinação de NADH</b>	61
4.5.1. Aplicação de um sensor para NADH	62
<b>4.6. Conclusões</b>	65
<b>5. Referências bibliográficas</b>	66

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Interface eletrodo-solução para um EQM na presença apenas de um eletrólito suporte. 6
- Figura 2:** Oxidação electrocatalítica de um determinado analito pelo EQM. 6
- Figura 3:** Estrutura do acetato de celulose. 9
- Figura 4:** Corantes orgânicos com propriedades redox utilizados como mediadores de elétrons. 11
- Figura 5:** Estrutura do ácido ascórbico na forma oxidada e reduzida. 15
- Figura 6:** Voltamograma cíclico típico de espécies redox em solução e os principais parâmetros obtidos a partir deste. 17
- Figura 7:** Eletrodo de pasta de carbono. 24
- Figura 8:** Esquema da cela electroquímica utilizada. 24
- Figura 9:** Imagens do Acel/TiO<sub>2</sub>, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, (A) imagem MEV e (B) imagem EDS. 27
- Figura 10:** Voltamogramas cíclicos do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub> (A) e do eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM (B) Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Velocidade de varredura: 20 mV s<sup>-1</sup>. E<sub>inicial</sub> = - 800 mV e E<sub>inversão</sub> = 800 mV. 28
- Figura 11:** Estabilidade química do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM após 100 ciclos redox. Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>. 29
- Figura 12:** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se EPC modificado com Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em diferentes velocidades de varredura (2, 5, 8, 10, 20, 30, 40, 50 mV s<sup>-1</sup>). Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. 30
- Figura 13:** Dependência entre as correntes I<sub>pa</sub> e I<sub>pc</sub> com v<sup>1/2</sup>. Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. 31
- Figura 14:** Dependência entre o E<sub>m</sub> e o pH para o Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>. 34
- Figura 15:** Comportamento redox do azul de metileno em diferentes pHs. 35
- Figura 16:** Influência do pH nas correntes de pico para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup> e concentração do ácido ascórbico 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>. 36

- Figura 17:** Influência do pH no Em para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup> e concentração de ácido ascórbico 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>. 36
- Figura 18:** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se eletrodo de pasta de carbono em 20 mL do eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>: (A) Acel/TiO<sub>2</sub> na ausência de H<sub>2</sub>AA, (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na ausência de H<sub>2</sub>AA e (C) Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na presença de 5 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>AA. 37
- Figura 19:** Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na ausência de ácido ascórbico (a) e na presença H<sub>2</sub>AA nas concentrações em mol L<sup>-1</sup>: (B) 1,0 x 10<sup>-3</sup>, (C) 10,0 x 10<sup>-3</sup>, (D) 20,0 x 10<sup>-3</sup>, (E) 30,0 x 10<sup>-3</sup>, (F) 40,0 x 10<sup>-3</sup>. Solução de eletrólito suporte 20 mL de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup> e pH 7,0. 38
- Figura 20:** Relação entre a intensidade de corrente de pico versus a concentração de H<sub>2</sub>AA. 39
- Figura 21:** Estudo cronoamperométrico para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O cronoamperograma obtido por sucessivas adições de 100 µL de ácido ascórbico 0,010 mol L<sup>-1</sup> em uma cela eletroquímica contendo 20 mL de solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. 41
- Figura 22:** Gráfico da corrente de pico anódica (I<sub>pa</sub>) pela concentração de ácido ascórbico. 41
- Figura 23:** Comportamento redox do Azul de Meldola em diferentes pHs. 45
- Figura 24:** Comportamento redox do corante azul de Toluidina em diferentes pHs. 46
- Figura 25:** Voltamogramas cíclicos: (A) Acel/TiO<sub>2</sub> e (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld, em velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>, pH 7,0 e solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. 50
- Figura 26:** Voltamogramas cíclicos: (A) Acel/TiO<sub>2</sub> e (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AT, em velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>, pH 7,0 e solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. 50
- Figura 27:** Corrente de pico (A) Acel/TiO<sub>2</sub>/AT e (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld em função do número de ciclos redox. Velocidade de varredura: 10 mV s<sup>-1</sup>, pH 7,0 e solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, (■) corrente de pico catódica e (●) corrente de pico anódica. 51
- Figura 28:** (A) Curva de probabilidade normal dos efeitos padronizados com p= 0,05. A linha pontilhada em 50% divide os efeitos negativos dos efeitos positivos. (B) Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados com p= 0,05. 60
- Figura 29:** Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld na ausência e na presença de NADH para: (—)com [NADH] = 0 mol L<sup>-1</sup> e (---) com [NADH] =

$7,69 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Solução de eletrólito-suporte KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7,0 e velocidade de varredura  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . 61

**Figura 30:** Cronoamperogramas para o eletrodo modificado ACel/TiO<sub>2</sub>/AMeld em várias concentrações de NADH. Solução de eletrólito-suporte KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $E_{ap} = 0,02 \text{ V vs ECS}$ . 63

**Figura 31:** Relação entre a densidade de corrente anódica vs concentração NADH para o eletrodo ACel/TiO<sub>2</sub>/AMeld. 63

## LISTA DE TABELAS

- Tabela I:** Parâmetros ciclovoltagemétricos do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em diferentes velocidades de varredura. 32
- Tabela II:** Potenciais médios e razão entre as intensidades de pico anódica e catódica do Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em diferentes eletrólitos-suportes, de concentração 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>. 33
- Tabela III:** Resultados obtidos na determinação de ácido ascórbico em amostras de vitamina C utilizando-se o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM e através da técnica de iodometria. 40
- Tabela IV:** Otimização do sistema eletroquímico usando o planejamento fatorial 2<sup>4</sup> com dois pseudopontos centrais (20 experimentos). 53
- Tabela V:** Planejamento Fatorial: Efeitos principais e interações sobre o ΔE. 54
- Tabela VI:** Planejamento Fatorial: Efeitos principais e interações sobre o I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub>. 56
- Tabela VII:** Comparação dos resultados do eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld com outros sensores amperométricos preparados com diferentes suportes sólidos para a determinação de NADH. 64

## ABREVIATURAS

**EQM** - Eletrodos Quimicamente Modificados

**NADH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo na Forma Reduzida

**EPCQM** - Eletrodos Quimicamente Modificados por Pasta de Carbono

**AT** - Azul de Meldola

**AMeld** - Azul de Metileno

**AT** - Azul de Toluidina

**AM<sup>+</sup>** - Forma Oxidada do Azul de Metileno

**LMB** – Forma Reduzida do Azul de Metileno

**E<sup>0'</sup>** - Potencial Formal

**ECS** – Eletrodo de Calomelano Saturado

**ΔE<sub>p</sub>** – Diferença entre os Potenciais de Pico

**E** – Potencial Aplicado

**E<sub>m</sub>** – Potencial Médio

**E<sub>p</sub>** – Potencial de Pico

**E<sub>pa</sub>** – Potencial de Pico Anódico

**E<sub>pc</sub>** – Potencial de Pico Catódico

**I** – Corrente

**I<sub>p</sub>** – Corrente de Pico

**I<sub>pa</sub>** – Corrente de Pico Anódica

**I<sub>pc</sub>** – Corrente de Pico Catódica

**I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub>** – Razão das Correntes Anódica e Catódica

**v<sup>1/2</sup>** – Raiz Quadrada da Velocidade de Varredura

**H<sub>2</sub>AA** – Ácido Ascórbico

**Acel/TiO<sub>2</sub>** – Acetato de Celulose Modificada com Óxido de Titânio

**Acel/TiO<sub>2</sub>/AM** - Acetato de Celulose Modificada com Óxido de Titânio com Corante Azul de Metileno Imobilizado

**MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura

**Γ** - Quantidade de Sítios Ativos do Corante Presentes na Superfície do Eletrodo

**Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld** - Acetato de Celulose Modificada com Óxido de Titânio com Corante Azul de Meldola

**Acel/TiO<sub>2</sub>/AT** - Acetato de Celulose Modificada com Óxido de Titânio com Corante

Azul de Toluidina

**AMeld<sup>+</sup>** - Azul de Meldola na Forma Oxidada

**AT<sup>+</sup>** - Azul de Toluidina na Forma Oxidada

## RESUMO

Neste trabalho, acetato de celulose em pó foi modificado com óxido de titânio (Acel/TiO<sub>2</sub>) e utilizado como matriz para a realização de estudos eletroquímicos. A quantidade de TiO<sub>2</sub> incorporado na matriz de acetato de celulose foi de 1,8 mmol g<sup>-1</sup>.

Sobre a superfície da fibra do material modificado com o óxido metálico, Acel/TiO<sub>2</sub>, foram imobilizados três corantes orgânicos; azul de metileno (AM), azul de meldola (AMeld) e azul de toluidina (AT), resultando em três materiais denominados de Acel/TiO<sub>2</sub>/AM, Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT. As propriedades eletroquímicas dos materiais foram estudadas através das técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria.

Os estudos eletroquímicos do material, Acel/TiO<sub>2</sub>/AM indicaram que o potencial médio da espécie eletroativa imobilizada é  $E^0 = 225 \text{ mV vs ECS}$  (Eletrodo Calomelano Saturado). O material apresentou alta estabilidade química, visto que não foi observado lixiviação da espécie eletroativa da superfície da matriz, mesmo após 100 ciclos de experimentos. O estudo da estabilidade do material após 100 ciclos redox demonstrou que não ocorre lixiviação da espécie eletroativa da superfície da matriz modificada. O tipo de solução de eletrólito suporte bem como o pH não afetaram significativamente as intensidades de corrente de pico que permaneceram praticamente constante. O material Acel/TiO<sub>2</sub>/AM foi utilizado como matriz para a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono e foi aplicado como um novo sensor eletroquímico que se mostrou eficiente na determinação de ácido ascórbico em produtos comerciais.

As propriedades eletroquímicas dos materiais Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT foram otimizadas utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com dois pseudo pontos centrais (n= 20 experimentos). Os fatores experimentais escolhidos para os procedimentos de otimização foram aqueles que afetam a reversibilidade do processo de transferência de elétrons. Duas respostas das propriedades dos sistemas foram investigadas: a separação dos potenciais de pico,  $\Delta E$  [ $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ ], e a razão entre as correntes,  $I_{pa}/I_{pc}$ , onde  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  são as intensidades de corrente de pico anódico e catódico, respectivamente. Para a resposta  $I_{pa}/I_{pc}$ , não foi observado nenhum efeito significativo em relação à reversibilidade do sistema.

As melhores condições de reversibilidade eletroquímica do sistema estudado foram: o eletrodo quimicamente modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld, pH 7,0, [KCl] = 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>. Estas condições foram aplicadas na determinação do cofator NADH. As propriedades eletrocatalíticas do Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld para oxidar o cofator

NADH são bastante satisfatórias e o sistema eletródico apresenta uma boa sensibilidade para o NADH.

## **ABSTRACT**

In this work, the cellulose acetate surface was modified with titanium dioxide and used as matrix for electrochemical studies. The content of TiO<sub>2</sub> incorporated in the cellulose acetate matrix resulted in 1,8 mmol g<sup>-1</sup>.

On the fiber surface of the titanium dioxide, Acel/TiO<sub>2</sub>, modified material three organics dyes were immobilized; methylene blue; meldola blue and toluidine blue, resulting in the materials assigned as Acel/TiO<sub>2</sub>/AM, Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld and Acel/TiO<sub>2</sub>/AT. The electrochemical properties of these materials were studied through cyclic voltammetric and chronoamperometric techniques.

The electrochemical studies of Acel/TiO<sub>2</sub>/AM indicated that the medium potential of the electroactive species immobilized is  $E^0 = 225 \text{ mV vs SEC}$ . The material present high chemical stability, since leaching of the electroactive species from the matrix surface has not been observed, even after 100 experimental cycles. The type and the pH of the solution did not affect the intensities of current peak that remained practically constant. The material Acel/TiO<sub>2</sub>/AM was used as matrix for the preparation of carbon paste electrodes and it was applied as a new sensor that shows to be efficiency for ascorbic acid determination in commercial products.

The electrochemical properties of the materials Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld and Acel/TiO<sub>2</sub>/AT were optimized using a factorial design 2<sup>4</sup> with two pseudo central points (n= 20 experiments). The chosen experimental factors for the optimization procedure were those that affect the reversibility of the electron transfer process. Two responses of the system properties were investigated: the peak potentials separation,  $\Delta E$  [ $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ ], and the current ratio,  $I_{pa}/I_{pc}$ , where  $I_{pa}$  and  $I_{pc}$  are the anodic and cathodic current intensities, respectively. For the response  $I_{pa}/I_{pc}$ , any significant effect has been observed in relation to the reversibility of the system. The best electrochemical reversibility conditions were: using the Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld electrode, pH 7.0; 1.0 mol L<sup>-1</sup> KCl as supporting electrolyte and scan rate of 10.0 mV s<sup>-1</sup>. Afterwards, the Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld modified electrode was tested as amperometric sensor for NADH determination, presenting good sensitivity.

## **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos tem despertado grande atenção da comunidade científica, pois esses sistemas aliam um grande potencial analítico para medidas eletroquímicas com uma alta seletividade das espécies eletroativas mediadoras de elétrons, o que lhes confere capacidade de aplicação nas mais diversas áreas como medicina e clínica geral, indústria de alimentos e também no monitoramento ambiental. Nesse contexto, um grande esforço tem sido realizado para encontrar novos materiais que possam ser utilizados como suportes sólidos de mediadores eletroquímicos ou enzimas fortemente aderidas à superfície do material para evitar a lixiviação das espécies imobilizadas durante os experimentos<sup>1</sup>.

Os materiais que usualmente são utilizados na preparação de eletrodos quimicamente modificados (EQM) incluem sílica gel, sílica preparada pelo processo sol-gel e zeólitas<sup>2,3</sup>. Recentemente, a utilização de materiais alternativos como celulose e seus derivados na preparação de suportes para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem apresentado crescente interesse.

Sintetizada inicialmente em 1865 por P. Schutzenberger, o acetato de celulose é uma celulose esterificada que tem sido muito pesquisada nas duas últimas décadas devido as suas propriedades termoelásticas<sup>4,5</sup>. Em particular, o acetato de celulose é usado na preparação de materiais híbridos, pois apresenta vantagens como baixo custo, alta disponibilidade e facilidade de manuseio<sup>6</sup>.

O acetato de celulose é um composto que se caracteriza por ser relativamente inerte do ponto de vista químico. Nesse sentido, para aumentar sua reatividade e possibilitar a imobilização de espécies eletroquímicas sobre sua superfície, a preparação de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos tem sido realizada através da mistura do polímero orgânico com soluções de óxidos metálicos. Os materiais híbridos resultantes são utilizados em processos de separação<sup>7</sup>, para imobilização de enzimas<sup>8</sup>, para preparação de membranas semipermeáveis<sup>9,10</sup> e também na preparação de sensores eletroquímicos<sup>11,12</sup>.

Dessa forma, o desenvolvimento de novos materiais híbridos orgânicos-inorgânicos como acetato de celulose torna-se extremamente atraente. O acetato de celulose, além de ser facilmente disponível na natureza, pode ser sintetizado de maneira simples e econômica, apresentando a possibilidade de ser utilizado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos quimicamente modificados com aplicação em determinações analíticas.

O presente trabalho apresenta a síntese de uma matriz orgânica-inorgânica sobre a qual

foram imobilizados três corantes orgânicos: azul de metileno, azul de meldola e azul de toluidina. Na primeira parte do trabalho, o corante azul de metileno foi imobilizado no suporte acetato de celulose modificado com óxido de titânio (Acel/TiO<sub>2</sub>) e o material resultante foi aplicado na determinação de ácido ascórbico presente em pastilhas de vitamina C. Na segunda parte do trabalho, foi aplicado um planejamento fatorial completo na otimização dos parâmetros que influenciam as propriedades eletroquímicas dos corantes azul de meldola e azul de toluidina imobilizados na matriz Acel/TiO<sub>2</sub>. As melhores condições redox encontradas foram aplicadas na determinação do cofator NADH.

### **1.1. OBJETIVOS**

- Utilizar o acetato de celulose modificado com óxido de titânio como suporte sólido de espécies eletroativas.
- Verificar as potencialidades eletroanalíticas do corante azul de metileno imobilizado no suporte sólido para a determinação de ácido ascórbico.
- Aplicar um planejamento fatorial na otimização dos parâmetros que influenciam as propriedades redox dos corantes azul de toluidina e azul de meldola imobilizados no suporte sólido.
- Estudar as potencialidades de aplicação das melhores condições encontradas através da otimização das propriedades redox dos sistemas eletroquímicos na eletrooxidação do cofator enzimático NADH.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)

A imobilização de espécies químicas na superfície de eletrodos é uma área de pesquisa da eletroquímica que tem apresentado notável crescimento nas últimas décadas<sup>13</sup>.

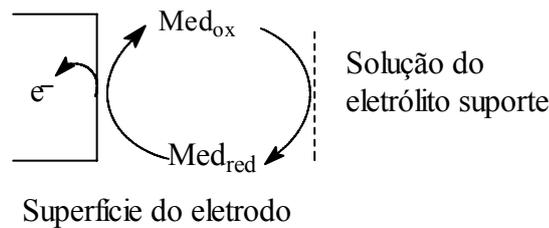
Na área de eletroquímica demonstra-se que os eletrodos quimicamente modificados (EQM) apresentam algumas vantagens sobre os eletrodos convencionais, contribuindo para o desenvolvimento de inúmeras aplicações, como por exemplo, eletroanalíticas, eletrocatalise, sensores eletroquímicos<sup>14</sup>, permeação de membranas e em sínteses eletroorgânicas<sup>15</sup>.

O termo eletrodo quimicamente modificado foi introduzido por Murray e colaboradores para designar eletrodos com espécies imobilizadas sobre a superfície de eletrodos convencionais tais como, platina e carbono, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução<sup>16</sup>.

A modificação da superfície de um eletrodo através da imobilização de espécies eletroquimicamente ativas é uma forma de impor e controlar sua reatividade e seletividade possibilitando o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações<sup>17</sup>. As características específicas das espécies imobilizadas facilitam o estudo do processo eletroquímico de transferência de elétrons e permitem investigar as propriedades químicas e físicas dessas moléculas adsorvidas ao eletrodo<sup>16</sup>.

A utilização de eletrodos quimicamente modificados permite a detecção de substâncias a serem analisadas em uma faixa mais ampla de potencial, na qual não poderíamos aplicar o eletrodo gotejante de mercúrio<sup>18</sup>. Além disso, ocorre a diminuição do sobrepotencial que é o potencial adicional ao potencial formal do analito,  $E^0$ , necessário para vencer a barreira de ativação da eletrólise de um determinado sistema eletródico, mantendo a reação em uma determinada velocidade; minimizando assim, o nível de interferentes nas análises e aumentando a velocidade de certas reações eletroquímicas, bem como, a sensibilidade e a seletividade.

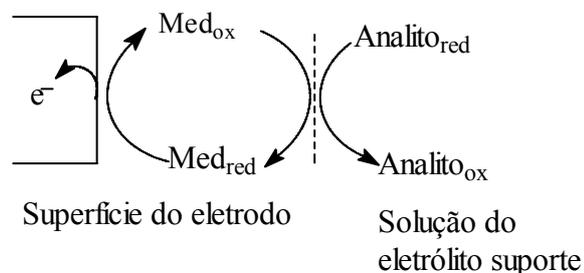
A interface eletrodo-solução para um EQM na presença apenas da solução de eletrólito-suporte, pode ser demonstrada esquematicamente na Figura 1<sup>19</sup>.



**Figura 1:** Interface eletrodo-solução para um EQM na presença de um eletrólito-suporte.

A aplicação de um eletrodo quimicamente modificado é extremamente importante em situações em que o analito apresenta uma reação redox lenta na superfície do eletrodo. Dessa forma, com a utilização do EQM temos a possibilidade de tornar essa reação mais rápida, pois com a presença da espécie eletroquimicamente ativa ocorre a mediação da transferência de elétrons ( $\text{Med}_{\text{ox}}/\text{Med}_{\text{red}}$ ) fazendo com que a reação se torne mais rápida, reduzindo assim o sobrepotencial de ativação da reação.

Na Figura 2, está representado o processo de transferência de carga eletrocatalítico onde o analito é oxidado pelo mediador, que por sua vez, é subsequentemente re-oxidada na superfície do eletrodo. O processo inverso, a redução do analito, também pode ocorrer.



**Figura 2:** Oxidação eletrocatalítica de um determinado analito pelo EQM.

Entre os métodos mais comuns de obtenção de eletrodos quimicamente modificados encontrados na literatura podemos citar *adsorção ou quimissorção*, que é uma das técnicas mais simples de se modificar a superfície de um eletrodo. Esta técnica consiste em utilizar eletrodos de carbono capazes de quimissorver espécies moleculares que apresentam sistemas estendidos de elétrons  $\pi$ . Uma das desvantagens deste método é que a espécie imobilizada

apresenta uma baixa estabilidade na superfície do eletrodo, pois como a adsorção é um processo de equilíbrio, a dessorção ocorrerá inevitavelmente.

A técnica de *Formação de ligação covalente* é baseada na modificação da superfície de carbono que ocorre através da reatividade dos grupos funcionais álcoois (fenóis), ácidos carboxílicos, cetonas (quinonas) e anidridos resultantes da oxidação de átomos de carbono, com reagentes tais como, aminas, organossilanos, cloreto de tionila, cloreto cianúrico, entre outros, dando origem a eletrodos mais estáveis que os obtidos pelo método de adsorção, porém, de forma mais complexa.

Outro método é a *deposição de filmes poliméricos* onde o eletrodo de platina ou carbono é mergulhado em uma solução contendo o polímero. Deixando-se evaporar o solvente é possível a formação de uma fina camada do polímero sobre o eletrodo, o qual também pode ser produzido através de eletrodeposição e eletropolimerização de monômeros eletroativos.

*Eletrodos quimicamente modificados por pasta de carbono (EPCQMs)* foram introduzidos por Adams em 1958, usando-se uma pasta obtida da mistura de grafite em pó com um líquido orgânico de baixa volatilidade. Em 1964, Kuwana e colaboradores misturaram à pasta substâncias eletroativas e constataram que estas apresentavam propriedades eletrocatalíticas nesse tipo de eletrodo<sup>16</sup>.

Os eletrodos quimicamente modificados de pasta de carbono são constituídos de uma mistura de grafite em pó, o qual deve apresentar um tamanho de partícula inferior a 20  $\mu\text{m}$ <sup>18</sup> para facilitar o ajuste da superfície, melhorar a preparação da pasta e minimizar a presença de ruído; com um líquido orgânico aglutinante, não condutor, de baixa volatilidade, inerte, imiscível com a solução do eletrólito suporte e de alta pureza que é utilizado para homogeneizar a pasta.

A composição da pasta influencia significativamente a reatividade do eletrodo, pois com o aumento da quantidade do conteúdo de líquido orgânico verificamos um aumento da resistência, diminuindo assim a velocidade de transferência de elétrons e a intensidade da corrente.

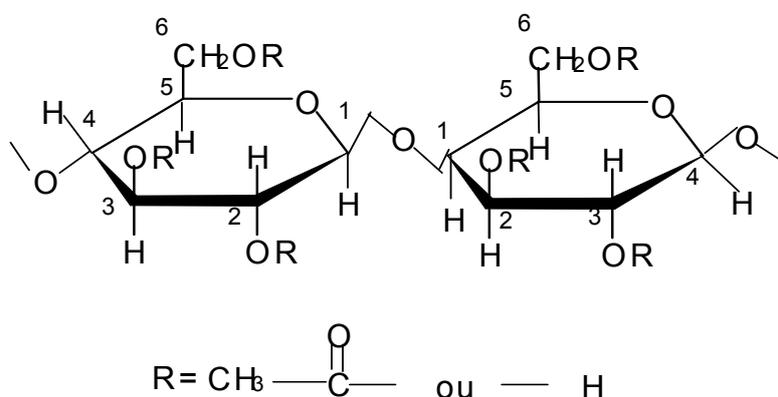
Os eletrodos quimicamente modificados de pasta de carbono têm apresentado um grande desenvolvimento principalmente por apresentarem certas vantagens tais como, versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, ampla faixa de potencial de trabalho, superfície facilmente renovável, possibilidade de miniaturização, além de permitir uma fácil incorporação de suportes e mediadores que aumentam a variedade de aplicações, superando problemas como a baixa reprodutibilidade e baixa resistência a solventes

orgânicos. Devido a essas propriedades os eletrodos de pasta de carbono apresentam um extensivo uso em eletroanálise<sup>20</sup>.

Entretanto, os eletrodos de pasta de carbono apresentam algumas desvantagens como instabilidade quando submetidos a um longo período de uso, quando utilizados em condições hidrodinâmicas e falta de reprodutibilidade devido à variação na pasta de carbono<sup>21</sup>.

## 2.2. Acetato de Celulose

As unidades glicosídicas da celulose apresentam três grupos hidroxila (um secundário e dois primários), envolvidos em um grande número de ligações de hidrogênio. O acetato de celulose é um biopolímero termoplástico produzido pela acetilação da celulose. A acetilação ocorre preferencialmente nos grupos hidroxila ligados ao carbono 6. O número médio de carbonos acetila, presente em cada unidade glicosídica depois da reação de acetilação é chamado de grau de acetilação ou grau de substituição.(Figura 3)<sup>22</sup>.



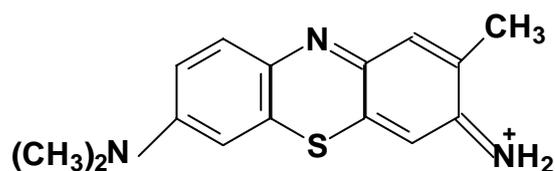
**Figura 3:** Estrutura do acetato de celulose.

O acetato de celulose pode ser facilmente moldado em diferentes formas como membranas, fibras ou pérolas. Para conjugar as propriedades mecânicas do polímero orgânico com as propriedades intrínsecas de um composto inorgânico, materiais híbridos orgânico-inorgânicos têm sido preparados<sup>6,23</sup>. A dispersão de partículas de óxidos metálicos inorgânicos na superfície de fibras ou interior de membranas de acetato de celulose permite obter materiais com um alto grau de aderência, o que os torna atraentes para diversas aplicações analíticas, tais como, processos de separação<sup>21,24</sup>, imobilização de enzimas<sup>23,25,26</sup> e como suporte de espécies químicas eletroativas para uso como sensores eletroquímicos<sup>27,28</sup>. Esses materiais híbridos são normalmente feitos pela mistura de uma solução do polímero com uma solução do alcóxido metálico seguida de um processo denominado de inversão de fase<sup>6</sup>. A incorporação de partículas de óxidos metálicos na matriz de acetato de celulose pode produzir materiais poliméricos híbridos com ligações entrelaçadas com alta resistência química e mecânica e, também, com um alto grau de dispersão das partículas do óxido<sup>29</sup>.

### **2.3. Corantes orgânicos redox como mediadores de elétrons**

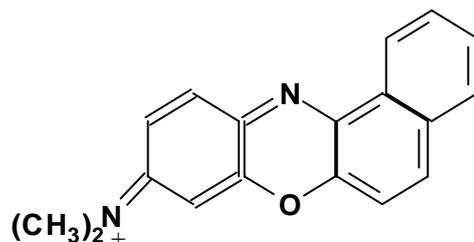
A modificação da superfície de eletrodos e o desenvolvimento de novos materiais para fins de obtenção dos chamados eletrodos quimicamente modificados (EQMs) têm sido muito investigados<sup>30,31</sup>. Nesse sentido, a preparação de materiais com espécies eletroativas imobilizadas tem se apresentado como uma excelente alternativa já que estas espécies constituem uma importante classe de compostos fenotiazínicos com interessantes propriedades eletroquímicas<sup>32,33</sup>.

As estruturas poliaromáticas, como fenazinas, fenoxiazinas (Azul de Meldola, Azul do Nilo) e fenotiazinas (Azul de Metileno, Azul de Toluidina), quando adsorvidas na superfície do eletrodo, apresentam baixo potencial formal, permitindo a eletrooxidação de determinados analitos e assim aumentam a velocidade da reação, pois essas substâncias são adicionadas aos EQMs com a função de mediar a transferência de elétrons na superfície do eletrodo em um processo de oxido-redução.



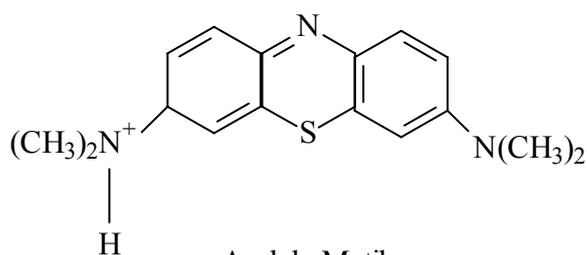
Azul de Toluidina

3-Amino-70(dimethylamino)-2-Methylphenothiazin-5-ium Chloride  
CI 52040



Azul de Meldola

8-dimethylamino-2,3-benzophenoxazine hemi(zinc chloride) salt  
CI 51175



Azul de Metileno

3,7-bis(Dimethylamino)phenazathionium chloride  
CI 52015

**Figura 4:** Corantes orgânicos com propriedades redox utilizados como mediadores de elétrons.

Em vários processos eletroquímicos, a transferência de elétrons é uma etapa lenta da reação. O processo eletrolítico tem por objetivo reduzir a energia de ativação da reação, no caso, a redução de energia ocorre pela diminuição do sobrepotencial de resposta do analito. Nesse processo, o mediador funciona como um eletrocatalisador interagindo com o analito, diminuindo, assim, o potencial necessário para ocorrer a reação de resposta do mesmo e, conseqüentemente, o nível de interferência nas análises<sup>18</sup>.

As espécies eletroativas que se encontram altamente dispersas na superfície da matriz aumentam a estabilidade e a ação catalítica. Os mediadores adsorvidos podem apresentar fraca ou forte afinidade com a matriz suporte, conferindo ao eletrodo alta ou baixa estabilidade<sup>18</sup>.

O corante orgânico Azul de Meldola (AMeld) é um corante estável que apresenta baixo potencial redox ( $E = -175 \text{ mV vs ECS a pH 7}$ ) tornando-se muito atrativa sua utilização na preparação de EQM para vários fins, como por exemplo, sensores amperométricos na determinação de  $\beta$  D-glicose e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida)<sup>34</sup>.

O estudo da classe das hidrogenases é de grande importância, pois é composta por mais de 450 enzimas NAD(P)H dependentes. Essas enzimas necessitam do cofator enzimático, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), sem o qual não se desenvolvem suas atividades bioquímicas. Entretanto, esse cofator exige elevado potencial de operação, o que diminui a viabilidade de utilização de sensores em aplicações analíticas devido à interferência de outros componentes eletroativos presentes no meio. Na busca da redução desse potencial, faz-se o uso dos mediadores de elétrons<sup>17</sup>.

O azul de metileno (AM) é um corante catiônico descoberto por Heinrich Caro em 1876 e inicialmente ganhou prestígio como um corante citológico e como indicador de oxido-redução. O composto é muito importante em processos fotodinâmicos, principalmente o da geração de oxigênio singleto e, devido a suas propriedades fotoquímicas, pesquisas têm sido desenvolvidas visando a sua aplicação na inativação de bactérias e vírus, na utilização do corante em células fotogalvânicas e na área de eletrodos modificados. Essas últimas aplicações demonstram a importância de um conhecimento detalhado a respeito das propriedades redox do corante. O AM sofre uma redução de dois elétrons em solução aquosa. Essa redução ocorre via um mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico, no qual acontecem duas sucessivas transferências de um elétron, com uma rápida, protonação, interposta entre elas. Os estudos clássicos das propriedades redox e ácido-base do sistema  $AM^+/LAM$ , em que  $AM^+$  é a forma oxidada de coloração azul e a LAM é a forma reduzida incolor do corante denominada de leucometileno, foram conduzidos por Clark, Cohen e Gibbs<sup>20</sup>.

O potencial formal do corante azul de metileno,  $E^0$ , está entre -0,1 a -0,4 V (vs ECS) em, respectivamente uma faixa de pH entre 4 a 11<sup>35</sup>. Devido ao seu baixo potencial formal, o AM facilita a transferência de elétrons entre a matriz e o analito. Estudos revelam que esse corante pode ser utilizado na eletrooxidação do ácido ascórbico<sup>16</sup>.

O corante azul de toluidina é um derivado fenotiazínico que tem um potencial formal,  $E^0$ , em solução de pH 7 igual a -160 mV e quando imobilizado em eletrodos de grafite sólidos convencionais igual a - 235 mV vs Ag/AgCl em pH 7. Estudos revelam que esse corante pode ser utilizado na eletrocatalise de NADH, peroxidase de raiz forte (horseradish) e  $H_2O_2$ <sup>36</sup>.

## 2.4. Trocadores inorgânicos

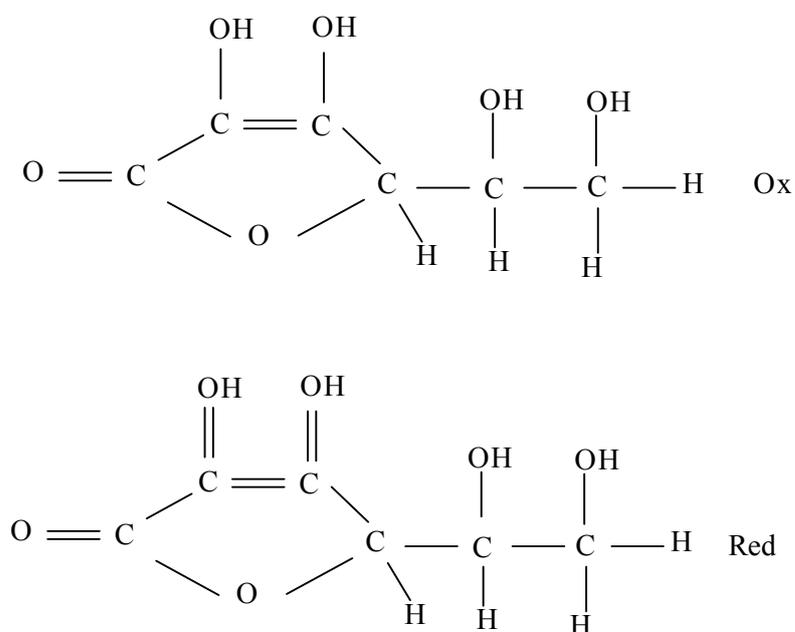
Eletrodos preparados com filmes de polímeros ou óxidos metálicos têm sido utilizados para imobilizar corantes catiônicos por meio de processos de troca iônica<sup>37,38</sup>. A importância de trocadores inorgânicos sintéticos tem aumentado devido à sua alta seletividade, estabilidade em temperaturas elevadas e resistência para altos níveis de radiação. Dentre os materiais inorgânicos de troca iônica, destacam-se os óxidos hidratados e hidróxidos, incluindo-se os de zircônio, antimônio, titânio, manganês e estanho<sup>35</sup>.

Óxidos metálicos como óxidos de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) são conhecidos por apresentar uma alta capacidade de troca iônica e propriedades condutoras<sup>39,40</sup>. Tais características tornam esses materiais atraentes para serem utilizados na imobilização de espécies mediadoras do processo de transferência de elétrons<sup>11,12</sup>.

## 2.5. Ácido Ascórbico

Ácido ascórbico ( $H_2AA$ ) ou vitamina C é encontrado em animais e vegetais. Nas células animais, ocorre de forma livre e também freqüentemente ligado a proteínas. Entre os organismos animais, o fígado e a glândula pituitária apresentam altas concentrações de ácido ascórbico. A vitamina C também está presente em muitos sistemas biológicos e na preparação de vitaminas que são freqüentemente usadas como suplemento dietético. A vitamina C é ainda usada em alimentos como antioxidante para estabilizar a cor e o aroma e estender a validade do produto. Dessa forma, é essencial o desenvolvimento de métodos rápidos e simples para análises rotineiras. A determinação de  $H_2AA$  é extremamente difícil de forma direta em eletrodos inertes (metal ou carbono), pois ele possui um alto sobrepotencial e interferentes são produzidos pela oxidação<sup>40</sup>.

A literatura está repleta de diferentes métodos para determinação de ácido ascórbico em diferentes matrizes. Entre esses destacam-se os métodos colorimétrico<sup>41</sup>, fluorométricos<sup>42</sup>, potenciométricos<sup>43</sup>, quimiluminescentes<sup>44</sup> e cromatográficos<sup>45,46</sup>. Os métodos voltamétricos empregados para a determinação de vitamina C descritos na literatura utilizam eletrodos convencionais e eletrodos de pasta de carbono. A aplicabilidade desses eletrodos decresce com o uso repetitivo devido aos danos causados pelos produtos da oxidação<sup>14</sup>.



**Figura 5:** Estrutura do ácido ascórbico na forma oxidada e reduzida.

## 2.6. Técnicas eletroquímicas utilizadas para o estudo de eletrodos quimicamente modificados

### 2.6.1. Voltametria Cíclica

A técnica eletroquímica de voltametria cíclica é extremamente utilizada principalmente em investigações preliminares de mecanismos de processos eletroquímicos.

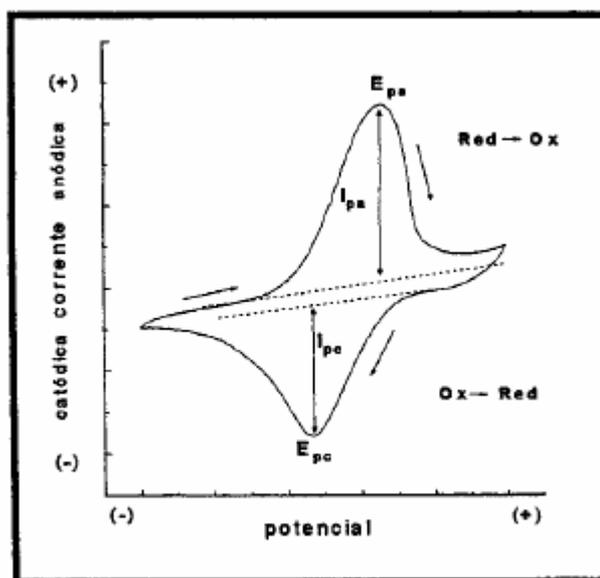
A voltametria compreende um conjunto de técnicas em que se estuda as relações entre corrente-potencial durante uma eletrólise em microescala que se desenvolve em uma célula eletrolítica submetida a uma varredura de potencial<sup>15</sup>. A técnica consiste em submeter um eletrodo polarizável, denominado eletrodo de trabalho, a um potencial de onda triangular (sinal de excitação). O voltamograma cíclico é obtido através da medida de corrente nesse eletrodo durante a varredura de potencial. A corrente pode ser considerada o sinal de resposta à aplicação desse potencial, medido em relação a um eletrodo de referência (os mais utilizados são os eletrodos de calomelano saturado (ECS) e Ag/AgCl) no qual não há fluxo de corrente, sendo o circuito completado por um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo, normalmente um fio de platina.

A voltametria cíclica é uma técnica muito útil para o estudo das propriedades de espécies eletroativas. As investigações de espécies eletroativas envolvendo o estudo da relação potencial-corrente em função de diferentes eletrólitos<sup>47</sup> têm mostrado algumas propriedades interessantes como por exemplo, a permeação seletiva de íons metálicos e boa estabilidade química dos sistemas eletródicos<sup>48</sup>. Esses sistemas podem ser utilizados na investigação de mecanismos de transporte de carga e são apropriados como agentes mediadores de reações redox entre o eletrodo e o analito presente no eletrólito. Essas características são muito importantes para materiais utilizados na construção de sensores eletroquímicos com propósitos analíticos<sup>47</sup>.

Em um voltamograma cíclico típico, os principais parâmetros de interesse medidos são os valores de potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$ , as correntes de pico,  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ , e a diferença entre os potenciais de pico  $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ . O potencial de pico médio pode ser obtido através da média entre os potenciais de pico anódico e catódico  $E_m = (E_{pa} + E_{pc})/2$ . Na Figura 6, apresentamos um voltamograma cíclico típico para espécies redox em solução, que apresentam comportamento controlado por difusão.

Podemos notar que quando o potencial torna-se suficientemente positivo para que ocorra a oxidação da espécie em solução, o  $E_{pa}$  (potencial anódico que é uma propriedade

intrínseca da espécie), há um aumento da corrente anódica,  $I_{pa}$  (proporcional à concentração da espécie), até atingir um valor máximo. Como a concentração da espécie reduzida na interface eletrodo-solução nessa etapa torna-se muito pequena, observa-se um decréscimo significativo da corrente após ter sido atingido um máximo, pois o passo determinante vem a ser agora a difusão da espécie eletroativa ao eletrodo. Quando invertida a varredura de potencial, no sentido catódico (para potenciais mais negativos), a espécie é então reduzida, observando-se novamente um aumento de corrente,  $I_{pc}$ , a um determinado potencial,  $E_{pc}$ .



**Figura 6:** Principais parâmetros obtidos a partir de um voltamograma cíclico típico de espécies redox em solução.

Em sistemas eletroquimicamente reversíveis, a relação  $I_{pa}/I_{pc}$  é igual a 1 e a separação entre os potenciais de pico é de  $\Delta E_p = 59/n$  mV (em que  $n$  é o número de elétrons envolvidos na semi-reação) e o qual mantém constante com o aumento da velocidade de varredura. Voltamogramas cíclicos reversíveis podem ser obtidos somente quando as espécies oxidada e reduzida são estáveis e a cinética de reação eletrônica é rápida. Valores maiores do que 1 e um aumento do  $\Delta E_p$  com a velocidade de varredura indicam que o processo de transferência de elétrons no eletrodo é lento<sup>49,50</sup>.

## 2.6.2. Cronoamperometria

Os cronométricos são métodos eletroanalíticos nos quais a magnitude de um sinal elétrico é medida em função do tempo. Os parâmetros elétricos medidos podem ser: corrente (como no caso de cronoamperometria), no qual o processo é iniciado por um pulso de potencial; ou pode ser o potencial (cronopotenciometria), no qual o processo por sua vez é iniciado por um fluxo de corrente.

A cronoamperometria a potencial constante é a classe das medidas eletroanalíticas nas quais a corrente que flui através do eletrodo de trabalho é monitorada em função do tempo, a um potencial fixo no qual ocorre a reação redox do substrato de interesse. Em sistemas em que a espécie eletroativa encontra-se adsorvida na superfície do eletrodo, como no caso dos eletrodos quimicamente modificados, quando aplicado um potencial fixo, ocorre a redução ou oxidação total do mediador, a corrente estabiliza eletroquimicamente a espécie (analito) a qual se deseja determinar, observando-se uma variação de corrente devido ao processo catalítico. Se a corrente observada apresentar uma correlação linear com a concentração do analito, tal eletrodo modificado pode ser utilizado como sensor amperométrico<sup>49,51</sup>.

## 2.7. Planejamento Fatorial

Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem obter respostas de forma mais rápida. Nesse contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema<sup>52-57</sup>.

Os planejamentos estatísticos de experimentos são uma ferramenta de grande utilidade na pesquisa científica, pois fornecem com menor quantidade de experimentos maior quantidade de informações e de indicações sobre a influência de diferentes variáveis e principalmente das implicações das interações dessas variáveis sobre a resposta estudada.

Um planejamento fatorial consiste na realização de experimentos que investigam um processo produtivo ou um determinado sistema, no qual são alteradas as variáveis de entrada e observadas as respostas obtidas, com o objetivo de determinar as variáveis que mais influenciam o resultado de um determinado processo. O planejamento fatorial, além de ser mais racional, possibilita economia de tempo, de material e de recursos quando comparado a experimentos feitos por tentativa<sup>58</sup>.

A utilização de métodos estatísticos, como planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, passou a ser mais freqüente devido ao desenvolvimento dos recursos computacionais e à facilidade de acesso a tecnologia<sup>52-57</sup>.

Um planejamento experimental deve passar por várias etapas, sendo uma exploratória, uma de refinamento e outra de análise estatística dos resultados finais. Na fase exploratória pode-se empregar planejamentos fatoriais de dois níveis, os quais permitem avaliar quantitativamente a influência de uma ou mais variáveis sobre uma resposta de interesse, bem como suas possíveis interações, com a execução de um número mínimo de experimentos. Planejamentos desse tipo são de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta e não se está preocupado ainda com uma descrição muito rigorosa dessa influência. Planejamentos experimentais mais sofisticados são importantes quando se deseja conhecer melhor a relação funcional existente entre a resposta e os fatores<sup>59</sup>.

Para executar um planejamento fatorial é necessário especificar os fatores e os níveis que serão estudados e também, selecionar a variável resposta. Os fatores, que são as variáveis

controladas pelo pesquisador, podem ser tanto qualitativos como quantitativos. Os níveis são os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos.

Na execução de um planejamento fatorial estão envolvidos  $k$  fatores (ou variáveis) cada um deles presente em diferentes níveis. O caso mais simples é aquele em que cada fator  $k$  está presente em apenas dois níveis. Na realização de um experimento com  $k$  fatores em dois níveis, são feitas  $2 \times 2 \times \dots \times 2$  ( $k$  vezes)  $= 2^k$  observações da variável resposta e, portanto, esse planejamento é denominado experimento fatorial  $2^k$ .

Tendo selecionado as variáveis importantes, os ensaios delineados por uma matriz de experimentos são executados e os registros das respostas, para todas as possíveis combinações dos níveis e fatores, efetuados. Os resultados obtidos no planejamento são interpretados a partir do cálculo dos efeitos dos fatores isolados (efeitos principais) e dos efeitos de interação entre os fatores. Tanto os efeitos principais quanto os efeitos de interação são calculados a partir de todas as respostas observadas. A existência de um efeito de interação significativo indica que esses valores devem ser interpretados conjuntamente.

No planejamento fatorial completo, cada possível combinação dos níveis dos fatores precisa ser testada para se determinar o quanto o processo ou experimento em estudo é afetado pelas variáveis individualmente. O número de experimentos aumenta geometricamente com o número de variáveis, de modo que esse método não é usualmente prático quando estão envolvidas acima de quatro variáveis. Para evitar a realização do grande número de experimentos necessários pelo fatorial completo, podem ser utilizados outros planejamentos experimentais como o fatorial fracionado, as redes ortogonais de Taguchi e os planejamentos de Plackett e Burman. Contudo, essas alternativas são não apenas complexas como produzem, geralmente, resultados misturados, isto é, nem sempre é possível dizer se uma determinada resposta é devida a uma interação de diversas variáveis ou ao efeito de uma única variável<sup>59</sup>.

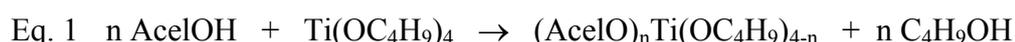
**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO PARA A**  
**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

### 3. DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

#### 3.1. PARTE EXPERIMENTAL

##### 3.1.1. PREPARAÇÃO DA MATRIZ Acel/TiO<sub>2</sub>

O material Acel/TiO<sub>2</sub> foi preparado misturando-se butóxido de titânio com um xarope de acetato de celulose. Cerca de 10 g de acetato de celulose (Aldrich, 2,5 graus de acetilação), (AcelOH) foram adicionados a uma mistura contendo 40 mL de anidrido acético e 50 mL de acetona. Em torno de 7,5 mL de butóxido de titânio foram adicionados a esta solução e, em seguida, a mistura foi agitada para homogeneização de fase. O xarope resultante foi lentamente transferido para um béquer contendo um litro de água deionizada sob rápida agitação. As fibras foram coletadas por filtração, lavadas com água destilada e secas em estufa a 60 °C por 12 h, após foram trituradas resultando no material designado de Acel/TiO<sub>2</sub><sup>60</sup>. A reação de preparação do material Acel/TiO<sub>2</sub> pode ser representada pelas seguintes equações:



##### 3.1.2. IMOBILIZAÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO NA MATRIZ Acel/TiO<sub>2</sub>

Em 50 mL de solução aquosa de azul de metileno  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 foi adicionado 0,5 g de Acel/TiO<sub>2</sub>. A mistura foi agitada por 30 minutos e o sólido resultante foi filtrado, lavado várias vezes com água desionizada e seco em estufa por 30 min a 60° C. O material resultou em um produto final de coloração azul-escura e foi designado de

Acel/TiO<sub>2</sub>/AM. A quantidade de azul de metileno (AM) adsorvido na matriz Acel/TiO<sub>2</sub> foi determinada por análise elementar CHN, resultando em 0,17 ± 0,01 mmol g<sup>-1</sup>.

A imobilização da forma oxidada do azul de metileno na superfície do material Acel/TiO<sub>2</sub> ocorre por reação de troca iônica, e pode visualmente ser observada pela coloração azul assumida pelo material, sendo representada pela equação<sup>20</sup>:

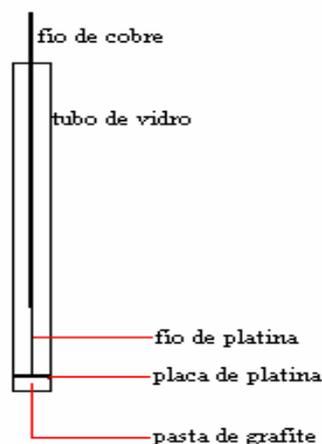


### 3.1.3. ANÁLISE QUÍMICA

A quantidade de óxido de titânio incorporado na matriz de acetato de celulose foi determinada em triplicata por análise gravimétrica na qual a queima do material ocorreu a 900 °C por 3 h e posterior pesagem do resíduo como Acel/TiO<sub>2</sub>. Os resultados obtidos foram de 1,8 mmol g<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> (10,1 % m / m).

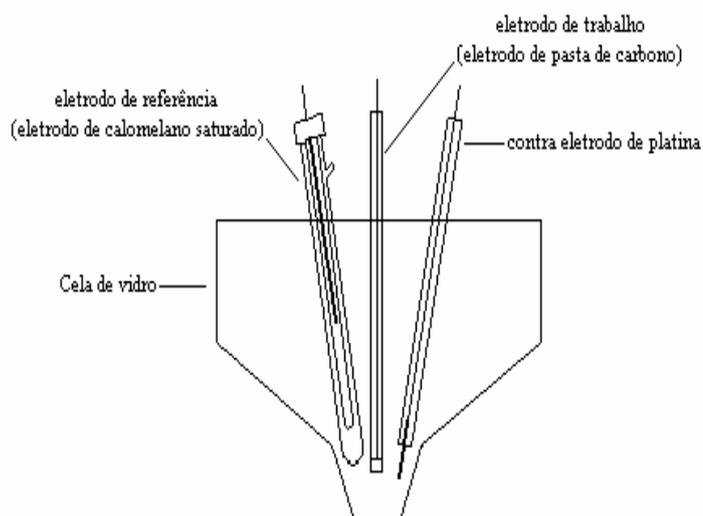
### 3.1.4. MEDIÇÕES ELETROQUÍMICAS

Os eletrodos de pasta de carbono dos materiais Acel/TiO<sub>2</sub> e Acel/TiO<sub>2</sub>/AM, foram preparados pela mistura de grafite de grau analítico (Fluka, grau 99,9 %) na proporção 1:1 (m / m) utilizando uma gota de óleo mineral (Nujol), resultando numa pasta homogênea com massa de aproximadamente 20 mg. A pasta foi colocada dentro de uma cavidade na extremidade de um tubo de vidro cuja profundidade é de 0,2 cm e que possui internamente um disco de platina, selado para contato elétrico, com 3 mm de diâmetro interno, conforme está representado na Figura 7.



**Figura 7:** Eletrodo de pasta de carbono.

A pasta de carbono contendo o material preparado foi utilizada como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contra-eletrodo e eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência. Os estudos voltamétricos e amperométricos foram realizados em um potenciostato-galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 30 interfaciado a um microcomputador para controle do potencial, aquisição e tratamento dos dados. A cela eletroquímica de trabalho continha 20 mL de solução do eletrólito KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> imerso em banho termostaticado a 25,0 ± 0,2 °C. O pH da solução do eletrólito-suporte foi ajustado através da adição de HCl ou KOH de acordo com a faixa de pH desejada. Os experimentos foram realizados na presença de argônio e sob agitação.



**Figura 8:** Esquema da cela eletroquímica utilizada.

As propriedades eletrocatalíticas do eletrodo modificado de pasta de carbono Acel/TiO<sub>2</sub>/AM foram testadas utilizando-se ácido ascórbico como analito. Tal solução foi preparada no mesmo dia em que foi utilizada.

### **3.1.5. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO (H<sub>2</sub>AA)**

#### **3.1.5.1. Obtenção da curva de calibração para H<sub>2</sub>AA por cronoamperometria**

A resposta do eletrodo modificado com Acel/TiO<sub>2</sub>/AM para ácido ascórbico foi avaliada utilizando-se a técnica de cronoamperometria. Para a obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução-mãe de ácido ascórbico 0,010 mol L<sup>-1</sup>. Na cela eletroquímica, contendo 20 mL de solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, e pH 7,0, em atmosfera de argônio, foram adicionadas sucessivas alíquotas de 100 µL da solução-mãe até completar 1 mL, aplicando-se um potencial fixo de 300 mV *vs* ECS. A curva de calibração obtida foi utilizada para determinação de ácido ascórbico em pastilhas de vitamina C (1g/tablete). As soluções foram preparadas na mesma hora do experimento, acondicionadas em um frasco escuro e tampadas com papel alumínio para evitar o contato com a luz e o ar.

#### **3.1.5.2. Determinação de H<sub>2</sub>AA em pastilhas de Vitamina C (1g/tablete)**

Uma pastilha (~ 1g) é dissolvida em água bidestilada e completa-se o volume a 100 mL (solução A). A solução A é preparada no mesmo momento do experimento e é acondicionada em um frasco escuro e tampada com papel alumínio para evitar o contato com a luz e o ar. A resposta cronoamperométrica é obtida adicionando-se 100 µL da solução A na cela contendo 20 mL de solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,0, em atmosfera de argônio, aplicando-se um potencial fixo de 300 mV *vs* ECS.

#### **3.1.5.3. Determinação de H<sub>2</sub>AA pelo método iodométrico**

Para efeito de comparação dos resultados obtidos por cronoamperometria utilizando-se o eletrodo modificado com Acel/TiO<sub>2</sub>/AM, realizou-se a determinação de ácido ascórbico em

pastilhas de vitamina C pelo método iodométrico<sup>61</sup>. Para tanto, dissolveu-se a pastilha (~1g) com água bidestilada e completou-se o volume a 250 mL. Dessa solução, transferiram-se 50 mL para um erlenmeyer e adicionaram-se 40 mL de solução padrão de iodo 0,04510 mol L<sup>-1</sup> e 3 mL de solução de amido e titulou-se o excesso de iodo com tiosulfato de sódio 0,1156 mol L<sup>-1</sup>.

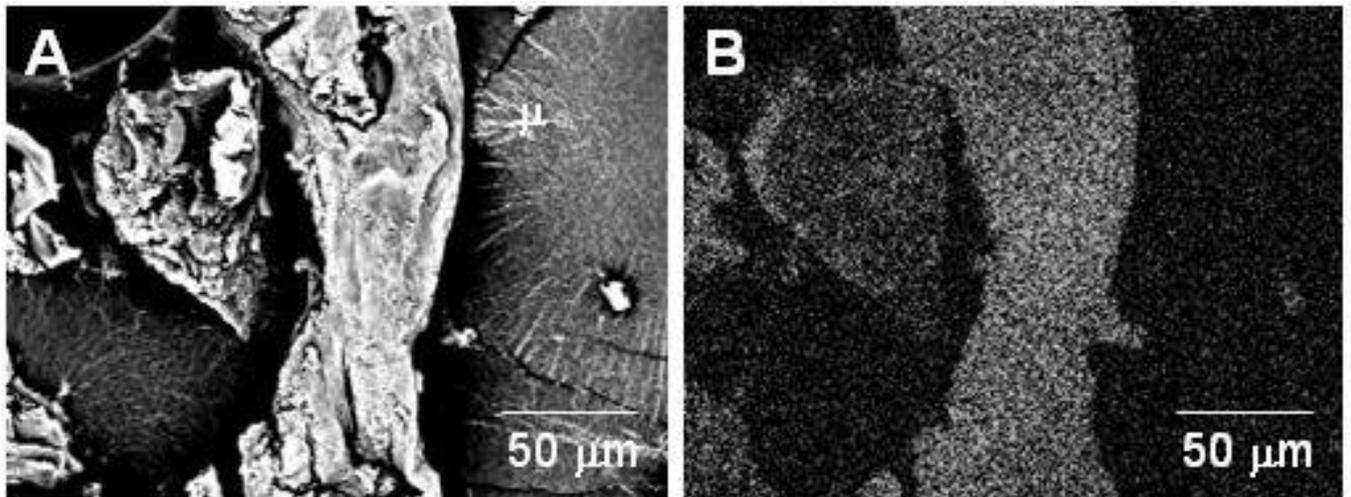
### **3.1.6. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV**

O acetato de celulose puro na forma de pó, bem como o material Acel/TiO<sub>2</sub> foram depositados sobre uma fita de carbono condutora de dupla face aderida a um suporte de alumínio. As amostras foram recobertas com um filme condutor de ouro usando-se um equipamento Baltec SCD 050 Sputter Coater. As micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM 5800, equipado com microsonda de energia dispersa de elétrons (EDS).

## 3.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.2.1. DISPERSÃO DE TiO<sub>2</sub> NA SUPERFÍCIE DE ACETATO DE CELULOSE

A textura do acetato de celulose puro e do material híbrido Acel/TiO<sub>2</sub> foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 9). A dispersão das partículas de TiO<sub>2</sub> pode ser observada através da imagem do material Acel/TiO<sub>2</sub> sugerindo que o filme de TiO<sub>2</sub> está altamente disperso sobre a superfície da fibra, embora de forma heterogênea. Alguns particulados de aglomerados brancos são devidos ao TiO<sub>2</sub> e podem ser detectados na superfície modificada.



**Figura 9:** Imagens do Acel/TiO<sub>2</sub>, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, (A) imagem MEV e (B) imagem EDS.

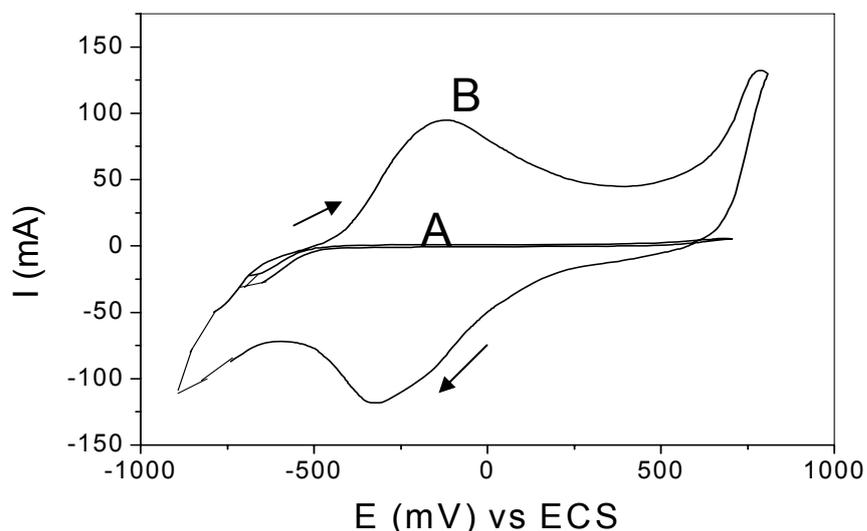
### 3.2.2. ESTUDOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA

Os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado de pasta de carbono Acel/TiO<sub>2</sub> não apresentaram ondas voltamétricas relevantes o que pode ser observado na Figura 10, curva A; enquanto que foram observadas claramente ondas voltamétricas mostradas na Figura 10, curva B, para o eletrodo modificado de pasta de carbono Acel/TiO<sub>2</sub>/AM. O potencial médio,  $E_m$ , ( $E_m = E_{pa} + E_{pc}/2$ ) em que  $E_{pa}$  é o potencial de pico anódico e  $E_{pc}$  é o potencial de pico catódico, foi - 225 mV vs. ECS em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0.

A quantidade de espécies eletroativas (AM),  $\Gamma$ , a qual representa a quantidade de sítios ativos presentes na superfície do eletrodo e expressa como carga por unidade de área e pode ser calculada aplicando a equação<sup>20</sup>:

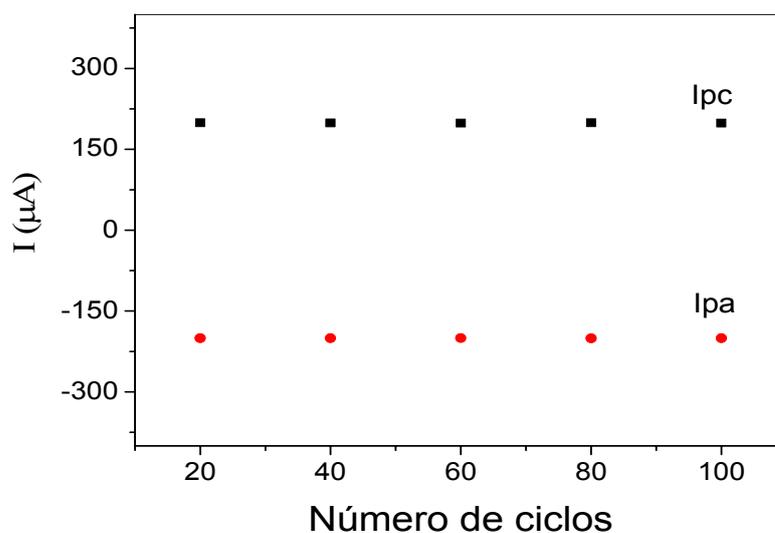
$$\text{Eq. 4} \quad \Gamma = Q / nFA \quad \text{onde } n = 2 \text{ elétrons}$$

$Q$  é a carga integrada sob a onda voltamétrica cíclica,  $n$  é o número de elétrons envolvidos,  $F$  é a constante de Faraday e  $A$  é a área geométrica do eletrodo igual a 0,28 cm<sup>2</sup>. O valor obtido para o pico anódico foi de  $3,1 \times 10^{-8}$  mol cm<sup>-2</sup> o que sugere que suporte-sólido apresenta-se relativamente poroso.



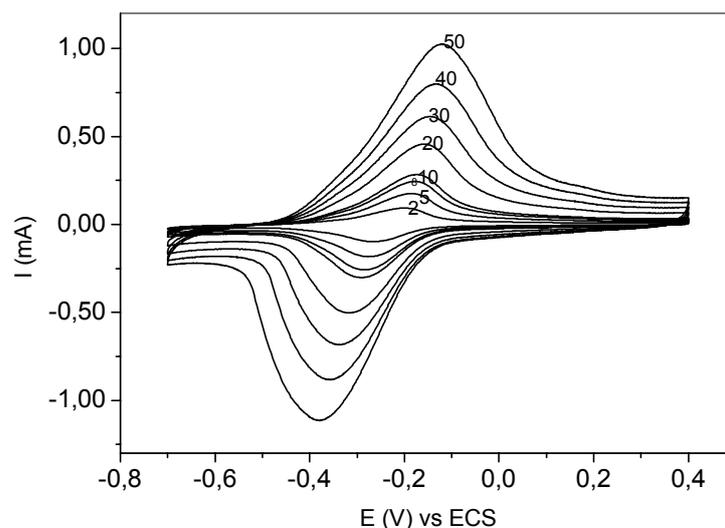
**Figura 10:** Voltamogramas cíclicos do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub> (A) e do eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM (B). Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>.  $E_{inicial} = - 800$  mV e  $E_{inversão} = 800$  mV.

A estabilidade do eletrodo de trabalho foi testada medindo-se os valores das correntes anódica e catódica em função do número de ciclos. Os resultados mostram que nenhuma variação significativa foi observada após 100 ciclos redox (Figura 11). As intensidades de corrente de pico permanecem praticamente constantes. Isso indica que o corante está fortemente adsorvido sobre a superfície do eletrodo modificado não ocorrendo lixiviação do corante imobilizado ou decomposição durante o experimento. A estabilidade observada para o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM indica que o material eletrodico pode ser utilizado como sensor eletroquímico.



**Figura 11:** Estabilidade química do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM após 100 ciclos redox. Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>.

As curvas voltamétricas obtidas em diferentes velocidades de varredura mostradas na Figura 12 indicam que a separação entre os potenciais de pico,  $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ , aumenta com o aumento da velocidade de varredura de 2 até 50 mV s<sup>-1</sup> (Tabela I), indicando que a velocidade de transferência de carga não é muito rápida.



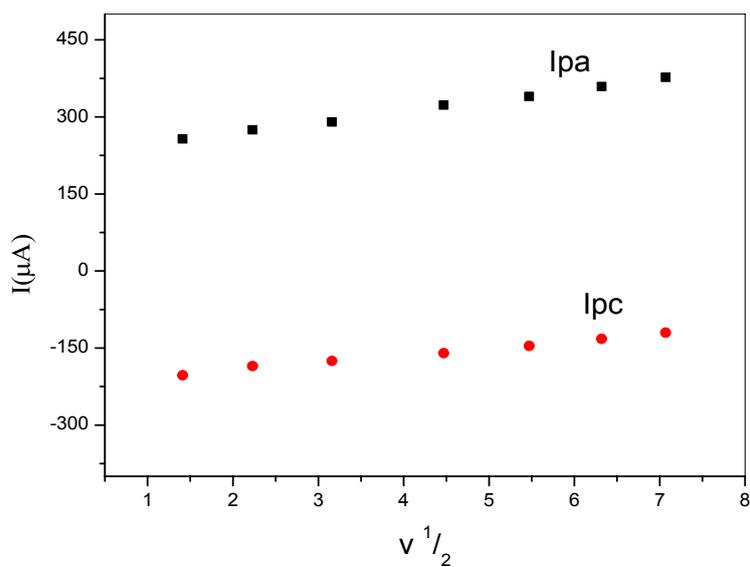
**Figura 12:** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se EPC modificado com Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em diferentes velocidades de varredura (2, 5, 8, 10, 20, 30, 40, 50 mV s<sup>-1</sup>). Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

A correlação linear entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $I_p$  vs  $v^{1/2}$ ), mostrada na Figura 13, indica que o sistema apresenta comportamento similar àqueles onde o processo é controlado pela difusão das espécies eletroativas à superfície do eletrodo<sup>49,50</sup>. Nesse sistema, podemos atribuir o comportamento do eletrodo quimicamente modificado, à lenta difusão do ânion Cl<sup>-</sup><sub>(aq)</sub> do eletrólito-suporte dentro da estrutura do material que ocorre para garantir a neutralidade de carga durante a reação de oxirredução. Dessa forma, observa-se um gradiente de concentração no seio da solução atribuído ao ânion do eletrólito-suporte.

A reação de oxidação e redução do corante orgânico ocorre inicialmente pelo equilíbrio do ânion do eletrólito suporte com a superfície do material, o qual pode ser representado pela equação<sup>16,20</sup>:



Para espécies adsorvidas na superfície do eletrodo, isto é, confinadas, as correntes de pico anódico e catódico são linearmente proporcionais à velocidade de varredura e não se observa difusão das espécies eletroativas, pois não há um gradiente de concentração, conseqüentemente não observamos um aumento no  $\Delta E$  com o aumento da velocidade de varredura.



**Figura 13:** Dependência entre as correntes  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  com  $v^{1/2}$ . Solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela I:** Parâmetros ciclovoltagemétricos do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em diferentes velocidades de varredura.

$V / \text{mV s}^{-1}$	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E \text{ (mV)}$
2	0,892	19
5	0,951	89
8	1,000	109
10	0,948	113
20	0,904	119
30	0,919	192
40	0,890	228
50	0,913	256

### 3.2.3. INFLUÊNCIA DO ELETRÓLITO-SUPORTE

Foram realizados estudos voltamétricos em diferentes eletrólitos suportes e os resultados indicaram que praticamente não ocorreram mudanças significativas no potencial médio do eletrodo modificado. Os valores de potenciais médios e a razão entre as correntes de pico anódico e catódico observados nesses estudos são mostrados na Tabela II. Isso significa que os eletrólitos-suportes utilizados não interagiram com a espécie eletroativa e nem deslocam o corante da superfície do eletrodo modificado para a solução, através de uma reação de troca iônica<sup>22</sup>. Portanto, para os estudos posteriores, escolheu-se KCl como eletrólito-suporte.

**Tabela II:** Potenciais médios e razão entre as intensidades de pico anódica e catódica do Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em diferentes eletrólitos-suportes, em concentração 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

Eletrólitos	Em/ mV vs ESC	Ipa/Ipc
KNO <sub>3</sub>	176	0,70
NaNO <sub>3</sub>	254	0,73
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	257	0,70
NaCl	223	0,80
NH <sub>4</sub> Cl	245	0,77
KCl	226	0,72

### 3.2.4. INFLUÊNCIA DO pH

A reação do corante azul de metileno apresenta um comportamento fortemente dependente do pH, pois envolve a participação de prótons, H<sup>+</sup> (Figura 15). Dessa forma, o efeito do pH do meio é extremamente relevante no estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo quimicamente modificado.

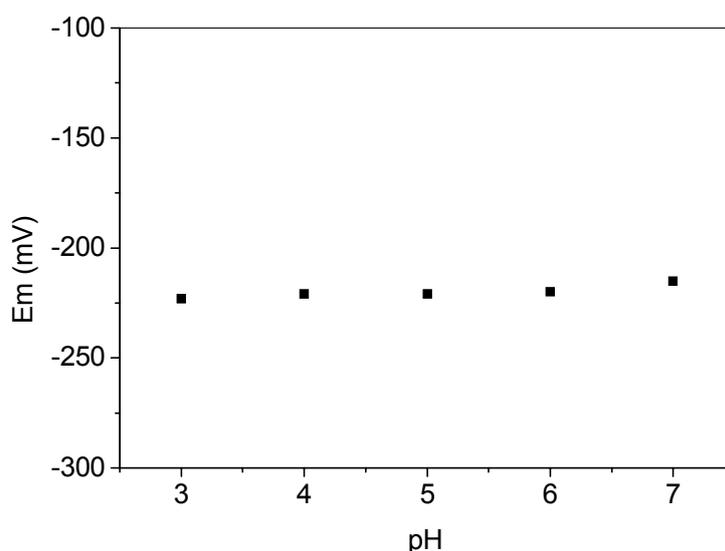
O comportamento do AM é extremamente dependente do pH do meio quando em solução aquosa, adsorvido em eletrodos de grafite ou imobilizado sobre matrizes poliméricas. Em tais sistemas, observa-se um deslocamento de 30, 60 ou 90 mV por unidade de pH, dependendo do número de H<sup>+</sup> participantes da reação redox. Em pH < 6 ocorre um deslocamento de potencial em torno de 90 mV, indicando que 3H<sup>+</sup> estão envolvidos no processo redox nessas condições de pH, enquanto que em pH > 6 esse deslocamento é de apenas 30 mV sugerindo que há apenas 1H<sup>+</sup> envolvido no processo redox.

Em pH < 5,4, a forma reduzida (Figura 14, forma IV) do AM é predominante, provocando um deslocamento de potenciais médios para valores mais positivos. Em 5,4 < pH < 6,0 predomina a forma V. Em pH > 6, a forma predominante do azul de metileno é a II, que

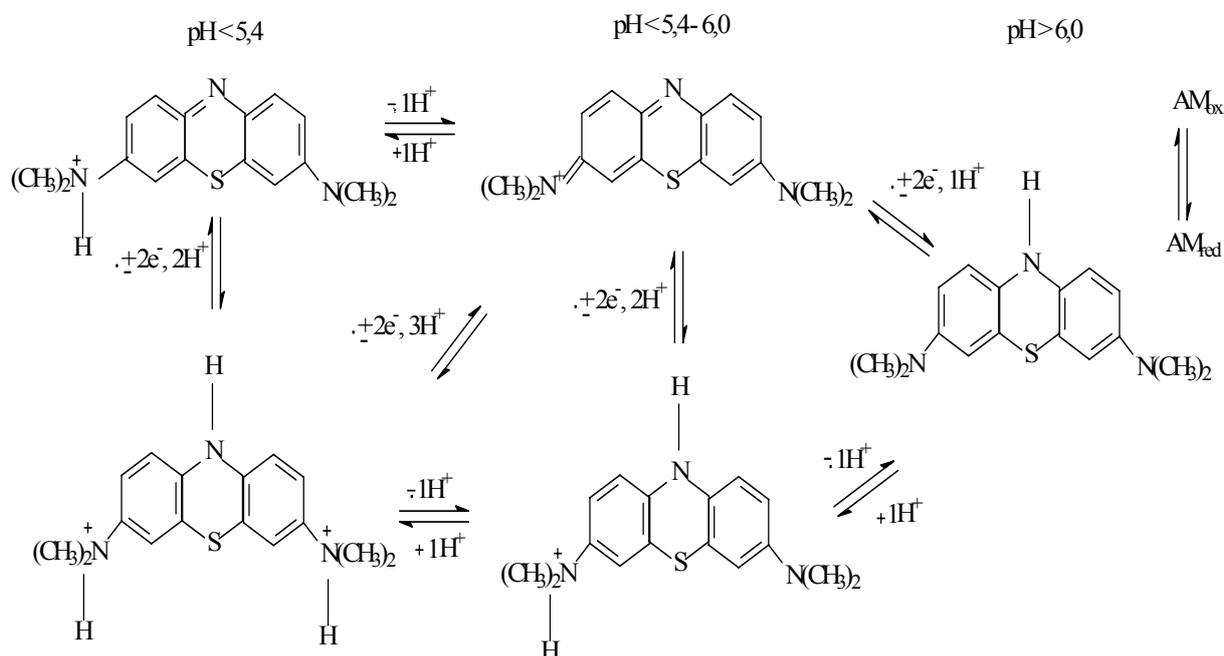
é a forma oxidada, provocando um deslocamento dos potenciais médios para valores mais negativos<sup>34</sup>.

Em meios mais básicos, a forma oxidada do AM apresenta-se mais estável e o deslocamento de potencial ocorre na direção negativa, enquanto que em meios mais ácidos a forma reduzida encontra-se mais estabilizada sobre o eletrodo e esse deslocamento ocorre na direção positiva de potencial.

A influência do pH no comportamento do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM foi investigada utilizando-se como eletrólito-suporte uma solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e uma faixa de pH entre 3 a 7 (Figura 14). Foi observado que na faixa de pH estudada o potencial médio, E<sub>m</sub>, para o AM imobilizado na matriz, não foi afetado, permanecendo praticamente constante. Esse comportamento é muito diferente para o corante azul de metileno quando em solução aquosa, onde o corante apresenta mudanças no comportamento com a variação do pH. Nesse caso, com a diminuição do pH, maior é o número de prótons presentes na solução e, conseqüentemente, mais eficiente é o processo de transferência de elétrons e maior é a corrente observada. Esse comportamento não é observado para o corante imobilizado no material Acel/TiO<sub>2</sub>. Dessa forma, o resultado obtido sugere que o corante está interagindo com a matriz na forma protonada, através de ligações eletrostáticas, tornando-se pouco sensível a mudanças no pH do sistema.



**Figura 14:** Dependência entre o E<sub>m</sub> e o pH para o Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>.

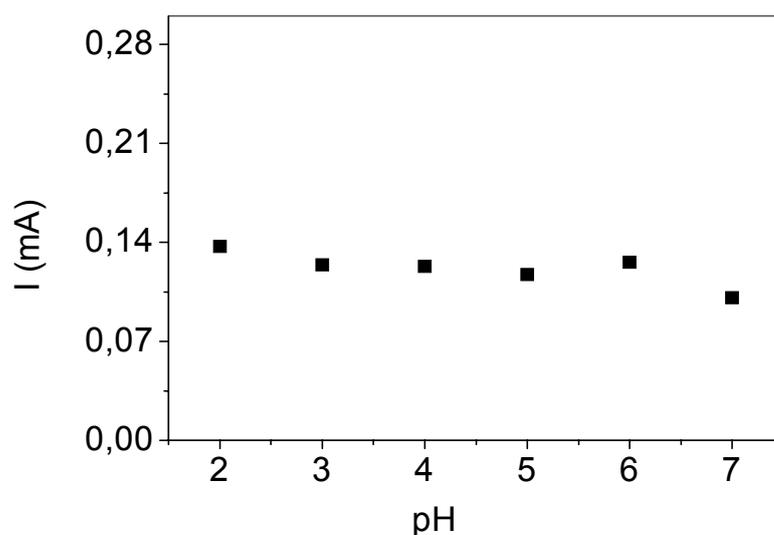


**Figura 15:** Comportamento redox do azul de metileno em diferentes pHs.

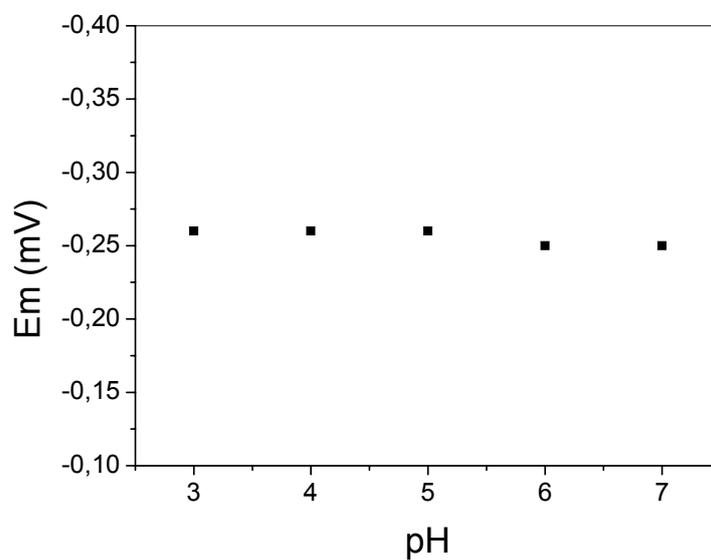
### 3.2.5. EFEITO DO pH NA OXIDAÇÃO DO H<sub>2</sub>AA

O pH da solução do eletrólito-suporte apresenta considerável influência na reação de oxidação do ácido ascórbico<sup>16</sup>. Sendo assim, foram realizados estudos da resposta do eletrodo em diferentes pHs. Para tanto, foram medidas as correntes de pico e os potenciais de pico em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> com pH entre 2 e 7 e 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>AA. Na faixa de pH entre 2 e 7, a intensidade da corrente de pico da oxidação do ácido no eletrodo modificado permaneceu praticamente constante (Figura 16).

Podemos observar através da Figura 17, a não dependência do E<sub>m</sub> para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na eletrooxidação do H<sub>2</sub>AA em uma faixa de pH entre 3 e 7. Este aspecto é muito importante pois o comportamento do corante AM em solução aquosa é dependente do pH do meio (Figura 15).



**Figura 16:** Influência do pH nas correntes de pico para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup> e concentração de ácido ascórbico 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

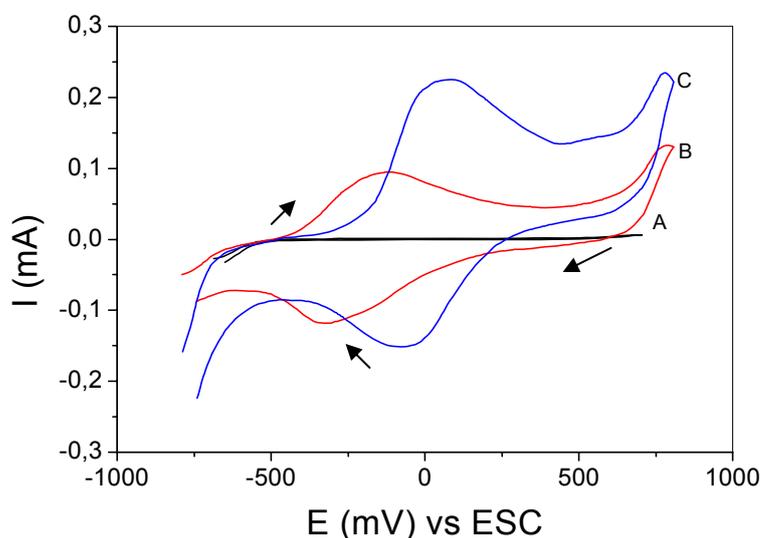


**Figura 17:** Influência do pH no Em para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup> e concentração de ácido ascórbico 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### 3.2.6. OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Para verificar as propriedades electrocatalíticas do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM realizaram-se estudos utilizando o ácido ascórbico, H<sub>2</sub>AA, como analito. O ácido ascórbico apresenta um potencial redox  $E^0 = 54 \text{ mV}$ , mas sua oxidação electroquímica em eletrodos convencionais ocorre em altos sobrepotenciais, sofrendo, dessa forma, a interferência de outras espécies oxidáveis existentes em amostras biológicas. A utilização de eletrodos quimicamente modificados possibilita baixar esse sobrepotencial facilitando a electrooxidação do H<sub>2</sub>AA.

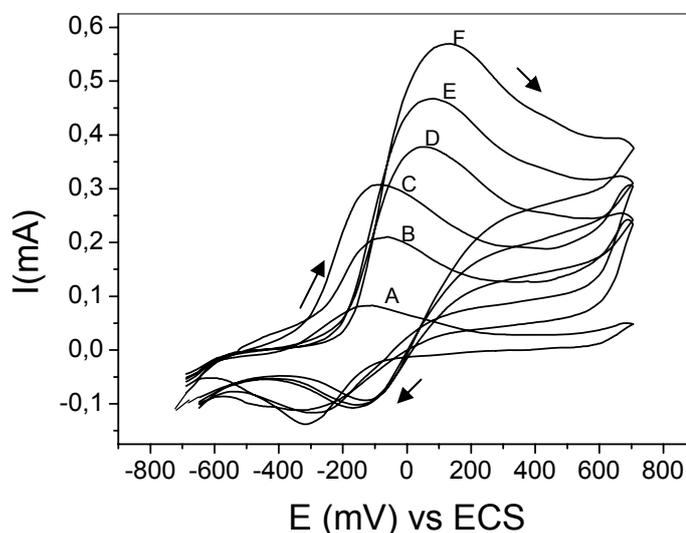
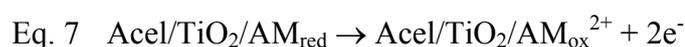
Podemos observar pela Figura 18, curva A, que o voltamograma obtido para o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub> não apresenta picos de oxidação e redução definidos. A curva B apresenta o voltamograma obtido para o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM sem a presença de H<sub>2</sub>AA. A electrooxidação do H<sub>2</sub>AA em eletrodos de grafite ocorre em 400 mV como demonstrado na literatura<sup>16</sup>. Utilizando-se o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM, foi observado um aumento de corrente após a adição do H<sub>2</sub>AA (Figura 18, curva C) e uma antecipação de potencial em cerca de 200 mV na mesma região de potencial de oxidação do corante redox, comprovando, dessa forma, a atividade catalítica do azul de metileno imobilizado na matriz Acel/TiO<sub>2</sub>.



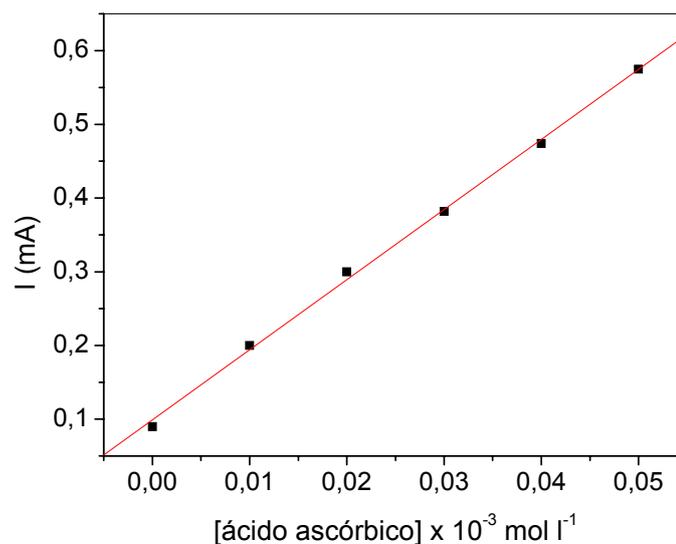
**Figura 18:** Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando-se eletrodo de pasta de carbono em 20 mL do eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>: (A) Acel/TiO<sub>2</sub> na ausência de H<sub>2</sub>AA, (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na ausência de H<sub>2</sub>AA e (C) Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na presença de 5 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>AA.

A Figura 19 mostra os voltamogramas obtidos com o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM imerso em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e em pH 7,0, na ausência de ácido ascórbico (Figura 19, curva A) e na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (Figura 19, curva B-F). Foi observado um aumento na intensidade da corrente de pico anódico, quando foram adicionadas sucessivas quantidades de ácido ascórbico 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> até 40,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, o que indica que a oxidação catalítica do ácido ascórbico é mediada pelo eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM. Na Figura 20 podemos observar que a corrente é proporcional à concentração do ácido ascórbico.

O mecanismo da reação na interface do eletrodo pode ser descrito como a equação abaixo<sup>16</sup>:



**Figura 19:** Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM na ausência de ácido ascórbico (A) e na presença de H<sub>2</sub>AA nas concentrações em mol L<sup>-1</sup>: (B) 1,0 x 10<sup>-3</sup>; (C) 10,0 x 10<sup>-3</sup>; (D) 20,0 x 10<sup>-3</sup>; (E) 30,0 x 10<sup>-3</sup> e (F) 40,0 x 10<sup>-3</sup>. Solução de eletrólito suporte 20 mL de KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup> e pH 7,0.



**Figura 20:** Relação entre a intensidade de corrente de pico versus a concentração de H<sub>2</sub>AA.

Analisando a Figura 19, observamos também que, com o aumento da concentração do ácido ascórbico, ocorre um aumento no  $\Delta E$  a uma velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>. Esse comportamento pode ser atribuído a difusão do ácido ascórbico na superfície do eletrodo, pois ocorre um gradiente de concentração no seio da solução tornando o processo de transferência de carga lento.

### 3.2.7. ESTUDOS CRONOAMPEROMÉTRICOS

Medidas cronoamperométricas foram realizadas com o intuito de verificar a potencialidade do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM e sua utilização como sensor eletroquímico para ácido ascórbico. Inicialmente os estudos cronoamperométricos foram realizados para se determinar o melhor potencial a ser aplicado. O potencial foi escolhido através das medidas de intensidade de corrente para uma solução contendo [H<sub>2</sub>AA] = 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. Para os futuros experimentos, o potencial foi fixado em 300 mV.

A Figura 21 mostra a curva de calibração por cronoamperometria para H<sub>2</sub>AA através de adições de sucessivas alíquotas de 100  $\mu$ L de solução-padrão de ácido ascórbico,

$[H_2AA] = 0,010 \text{ mol L}^{-1}$ , à 20 mL de solução de KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em um potencial fixado  $E_{pa} = 300 \text{ mV}$ .

Na Figura 22, pode-se observar a curva cronoamperométrica para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em função da concentração de ácido ascórbico. Na faixa de concentrações compreendida entre  $1,0$  e  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , observou-se uma correlação linear demonstrada pela equação  $I = (0,96 \pm 2,46) + (71,26 \pm 1,61) [H_2AA]$ , com um coeficiente de correlação linear  $R = 0,999$ . O limite de detecção (considerando a relação sinal / ruído = 3) foi de  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  e o limite de quantificação encontrado foi de  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . A sensibilidade foi de  $7,13 \text{ } \mu\text{A L mol}^{-1}$ . O tempo de resposta do eletrodo, medido após a adição do analito na cela eletroquímica foi de  $1,0 \text{ s}$ . Sendo assim, o presente eletrodo apresenta potencial para ser usado como sensor de ácido ascórbico.

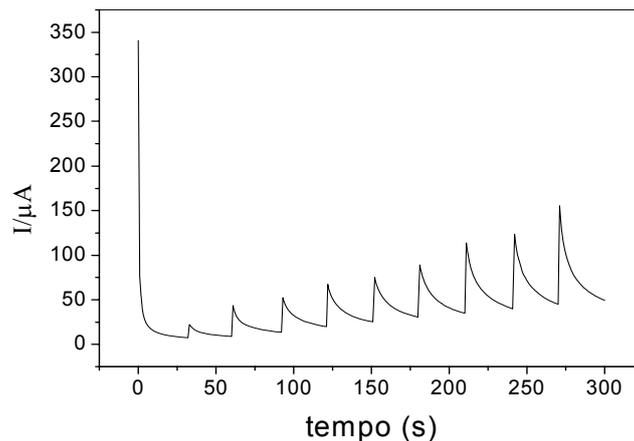
Objetivando testar o eletrodo foi realizado um experimento para determinar a concentração de ácido ascórbico em uma amostra comercial. Foi utilizado um tablete de vitamina C comercial, comprado em drogaria local, que foi dissolvido em 100 mL de água bidestilada (solução A). A resposta cronoamperométrica foi obtida adicionando-se  $50 \text{ } \mu\text{L}$  da solução A na cela eletroquímica contendo 20 mL de solução de KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e então realizada a medida de corrente utilizando-se o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM, com a aplicação de um potencial de 300 mV. A quantidade de ácido ascórbico nos tabletes foi calculada a partir da curva de calibração. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos através do método iodométrico. Os dados obtidos estão demonstrados na Tabela III.

**Tabela III:** Resultados obtidos na determinação de ácido ascórbico em amostras de vitamina C utilizando-se o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AM e através da técnica de iodometria.

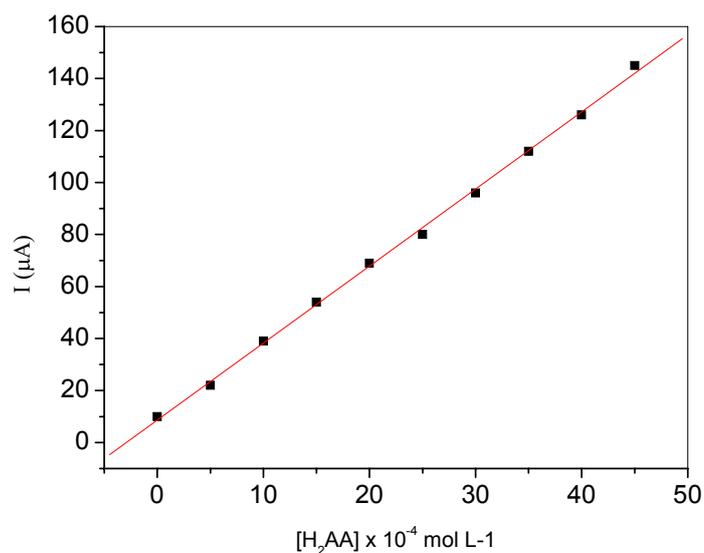
Amostra	Quantidade declarada / g	Método iodométrico	Cronoamperometria
		m / g	m / g
A	1g/tablete	0,997 g/ tablete	1,021 g/tablete

A – Amostra de ácido ascórbico comercial

A resposta do sensor pode ser considerada muito rápida cerca de  $1,0 \text{ s}$ . O eletrodo modificado de pasta de carbono Acel/TiO<sub>2</sub>/AM mostrou-se eficiente na detecção de ácido ascórbico.



**Figura 21:** Estudo cronoamperométrico para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AM em solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O cronoamperograma obtido por sucessivas adições de 100 μL de ácido ascórbico 0,010 mol L<sup>-1</sup> em uma cela eletroquímica contendo 20 mL de solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0.



**Figura 22:** Gráfico da corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) pela concentração de ácido ascórbico.

### 3.3. CONCLUSÕES

Não foi observada lixiviação do corante azul de metileno mesmo quando imerso em soluções concentradas do eletrólito-suporte e em circuito aberto. Esse fato sugere que o corante está fortemente aderido à matriz Acel/TiO<sub>2</sub>. A natureza do eletrólito-suporte não afetou significativamente a resposta do eletrodo. Os potenciais redox do corante imobilizado não foram afetados pelo pH da solução do eletrólito suporte na faixa de pH de 3,0 a 7,0, bem como as intensidades de corrente em uma faixa de pH de 2,0 e 7,0. As propriedades electrocatalíticas do Acel/TiO<sub>2</sub>/AM para oxidar ácido ascórbico são bastante satisfatórias e o sistema eletródico apresenta uma boa sensibilidade para o ácido ascórbico. A resposta do eletrodo, após a adição do analito, foi muito rápida, cerca de 1 segundo. Portanto, a matriz modificada apresenta-se como excelente suporte para a imobilização de outras espécies electroquímicas abrindo a possibilidade de utilizá-la no estudo de outros analitos.

**AVALIAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE MELDOLA E AZUL DE  
TOLUIDINA IMOBILIZADOS EM ACETATO DE CELULOSE  
MODIFICADA COM DIÓXIDO DE TITÂNIO COMO SENSORES  
AMPEROMÉTRICOS POR PLANEJAMENTO FATORIAL**

#### **4. AVALIAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE MELDOLA E AZUL DE TOLUIDINA IMOBILIZADOS EM ACETATO DE CELULOSE MODIFICADA COM DIÓXIDO DE TITÂNIO COMO SENSORES AMPEROMÉTRICOS POR PLANEJAMENTO FATORIAL**

##### **4.1. INTRODUÇÃO**

Os corantes orgânicos azul de meldola (AMeld) e azul de toluidina (AT) têm sido usados como efetivos mediadores de elétrons no processo redox através da imobilização em superfícies químicas tratadas com óxidos metálicos para produzir eletrodos quimicamente modificados (EQM)<sup>36,62</sup>.

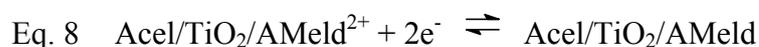
O comportamento redox e as propriedades eletrocatalíticas desses corantes orgânicos têm sido estudadas para a determinação de diferentes analitos tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>36,63</sup>, álcoois<sup>64</sup>, lactose<sup>65,66,67</sup>, amônia<sup>68</sup>, ácido fórmico<sup>69</sup>, enzimas como aminotransferase aspartato<sup>70</sup> e peroxidase de raiz forte (horseradish)<sup>63</sup>, NADH e oxalatos<sup>71,72</sup>.

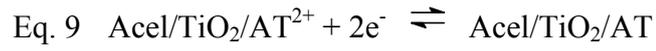
Essas características são muito importantes para o desenvolvimento de sensores e de biossensores baseados na ligação redox entre o material do eletrodo e o centro redox na biomolécula<sup>73,74</sup>.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois materiais híbridos quimicamente modificados preparados pela imobilização do azul de meldola na matriz acetato de celulose/TiO<sub>2</sub> (Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld) e azul de toluidina imobilizado na matriz acetato de celulose/TiO<sub>2</sub> (Acel/TiO<sub>2</sub>/AT).

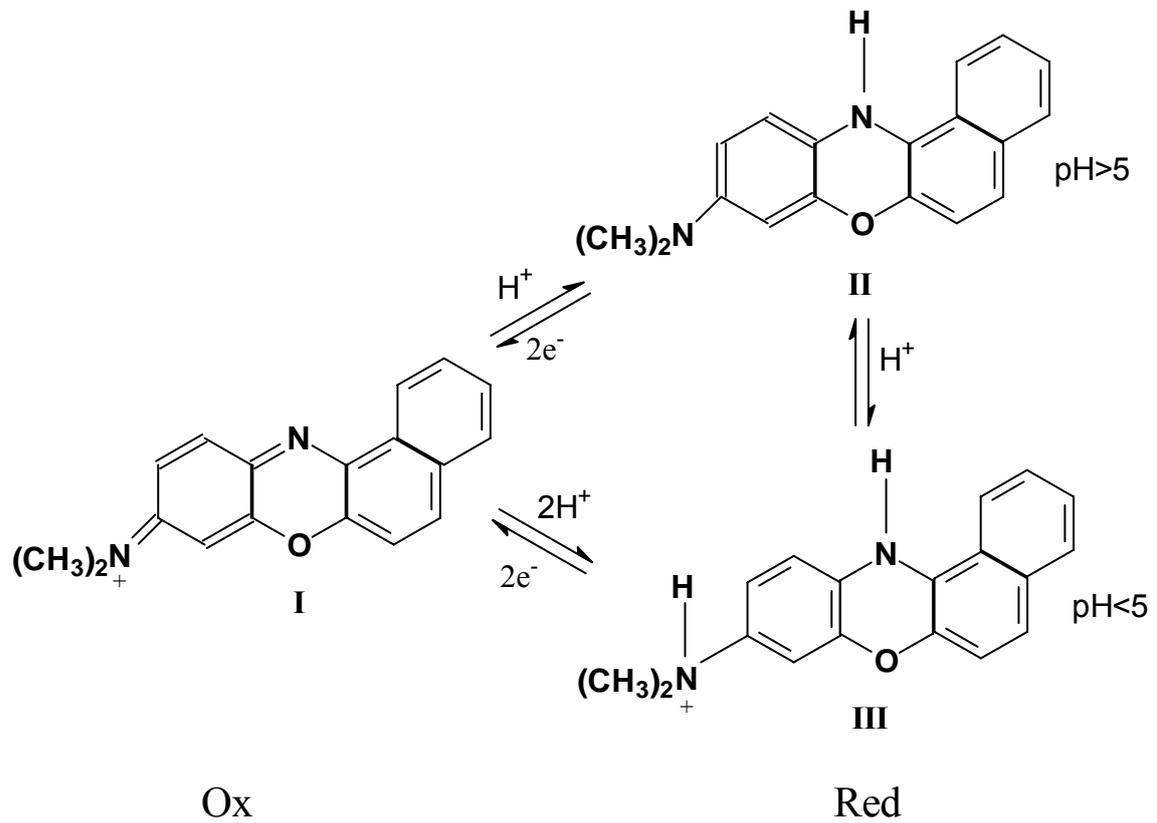
Os dois mediadores estudados apresentam processos de oxidação e redução envolvendo dois elétrons e dois prótons (Figuras 23 e 24). Dessa forma, a concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte pode afetar o potencial de resposta dos eletrodos.

As reações de oxidação e redução dos compostos ocorre inicialmente pelo equilíbrio do ânion do eletrólito suporte com a superfície do material e podem ser representadas pelas equações<sup>16</sup>:

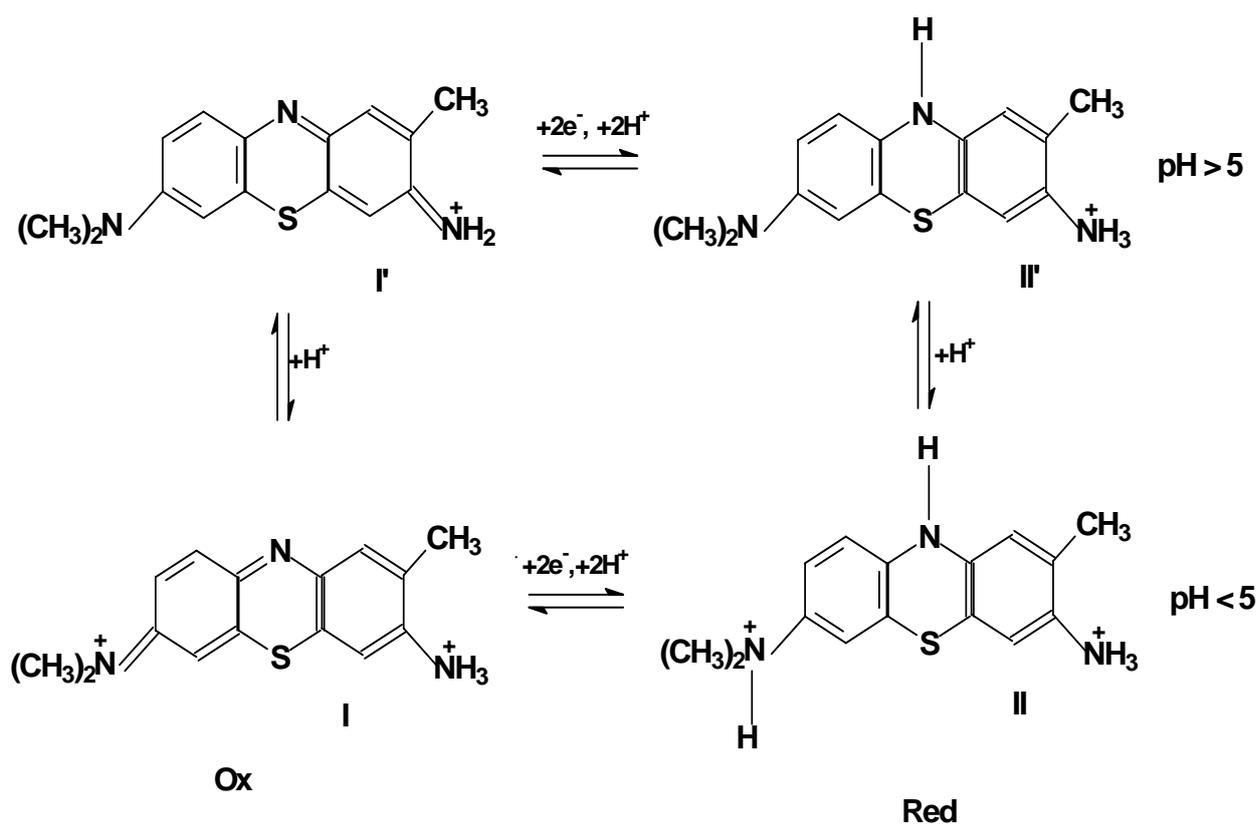




Para chegarmos às melhores condições de reversibilidade desses eletrodos, foi realizado um planejamento fatorial  $2^4$  com dois pseudopontos centrais ( $n=20$  experimentos).



**Figura 23:** Comportamento redox do Azul de Meldola em diferentes pHs.



**Figura 24:** Comportamento redox do corante Azul de Toluidina em diferentes pHs.

## **4.2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.2.1. PREPARAÇÃO DA MATRIZ Acel/TiO<sub>2</sub>**

A preparação da matriz Acel/TiO<sub>2</sub> está descrita no item **3.1.1.**

### **4.2.2. IMOBILIZAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE MELDOLA E AZUL DE TOLUIDINA NA MATRIZ Acel/TiO<sub>2</sub>**

Em 50 mL de solução aquosa de azul de meldola (Aldrich)  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e, alternativamente de azul de toluidina (Aldrich)  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, em pH 6,0, foram adicionados 0,5 g de Acel/TiO<sub>2</sub>. A mistura foi agitada por 1 h e o sólido resultante foi filtrado, lavado várias vezes com água bidestilada e seco em estufa por 30 min a 60 °C.

### **4.2.3. ANÁLISE QUÍMICA**

As quantidades de corantes imobilizados no suporte foram determinadas por análise elementar baseada no elemento nitrogênio (N). Os materiais resultantes foram denominados Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT.

### **4.2.4. MEDIÇÕES ELETROQUÍMICAS**

As medições eletroquímicas foram realizadas conforme descrito no item **3.1.4.** Os estudos voltamétricos e amperométricos foram realizados em um potenciostato-galvanostato Radiometer modelo DEA 332.

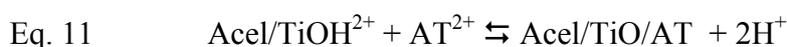
### **4.2.5. DETERMINAÇÃO DE NADH POR CRONOAMPEROMETRIA**

Para a construção da curva de calibração do NADH, foi preparada uma solução-mãe concentração, [NADH] 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Foram então adicionadas alíquotas de 100 µL desta

solução na cela eletroquímica contendo 20 mL de solução do eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O pH da solução do eletrólito-suporte foi ajustado através da adição de HCl ou KOH de acordo com a faixa de pH desejada.

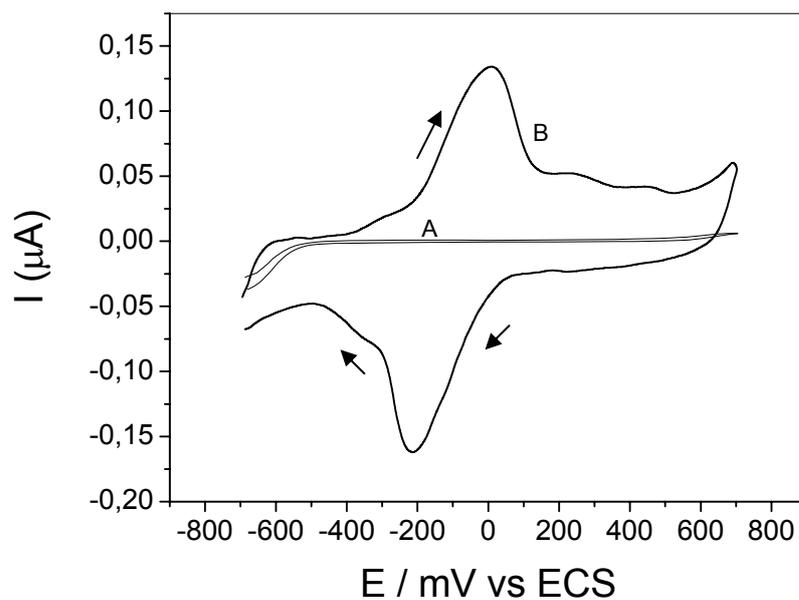
### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A imobilização dos corantes azul de meldola e azul de toluidina em Acel/TiO<sub>2</sub> foi feita em pH 6,0. O comportamento eletroquímico do corante AMeld<sup>2+</sup> em diferentes pHs é mostrado na Figura 23 e do corante AT<sup>2+</sup> na Figura 24. A imobilização dos corantes azul de meldola e do azul de toluidina na superfície Acel/TiO<sub>2</sub> ocorreu através da reação de troca iônica representada pelas seguintes reações<sup>16</sup>:

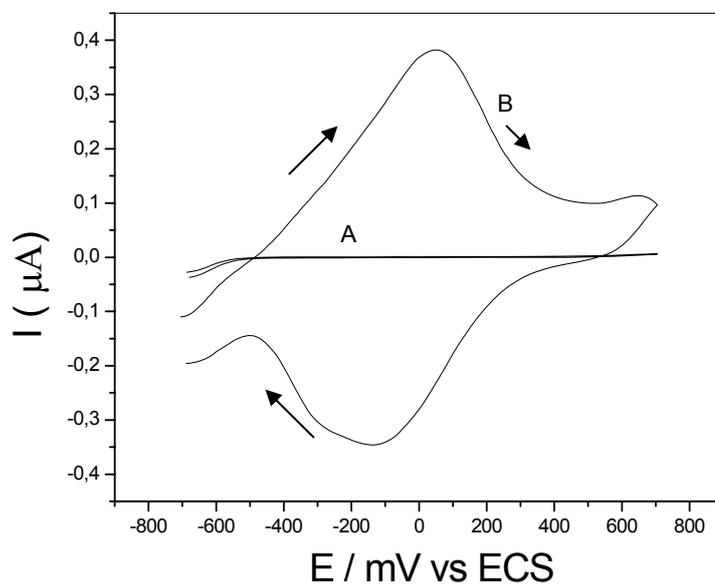


As quantidades de azul de meldola (AMeld) e azul de toluidina (AT) adsorvidos na matriz Acel/TiO<sub>2</sub> foram determinadas por análise elementar CHN, resultando em 0,054 ± 0,005 e 0,133 ± 0,004 mmol g<sup>-1</sup> respectivamente.

As Figuras 25A e 25B mostram os voltamogramas cíclicos para Acel/TiO<sub>2</sub> e Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e as Figuras 26A e 26B os voltamogramas cíclicos para Acel/TiO<sub>2</sub> e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT. Os potenciais médios, E<sub>m</sub>, (E<sub>m</sub> = (E<sub>pa</sub> + E<sub>pc</sub>)/2) em que E<sub>pa</sub> e o E<sub>pc</sub> são respectivamente os potenciais de pico anódico e catódico, foram - 113 mV para Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e - 93 mV para Acel/TiO<sub>2</sub>/AT. Uma pequena diferença observada entre os potenciais médios dos materiais Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT sugere que as moléculas dos corantes estão, provavelmente, fortemente ligadas pela atração eletrostática através dos grupos aminas e/ou pelos nitrogênios presentes nos heterociclos das moléculas dos corantes com o óxido metálico disperso sobre as fibras de acetato de celulose<sup>75,76</sup>.

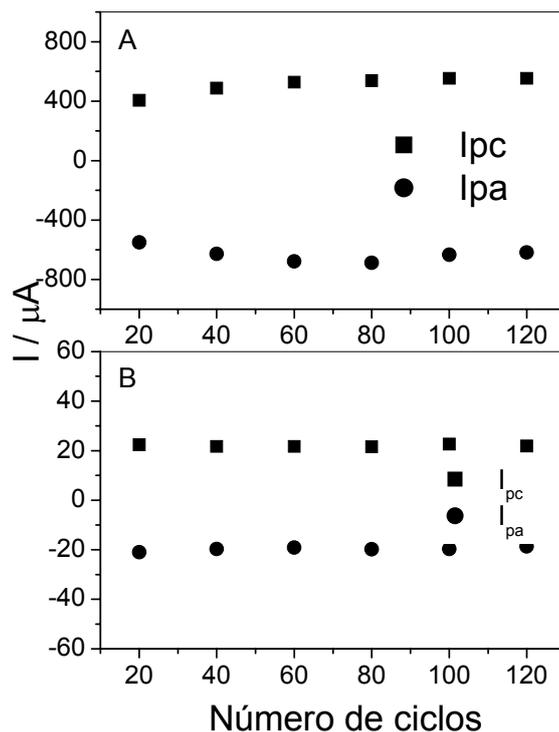


**Figura 25:** Voltamogramas cíclicos: (A) Acel/TiO<sub>2</sub> e (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld, em velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>, pH 7,0 e solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 26:** Voltamogramas cíclicos: (A) Acel/TiO<sub>2</sub> e (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AT, em velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>, pH 7,0 e solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

Estudamos a estabilidade dos eletrodos quando submetidos a vários ciclos redox em solução de eletrólito-suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,0 (Figura 27). Foi observado que mesmo após 120 ciclos de trabalho para os eletrodos Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT, as correntes de pico catódico permanecem praticamente constantes demonstrando que os corantes não lixiviam da superfície da matriz devido a sua larga afinidade. Em relação às correntes de pico catódico foi observado o mesmo comportamento.



**Figura 27:** Corrente de pico (A) Acel/TiO<sub>2</sub>/AT e (B) Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld em função do número de ciclos redox. Velocidade de varredura: 10 mV s<sup>-1</sup>, pH 7,0 e solução de KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, (■) corrente de pico catódica e (●) corrente de pico anódica.

#### 4.4. OTIMIZAÇÃO DOS SISTEMAS ELETROQUÍMICOS ATRAVÉS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^4$ COM DOIS PSEUDO PONTOS CENTRAIS

A otimização das condições voltamétricas com o intuito de determinar as melhores condições de reversibilidade em sistemas de eletrodos quimicamente modificados pode depender de vários fatores tais como a acidez do meio (pH), concentração do eletrólito suporte, velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ ), tipo de eletrodo quimicamente modificado e temperatura, etc. A otimização de todas essas variáveis usando um procedimento univariado na prática pode ser muito tediosa, pois existe a necessidade de se variar um fator de cada vez enquanto os outros fatores são fixados.

A desvantagem do processo univariado é que as melhores condições experimentais não podem não ser alcançadas, pois as interações envolvendo os fatores são negligenciadas. Uma outra desvantagem se refere ao número total de experimentos executados em que em um procedimento univariado este número é muito maior quando comparado com planejamentos estatísticos de experimentos.

Neste estudo, foi utilizado um planejamento fatorial completo  $2^4$  com dois pseudopontos centrais ( $n= 20$  experimentos) (Tabela IV) com o objetivo de determinar a importância de diferentes fatores experimentais na otimização das condições voltamétricas para a utilização de um sistema eletródico modificado quimicamente. Os fatores experimentais escolhidos para os procedimentos de otimização foram aqueles que afetam a reversibilidade de transferência de elétrons, tais como pH da solução, concentração de KCl ( $\text{mol L}^{-1}$ ), velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ ), e o tipo de corante orgânico imobilizado na matriz (Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT).

Dois respostas das propriedades dos sistemas foram investigadas: a separação dos potenciais de pico,  $\Delta E$ , [ $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ ], e a razão entre as correntes,  $I_{pa}/I_{pc}$  ( $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  são as intensidades de corrente de pico anódico e catódico respectivamente). Os parâmetros foram analisados usando o software estatístico MINITAB<sup>®</sup> Release 14.12.0, o qual calcula os principais efeitos e as interações entre os fatores, o desvio padrão entre coeficientes e a probabilidade de cada um dos termos.

**Tabela IV:** Otimização do sistema eletroquímico usando o planejamento fatorial  $2^4$  com dois pseudo pontos centrais (20 experimentos).

Experimentos	Fatores				$\Delta E$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$
	A	B	C	D		
1	-1	-1	-1	-1	444	0,955
2	1	-1	-1	-1	121	0,956
3	-1	1	-1	-1	215	0,987
4	1	1	-1	-1	223	0,956
5	-1	-1	1	-1	171	0,935
6	1	-1	1	-1	314	0,954
7	-1	1	1	-1	496	1,006
8	1	1	1	-1	359	0,987
9	-1	-1	-1	1	611	1,002
10	1	-1	-1	1	333	1,008
11	-1	1	-1	1	171	0,975
12	1	1	-1	1	193	0,975
13	-1	-1	1	1	703	0,965
14	1	-1	1	1	678	1,002
15	-1	1	1	1	460	0,965
16	1	1	1	1	496	1,001
17	0	0	0	-1	444	1,003
18	0	0	0	1	551	0,987
19	0	0	0	-1	352	1,003
20	0	0	0	1	528	0,972

Fatores	Níveis			
	-1	0	1	
A	pH	3,0	5,0	7,0
B	Concentração KCl ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,2	0,6	1,0
C	Velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ )	10,0	30,0	40,0
D	Tipo de eletrodo	Acel/TiO <sub>2</sub> /AMeld	Acel/TiO <sub>2</sub> /AT	

**Tabela V:** Planejamento Fatorial: Efeitos principais e interações sobre o  $\Delta E$ .

<b>Efeitos</b>			
<b>Termos</b>	<b><math>\Delta E</math></b>	<b>Coefficientes</b>	<b>P</b>
Constantes		374,25	0,000
Principais Efeitos			
A	-69,25	-34,62	0,041
B	-95,25	-47,63	0,018
C	170,75	85,37	0,003
D	158,50	79,25	0,003
Interações para dois fatores			
A*B	51,50	25,75	0,083
A*C	73,50	36,75	0,035
A*D	8,00	4,00	0,718
B*C	81,50	40,75	0,027
B*D	-156,00	-78,00	0,004
C*D	86,50	43,25	0,023
Interações de três fatores			
A*B*C	-106,25	-53,12	0,013
A*B*D	38,75	19,38	0,150
A*C*D	-6,75	-3,37	0,759
B*C*D	-42,75	-21,37	0,124
Interações de quarto fatores			
A*B*C*D	46,50	23,25	0,104
Ponto central		94,50	0,025
Fatores			
A	pH		
B	Concentração do eletrólito		
C	Velocidade de Varredura		
D	Tipo de eletrodo		

S = 40.2399  $R^2 = 99.17\%$

Através da análise da Tabela V para separação dos potenciais de pico,  $\Delta E$ , podemos verificar que os principais efeitos e interações significativas apresentam probabilidade de 5 % ( $p < 0,05$ ).

Todos os efeitos e as interações que apresentaram probabilidades inferiores a 0,05 foram significativas. Os principais efeitos e as interações significativas para  $p < 0,05$  foram: A, B, C, D, e as interações A\*C, B\*C, B\*D, C\*D, A\*B\*C. Onde A: pH; B: concentração do eletrólito KCl; C: velocidade de varredura ( $\text{mV s}^{-1}$ ) e D- tipo de eletrodo (Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT).

Todos os efeitos e interações que apresentaram probabilidade superior a 5 % não foram significativos. O modelo apresenta-se apropriado com um coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) de 99,17%. Nesse sentido, o  $\Delta E$  para o processo de transferência de elétrons usando os eletrodos quimicamente modificados pode ser expresso pela equação:

$$\text{Eq. 12} \quad \Delta E = 374,25 - 34,62*A - 47,63*B + 85,37*C + 79,25*D + 36,75*A*C + 40,75*B*C - 78,00*B*D + 43,25*C*D - 53,12*A*B*C$$

Os valores positivos obtidos para os efeitos indicam a ocorrência de um aumento na separação dos potenciais de picos anódico e catódico ( $\Delta E$ ) e, como resultado, temos um aumento na dificuldade do sistema eletródico em mediar elétrons. Por outro lado, valores negativos obtidos para os efeitos indicam uma diminuição da resposta ( $\Delta E$ ), sugerindo que as melhores condições de reversibilidade poderão ser atingidas.

**Tabela VI:** Planejamento Fatorial: Efeitos principais e interações sobre  $I_{pa}/I_{pc}$ .

<b>Termos</b>	<b>Efeitos <math>\Delta E</math></b>	<b>Coefficientes</b>	<b>P</b>
Constantes		0,97681	0,000
Principais Efeitos			
A	0,00612	0,00306	0,633
B	0,00937	0,00469	0,476
C	0,00013	0,00006	0,992
D	0,01100	0,00550	0,365
Interações entre dois fatores			
A*B	-0,00963	-0,00481	0,466
A*C	0,01212	0,00606	0,371
A*D	0,01363	0,00681	0,323
B*C	0,01637	0,00819	0,251
B*D	-0,02463	-0,01231	0,123
C*D	-0,00688	-0,00344	0,594
Interações entre três fatores			
A*B*C	-0,00012	-0,00006	0,992
A*B*D	0,00787	0,00394	0,544
A*C*D	0,00463	0,00231	0,716
B*C*D	-0,00162	-0,00081	0,897
Interações de quatro fatores			
A*B*C*D	0,00137	0,00069	0,913
Ponto central		0,01444	0,345
Fatores			
A		pH	
B		Concentração do eletrólito	
C		Velocidade de Varredura	
D		Tipo de eletrodo	

Para avaliar melhor cada fator e suas interações, na Figura 28 A, foi apresentada a curva de probabilidade normal dos efeitos. Esse gráfico é dividido em duas regiões, sendo que na região com porcentagem abaixo de 50% estão os fatores e as interações que apresentam coeficientes negativos (B\*D, A\*B\*C, B, A) e na região com porcentagem acima de 50% estão os fatores que apresentam coeficientes positivos (D, C, C\*D, B\*C, A\*C). Todos os fatores e interações representados por um quadrado são significativos e os pontos estão fora da linha central que cruza o ponto zero na abscissa em 50 %. Os efeitos posicionados próximos dessa linha representados por um círculo correspondem a uma estimativa de erros dos efeitos, não são significativos (B\*C\*D, A\*C\*D, A\*D, A\*B\*D, A\*B\*C\*D e A\*B).

Na Figura 27 B é apresentado o gráfico de Pareto para os efeitos padronizados para  $p = 0,05$ . Todos os efeitos padronizados estão em valores absolutos (Figura 28 A permite

verificar quais efeitos são positivos ou negativos). Todos os valores que apresentam valores absolutos maiores que 3,18 ( $p= 0,05$ ) e que estão localizados a direita da linha pontilhada são significativos. O valor padronizado absoluto do efeito de cada fator e sua interação aparece à direita da cada barra.

Analisando os gráficos de Figura 28 e os valores da Tabela V podemos observar que a velocidade de varredura foi a variável mais importante da otimização global do sistema. Pode-se constatar que, quando passamos da velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  para  $40 \text{ mV s}^{-1}$ , ocorreu um aumento no  $\Delta E$ , tornando o processo menos reversível. De acordo com a teoria da voltametria cíclica, em processos reversíveis, o potencial de pico,  $E_{pc}$ , é independente da velocidade de varredura<sup>49,50</sup>. No entanto, em um processo totalmente irreversível, há uma correlação linear entre o potencial de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que o processo de transferência de elétrons do mediador é lento, favorecendo a reversibilidade do sistema em baixas velocidades de varredura.

O segundo fator importante para a otimização global do sistema eletroquímico foi o tipo de eletrodo quimicamente modificado. O valor positivo obtido para o coeficiente significa que, quando o eletrodo modificado quimicamente foi mudado de Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld para Acel/TiO<sub>2</sub>/AT, a separação entre os picos anódicos e catódicos foi aumentada, isto é, o sistema se tornou menos reversível. Esses resultados indicam que o azul de meldola é um melhor mediador eletroquímico quando comparado com o azul de toluidina. Esse comportamento pode ser explicado observando-se a estrutura de cada um dos corantes. O corante azul de meldola possui dois nitrogênios nos anéis e mais um anel heterocíclico aromático enquanto que o corante azul de toluidina apresenta dois nitrogênios nos anéis e um heterocíclico aromático. O maior número de anéis na estrutura do azul de meldola melhora a transferência de elétrons nas reações eletroquímicas<sup>77</sup>. Além disso, observando a forma do voltamograma do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AT (Figura 26B) podemos notar que a curva anódica apresenta uma região linear pronunciada demonstrando que o processo de transferência de carga nessa região é controlado apenas pela cinética conforme a Lei de Ohm, e, conseqüentemente, o processo de transferência de carga se torna mais lento.

O terceiro fator importante foi a interação de dois fatores B\*D ([KCl]\*tipo de eletrodo) que foi mais significativa que o principal fator B ([KCl]). Somente a obtenção desse resultado justifica o uso do planejamento estatístico de experimentos sobre o processo convencional univariado da otimização de sistemas. Essa informação não poderia ser adquirida em uma otimização univariada de sistemas eletroquímicos. O resultado indica que,

com o aumento da concentração de KCl associado ao uso do eletrodo quimicamente modificado azul de meldola, verificamos uma diminuição significativa no  $\Delta E$ .

O quarto fator relevante foi a interação entre três fatores A\*B\*C (pH\*[KCl]\*velocidade de varredura) que apresenta maior significância do que o efeito da concentração do eletrólito KCl (quinto fator em ordem de importância). Isso pode enfatizar a importância da aplicação do planejamento fatorial para avaliar as melhores condições de reversibilidade dos sistemas eletroquímicos. Ainda que a otimização dos sistemas pudesse ser realizada em um modelo univariado, um pequeno aumento do pH da solução combinada com um pequeno aumento da concentração do eletrólito associados a um pequeno aumento na velocidade de varredura (variações provocadas por uma possível oscilação do potenciostato) poderiam conduzir a uma interpretação errônea dos resultados obtidos pelo método univariado. Provavelmente o analista teria de refazer todos os experimentos, pois não conseguiria perceber o efeito sinérgico causado por uma pequena variação dos três fatores combinados, levando a um aumento inexplicável no  $\Delta E$ . Esses resultados não podem ser explicados usando um procedimento univariável para a otimização dos sistemas eletródicos.

O quinto fator em ordem de importância para a otimização dos sistemas eletroquímicos foi a concentração do eletrólito KCl. Foi observado que um aumento na concentração do eletrólito-suporte conduz a um aumento na reversibilidade do sistema. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da força iônica que deve facilitar a transferência de carga, favorecendo um aumento na resposta de corrente e uma diminuição na separação entre os potenciais de pico<sup>54,78</sup>.

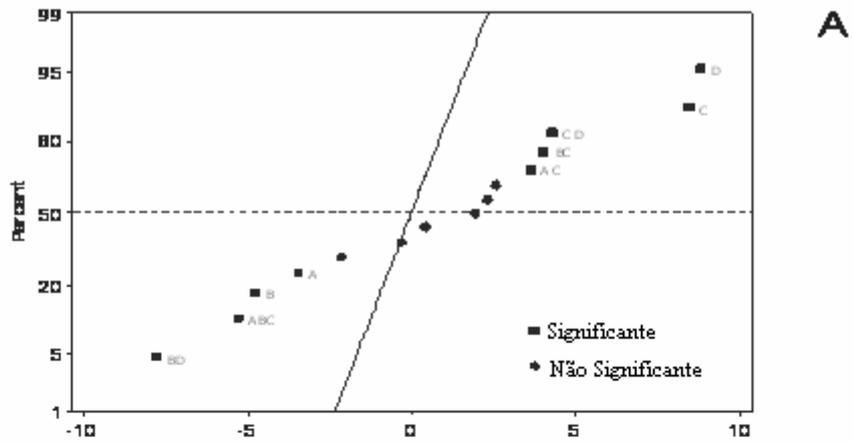
O sexto efeito importante foi a interação C\*D (velocidade de varredura\*tipo de eletrodo). Quando a velocidade de varredura foi modificada de níveis mais baixos (-) para níveis mais altos (+) e o eletrodo variado do azul de meldola para o eletrodo de azul de toluidina, o  $\Delta E$  aumentou. Esse comportamento sugere que, em velocidades de varredura mais baixas e utilizando o eletrodo quimicamente modificado azul de meldola, temos uma menor separação entre os picos anódico e catódico.

O sétimo fator a ser considerado foi a interação entre B\*C (concentração de KCl\*velocidade de varredura). Quando a concentração da solução de KCl foi aumentada, associada com o aumento da velocidade de varredura, observou-se um aumento na separação dos picos anódico e catódico. Como já foi discutido, somente com o aumento da concentração de KCl ocorre uma diminuição na separação dos picos. Entretanto, o aumento da velocidade de varredura leva a um aumento no  $\Delta E$ . Portanto, o efeito negativo desse último fator

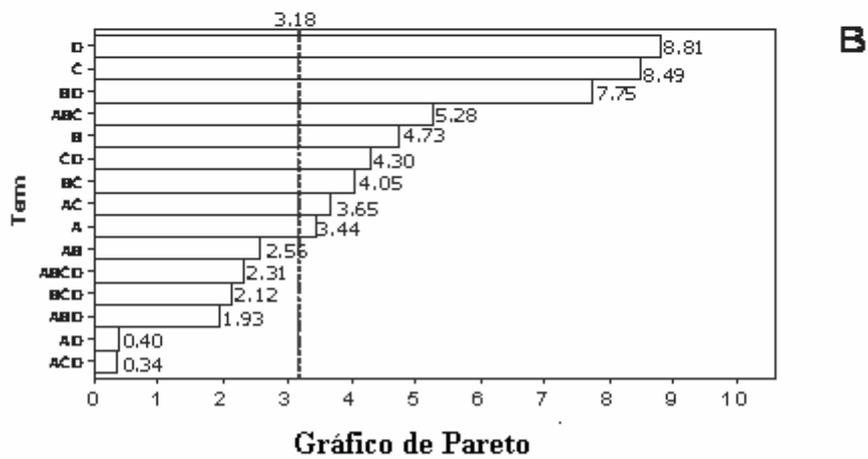
sobrepuja o efeito positivo para o sistema eletroquímico quando a concentração do eletrólito é aumentada, o que explica esse resultado.

O oitavo fator significativo foi a interação A\*C (pH\*velocidade de varredura), e o último fator importante foi o fator principal A (pH). Quando o pH foi aumentado a partir do nível mais baixo (-) para o nível mais alto (+), foi observada menor separação dos picos eletroquímicos. Esse comportamento pode ser atribuído aos processos de protonação e desprotonação dos grupos funcionais existentes na molécula dos corantes que não participam das ligações com a superfície da matriz híbrida, mas que estão envolvidos na transformação entre as formas oxidada e reduzida de ambos os corantes. O aumento do pH significa uma diminuição na concentração hidrogênionica, sendo assim, o processo de transferência de elétrons é mais eficiente, levando a uma diminuição na separação dos potenciais ( $\Delta E$ )<sup>76,79</sup>.

Para a resposta  $I_{pa}/I_{pc}$  (Tabela VI), não foi observado nenhum efeito significativo em relação à reversibilidade do sistema. Ambos os eletrodos quimicamente modificados Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld e Acel/TiO<sub>2</sub>/AT apresentaram uma razão de corrente  $I_{pa}/I_{pc}$  muito próxima da unidade, o que sugere que eles são apropriados para a utilização como mediadores eletroquímicos.



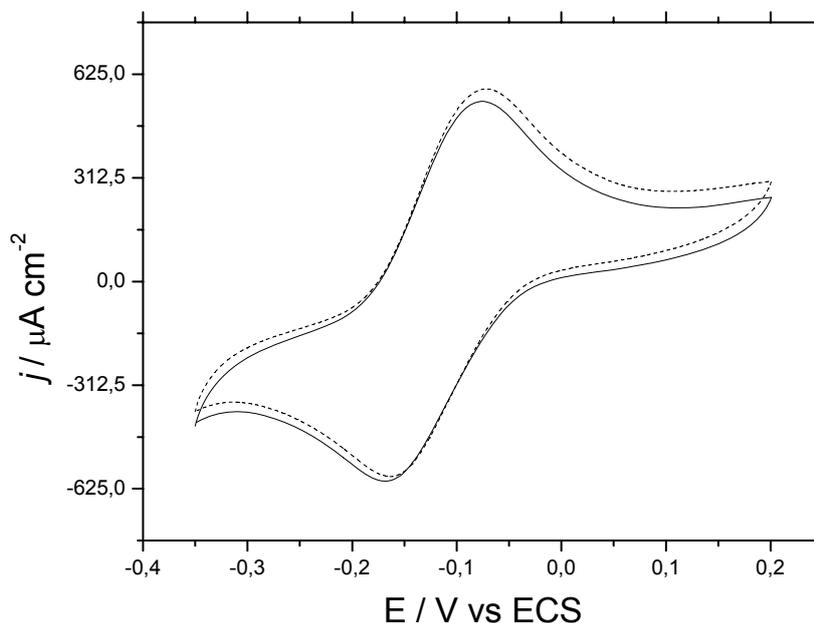
Curva de Probabilidade Normal dos Efeitos Padronizados



**Figura 28:** (A) Curva de probabilidade normal dos efeitos padronizados com  $p=0,05$ . A linha pontilhada em 50% divide os efeitos negativos dos efeitos positivos. (B) Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados com  $p=0,05$ .

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DE NADH

Após a determinação das melhores condições voltamétricas através do planejamento fatorial completo, a oxidação electrocatalítica do NADH sobre a superfície do eletrodo quimicamente Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld foi investigada através das técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria. A Figura 29, mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld na presença de uma concentração fixa de NADH, [NADH] = 7,69 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em solução de eletrólito suporte 1,0 mol L<sup>-1</sup> de KCl, velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> e em pH 7,0 na ausência de NADH. Comparando-se os voltamogramas obtidos na presença de NADH com o obtido na ausência de NADH podemos observar claramente um aumento na densidade de corrente de anódica e uma diminuição da corrente catódica de acordo com o mecanismo proposto para a oxidação electrocatalítica do NADH com o este mediador. A oxidação electrocatalítica do NADH ocorreu em torno de 0,07 V vs. ECS<sup>80</sup>.



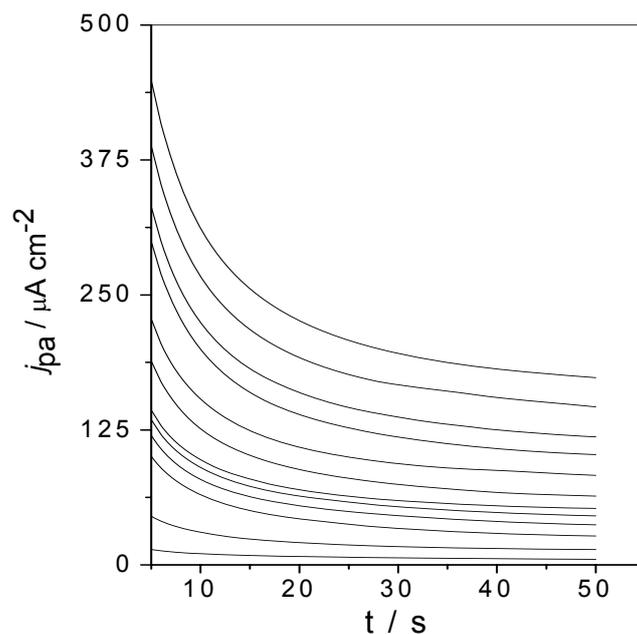
**Figura 29:** Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld na ausência e na presença de NADH para: (—)na ausência de NADH e (---) com [NADH] = 7,69 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. Solução de eletrólito suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,0 e velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>.

O aumento da intensidade de corrente anódica, após a adição do cofator, indica que o corante azul de meldola imobilizado na matriz eletrocatalisa a sua oxidação. Ocorre uma significativa diminuição do sobrepotencial de oxidação do NADH, de cerca de 380 mV *vs* ECS (a oxidação direta do NADH em eletrodos de grafite não modificados ocorre em torno de 400 mV *vs* ECS)<sup>16</sup>.

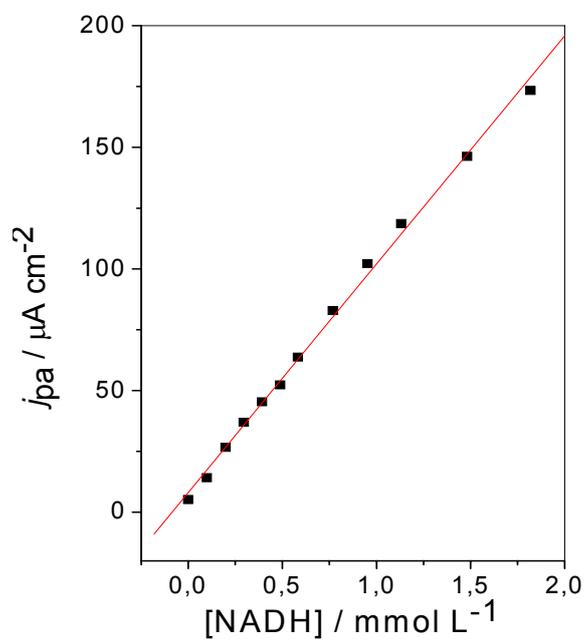
Esse potencial onde ocorre a oxidação do NADH propicia a utilização do eletrodo quimicamente modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld na determinação cronoamperométrica do cofator.

#### 4.5.1. APLICAÇÃO DE UM SENSOR PARA NADH

Para verificar o potencial do eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld como sensor para o cofator NADH foram realizados estudos cronoamperométricos. O potencial aplicado foi escolhido através da medição das intensidades de corrente anódica para uma concentração de NADH de  $7,69 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . O estudo mostrou que uma alta densidade de corrente anódica foi observada para valores de potenciais mais altos do que 0,01 V e, portanto, o potencial escolhido para as medições cronoamperométricas foi de 0,02 V *vs* ECS. A Figura 30 mostra os cronoamperogramas para o eletrodo modificado em uma faixa de concentração de NADH entre  $2,09 \times 10^{-6}$  e  $1,82 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , fixando-se o potencial em 0,02 V *vs* ECS. A Figura 31 mostra a relação entre a densidade de corrente anódica e a concentração do cofator apresentando uma curva ajustada pela equação  $j_{pa}/\mu\text{A cm}^{-2} = 1,29 (\pm 0,24) + 15023,56 [\text{NADH}]/\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r = 0,998$  para  $n = 12$ ), onde  $j_{pa}$  é a densidade de corrente anódica ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ ) e  $[\text{NADH}]$  é a concentração de NADH ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). O limite de detecção encontrado (considerando a relação sinal / ruído = 3) foi de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , demonstrando a boa sensibilidade do eletrodo na dosagem de NADH.



**Figura 30:** Cronoamperogramas para o eletrodo modificado ACel/TiO<sub>2</sub>/AMeld em várias concentrações de NADH. Solução de eletrólito suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e  $E_{ap} = 0,02$  V vs ECS.



**Figura 31:** Relação entre a densidade de corrente anódica vs concentração NADH para o eletrodo ACel/TiO<sub>2</sub>/AMeld.

Na Tabela VII, podemos comparar o resultado obtido com o eletrodo Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld com outros sensores amperométricos de pasta de carbono para a determinação do cofator NADH. Podemos observar que o eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld apresenta um bom resultado com baixo limite de detecção e alta sensibilidade, mostrando o potencial de sua utilização como sensor amperométrico para NADH.

**Tabela VII:** Comparação dos resultados do eletrodo modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld com outros sensores amperométricos preparados com diferentes suportes sólidos para a determinação de NADH.

Eletrodo	Suporte Sólido	Faixa Linear (mmol L <sup>-1</sup> )	Limite de Detecção (μmol L <sup>-1</sup> )	Sensibilidade (mA cm <sup>-2</sup> /mol L <sup>-1</sup> )	Referência
Acel/TiO <sub>2</sub> /AMeld	Acetate de celulose	0,01-1,82	0,1	15	este trabalho
CPE/SNPDA	Silica gel	0,04-0,8	7,1	24,2	81
SiO <sub>2</sub> /ZrO <sub>2</sub> /Sb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /MB	Sol-gel		36		82
ZPMB	Fosfato	0,1-2,0	10		32
ZPNB	Fosfato	0,1-2,0	5		32
SiSbMeB	Sol-gel	0,1-0,6	7	4,6	83
SiSbMB	Sol-gel	0,1-0,6	25	1,8	83
SiSbMTB	Sol-gel	0,4-1	42	0,5	83
CPE/SNNB	Silica gel	0,01-0,52		18	84
C:ZrP:NB	Fosfato			19,2-60,8	85
C:ZrP:MV	Fosfato			18,4-50,9	85

## 4.6. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a aplicação de um método estatístico pode proporcionar um modo eficiente de extrair informações relevantes de um planejamento experimental envolvendo os corantes azul de meldola (AMeld) e azul de toluidina (AT) adsorvidos na superfície de acetato de celulose modificada para otimização das características de reversibilidade do mediador adsorvido. O planejamento fatorial completo utilizado permitiu a investigação simultânea de quatro fatores selecionados realizando somente vinte experimentos. O planejamento fatorial multivariado utilizado neste estudo foi mais econômico do que se fosse utilizada metodologia univariada. As melhores condições de reversibilidade eletroquímica do sistema estudado foram: o eletrodo quimicamente modificado Acel/TiO<sub>2</sub>/AMeld, pH 7,0, [KCl] = 1,0 mol L<sup>-1</sup> e velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>. Essas melhores condições obtidas foram aplicadas na determinação do cofator NADH. Os resultados obtidos para esse sistema eletródico indicaram propriedades eletrocatalíticas bastante satisfatórias e boa sensibilidade para o NADH.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dempsey, E.; Wang, J.; Wollenberger, V.; Ozsoz, M.; Smith, M.R.; *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 715, 323.
2. Walcarius, A.; *Electroanalysis.* **1998**, 10, 1217.
3. Walcarius, A.; *Anal. Chim. Acta.* **1999**, 384, 1.
4. Ullmann's "Encyclopedia of Industrial Chemistry"; VCH: Germany., 1986.
5. Samios, E.; Dart, R. K.; Dawkins, J. V.; *Polymer* **1997**, 38, 3045.
6. Gushikem, Y.; Toledo, E. A.; "Preparation of oxide-coated cellulose fibers, in *Polymer Interfaces and Emulsions*"; K. Esumi, Marcel Dekker, New York, 1999.
7. Lazarin, A.M.; Gushikem, Y.; Braz, J.; *Chem. Soc.* **2002**, 13, 88.
8. Murtinho, D.; Lagoa, A.R.; Garcia, F. A. P.; Gil, M. H.; *Cellulose.* **1998**, 5, 299.
9. Kurokawa, Y.; Ueno, K.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, 27, 621.
10. Kurokawa, Y.; *J. Membr. Sci.* **1996**, 114, 1.
11. Gushikem, Y.; Campos, E. A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 273.
12. Lazarin, A. M.; Borgo, C. A.; Gushikem, Y.; *J. Membr. Sci.* **2003**, 221, 175.
13. Barros, V. P.; "Caracterização eletroquímica de metaloporfirinas e imobilização em filmes de pirrol eletropolimerizados: preparação e aplicação"; Tese de Mestrado, Departamento de Química, USP, 2003.
14. Carmo, D. R.; Silva, R. M.; Stradiotto; N. R.; *Portugaliae Electrochimica Acta* **2004**, 22, 71.
15. Ferreira, K. S. M; "Estudos Voltamétricos de eletrodos quimicamente modificados à base de pasta de carbono e sílica gel funcionalizada para a determinação de cobre e prata"; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1998.
16. Pessoa, C. A.; "Estudo Eletroquímico de corantes orgânicos com propriedades redox imobilizados sobre o fosfato de zircônio"; Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1997.
17. Santana, A. S.; "Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Álcool, empregando mediadores de elétrons imobilizados sobre  $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ "; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 2003.
18. Perez, E. F., "Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para oxalato"; Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 2000.

19. Pessoa, C. A.; “Óxido de nióbio enxertado sobre a superfície da sílica gel: Preparação e utilização na construção de eletrodos modificados”; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 2001.
20. Dias, S.L. P.; “Utilização do material híbrido orgânico-inorgânico celulose óxido de titânio para a imobilização de alguns catalisadores”; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 2003.
21. Silva, L. R. D.; Rodrigues, U. P. F.; Peixoto, C. R. M.; Gushikem, Y.; *Quim. Nova* **1995**, 18, 337.
22. Borgo, C. A.; “Preparação, Caracterização e Aplicação do Material Celulose-Óxido de Zircônio”; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 2003.
23. Kurokawa, Y.; Ohmori, Y.; *J. Biotechnol.* **1994**, 33, 205.
24. Silva, L. R. D.; Peixoto, C. R. M.; Gushikem, Y.; *Sep. Sci. Technol.* **1996**, 31, 1045.
25. Silva, L. R. D.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Colloid Surf. B Biointerfaces.* **1996**, 6, 309.
26. Rodrigues, U. P. F.; Gushikem, Y.; Fujiwara, F. Y.; Castro, S. C.; Torriani, I. C. L.; Cavalcanti, L. P.; *Langmuir.* **1994**, 10, 4357.
27. Dias, S. L. P.; Gushikem, Y.; Ribeiro, E. S.; Benvenutti, E. V.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 523, 64.
28. Campos, E. A.; Gushikem, Y.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, 9, 273.
29. Rodrigues, U. P. F.; Gushikem, Y.; Gonçalves, M. D.; Cachichi, R. C.; Castro, S. C.; *Chem. Mater.* **1996**, 8, 1375.
30. Song, S.; Clark, R. A.; Bowden, E. F.; Tailov, M. J.; *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6564.
31. Audrieux, C. P.; Audebert, P.; Divisa-Blohorn, B.; Linquette-Marllet, S.; *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 353, 289.
32. Pessoa, C. A.; Y. Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; Gorton, Lo; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 431, 23.
33. Ye, J. N.; Baldwin, R. P.; *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2263.
34. Ferreira, C. U. “Propriedades de troca iônica da Sílica/Titânio/Fosfato e da Sílica/Titânio/Antimonato e eletroquímicas do Azul de Meldola e Azul de Metileno imobilizados sobre estas matrizes”; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 2000.
35. Arvand, M.; Sohrabnezhad, S.; Mousavi, M. F.; Shamsipur, M.; M.A. Zanjanchi, M. A.; *Anal. Chim. Acta.* **2003**, 491, 193.
36. Munteanu, F-D.; Okamoto, Y.; Gorton, L.; *Anal. Chim. Acta.* **2003**, 476, 43.

37. Gushikem, Y.; Andreotti, E. I. S.; Kubota, L. T.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1992**, 3, 21.
38. Zaldivar, G. A. P.; Gushikem, Y.; *J. Electrochem. Chem.* **1992**, 337, 165.
39. Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 362, 219.
40. Raoof, J. B.; Ojani, R.; Kiani, A.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 515, 45.
41. Arya, S. P.; Mahajan, M.; Jaim, P.; *Anal. Sci.* **1998**, 14, 889.
42. Augustm, J.; Beck, C., Marousck, G. I.; *J. Food Sci.* **1981**, 46, 312.
43. Faudey, N. K.; *Anal. Chem.* **1982**, 34, 793.
44. Kim, J. M.; Huang, Y.; Shimid, R. D.; *Anal. Lett.* **1990**, 23, 2275.
45. Ferena, A. V.; Filho-Fatibello, O.; *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 366, 55.
46. Bur-Nguyen, N. H.; *Chromatogr.* **1980**, 196, 163.
47. Thomsen, K. N.; Baldwin, R. P.; *Electroanalysis* **1990**, 2, 263.
48. Zaldivar, G. A. P.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *J. Electrochem. Chem.* **1991**, 318, 247.
49. Brett, A. M. O., Brett, C. M. A.. “*Electroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*”. Almeida, Coimbra, 1996.
50. Greef, R.; Peat R.; Peter, L. M.; Pletcher, D.; Robinson, J.; “*Instrumental Methods in Electrochemistry*”; Ellis Horwood Limited, New York, 1985.
51. Fujiwara, S. T.; “*Filme Fino do Polieletrólito Cloreto de 3-n-Propiolorpiridínico Silsesquioxano Sobre SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Preparação, Caracterização e Aplicações*”. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Unicamp, 2002.
52. Liu, G.; Wie, B. J. V.; Leatzow, D.; Weyrauch, B.; Tiffany, T.; *Anal. Chim. Acta.* **2000**, 408, 21.
53. Pereira, E. R. F.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z.; *Quím. Nova* **2002**, 25, 246.
54. Ensofi, A. A.; Khayamian, T.; Hemmateenejad, B.; *Anal Lett.* **1999**, 32, 111.
55. Rocha, R. F.; Rosatto, S. S. Bruns, R. E.; Kubota, L. T.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 433, 73.
56. Hows, M. E. P.; Perrett, D.; Kay, J.; *Chromat. A.* **1997**, 768, 97.
57. Nagata, N.; Peratta, P. G. Z.; Kubota, L. T.; *Anal. Sci.* **1999**, 15, 761.
58. Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; “*Statistics for Experimenters—An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*”, John Wiley & Sons, New York, 1978.
59. Barros, B. N.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; “*Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*”. Ed. Unicamp, Campinas, 1995.
60. Campos, E. A.; Gushikem, Y.; *J. Coll. Interf. Sci.* **1997**, 193, 121.

61. Silva, C. R.; Simoni, J. A.; Colins, C. H.; Volpe, P. L. O.; *J. Chem. Educ.* **1999**, 76, 1421.
62. Liu, H.; Zhang, Z.; Fan, Y.; Dai, M.; Zhang, X.; Wei, J.; Qiu, Z.; Li, H.; Wu, X.; Deng, J.; Qi, D.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, 357, 297.
63. Mao, L.; Yamamoto, K.; *Talanta* **2000**, 51, 187.
64. Sprules, S. D.; Hartley, I. C.; Wedge, R.; Hart, J. P.; Pittson, R.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 329, 215.
65. Sprules, S. D.; Hart, J. P.; Wring, S. A.; Pittson, R.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, 304, 17.
66. Sprules, S. D.; Hart, J. P.; Pittson, R.; Wring, S. A.; *Electroanalysis* **1996**, 8, 539.
67. Molina, C. R.; Boujtita, M.; El Murr, N.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 401, 155.
68. Abass, A. K.; Hart, J. P.; Cowell, D. C.; Chapell, A.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 373, 1.
69. Sandström, K. J. M.; Newman, J.; Sunesson, A.-L.; Levin, J.-O.; Turner, A.P.F.; *Sens. Actuators B* **2000**, 70, 182.
70. Wedge, R.; Pemberton, R. M.; Hart, J. P.; Luxton, R.; *Analysis* **1999**, 27, 570.
71. Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 484, 55.
72. Perez, E. F.; Neto, G. D.; Kubota, L. T.; *Sensors and Actuators B-Chem.* **2001**, 72, 80.
73. Clark, W.; “*Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems*”, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1960.
74. Heineman, W.; Meckstroth, M.; Norris, B.; Su, C.; *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1979**, 8, 571.
75. Silva, L. R. D.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* **1996**, 6, 309.
76. Gorton, L.; Torstensson, A.; Jaegfeldt, H.; Johansson, G.; *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 161, 103.
77. Simonet, J.; “*Organic Electrochemistry*”. Marcel Dekker Inc., New York, 1983.
78. Dias, S. L. P.; Fujiwara, S. T.; Gushikem, Y.; Bruns, R. E.; *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 531, 141.
79. Huck, H.; *Fres. J. Anal. Chem.* **1982**, 313, 548.
80. Persson, B.; Gorton, L.; *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 292, 115.
81. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *Electrochim. Acta.* **2003**, 48, 3541.
82. Zaitseva, G.; Gushikem, Y.; Ribeiro, E. S.; Rosatto, S. S.; *Electrochim. Acta.* **2002**, 47, 1469.

83. Ribeiro, E. S.; Rosatto, S. S.; Gushikem, Y.; Kubota, L. T.; *J. Sol. State Electrochem.* **2003**, 7, 665.
84. Santos, A. S.; Gorton, L.; Kubota, L. T.; *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 3351.
85. Malinauskas, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; *J. Coll. Interf. Sci.* **2000**, 224, 325.