



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RITA MARIA DE SOUSA CARVALHO

**UM NOVO E SELETIVO SENSOR À BASE DE CuTSPc E ÓXIDO DE GRAFENO
REDUZIDO PARA A DETERMINAÇÃO INDIVIDUAL E SIMULTÂNEA DOS
ANTIOXIDANTES BHA E TBHQ EM AMOSTRAS DE BIODIESEL**

São Luís
2016

RITA MARIA DE SOUSA CARVALHO

Um novo e seletivo sensor à base de CuTSPc e óxido de grafeno reduzido para a determinação individual e simultânea dos antioxidantes BHA e TBHQ em amostras de biodiesel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Silva Luz

São Luís

2016

RITA MARIA DE SOUSA CARVALHO

Um novo e seletivo sensor à base de CuTSPc e óxido de grafeno reduzido para a determinação individual esimultânea dos antioxidantes BHA e TBHQ em amostras de biodiesel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Dra. Rita de Cássia Silva Luz

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edmar Pereira Marques

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Membro Titular

Prof. Dr. Jomar Sales Vasconcelos

Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA

Membro Titular

Profa. Dra. Rita de Cássia Silva Luz

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Presidente

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Carvalho, Rita Maria de Sousa.

Um novo e seletivo sensor à base de CuTSPc e óxido de grafeno reduzido para a determinação individual e simultânea dos antioxidantes BHA e TBHQ em amostras de biodiesel / Rita Maria de Sousa Carvalho. - 2016.

89 f.

Orientador(a): Rita de Cássia Silva Luz.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, SAO LUIS, 2016.

1. Antioxidantes. 2. Biodiesel. 3. CuTSPc. 4. Óxido de grafeno. I. Luz, Rita de Cássia Silva. II. Título.

Em especial...

A minha mãe, Maria de Sousa Carvalho, por seu exemplo de determinação e simplicidade.

Em memória do meu pai, José Guido de Carvalho, que deixou saudades e exemplo de dignidade e disciplina.

A vocês dedico mais uma conquista das muitas que serão alcançadas, com imensa gratidão e satisfação ao amor dedicado a mim.

“O temor do Senhor é o princípio da ciência; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução. Filho meu, ouve a instrução de teu pai, e não deixes a doutrina de tua mãe”.

Provérbios 1: 7-8

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu amado Deus por ser responsável pelo pulsar da minha vida e que me possibilitou viver grandes experiências em vários aspectos neste trabalho.

Ao meu pai, que mesmo ausente em vida terrena, inspirou-me com sua forte lembrança de determinação e coragem e à minha mãe por não medir esforços em meu auxílio, bem como sua compreensão nos momentos de tensão no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas irmãs, Lana, Nesita e Sandra, por acreditarem no meu potencial, além dos incentivos prestados, meus agradecimentos.

Aos meus sobrinhos, Lara e Dante pelos momentos de carinho e descontração e Paulo Victor, por ter me dado todo suporte para que minha pesquisa científica fosse efetivada.

Agradeço à Profa. Dra. Rita de Cássia Silva Luz pela orientação prestada para a conclusão deste trabalho, por ter me acolhido em sua família científica (Laboratório Interfaces), ao apoio imensurável à minha formação e por ser exemplo de dedicação ao seu ofício.

Ao Prof. Dr. Flávio Santos Damos, que em todas as oportunidades me enriqueceu com seus conhecimentos e entusiasmo científico.

Agradeço aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG que de qualquer forma contribuíram para o meu crescimento intelectual e profissional, em especial ao professor Fernando Silva Carvalho pelas amostras de biodiesel concedidas.

Aos colegas de vida acadêmica, Rita de Cássia, Kayni, Rolff, Eduardo, Paulo e Diego pelos momentos memoráveis e alegres nesse período.

Aos demais companheiros do laboratório que posteriormente convivi, Sakae (pelos vários conhecimentos compartilhados), Carol, Julianna, Cleidivan, Taís, Raíssa, Bia, Camila, Antônio, Claudiana, Fernanda, Adriana, Leo, Thatyara e Thiago, meus sinceros agradecimentos.

Aos técnicos do Dequi, meus companheiros, Geysel, Paulo, Edla, Rivelino e Anderson e também a colaboradora Bevilene por total apoio de todos nessa jornada do mestrado.

À Maria de Lourdes, técnica do Dequi, pois desde o processo seletivo foi total incentivadora para meu crescimento intelectual.

Com especial carinho, Selma, Jasiene, Jádiane, Luciana, Glauciane, ao casal Geane e Campelo, Leide, Sandrinha, Grayce, Marléia, Keiliane, Alê que contribuíram com amizade, orações e amor e muita compreensão nos instantes difíceis e nos momentos de alegria, que norteou toda pesquisa científica.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Um novo e seletivo sensor eletroquímico para a determinação dos antioxidantes butilato de hidroxianisol (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) empregando a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foi desenvolvido. Neste sentido, um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTSPc) adsorvida sobre óxido de grafeno reduzido (OGr) mostrou uma excelente resposta para as oxidações de TBHQ e BHA com uma diminuição nos sobrepotenciais cerca de 130 mV vs Ag/AgCl e correntes de pico anódicas cerca de 4 vezes maiores do que as respostas observadas em um eletrodo não modificado. O aumento nas velocidades das reações de oxidação de TBHQ e BHA foi atribuído à eficiente transferência de elétrons entre as espécies estudadas e os materiais imobilizados na superfície do ECV. Os materiais OGr, CuTSPc e OGr/CuTSPc foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a resposta analítica do sensor para os analitos foi estudada pelas técnicas voltametria cíclica (VC) e voltametria de varredura linear (VVL). Após a otimização dos parâmetros experimentais e operacionais, as curvas analíticas para a determinação individual e simultânea de BHA e TBHQ, pela técnica VPD, demonstraram uma excelente resposta linear de 0,1 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de 0,045 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para TBHQ e 0,036 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para BHA. Finalmente, o sensor proposto foi utilizado com sucesso para a determinação TBHQ e BHA em seis amostras de biodiesel e os resultados foram similares aos obtidos pelo método HPLC com um nível de concordância de 95 %. Os estudos de adição e recuperação mostraram que o método proposto apresenta boa exatidão com valores de recuperação entre 99,5 e 100,5% para TBHQ e 99,1 e 100,2 para BHA.

Palavras-chave: *antioxidantes, óxido de grafeno reduzido, CuTSPc, biodiesel.*

ABSTRACT

A novel and selective electrochemical sensor for the determination of the butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ) antioxidants employing the differential pulse voltammetry (DPV) was developed. In this sense, a glassy carbon electrode (GCE) modified with a copper tetrasulfonated phthalocyanine (CuTSPc) adsorbed on reduced graphene oxide (rGO) showed excellent response for the TBHQ and BHA oxidation with a decrease in the overpotentials about 130mV vs Ag/AgCl and anodic peak currents about 4 times higher than the observed responses at an electrode unmodified. The increase of the oxidation reaction rates for TBHQ and BHA was attributed to the efficient electron transfer between the studied species and the immobilized materials on surface of the GCE. The materials rGO, CuTSPc and rGO/CuTSPc were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the analytical response of the sensor for the analytes was studied by cyclic voltammetry (CV) and linear scan voltammetry (LSV) techniques. After optimization of the experimental parameters, the analytical curves for determination of BHA and TBHQ by DPV technique demonstrated an excellent linear response from 0.1 to 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with detection limit of 0.045 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for TBHQ and 0.036 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for BHA. Finally, the proposed method was successfully applied in the simultaneous determination of BHA and TBHQ in six biodiesel samples, and the results obtained were found to be similar to those obtained using the HPLC method with agreement at 95 % confidence level. The addition and recovery studies have shown that the proposed method has good accuracy with recovery values between 99.5 and 100.5 % for TBHQ and 99.1 and 100.2 for BHA.

Keywords: *Antioxidants, biodiesel, reduced graphene oxide, CuTSPc*

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHA - Butilado de hidroxianisol
- TBHQ - Terc-butil-hidroquinona
- CuTSPc - Ftalocianina tetrassulfonada de cobre (II)
- OGr - Óxido de grafeno reduzido
- ECV - Eletrodo de carbono vítreo
- FTIR - Espectroscopia noInfravermelho com Transformada de Fourier (*do inglês Fourier-transform infrared*).
- VC - Voltametria cíclica
- DPV - Voltametria de pulso diferencial
- EQM's - Eletrodos quimicamente modificados
- PG - Propil galato
- BHT - Hidroxitolueno butilado
- Pt - Platina
- CVD - Deposição química de vapor
- Pc - Ftalocianina
- B-R - Britton-Robinson
- LOD - Limite de detecção (do inglês "*limit of detection*")
- LOQ - Limite de quantificação (do inglês "*limit of quantification*")
- DPR - Desvio padrão relativo
- GC/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês "*Gas chromatography–mass spectrometry*")
- HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês "*High-performance liquid chromatography*")
- EA - Eletrodo auxiliar
- ET - Eletrodo de trabalho
- v - Velocidade de varredura
- E_{pa} - Potencial de pico anódico
- I_{pa} - Corrente de pico anódico
- Ag/AgCl - Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata
- ECV/OGr/CuTSPc-Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e ftalocianina tetrassulfonada de cobre II

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do processo de oxidação dos triglicerídeos	23
Figura 2 - Estruturas dos antioxidantes TBHQ e BHA.....	24
Figura 3 - Da esquerda para direita: as estruturas de fulereno, do nanotubo de carbono e do grafite, todos construídos a partir da mesma matriz bidimensional-grafeno	29
Figura 4 - Estrutura da ftalocianina de base livre.	31
Figura 5 - Estrutura da metaloftalocianina tetrassulfonada de cobre.....	32
Figura 6 - Autolab® modelo PGSTAT 128 N da <i>Echo Chemie</i> (Utrecht, The Netherlands) acoplado a um microcomputador com o <i>software</i> GPES 4.9. Respostas eletroquímicas de E°/ip	40
Figura 7 - Eletrodos utilizados nas análises eletroquímicas. ER= Eletrodo de Referência; ET = Eletrodo de trabalho e EA = Eletrodo Auxiliar.	41
Figura 8 - Espectros de FTIR do compósito OGr/CuTSPc (c, linha azul), o complexo CuTSPc (b, linha preta) e o OGr (a, linha vermelha).....	48
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ sobre: (1) o eletrodo não modificado; (2) eletrodo modificado apenas com o complexo CuTSPc; (3) o eletrodo modificado apenas com o OGr e (4) o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc. Figura inserida: VC referente ao eletrodo modificado com OGr/CuTSPc na ausência do analito. Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução tampão B-R (pH 4.0), $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	51
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ BHA sobre: o eletrodo não modificado (1), o eletrodo modificado apenas com CuTSPc (2), o eletrodo modificado com o OGr (3) e o eletrodo modificado com OGr/CuTSPc (4). Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão B-R (pH 4), $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	52
Figura 11 - Voltamogramas de varredura linear da mistura TBHQ e BHA empregando o eletrodo não modificado (curva 1) e o eletrodo modificado com OGr/CuTSPc (curva	

2). Experimentos conduzidos em 0,04 mol L⁻¹ de solução tampão B-R, pH 4. [BHA]= 100 μmol L⁻¹; [TBHQ]= 100 μmol L⁻¹; $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$54

Figura 12 - Gráfico de corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura (A) e Gráfico do logaritmo da corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura (B). Experimentos conduzidos em 0,04 mol L⁻¹ de tampão B-R, pH 4. [TBHQ]=[BHA]=1.8 mmol L⁻¹. $\nu = 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09$ e $0,1 \text{ V s}^{-1}$56

Figura 13- Influência do pH sobre: (A) a corrente de pico anódica e (B) potencial de pico anódico do TBHQ e BHA. Experimentos conduzidos em 0,04 mol L⁻¹ de solução tampão B-R, pH 4 em 100 μmol L⁻¹ TBHQ e 100 μmol L⁻¹ BHA. $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$58

Figura 14 - Mecanismos de oxidação propostos para os antioxidantes TBHQ e BHA sobre o sensor à base de OGr/CuTSPc.....59

Figura 15 - Influência de diferentes soluções tampão de concentração 0,04 mol L⁻¹ (pH 4) sobre as correntes de pico anódicas (I_{pa}) referentes à oxidação de BHA e TBHQ. $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. [TBHQ]=100 μmol L⁻¹ e [BHA]=100 μmol L⁻¹. $\nu=0,05 \text{ V s}^{-1}$60

Figura 16 -Gráfico da corrente de pico anódica para o BHA e TBHQ em função de diferentes concentrações de solução tampão B-R. [TBHQ]=100 μmol L⁻¹ e [BHA]=100 μmol L⁻¹. $\nu=0,05 \text{ V s}^{-1}$61

Figura 17 - (A) e (B) VPD referentes à oxidação de TBHQ e BHA sobre o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc em 0,04 mol L⁻¹ de solução tampão B-R (pH 4) nas seguintes concentrações: 0,1; 14,0; 30,0; 55,0; 85,0; 150,0; 300,0 e 500,0 μmol L⁻¹ ou 0,017 – 83,10 mg L⁻¹ de TBHQ (a-h, respectivamente) e 0,1; 2,5; 46,0; 88,0; 154,0; 213,0; 344,0 e 500,0 μmol L⁻¹ ou 0,018 – 90,12 mg L⁻¹ para o BHA (a-h, respectivamente). Inserções das Figuras 17A e 17B: Curvas analíticas para o TBHQ. $\nu=0,1 \text{ V s}^{-1}$ e Amplitude de pulso=0,06 V.....63

Figura 18 - VPD referentes à oxidação da mistura TBHQ e BHA. Inserção: Curvas analíticas para a oxidação do TBHQ e BHA nas seguintes concentrações: 0,1, 2,5, 5,0, 15,0, 35,0, 60,0, 100,0, 190,0, 360,0, e 500,0 μmol L⁻¹, para ambos os analitos (a-j, respectivamente), ou 0,017 – 83,10 mg L⁻¹ para TBHQ e 0,018 – 90,12 mg L⁻¹ BHA. Experimentos conduzidos em 0,04 mol L⁻¹ de solução tampão B-R, pH 4. $\nu=0,1 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de pulso=0,06 V.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de modificação de superfície de eletrodo.....	26
Tabela 2 -Concentrações de TBHQ e BHA nas amostras fortificadas.....	44
Tabela 3 - Comparação de algumas características de vários eletrodos modificados para a determinação de TBHQ e BHA	65
Tabela 4 - Valores de recuperação obtidos para o TBHQ e BHA para seis amostras de biodiesel (n = 3).....	67
Tabela 5 - Comparação entre o método proposto e o método comparativo.	67
Tabela 6 -Avaliação da repetibilidade de medidas obtidas com o ECV/OGr/CuTSPc para os antioxidantes TBHQ e BHA.	68
Tabela 7 - Avaliação da repetibilidade do preparo de ECV/OGr/CuTSPc em diferentes dias para os antioxidantes TBHQ e BHA.	69
Tabela 8 - Influência de substâncias que podem coexistir na determinação de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BHA e TBHQ (n = 4).	70
Tabela 9 - Figuras de mérito determinadas na validação do método analítico proposto.	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	REVISAO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	O biodiesel e os antioxidantes sintéticos	22
3.2	Eletrodos quimicamente modificados (EQM's).....	25
3.3	Desenvolvimento de sensores para a determinação de TBHQ e BHA ..	26
3.4	Grafeno.....	29
3.5	Ftalocianinas (Pc).....	31
3.6	Importantes parâmetros analíticos utilizados para validação de métodos	32
4	PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1	Reagentes e soluções	39
4.2	Instrumentação.....	40
4.3	Síntese de óxido de grafite (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGr)	41
4.4	Caracterização do compósito OGr/CuTSPc por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.5	Preparação do eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc	42
4.6	Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais para a determinação dos antioxidantes empregando o sensor eletroquímico	43
4.7	Preparo e análise das amostras de biodiesel	43
4.8	Caracterização analítica do sensor.....	44
4.9	Avaliação da repetibilidade e estabilidade do sensor.....	45
4.10	Estudo de interferentes.....	45

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Caracterização do compósito OGr/CuTSPc por Espectroscopia noInfravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	47
5.2	Comportamento voltamétrico dos antioxidantes TBHQ e BHA.....	48
5.3	Otimização de parâmetros experimentais para determinação de TBHQ e BHA.....	57
5.4	Determinações individual e simultânea de BHA e TBHQ empregando a voltametria de pulso diferencial (VPD): Caracterização analítica do sensor à base de OGr/CuTSPc.....	61
5.5	Aplicação do sensor em amostras de biodiesel.....	65
5.6	Repetibilidade das medidas, no preparo do sensor e estudo da estabilidade.....	68
5.7	Estudo de interferentes.....	69
5.8	Avaliação das figuras de mérito e considerações finais sobre o ECV/OGr/CuTSPc.....	71
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS	91

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque nas últimas décadas. A substituição dos combustíveis fósseis tem sido motivada por fatores ambientais, econômicos e sociais, uma vez que toda a sociedade depende de seu uso. Nesse contexto, uma alternativa que se tem destacado é o uso de biocombustíveis, tais como carvão vegetal, álcool, biogás e o biodiesel (DEMIRBAS, 2008; GUO et al., 2015).

O biodiesel, por exemplo, é um combustível renovável, pois é produzido a partir de fontes vegetais (soja, mamona, dendê, girassol, entre outros), misturado com etanol (proveniente da cana-de-açúcar) ou metanol (pode ser obtido a partir da biomassa de madeiras (MILANO et al., 2016; SALUJA et al., 2016). Ou seja, um combustível totalmente limpo, orgânico e renovável.

Ao contrário dos combustíveis fósseis que são relativamente inertes e mantêm as suas características essenciais pouco alteradas, o biodiesel degrada-se com o tempo devido ao seu contato com contaminantes, tanto de natureza inorgânica, quanto microbiana, sendo a oxidação decorrente da sua exposição ao ar atmosférico um dos principais problemas a que está sujeito (KNOTHE et al., 2007; GUZMAN et al., 2009; DINKOV et al., 2009; RASHED et al., 2016).

A evolução da oxidação de um biodiesel está atrelada a diversos fatores como a composição do óleo do qual foi sintetizado, da quantidade e da natureza das insaturações presentes, as quais são responsáveis pela auto-oxidação do combustível, do processamento do biodiesel e condições de armazenamento. Esses fatores podem influenciar na potencialidade do combustível que por sua vez não terá homogeneidade na queima devido o atraso na ignição, dificultando assim o bom funcionamento do motor (SORAT e BHAL, 2015)

O processo de auto-oxidação do biodiesel pode ser minimizado e/ou retardado, diminuindo as condições que contribuem para o seu aumento, como por exemplo, manter exposição mínima à luz e altas temperaturas, evitar a presença de traços de metais, impedir ao máximo o contato com o oxigênio e diminuir a formação de radicais livres por meio de antioxidantes (RASHEDUL et al., 2014).

Neste sentido, muitos antioxidantes têm sido utilizados para melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel, por causa da sua capacidade para retardar ou inibir a oxidação dos lipídeos e/ou outras moléculas, evitando a iniciação ou

propagação de reações em cadeia de oxidação (DUNN, 2005; KNOTHE, 2006; KNOTHE, 2007; ALMEIDA et al., 2011; ZULETA et al., 2012).

Entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados para melhorar a estabilidade do biodiesel estão o butilado de hidroxianisol (BHA) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Além disso, estudos recentes demonstraram que o efeito sinérgico de uma formulação combinada contendo BHA e TBHQ proporciona uma maior estabilidade oxidativa para o biodiesel (GUZMAN et al., 2009; MAIA et al., 2011).

Nesse contexto, as técnicas eletroanalíticas mostram-se promissoras ferramentas para determinação destes analitos, já que apresentam reduzido custo, considerável rapidez aliadas a uma boa seletividade, sensibilidade e simplicidade (ARAÚJO et al., 2010). Entretanto, o principal problema em se trabalhar com essas técnicas é que o uso de eletrodos convencionais pode proporcionar a passivação gradativa da superfície do eletrodo dificultando assim a resposta do analito de interesse, e, conseqüentemente a seletividade do sistema.

Eletrodos quimicamente modificados têm atraído grande atenção nas últimas décadas porque melhoram a sensibilidade e a seletividade de métodos de análise eletroquímica (MIRCESKI et al., 2013). Neste sentido, o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos com base em eletrodos modificados é um campo de interesse crescente na química analítica.

Uma variedade de materiais eficientes foi desenvolvida para induzir a oxidação/redução de alguns compostos orgânicos (CARAMIT et al., 2013; PEREIRA et al., 2015; WANG et al., 2016), porque estes materiais podem promover uma melhor transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e as espécies eletroativas em solução.

Dentre os materiais utilizados para modificar a superfície de eletrodos destaca-se o óxido de grafeno reduzido, devido à sua excelente condutividade elétrica, principalmente originado a partir das ligações π deslocalizados acima e abaixo do plano basal, a sua grande área de superfície e baixos custos de produção (PARK e RUOFF, 2009; RATINAC, et al., 2011; WU et al., 2012).

As ftalocianinas (Pc) tem atraído grande atenção em relação às suas aplicações industriais, tais como propriedades eletrocromáticas, eletrocatalíticas e semicondutoras (BURAT et al., 2011; ARSLANOGLU et al., 2011; OSMANBAS et al., 2008), bem como a sua estabilidade e não toxicidade. Seus derivados metálicos

podem proporcionar alta sensibilidade e uma rápida resposta em determinados sistemas (KAYA et al., 2014).

Neste sentido, somando-se as características do grafeno e das ftalocianinas, o presente trabalho descreve o desenvolvimento e a aplicação de um sensor eletroquímico eficiente, sensível, seletivo e estável para a determinação individual e simultânea dos antioxidantes butilado de hidroxianisol (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) em amostras de biodiesel. O sensor proposto é constituído de óxido de grafeno reduzido (OGr) e ftalocianina tetrassulfonada de cobre II (CuTSPc) sobre um eletrodo de carbono vítreo (ECV) o qual foi denominado ECV/OGr/CuTSPc.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver um sensor para a determinação individual e simultânea dos antioxidantes Butilado de hidroxianisol (BHA) e Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) em amostras de biodiesel utilizando um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com CuTSPc adsorvido sobre óxido de grafeno reduzido (OGr).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico do ECV/OGr/CuTsPc empregando a voltametria cíclica (VC) e voltametria de varredura linear (VVL);
- ✓ Caracterizar o OGr, o CuTSPc e o composto OGr/CuTSPc empregando a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- ✓ Otimizar os parâmetros experimentais para a determinação dos antioxidantes, tais como, pH, tipo e concentração da solução tampão utilizada como eletrólito;
- ✓ Otimizar os parâmetros operacionais da técnica eletroquímica voltametria de pulso diferencial (VPD), e construir curvas analíticas para a determinação dos antioxidantes;
- ✓ Avaliar a repetibilidade de medidas e a repetibilidade do preparo do sensor e a estabilidade do mesmo;
- ✓ Aplicar o sensor em amostras de biodiesel e realizar estudos de adição e recuperação dos analitos nas amostras;
- ✓ Comparar os resultados obtidos com um método descrito em literatura.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISAO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O biodiesel e os antioxidantes sintéticos

Pela definição da Lei Nacional 11.097 de 13/01/2005, o biodiesel poder ser classificado como um combustível alternativo, de natureza renovável, que possa oferecer vantagens sócio-ambiental ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel). Pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais, existindo dezenas de espécies vegetais no Brasil que podem ser utilizadas, tais como: mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso e soja, dentre outras (ALPTEKIN, 2014).

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis formado por ésteres de ácidos graxos, obtido comumente a partir da reação química de óleos vegetais ou gorduras animais com um álcool na presença de um catalisador (DUNN, 2005; BORSATO et al., 2014). Uma de suas principais desvantagens é sua baixa resistência aos processos oxidativos, que é explicado pelo alto percentual de ésteres de ácidos graxos insaturados presentes em determinadas matérias-primas, portanto existe a necessidade do uso de alternativas para correção da estabilidade oxidativa, normalizada pelos parâmetros da Agência Nacional do Petróleo (KIVEVELE et al., 2011).

A estabilidade oxidativa é deste modo de suma importância, pois, caso o biodiesel se oxide rapidamente, outras propriedades físico-químicas serão alteradas, como consequência da presença dos produtos de oxidação no meio (RASHED, 2016). A auto-oxidação envolve uma série de radicais livres, gerando produtos indesejáveis primários, secundários e terciários. Esse processo envolve o oxigênio tripleto e ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. A FIGURA 1 mostra as etapas do mecanismo auto-oxidação (BERMAN et al., 2016):

Iniciação**Propagação****Terminação****FIGURA 1** - Esquema do processo de oxidação dos triglicerídeos.

A etapa de iniciação é caracterizada pela formação de radicais. Nesta etapa os iniciadores como calor, metais, enzimas e luz, formam os primeiros radicais livres (R) que são muito instáveis e altamente reativos. Esses radicais livres reagem rapidamente com o oxigênio em seu estado singlete ou triplete formando radicais peróxidos (ROO), os quais podem se romper para formar aldeídos e cetonas. Também, pode ocorrer a remoção de hidrogênio (H) de grupamentos alílicos de outras moléculas do lipídio insaturado para formar um hidroperóxido (ROOH) e novos radicais, que por sua vez reagem com O₂, e assim se estabelece uma sequência de reações em cadeia (fase de propagação) (RAMALHO e JORGE, 2006). Na etapa de terminação dois radicais se combinam, ocorrendo a formação dos produtos secundários de oxidação obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis). A terminação caracteriza-se por odores fortes, alterações da cor, da viscosidade e da composição do óleo e gordura (RAMALHO e JORGE, 2006). Os peróxidos e hidroperóxidos produzidos através da autooxidação podem polimerizar com outros radicais, produzindo moléculas de elevada massa molar, sedimentos insolúveis, gomas, em alguns casos, podem quebrar a cadeia de ácidos graxos oxidado, produzindo ácidos de cadeias menores e aldeídos.

Neste contexto, para inibir ou retardar a oxidação lipídica podem ser empregados compostos conhecidos como antioxidantes. Antioxidantes são substâncias utilizadas para controlar a oxidação lipídica podendo ser natural ou sintético. Sua atuação ocorre impedindo a etapa inicial de autooxidação, que

corresponde à formação de radicais livres, removendo-os do meio (KIVEVELE et al., 2011).

Os antioxidantes mais utilizados na indústria de biodiesel são pertencentes ao grupo dos antioxidantes sintéticos primários, onde os compostos mais conhecidos são os polifenóis, como BHA e TBHQ, sendo suas estruturas químicas apresentadas na FIGURA 2.

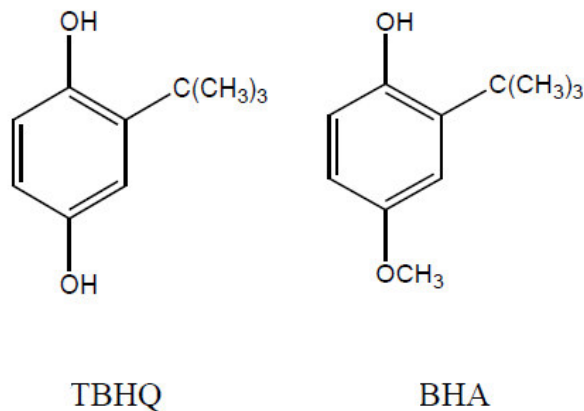


FIGURA 2 - Estruturas dos antioxidantes TBHQ e BHA (Adaptada pelo autor).

A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do diacilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, estes antioxidantes transformam-se em radicais livres, entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar as reações de oxidação (MONTEIRO et al., 2008).

Neste sentido, vários métodos analíticos são desenvolvidos para a determinação de TBHQ e BHA, dentre eles pode-se citar os espectrofotométricos (CAPITAN-VALLVEY et al., 2001; KULYS e BRATKOVSKAJA, 2007; TABART et al.; 2010; VERSARI et al., 2010), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- HPLC de fase reversa com detecção de arranjo de diodos (PERRIN e MEYER, 2002) cromatografia gasosa-espectrometria de massa - GC / MS (YANG et al., 2002; LIN et al., 2003; DING e ZOU, 2012). Porém, o elevado custo da instrumentação necessária para a execução destas técnicas, bem como a dificuldade de preparação das amostras, limitam seu uso em alguns casos (PIOVESAN, 2014).

Os métodos eletroanalíticos vêm se tornando bastante empregados, pois representam uma nova alternativa para análises dessas substâncias. Esses métodos eletroquímicos têm recebido grande atenção devido às diversas vantagens que

apresentam, tais como baixo custo, elevada sensibilidade e seletividade, rapidez de análise, possibilidade e facilidade de operação (CARAMIT et. al., 2013). Como alternativas para aprimorar as técnicas eletroanalíticas surgiram os eletrodos quimicamente modificados, os quais conferem ao eletrodo interessantes características físico-químicas (reatividade, seletividade, sensibilidade, etc.) do modificador. Estes eletrodos quimicamente modificados exibem melhorias significativas frente ao eletrodo de base, incluindo a capacidade de fornecer seletividade para a detecção de analitos específicos, prevenir incrustação no eletrodo, melhorar as propriedades eletrocatalíticas/eletroquímicas e reduzir o sobre-potencial necessário para a oxidação/redução de uma dada espécie (MURRAY et al., 1987; GUADALUPE e ABRUNA, 1985; WANG, 1991).

Existem poucos trabalhos na literatura que abordam novas metodologias eletroquímicas que identifiquem e determinem antioxidantes sintéticos em biodiesel, porém, avaliar quantitativamente estes compostos tem seu papel de destaque na qualidade do biodiesel.

3.2 Eletrodos quimicamente modificados (EQM's)

A modificação química dos eletrodos é um campo de interesse crescente na química analítica. Em eletroquímica, demonstrou-se que os eletrodos quimicamente modificados (EQM's) possuem vantagens distintas sobre os eletrodos convencionais em muitas áreas de aplicação, incluindo a área de eletrocatalise e a de sensores eletroquímicos (LUZ et al., 2004).

O termo EQM foi introduzido na eletroquímica por MURRAY et. al em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, devidamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução.

A introdução do agente modificador na superfície eletródica pode ser realizada de diferentes maneiras, sendo que as mais utilizadas são descritas na TABELA 1.

O material escolhido como eletrodo base, cuja superfície será modificada é um aspecto relevante na fabricação de um EQM. Este substrato deve apresentar características apropriadas, bem como ser adequado com o método escolhido. Entre

os materiais convencionais estão: ouro, platina, carbono vítreo, fibras de carbono e pasta de carbono (PEREIRA et al., 2002). Dentre esses materiais, destaca-se o carbono vítreo, devido sua boa condutividade elétrica, estabilidade térmica e robustez (MALEKI et al, 1998).

TABELA 1 - Métodos de modificação de superfície de eletrodo. Fonte: PEREIRA et al., 2002.

Modificações	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodos base
Ligação covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo.
Filmes poliméricos	Imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo – ampliação da resposta eletroquímica
Materiais compósitos	Possibilidade de modificação interna do material eletródico. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxi, poliestireno, etc.

A técnica de adsorção é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos. No entanto, a mesma apresenta a desvantagem de produzir EQM's com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que geralmente limita a faixa de resposta linear. Por outro lado, a adsorção é um processo de equilíbrio, o que pode levar à ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante sua utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM preparado desta forma (SOUZA, 1997).

O método utilizado neste trabalho foi a adsorção, que consistiu na a modificação de um eletrodo de carbono vítreo com o compósito OGr/CuTsPc.

3.3 Desenvolvimento de sensores para a determinação de TBHQ e BHA

Várias metodologias eletroanalíticas foram desenvolvidas para a determinação simultânea e individual de TBHQ e BHA, os quais são descritos a seguir:

De La Fuente e colaboradores (1999) usaram um eletrodo de platina modificado com polipirrol contendo ftalocianina tetrassulfonada de níquel II, para a determinação individual de BHA e TBHQ em diferentes amostras de alimentos. A oxidação dos analitos ocorreu nos potenciais 0,549V e 0,352V (Ag/AgCl/KCl_(sat)), respectivamente, os quais foram menores que os potenciais observados no eletrodo não modificado. O eletrodo modificado forneceu uma faixa linear de trabalho de $6,01 \times 10^{-5}$ - $1,80 \times 10^{-4}$ e $2,21 \times 10^{-5}$ - $1,44 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para TBHQ e BHA, respectivamente. Os limites de detecção de $1,037 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o BHA e $7,39 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o TBHQ foram obtidos empregando-se a voltametria de pulso diferencial. O eletrodo modificado apresentou boa resposta eletroquímica em termos de sensibilidade e estabilidade. A aplicação do método proposto para determinar o BHA em biscoitos e TBHQ em creme de cogumelo, usando o método da adição de padrão, apresentou uma recuperação de $93 \pm 1\%$ (BHA) e de $99 \pm 5\%$ (TBHQ), o que indica que método eletroanalítico é adequado para determinação do BHA e TBHQ nesse tipo de amostra.

Riber e colaboradores (2000) usaram um eletrodo de carbono vitreo modificado com polipirrol e ftalocianina tetrassulfonada de níquel II em um sistema de análise de injeção em fluxo, onde os antioxidantes analisados foram TBHQ, BHA e PG (propil galato) em amostra de caldo de peixe. O melhor potencial para a determinação amperométrica dos antioxidantes foi de 0,7 V (Ag/AgCl/KCl_(sat)). O eletrodo modificado forneceu uma faixa linear de trabalho de 0,8 - 7,2 e 3,2 - 32×10^{-6} mol L⁻¹ para BHA e TBHQ, respectivamente. O eletrodo polipirrol proporcionou um aumento do sinal e uma reprodutibilidade maior do que no eletrodo não modificado. A sua aplicação em amostras comerciais oferece bons resultados.

Raymundo e colaboradores (2007) otimizaram a metodologia para determinação de forma separada e simultânea dos antioxidantes BHA, BHT(hidroxitolueno butilado) e TBHQ em amostras de maionese, comparando as respostas obtidas entre o eletrodo de platina e eletrodo de carbono vítreo, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada onde para o eletrodo de carbono vítreo a faixa linear de concentração foram de $1,10 \times 10^{-5}$ - $5,54 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ BHA, $2,40 \times 10^{-5}$ - $6,01 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para TBHQ e $9,07 \times 10^{-6}$ - $9,07 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para BHT, utilizando eletrodo de platina a faixa linear de concentração foi de $4,43 \times 10^{-5}$ - $6,65 \times 10^{-4}$ para BHA, $6,01 \times 10^{-5}$ - $7,82 \times 10^{-4}$ para o TBHQ e $1,81 \times 10^{-5}$ - $1,36 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o BHT. Os potenciais de oxidação foram 0,385, 0,555 e 0,790 V (Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat)) para

TBHQ, BHA e BHT, respectivamente, para carbono vítreo; e 0,382, 0,540 e 0,736 V (Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.)) para TBHQ, BHA e BHT, respectivamente, para platina(Pt). Todos os sistemas testados apresentaram bom desempenho e aplicabilidade na análise de amostras de alimentos sem a utilização de abordagens quimiométricas para contornar o problema de sobreposição de onda.

Caramit e colaboradores (2013) realizaram a determinação simultânea de TBHQ e BHA, utilizando eletrodos impressos com nanotubos de carbono. TBHQ e BHA exibiram picos anódicos bem definidos a 0,140 V e 0,330 V (Ag/AgCl/KCl_(sat.)), respectivamente. Utilizando a técnica de voltametria de varredura linear, o método apresentou uma resposta linear na gama de concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para TBHQ e BHA, com limites de detecção de $3,40 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,76 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na quantificação do TBHQ e BHA em amostras de biodiesel, obtendo ótimos valores de recuperação.

Roushani e Sarabaegi (2014) desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado por nanopartículas de óxido de irídio para determinação amperométrica de BHA. O melhor potencial para a determinação amperométrica do antioxidante foi de 0,580 V (Ag/AgCl/KCl_(sat.)). O método proposto foi aplicado com sucesso na quantificação de BHA em amostras de flocos de batatas, obtendo ótimos valores de recuperação. O método apresentou uma faixa linear de concentrações de $1 - 280 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de 100×10^{-9} mol L⁻¹. O eletrodo modificado apresentou boa resposta eletroquímica em termos de sensibilidade e estabilidade.

Yue e colaboradores (2015) desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e óxido grafeno reduzido para a detecção simultânea de BHA e TBHQ em amostras de óleo comestível. TBHQ e BHA exibiram picos anódicos bem definidos a 0,315 V e 0,550V (Ag/AgCl), respectivamente. Utilizando a técnica de voltametria de varredura linear, o método apresentou para TBHQ e BHA uma faixa linear de concentrações de $6,02 \times 10^{-7}$ - $4,21 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $5,55 \times 10^{-7}$ - $5,55 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com limites de detecção de $3,03 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $2,32 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os resultados indicam que a plataforma de detecção eletroquímica construída apresenta um intervalo linear satisfatório, limites de detecção baixos, boa precisão e reprodutibilidade, que é aplicável para a análise fácil e sensível de compostos eletroativos em amostras de alimentos.

3.4 Grafeno

Grafeno é uma das formas alotrópicas de carbono elementar, é uma monocamada plana de átomos de carbono dispostos em uma rede bidimensional (2D) com estrutura de “favo de mel” com um comprimento de ligação carbono-carbono de 0,142 nm (SLONCZEWSKI, 1958; TETLOWA et al., 2014). Apartir dele é possível construir materiais com outras dimensionalidades, como: enrolar para obter nanotubos (1D) ou embrulhar para obter fulerenos (0D), como mostra a FIGURA 3.

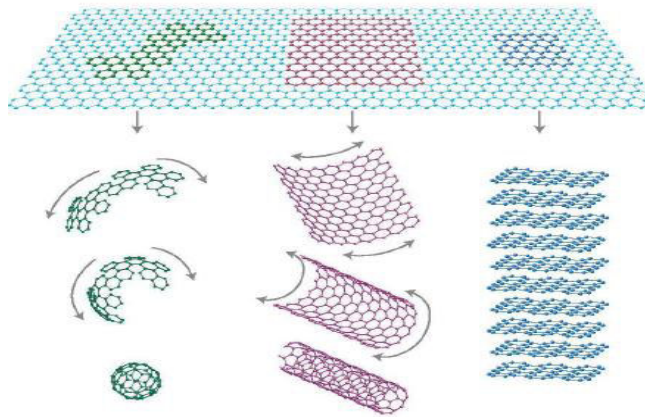


FIGURA 3- Da esquerda para direita: as estruturas de fullereno, do nanotubo de carbono e do grafite, todos construídos a partir da mesma matriz bidimensional-grafeno (NOVOSELOV et al, 2004).

Em 2004 Andre Geim e Kostya Novoselov, liderando um grupo de físicos da Universidade de Manchester, promoveram uma revolução ao produzir flocos de grafeno. Eles partiram do grafite tridimensional, extraíram uma única folha dele através de uma técnica chamada dissociação micromecânica (ou método da fita adesiva ou esfoliação mecânica), que consiste basicamente no uso de uma fita adesiva para destacar flocos de grafeno da estrutura do grafite- que pode ser visto como um empilhamento de folhas de grafeno. Esta descoberta permitiu a possibilidade de uma nova área para testes das extraordinárias propriedades do grafeno previstas teoricamente (WALLACE, 1947).

O grafeno apresenta propriedades notáveis, tais como elevada condutividade térmica, propriedades mecânicas superiores e excelentes propriedades de transporte de carga eletrônica (DREYER et al., 2010; WANG et al., 2008; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2006; BLACKKE et al., 2008). Estas propriedades intrínsecas de grafeno

têm gerado um enorme interesse para a sua possível implementação em uma infinidade de dispositivos (ALLEN, 2010).

O grafeno pode efetivamente melhorar a condutividade de nanomateriais, acomodar a expansão de volume e evitar nanopartículas da agregação, permitindo excelentes performances eletroquímicas. Como resultado, nanocompósito com base em grafeno tem sido aceito como material de eletrodos de alto desempenho.

Na literatura, os métodos comumente citados para obtenção de grafeno são: esfoliação mecânica do grafite, sublimação de carbetos, deposição química de vapor e síntese química. O método de esfoliação mecânica está relacionado com a descamação das lâminas de grafeno do floco de grafite com o uso de uma fita adesiva (NOVOLSELOV et al., 2004). A fita adesiva é grudada em um substrato, normalmente de silício. Esse método não é muito reprodutivo em larga escala uma vez que a obtenção de grafeno é ao acaso (GEIM e NOVOSELOV, 2007).

Na sublimação de carbetos, o grafeno é sintetizado pela sublimação de um elemento químico do carbetos, exceto o carbono. Assim, o carbono que sobra se reorganiza em estruturas hexagonais formando o grafeno. O carbetos de silício é o carbetos mais utilizado e a produção de grafeno é feita em vácuo (CASTRO NETO et al., 2009). A obtenção de grafeno a partir de um substrato possibilita a aplicação desse material em nanoeletrônica e uma grande vantagem desse método é que o carbetos de silício serve como substrato (MULLER et al., 2011).

O método de deposição química a vapor normalmente produz lâminas de grafeno livres de defeito que são utilizadas para estudos fundamentais e aplicações eletrônicas (KIM et al., 2010). Inicialmente uma superfície metálica ou um substrato de silício, recoberto por uma camada de aproximadamente 300nm de óxido de silício e por outra de metal, é colocada dentro de um tubo de quartzo e o conjunto dentro de um forno de deposição química de vapor (CVD). Em sequência, um tratamento térmico é realizado para que os grãos do metal catalisador aumentem seu tamanho proporcionando uma deposição mais uniforme (ZHANG et al., 2006). Sob uma atmosfera de argônio e hidrogênio ou vácuo o crescimento é realizado. É então injetado um gás (etileno, metano, etc.) no sistema de modo que a certa temperatura há quebra da molécula do gás e fixação no substrato. Por fim, resfria-se o tubo de quartzo.

Três métodos de síntese representativos e as suas variações foram desenvolvidos, que são os métodos de Brodie (BRODIE, 1859), Staudenmaier (STAUDENMAIER, 1898) e Hummers (HUMMERS, 1958). Nestes três métodos, as camadas de grafite são completamente oxidadas pelo tratamento oxidativo em ácidos fumegante, como se segue: KClO_3 em HNO_3 (Brodie), KClO_3 em $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (Staudenmaier), e KMnO_4 em H_2SO_4 (Hummers). Por último, o óxido de grafite pode ser reduzido quimicamente a grafeno utilizando hidrazina, hidroquinona, entre outros (WANG, 2009; STANKOVICH, 2006).

Devido às suas fascinantes propriedades, o uso do grafeno na construção de sensores químicos está sendo bastante requisitado.

3.5 Ftalocianinas (Pc)

Ftalocianina (Pc), apresenta-se como um excelente material de detecção, tem sido extensivamente estudada com base em suas sensibilidades elevadas, excelente estabilidade térmica e química (SIZUN, 2012; WANG et al., 2010; WANG et al., 2012). São macromoléculas formadas por quatro unidades isoindol ligadas por nitrogênios em posição azo. As mesmas foram descobertas acidentalmente por Braun e Tcherniac em 1907, quando examinavam as propriedades da o-cianobenzamida (KADISH et al., 2003). A FIGURA 4 mostra a estrutura de uma ftalocianina (Pc).

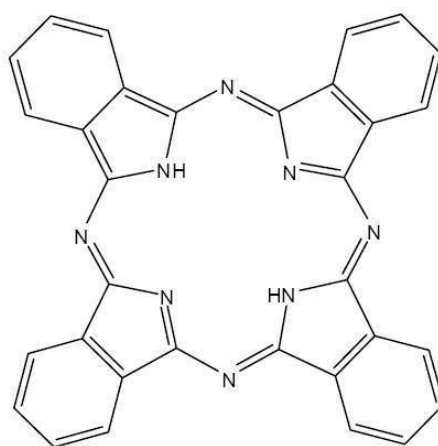


FIGURA 4 - Estrutura da ftalocianina de base livre (KUMAR et al., 2016).

O processo de substituir os dois hidrogênios do centro da molécula por vários grupos da tabela periódica, forma os compostos conhecidos como metalofteralocianinas (CRESPILHO e ZUCOLOTTO, 2007). Dentre as diversas características das metalofteralocianinas pode-se destacar a alta estabilidade térmica e química, estrutura eletrônica altamente conjugada, semicondutividade, fotocondutividade, etc. (LEZNOFF, 1989).

Várias aplicações destas macromoléculas exigem que elas sejam solúveis em água. Sendo assim, a inserção de grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos nas ftalocianinas aumentam sua solubilidade e viabiliza o preparo de filmes finos por solução, formando as metalofteralocianinas tetrassulfonatadas (ZUCOLOTTO et al., 2006). Neste contexto, destaca-se a ftalocianina tetrassulfonada de cobre II (CuTSPc), na qual os seus grupos sulfônicos (SO_3^-) a tornam solúvel em água, como mostra a FIGURA 5.

Metalofteralocianina tetrassulfonada de cobre II, entre outras, pode apresentar vantagens como componentes modificadores de eletrodos, facilitando a detecção de várias espécies.

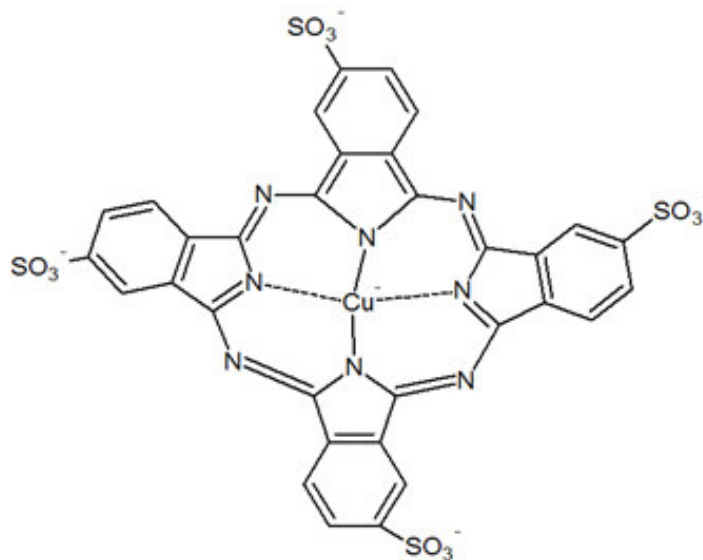


FIGURA 5 - Estrutura da metalofteralocianina tetrassulfonada de cobre (CHAURE et al., 2010).

3.6 Importantes parâmetros analíticos utilizados para validação de métodos

Novos métodos analíticos devem apresentar dados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação. Validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica, bem como é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BARROS, 2002).

As figuras de mérito são, portanto, os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, as mais comumente descritas na literatura especializada são: seletividade, faixa de linearidade, sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez (RIBEIRO e FERREIRA, 2008). No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos – a Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março de 2007, respectivamente. Os guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida, sendo intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado (SWARTZ e KRULL, 1998). Uma breve definição dos parâmetros de validação destacados em negrito será descrita a seguir:

A **seletividade** de um método refere-se à sua capacidade em avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise em presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Assim, a seletividade garante que a resposta obtida seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAN et al., 2001). A seletividade é o passo primordial no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser avaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. (GRANGEIRO JÚNIOR et al., 2004).

A **linearidade** é a habilidade que o método tem de produzir resultados que são diretamente, ou através de transformações matemáticas, proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, dentro de uma variação determinada (ICH, 2005; VALENTINI, 2007). Havendo uma relação linear, os

resultados da análise devem ser avaliados com base em apropriados métodos estatísticos, como por exemplo, o método dos quadrados mínimos (VALENTINI, 2007).

A **precisão** é utilizada para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra sob as condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2007). A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ) de um número significativo de medidas. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s), de acordo com a equação 1:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)$$

Onde \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável, calculada pela equação 2:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

Em que t_{n-1} corresponde ao valor crítico de *Student* com $n-1$ graus de liberdade. O valor de t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variância (CV) dada pela equação 3.

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Pode ser considerada em três níveis diferentes: precisão intermediária, repetitividade e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois níveis (SOARES SOBRINHO et al., 2005).

A **repetitividade ou repetibilidade** representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO,

2007). A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações, e pode ser expressa através da estimativa do DPR.

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. Esta medida é conhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de se usar. Para se avaliar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra nas condições pré-definidas (INMETRO, 2007). A reprodutividade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias. O método será considerado preciso quando apresentar níveis de variações dentro do aceitável para cada nível de concentração.

A **exatidão**, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da validação (BARROS, 2002). Os procedimentos utilizados normalmente para avaliar a exatidão de um método são: a comparação com materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007).

Os materiais de referência certificados (MRC) são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os MRC são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (*National Institute of Standards and Technology* – Estados Unidos), LGC (*Laboratory of the Government Chemist* – Reino Unido), USP (*United States Pharmacopeia* – Estados Unidos), etc.

A avaliação da exatidão do método a partir da comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, em que é avaliado o grau de proximidade entre os resultados obtidos por ambos. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida (RIBANI et al., 2004).

A recuperação é definida como a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é passível de ser quantificada (THOMPSON et al., 1999). A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*) em pelo menos três concentrações diferentes. Segundo INMETRO (2007), a recuperação pode ser calculada pela equação 4:

$$\text{Rec (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_2} \times 100 \quad (4)$$

onde C_1 corresponde à concentração determinada na amostra adicionada e C_2 à concentração determinada na amostra não adicionada.

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção (AMARANTE JUNIOR et al., 2003). O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (CURRIE, 1995), o LOD pode ser calculado através dos parâmetros da curva analítica, e ser expresso pela equação 5:

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{s}{b} \quad (5)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão das respostas do branco e b é a inclinação (*slope*) ou coeficiente de regressão angular da curva analítica.

O **limite de quantificação** é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos (AMARANTE JUNIOR et al., 2003). Segundo a IUPAC (CURRIE, 1995), o LOQ pode ser calculado através dos parâmetros da curva analítica, e ser expresso de acordo com equação 6:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{b} \quad (6)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão das respostas do branco e b é a inclinação (*slope*) ou coeficiente de regressão angular da curva analítica. Após ter sido determinado, o valor deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias.

A **sensibilidade** é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (AMARANTE et al., 2001). Do ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico (CAUSON, 1997; CURRIE, 1995).

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Este critério expressa a capacidade de o procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

Todos os parâmetros descritos acima foram avaliados no presente trabalho com o objetivo de verificar se o sensor proposto pode ser validado para ser utilizado como uma nova alternativa ou um novo método para a determinação de TBHQ e BHA em amostras de biocombustíveis ou em outros tipos de amostras.

PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

Oterc-butil-hidroquinona (TBHQ) e butilado de hidroxianisol (BHA) foram adquiridos da Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA. Ácido clorídrico, ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico, perclorato de sódio e hidróxido de sódio, a ftalocianina tetrassulfonada de cobre II e o pó de grafite foram adquiridos da Sigma Aldrich. Nitrato de sódio, ácido sulfúrico e permanganato de potássio foram adquiridos da Vetec[®] Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4) foi adquirido da Dinâmica[®] Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil. O álcool etílico (99,8%) foi adquirido da Impex[®]. O grafeno foi sintetizado no Laboratório de Eletroquímica da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

O preparo das soluções padrão de TBHQ e BHA em diferentes concentrações foi realizado por meio da dissolução do reagente ou diluição de padrões de alta concentração em água deionizada. Tampões citrato, fosfato, acetato e Britton-Robinson utilizados nas concentrações citadas no presente trabalho foram preparados por dissolução dos respectivos sais, sendo o volume desejado completado com água deionizada.

A solução tampão Britton-Robinson (B-R) foi preparada pela mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico, todos em concentrações $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. Quando foi feito o estudo da concentração da solução B-R utilizou-se a quantidade adequada de cada um desses reagentes para então completar a solução de acordo com o volume desejado. Para ajuste do pH das soluções tampão, utilizou-se soluções NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ou HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e um pHmetro da Quimis modelo Q400RS.

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas utilizando-se água purificada obtida em um sistema purificador de água via osmose reversa da GEHAKA[®], modelo OS10LXE.

4.2 Instrumentação

Um sistema purificador de água via osmose reversa da GEHAKA®, modelo OS10LXE foi utilizado para o preparo de todas as soluções, bem como o pH das soluções tampão foi determinado com um medidor de pH da Quimis modelo Q400RS.

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato da AUTOLAB PGSTAT 128N da Eco Chemie (Utrecht, Holanda) acoplado a um microcomputador PC com software GPES 4.9 conectado a uma célula eletroquímica contendo 5 mL de solução-tampão Britton-Robinson (B-R) (FIGURA 6). Nesta célula utilizou-se como eletrodo de referência um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), um fio de platina (Pt) como um eletrodo auxiliar e como eletrodo de trabalho utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo previamente limpo com alumina.

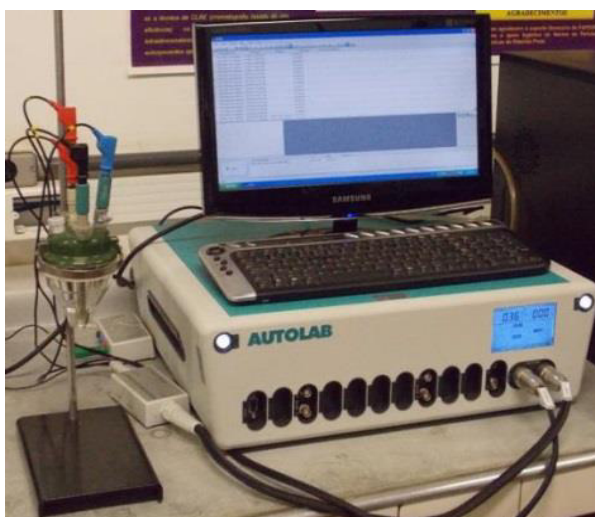


FIGURA 6 -Autolab® modelo PGSTAT 128 N da *Echo Chemie* (Utrecht, The Netherlands) acoplado a um microcomputador com o *software* GPES 4.9. Respostas eletroquímicas de E^o/ip.

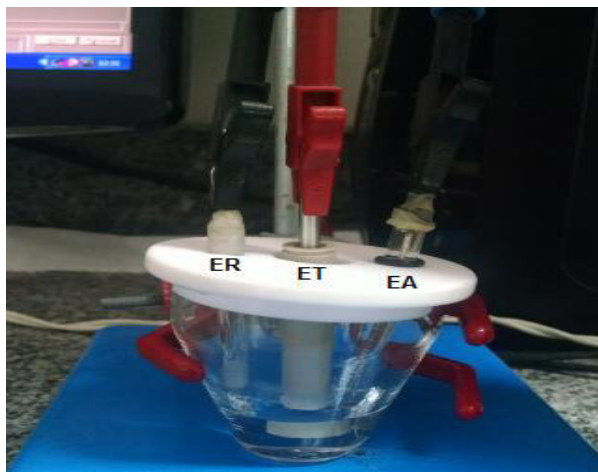


FIGURA 7 -Eletrodos utilizados nas análises eletroquímicas. ER= Eletrodo de Referência; ET = Eletrodo de trabalho e EA = Eletrodo Auxiliar.

As medidas espectroscópicas foram realizadas empregando-se um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da Shimadzu Prestige-21. As medidas cromatográficas foram realizadas empregando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu, constituído por bombas multicanal (LC 20AT), um amostrador automático (SIL 20A), um degaseificador (DGU 20A5) e um detector por arranjo de diodos (DAD SPD 20A). A separação de antioxidantes foi realizada utilizando uma coluna de fase inversa (C-18, 150 mm x 4.6 mm, 5 mm) da Agilent HP. Metanol/acetonitrila (50/50%, v/v) com um caudal de 1 mL min^{-1} foi usado como a fase móvel, e o volume de injeção foi de $25\ \mu\text{L}$.

4.3 Síntese de óxido de grafite (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGr)

O óxido de grafeno (OGr) foi preparado pela adaptação dos métodos de Hummers e Offeman (HUMMERS e OFFEMAN,1958; STANKOVICH et al., 2006). Inicialmente, o grafite, o NaNO_3 e o H_2SO_4 foram adicionados num béquer de 500 mL o qual foi colocado em um banho de gelo, acrescentado o KMnO_4 à mistura e, em seguida, a solução foi agitada. Posteriormente, adicionou-se água à solução, agitou-se, e a mesma foi transferida par um banho-maria e mantida à temperatura de $90 \pm 5\ ^\circ\text{C}$. Finalmente, H_2O_2 (30%) foi adicionado à mistura reacional e foi, em seguida, filtrada e o sólido foi lavado com água. O sólido foi disperso em água pela agitação mecânica e submetido à centrifugação a baixa velocidade de rotação. O óxido de

grafite obtido foi disperso em água na presença de quantidades apropriadas de hidrazina e amoníaco. A dispersão foi agitada e foi mantida num banho de água durante 1h. Finalmente, a mistura resultante foi filtrada e lavada para obter o óxido de grafeno reduzido (OLIVEIRA et al., 2015).

4.4 Caracterização do compósito OGr/CuTSPc por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterização dos materiais (OGr, CuTSPc e OGr/CuTSPc) utilizados para a modificação do eletrodo, foram realizadas medidas empregando o espectrômetro FTIR com o qual foram registrados espectros na região de 400 a 4000 cm^{-1} . Para estas análises, os materiais foram prensados em pastilhas de KBr a 1 %.

4.5 Preparação do eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc

Um eletrodo de carbono vítreo foi polido com uma suspensão de alumina de diâmetro de 0,05 μm e enxaguado com água deionizada. Após a limpeza do eletrodo, uma suspensão de OGr/CuTsPc foi preparada com 3 mg de OGr e 1 mg de CuTsPc em 1 mL de água deionizada. Essa quantidade de material foi escolhida por já ter sido verificado por outro aluno do grupo da professora Rita Luz que quantidades inferiores a 3 mg de OGr e 1 mg de CuTSPc proporcionam valores de corrente muito baixos para os analitos estudados. Por outro lado, concentrações entre 3 e 4 mg de OGr e 1 e 2 mg de CuTSPc não proporcionam variação significativa nas correntes. Em seguida, 20 μL desta suspensão foi colocada diretamente sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo e deixado para secar a 50 ° C durante 20 min para efetivar a modificação.

4.6 Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais para a determinação dos antioxidantes empregando o sensor eletroquímico

A fim de se obter o melhor perfil voltamétrico para a oxidação de TBHQ e BHA, foi realizado um estudo do pH e da solução tampão a serem utilizados. As análises foram feitas por voltametria cíclica em potenciais de -0,7 a 0,9 V vs Ag/AgCl, numa velocidade de varredura de 0,05 V s⁻¹.

Inicialmente, utilizou-se uma solução tampão BR como eletrólito suporte variando-se o pH deste nos seguintes valores: 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Após a otimização do pH, estudou-se a oxidação dos analitos em soluções tampão B-R, fosfato, acetato e citrato, todas em concentração de 0,04 mol L⁻¹.

As condições ótimas de pH e da solução tampão foram utilizadas em análises subsequentes para caracterização do sensor proposto para a oxidação eletrocatalítica de TBHQ e BHA.

A corrente de pico foi obtida por voltametria cíclica para várias concentrações do tampão BR: 0,024, 0,040, 0,10 e 0,14 mol L⁻¹.

As determinações individual e simultânea de TBHQ e BHA foram realizadas por VPD em solução tampão B-R, pH 4 utilizando-se o tampão B-R nas condições otimizadas e uma velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹ com uma amplitude de pulso de 0,06 V. Essa velocidade e amplitude foram escolhidas após estudos prévios envolvendo diferentes velocidades de varredura (0,01 a 0,15 V s⁻¹) e após a escolha desta velocidade, a mesma foi fixada para então realizar-se a variação da amplitude de pulso (0,01 a 0,1 V).

4.7 Preparo e análise das amostras de biodiesel

1,0 g de amostras de biodiesel de soja ou de babaçu foram diluídas em 100,0 mL de etanol puro contendo o BHA e TBHQ em várias concentrações (TABELA 2) sendo a solução agitada vigorosamente até a completa solubilização da amostra. Em seguida 0,45 mL de cada amostra contendo os antioxidantes foi adicionada em 4,55 mL de tampão B-R 0,04 mol L⁻¹ (pH 4) e analisada por voltametria de pulso diferencial em triplicata. Então, o TBHQ e o BHA presentes nas amostras de biodiesel foram quantificados utilizando o método da adição de um padrão. Para tanto, mediu-se a

corrente apenas da amostra fortificada, em seguida, adicionou-se volumes sucessivos (25, 50, 75, 100, 125 e 150 μL) das soluções estoque de TBHQ e/ou BHA ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), medindo-se então a corrente de pico apenas da amostra e da amostra com as seis soluções padrão. Em seguida plotou-se o gráfico de corrente de pico em função da concentração, e, por extrapolação obteve-se a concentração real de cada analito presente na amostra. Assim foi possível calcular a percentagem de antioxidante presente na amostra, configurando um estudo de adição e recuperação.

As análises cromatográficas foram realizadas conforme procedimento descrito por Saad (2007).

TABELA 2 -Concentrações de TBHQ e BHA nas amostras fortificadas.

Amostras	[TBHQ]/mg L⁻¹	[BHA]/mg L⁻¹
A*	59,0	63,9
B**	55,0	60,0
C*	50,0	55,0
D**	45,0	50,0
E*	41,0	45,0
F**	36,0	40,0

*biodiesel de babaçu; **biodiesel de soja; DPR=Desvio padrão relativo.

4.8 Caracterização analítica do sensor

A determinação simultânea de TBHQ e BHA foi realizada por VPD após a otimização dos parâmetros experimentais, tais como pH, tipo de solução tampão e concentração da solução tampão.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados utilizando as relações estatísticas $3 \times \text{DP} / b$ e $10 \times \text{DP} / b$, em que DP é o desvio padrão entre as medidas de corrente de pico para um “branco” (solução que não contém o analito) e b é o coeficiente angular da curva analítica.

4.9 Avaliação da repetibilidade e estabilidade do sensor

A precisão do sensor foi avaliada pela repetibilidade das medidas e pela repetibilidade no preparo de sensores preparados em dias diferentes. A repetibilidade foi avaliada através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) dos valores de corrente para medidas voltamétricas realizadas no mesmo dia, bem como para oito sensores preparados em dias diferentes. Para este último também foi calculado o DPR entre os valores de corrente dos voltamogramas obtidos.

A estabilidade do eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc foi avaliada realizando-se 100 medidas por VPD referentes à oxidação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ e BHA sobre o eletrodo modificado. Além disso, o sensor foi testado num período de 30 dias para avaliação da sua resposta analítica. Estes estudos foram realizados empregando-se as condições experimentais e operacionais otimizadas.

4.10 Estudo de interferentes

A seletividade do eletrodo modificado foi avaliada examinando-se a influência de várias possíveis substâncias interferentes sobre a detecção de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ dos analitos. A interferência de espécies químicas na oxidação de TBHQ e BHA foi estudada, uma vez que estas espécies podem coexistir com os analitos em amostras de biodiesel. O estudo foi realizado sob condições experimentais e operacionais otimizadas e as medidas foram obtidas em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a serem discutidos são referentes à caracterização do compósito OGr/CuTSPc por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, à otimização de parâmetros experimentais e operacionais, à caracterização analítica do sensor proposto, aplicação do mesmo em amostras de biodiesel e avaliação das figuras de mérito considerando a validação analítica do método proposto.

5.1 Caracterização do compósito OGr/CuTSPc por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A FIGURA 8 mostra os espectros de FTIR de óxido de grafeno reduzido (OGr) (FIGURA 8, espectro a), do complexo CuTSPc (FIGURA 8, espectro b), e do compósito OGr/CuTSPc (FIGURA 8, espectro c). Na FIGURA 8, espectro a, foi observada a presença de diferentes tipos de grupos funcionais oxigenados no óxido de grafeno reduzido. A presença destes grupos contendo oxigênio revelou que a grafite foi realmente oxidada. Estes grupos foram confirmados nos seguintes comprimentos de onda: em 800 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , os quais podem ser atribuídos à vibração de estiramento das ligações dos grupos $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos e carbonilas presentes no grafeno (SHAHRIARY e ATHAWALE, 2014); em 1100 cm^{-1} (vibrações de estiramento de grupos $\text{C}-\text{O}$ (XU et al., 2008); em 1257 cm^{-1} (vibrações de estiramento de grupos $\text{C}-\text{OH}$) (LIN et al., 2008); na banda a 1444 cm^{-1} (vibrações de estiramento das ligações de $\text{C}-\text{C}$ do ácido carboxílico (LIMA et al., 2016); em 1570 cm^{-1} (vibrações esqueléticas de domínios de grafite não oxidados); a 1712 cm^{-1} (vibrações de estiramento de $\text{C}=\text{O}$) e em 3400 cm^{-1} (vibrações de estiramento de grupos $\text{O}-\text{H}$) (MORAES et al., 2016). Estes grupos polares, resultam na formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e grafite; isto explica ainda mais a natureza hidrofílica do óxido de grafeno (SHAHRIARY e ATHAWALE, 2014).

As bandas observadas no espectro obtido para o complexo CuTSPc (FIGURA 8, espectro b) corresponde às vibrações dos grupos específicos presentes na estrutura molecular do composto (BERTONCELLO e PERUFFO, 2008), tais como as bandas em 570 cm^{-1} e 677 cm^{-1} (deformação angular fora do plano de $\text{C}-\text{H}$); em 1030 cm^{-1} (estiramento de grupos $-\text{SO}_3$); em 1160 cm^{-1} (vibração de ligação nos planos $\text{C}-\text{H}$) (AROCA e THEDCHANAMOORTHY, 1995). Finalmente, as bandas em 1085 cm^{-1}

¹, 1330 cm⁻¹ e em 1420 cm⁻¹ são referentes aos estiramentos de grupos C-N) (BERTONCELLO e PERUFFO, 2008).

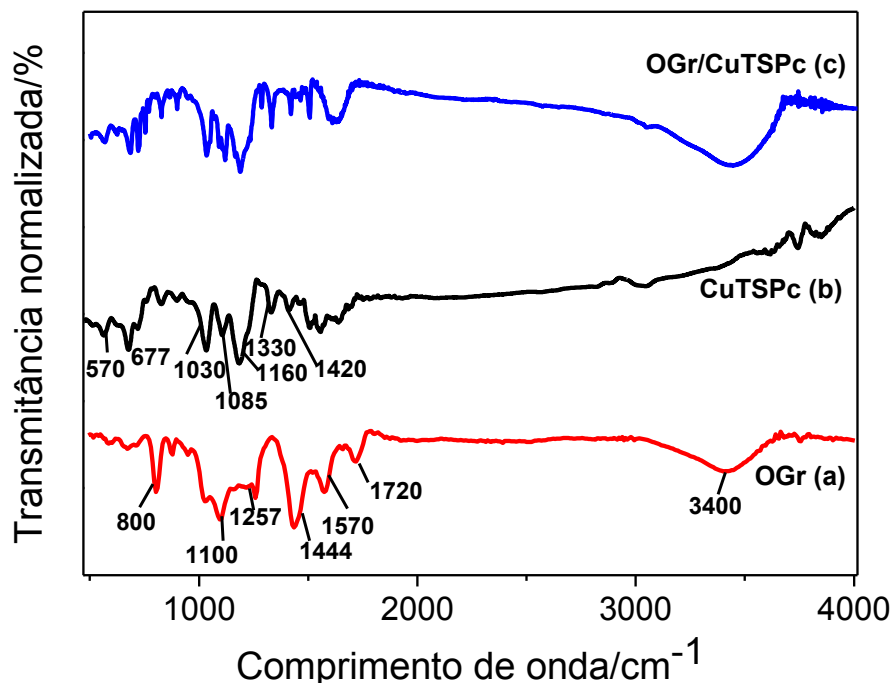


FIGURA 8 -Espectros de FT-IR do composto OGr (a, linha vermelha), o complexo CuTSPc (b, linha preta) e o composto OGr/CuTSPc (c, linha azul)

O espectro obtido para o composto OGr/CuTSPc (Figura 8, espectro c) indica que a modificação do grafeno pela ftalocianina ocorreu por meio de um processo físico de adsorção, uma vez que as bandas características de compostos observados na Figura 8, espectros a e b foram novamente observadas após a modificação do grafeno sem o aparecimento de novas bandas no espectro do composto.

5.2 Comportamento voltamétrico dos antioxidantes TBHQ e BHA

O comportamento eletroquímico dos antioxidantes TBHQ e BHA em vários eletrodos foi estudado na faixa de potencial de -700 a 900 mV vs Ag/AgCl em 0,04 mol L⁻¹ de uma solução tampão B-R, pH 4.0, empregando-se a voltametria cíclica.

A FIGURA 9 mostra o comportamento voltamétrico para 100 μmol L⁻¹ de TBHQ sobre o eletrodo de carbono vítreo nas diferentes situações: eletrodo não modificado

(curva 1), eletrodo modificado com o complexo CuTSPc (curva 2), eletrodo modificado com o óxido de grafeno reduzido - OGr (curva 3) e eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc (curva 4). Os eletrodos citados foram assim denominados: eletrodo não modificado, eletrodo modificado com o complexo CuTSPc, eletrodo modificado com OGr e eletrodo modificado com OGr/CuTSPc.

Considerando a varredura anódica para todos os eletrodos descritos anteriormente, verificou-se inicialmente que o TBHQ apresentou uma corrente de pico anódica (I_{pa}) de 10,23 μA em um potencial de pico (E_{pa}) de 395 mV para o eletrodo não modificado (FIGURA 9, curva 1). As correntes e os potenciais de pico observados para os demais eletrodos foram: 13,21 μA e 374 mV para o eletrodo modificado com CuTSPc (FIGURA 9, curva 2); 31,6 μA e 195 mV para o eletrodo modificado com o OGr (FIGURA 9, curva 3) e 48,0 μA e 262 mV para o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc (FIGURA 9, curva 4).

As correntes de pico para o eletrodo modificado com CuTSPc, o eletrodo modificado com o OGr e o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc foram, respectivamente, 1,3; 3,0 e 4,7 vezes maiores do que a observada para o eletrodo não modificado. Como pode ser visto a partir dos voltamogramas da FIGURA 9, se o OGr e o complexo CuTSPc não são usados simultaneamente, o TBHQ exibe uma corrente de pico menor do que a observada para o material compósito (OGr/CuTSPc) (FIGURA 9, curva 4). Além disso, a corrente de pico do TBHQ para o eletrodo modificado com o OGr/CuTSPc foi cerca de 3,6 vezes mais elevada do que a observada para o eletrodo modificado com o complexo CuTSPc e 1,5 vezes mais elevada do que a observada para o eletrodo modificado apenas com o OGr. De fato, o efeito sinérgico entre o grafeno e a ftalocianina como co-catalisadores torna o eletrodo modificado com esses dois compostos o melhor material eletrocatalítico para TBHQ entre os eletrodos modificados.

Em relação aos potenciais de oxidação observa-se que o eletrodo modificado com CuTSPc apresentou potencial de oxidação (374 mV) muito próximo ao eletrodo não modificado (395 mV) com uma diferença de 21 mV em relação a esse eletrodo. Entretanto, os eletrodos modificados com o OGr e o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc apresentaram um potencial de oxidação cerca de 200 e 133 mV (respectivamente) menor que o potencial de oxidação do ECV não modificado. A

diferença entre o potencial de oxidação do ECV/OGr e o ECV/OGr/CuTSPc foi de 67 mV.

Apesar do ECV/OGr ter apresentado um potencial de pico menor para a oxidação TBHQ (67 mV) do que o observado para o ECV/OGr/CuTSPc, e, considerando-se a importância em se trabalhar com sistemas com significativa sensibilidade para a determinação de um dado analito, optou-se pela utilização simultânea de OGr e CuTSPc devido ao uso combinado desses materiais apresentar maior valor de corrente de pico anódica. O voltamograma cíclico inserido na FIGURA 9 mostra o comportamento voltamétrico do eletrodo modificado com OGr/CuTSPc na ausência de TBHQ. Neste voltamograma cíclico é observado um par redox referente ao processo de oxidação do Cu(I)TSPc para Cu(II)TSPc em um potencial de oxidação e redução de cerca de 0 e -200 mV, respectivamente. É importante notar que a oxidação de TBHQ se inicia próximo ao potencial redox do eletrodo modificado com OGr/CuTSPc. Este resultado sugere que o material compósito OGr/CuTSPc melhora a transferência de carga entre a superfície do eletrodo e a molécula TBHQ em solução. Ressalta-se também que a utilização simultânea desses materiais promove uma diminuição no potencial de oxidação do TBHQ. Essa diminuição faz com que seja possível a determinação do TBHQ em um potencial menor do que o do eletrodo não modificado justificando assim a utilização desse filme.

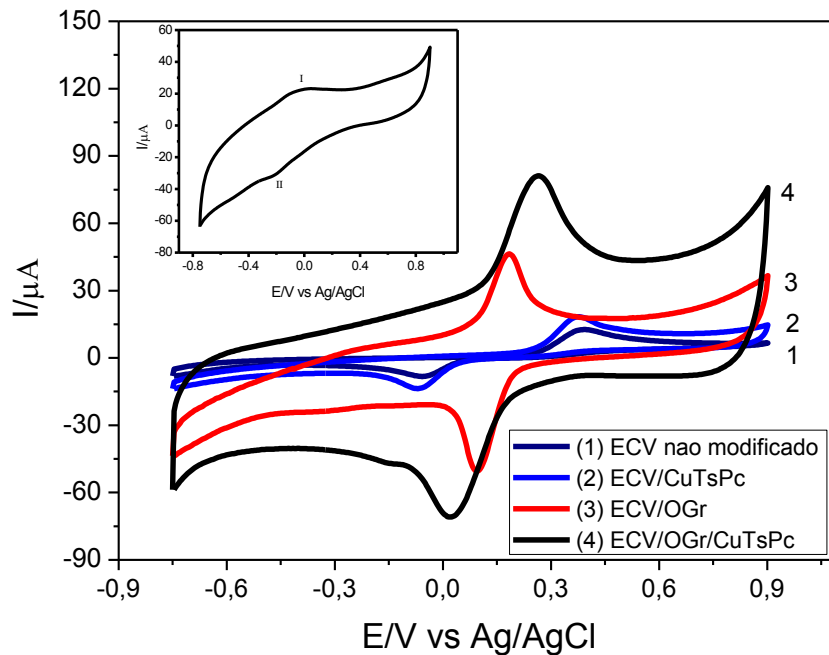


FIGURA 9 - Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ sobre: (1) o eletrodo não modificado; (2) eletrodo modificado apenas com o complexo CuTSPc; (3) o eletrodo modificado apenas com o OGr e (4) o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc. **Figura inserida:** VC referente ao eletrodo modificado com OGr/CuTSPc na ausência do analito. Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução tampão B-R (pH 4.0), $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

A FIGURA 10 mostra o comportamento voltamétrico para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BHA sobre os eletrodos: não modificado (curva 1), modificado com o complexo CuTSPc (curva 2), modificado com o OGr (curva 3) e modificado com o compósito OGr/CuTSPc (curva 4). Considerando-se a varredura anódica, observa-se que BHA apresentou correntes de pico anódicas e potenciais de, respectivamente, $5,10 \mu\text{A}$ e 600 mV para o eletrodo não modificado (FIGURA 10, curva 1); $26,8 \mu\text{A}$ e 490 mV para o eletrodo modificado com CuTSPc; $37,1 \mu\text{A}$ e 480 mV para o eletrodo modificado com OGr e $97,4 \mu\text{A}$ e 467 mV para o eletrodo modificado com o compósito OGr/ CuTSPc (FIGURA 10, curva 4). Desse modo, as correntes de pico obtidas para o eletrodo modificado com: o complexo CuTSPc, o OGr e o compósito OGr/CuTSPc foram, respectivamente, 5,2, 7,3 e 19,0 vezes mais elevada do que aquela observada com o eletrodo não modificado. As intensidades das correntes para o BHA também aumentaram progressivamente no eletrodo de carbono vítreo modificado com CuTSPc, OGr, e OGr/CuTSPc em comparação com o ECV não modificado.

Como pode ser visto, se o OGr ou o CuTSPc não são usados ao mesmo tempo, o BHA apresenta uma corrente de pico com a intensidade mais baixa do que a observada para o ECV/OGr/CuTSPc (FIGURA 10, curva 4). Tal como observado para o TBHQ, o efeito sinérgico do OGr e CuTSPc como co-catalisadores também fornece ao sensor uma maior atividade eletrocatalítica para BHA entre os eletrodos modificados. Além disso, a corrente de pico de BHA para o eletrodo modificado com o composto OGr/CuTSPc foi cerca de 2,6 vezes maior que a observada para o eletrodo modificado com o OGr e 3,5 vezes maior do que a observada para o eletrodo modificado com o CuTSPc. Os valores dos potenciais de oxidação de BHA diminuiu progressivamente com o eletrodo modificado com CuTSPc, OGr, e OGr/CuTSPc em comparação com o eletrodo de carbono vítreo não modificado. Este resultado também sugere que o material composto OGr/CuTSPc melhora a resistência à transferência de carga entre a superfície do eletrodo e o BHA em solução, mesmo não tendo sido observado qualquer processo redox do material composto na região de oxidação de BHA.

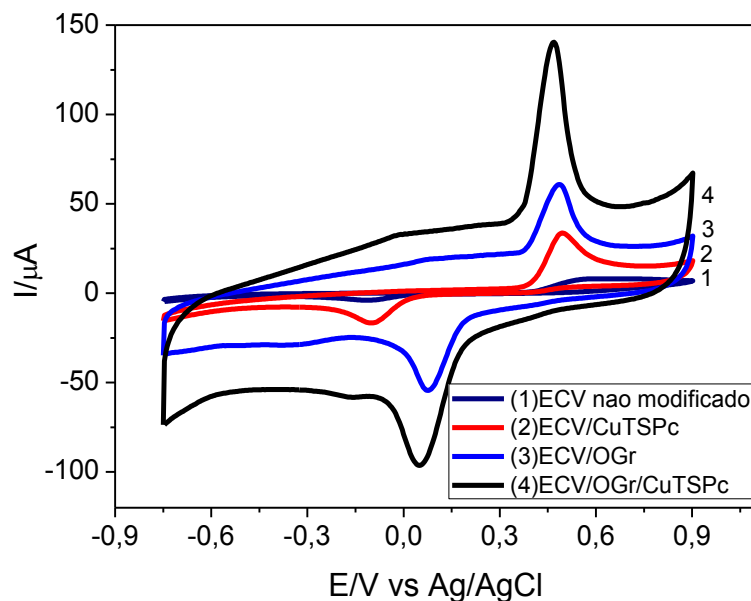


FIGURA 10 - Voltamogramas cíclicos referentes à oxidação/redução de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ BHA sobre: o eletrodo não modificado (1), o eletrodo modificado apenas com CuTSPc (2), o eletrodo modificado com o OGr (3) e o eletrodo modificado com OGr/CuTSPc (4). Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão B-R (pH 4), $v=$ de $0,05 \text{ V s}^{-1}$.

A FIGURA 11 mostra os voltamogramas de varredura linear (VVL) referentes à oxidação da mistura BHA e TBHQ sobre o eletrodo de carbono vítreo não modificado (curva 1) e modificado com o compósito OGr/CuTSPc (curva 2) em tampão B-R (pH 4.0). Na FIGURA 11, curva 1, observa-se que ambos os analitos apresentaram baixas correntes de pico em potenciais anódicos mais positivos. Entretanto, para o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc (FIGURA 11, curva 2), as correntes de pico anódicas para ambos os analitos foram consideravelmente aumentadas, seus perfis de correntes anódicas foram relativamente bem definidos e também seus potenciais foram deslocados para potenciais menos positivos. Neste sentido, como a detecção/quantificação de moléculas em potenciais redox mais próximos à zero é mais vantajoso devido a necessidade de se utilizar uma menor quantidade de energia para oxidar as moléculas, é possível ressaltar mais ainda a importância em se trabalhar com os dois materiais simultaneamente, em detrimento do uso individual de cada material.

Adicionalmente, o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc foi hábil para identificar simultaneamente tanto o BHA como o TBHQ com alta sensibilidade. Essas observações sugerem que o compósito OGr/CuTSPc possui não só uma grande área de superfície a qual ajuda no aumento da corrente de pico para ambos os analitos, mas também melhora a condutividade do eletrodo. Portanto, somando-se a boa condutividade do grafeno e do complexo de cobre tem-se como resultado uma melhora nas propriedades do sensor, o que contribui para a excelente determinação simultânea de BHA e TBHQ.

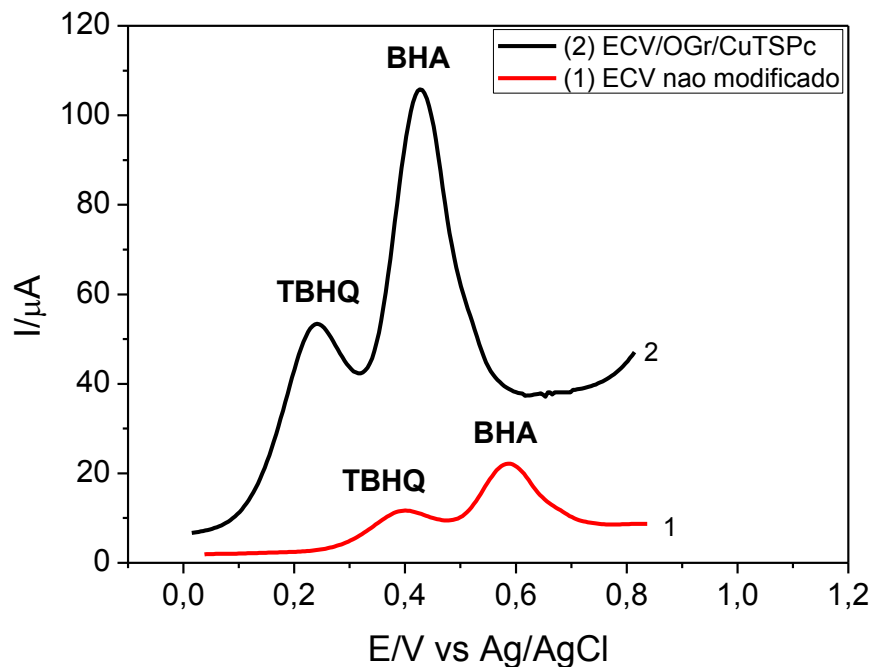


FIGURA 11 -Voltamogramas de varredura linear da mistura TBHQ e BHA empregando o eletrodo não modificado (curva 1) e o eletrodo modificado com OGr/CuTSPc (curva 2). Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão B-R, pH 4. $[\text{BHA}] = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; $[\text{TBHQ}] = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Mais estudos detalhados da corrente de pico foram realizados utilizando-se a voltametria cíclica para se obter mais detalhes em relação à oxidação do TBHQ e BHA sobre a superfície do sensor em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução tampão B-R pH 4. Em uma primeira etapa, o gráfico da corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura foi construído (I_{pa} vs $\nu^{1/2}$) empregando-se as velocidades de 0,01 a 0,1 V, bem como o gráfico do logaritmo da corrente de pico anódico (I_{pa}) versus o logaritmo da velocidade de varredura ($\log \nu$) do qual foram utilizados os mesmos valores de corrente e as mesmas velocidades. O gráfico de I_{pa} versus $\nu^{1/2}$ (FIGURA 12 A) e o gráfico de $\log I_{pa}$ versus $\log \nu$ (FIGURA 12 B) resultaram em uma linha reta. No primeiro caso, a corrente de pico varia linearmente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura, o que significa que o processo redox do analito na superfície do eletrodo ocorre por difusão, ou seja, o transporte de massa é a etapa limitante da reação (BARD e FAULKNER, 2001). No segundo caso observa-se uma correlação linear entre o logaritmo da corrente de pico anódica com o logaritmo da velocidade de varredura, o qual fornece coeficientes angulares de 0,58 para TBHQ e

0,64 para BHA. Para o gráfico de $\log I_{pa}$ versus $\log \nu$, tanto o coeficiente obtido para TBHQ quanto o coeficiente obtido para o BHA foram muito próximos a 0,50 esse fato sugere que reação redox do analito que ocorre na superfície do eletrodo é controlada por difusão (KUMAR e SWETHA, 2001). Neste contexto o gráfico da FIGURA 12 B confirma o resultado obtido na FIGURA 12 A.

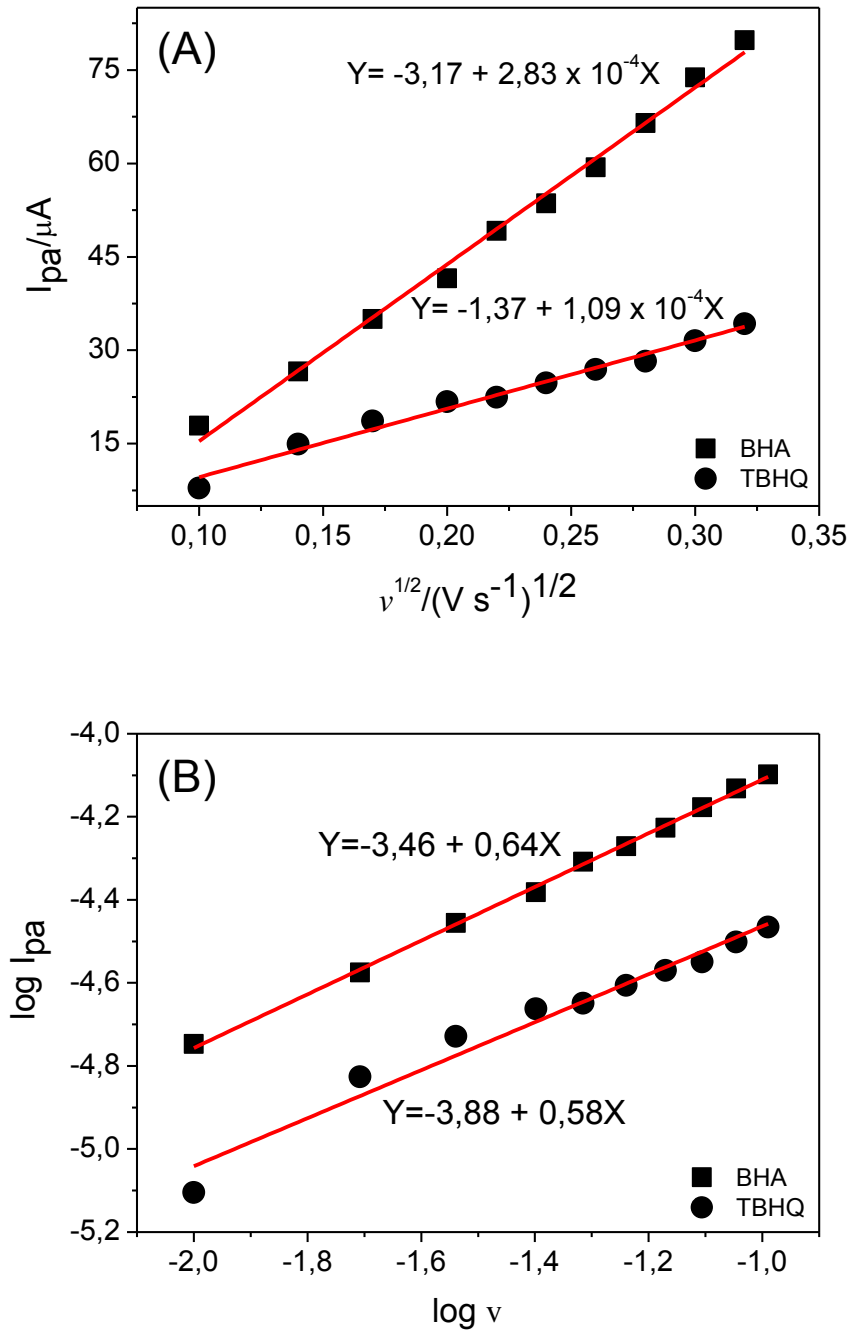


FIGURA 12 -Gráfico de corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura (A) e Gráfico do logaritmo da corrente de pico anódica em função do logaritmo da velocidade de varredura (B). Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R, pH 4. $[\text{TBHQ}] = [\text{BHA}] = 1,8 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09$ e $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

5.3 Otimização de parâmetros experimentais para determinação de TBHQ e BHA

As condições experimentais foram otimizadas considerando as condições mais favoráveis para a detecção individual e simultânea dos antioxidantes BHA e TBHQ comparando os valores das correntes de pico, perfis voltamétricos e reprodutibilidade dos voltamogramas registrados. Assim, a fim de otimizar a resposta do sensor para a oxidação do TBHQ e BHA, a influência do pH da solução tampão B-R $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ na resposta eletroquímica destes analitos foi estudada utilizando-se os valores de pH: 3, 4, 5, 6, 7, e 8. O valor do pK_a para ambos analitos é cerca de 10, sendo assim nesses valores de pH tanto o TBHQ quanto o BHA estão protonados (TAKEMOTO et al., 2009).

A FIGURA 13 A mostra o gráfico de I_p versus pH para o TBHQ e BHA. Com base nesse gráfico observa-se que a corrente é influenciada pelo pH da solução no intervalo de pH investigado. A corrente de pico para o TBHQ e BHA aumentou de pH 3 a 4 e diminuiu do pH 4 a 7 e, a partir de 7 manteve-se constante. Este resultado foi atribuído, supostamente, ao fato do sensor à base de OGr/CuTSPc ter apresentado maior estabilidade em pH 4,0, bem como à uma maior interação entre os antioxidantes BHA e TBHQ com o material compósito. Assim, o valor de pH ótimo para estudos posteriores foi fixado em pH 4.

Já a FIGURA 13 B mostra o gráfico do potencial de pico anódico em função do pH (E_{pa} vs pH para TBHQ e BHA). Esta figura mostra que, com o aumento do pH (3 a 8) o E_{pa} foi deslocado para potenciais menos positivos indicando que o processo redox é influenciado pela protonação do meio (BORREGO et al., 2001). Assim observou-se que para o TBHQ e para o BHA tem-se as equações: $E_{pa} = 0,680 - 0,053 \text{ pH}$ (com $r^2 = 0,997$) e $E_p = 0,464 - 0,050 \text{ pH}$ (com $r^2 = 0,998$), respectivamente. Esses coeficientes angulares obtidos foram similares ao valor teórico ($0,059 \text{ V/pH}$), indicando que o processo de oxidação do TBHQ e do BHA ocorrem com o envolvimento de dois elétrons e dois prótons (DE LA FUENTE et al., 1999). Portanto, um possível mecanismo de oxidação do TBHQ sobre o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc pode ser mostrado na FIGURA 14, a qual mostra que o TBHQ é oxidado à tert-butilquinona via reação de $2H^+$ e $2e^-$. Similar fenômeno também pode ser

observado para o estudo de BHA. Esse mecanismo também foi proposto por Wang e colaboradores (2016).

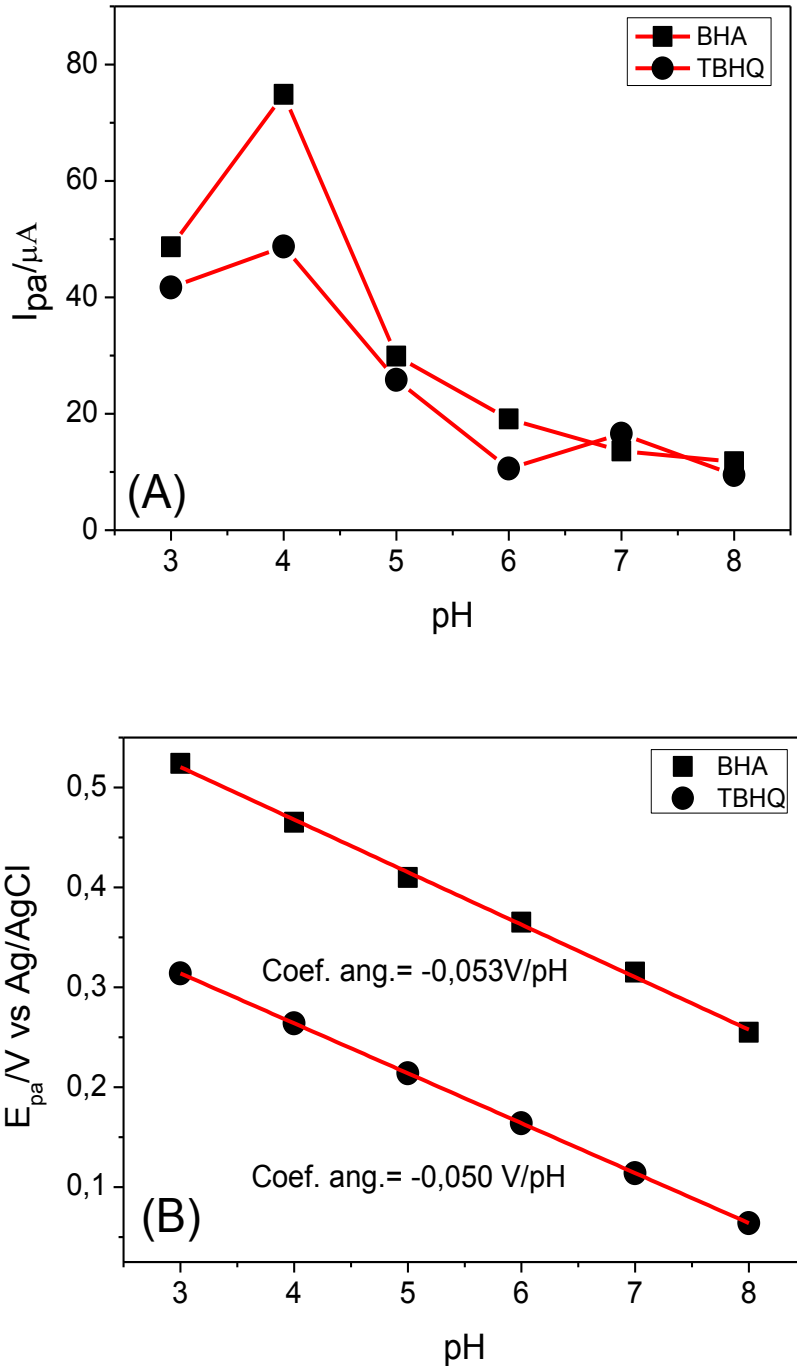


FIGURA 13 - Influência do pH sobre: (A) a corrente de pico anódica e (B) potencial de pico anódico do TBHQ e BHA. Experimentos conduzidos em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão B-R, em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ TBHQ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ BHA. $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

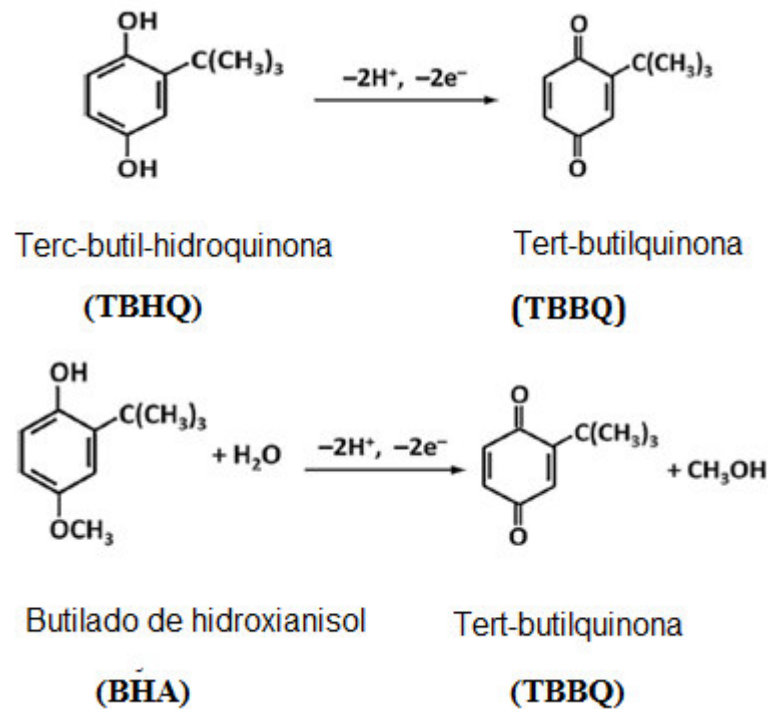


FIGURA 14 - Mecanismo de oxidação proposto para os antioxidantes TBHQ e BHA sobre o sensor à base de OGr/CuTSPc.

Adicionalmente estudou-se o efeito do tipo de solução-tampão sobre a corrente de pico anódica do TBHQ e BHA obtida com o sensor. A resposta deste foi verificada em quatro diferentes tipos soluções-tampão (citrato, acetato, fosfato e B-R) numa concentração de 0,04 mol L⁻¹, pH 4.

Os valores de corrente de pico obtidos para os tampões citrato, acetato, fosfato, e BR são mostrados na FIGURA 15. O tampão B-R foi que apresentou melhor desempenho de corrente, o que pode estar associado à alta mobilidade iônica dos íons TBHQ e BHA neste tampão, possibilitando uma melhor transferência eletrônica entre a superfície do eletrodo e os analitos em solução. Neste sentido, o tampão B-R foi escolhido para outros estudos.

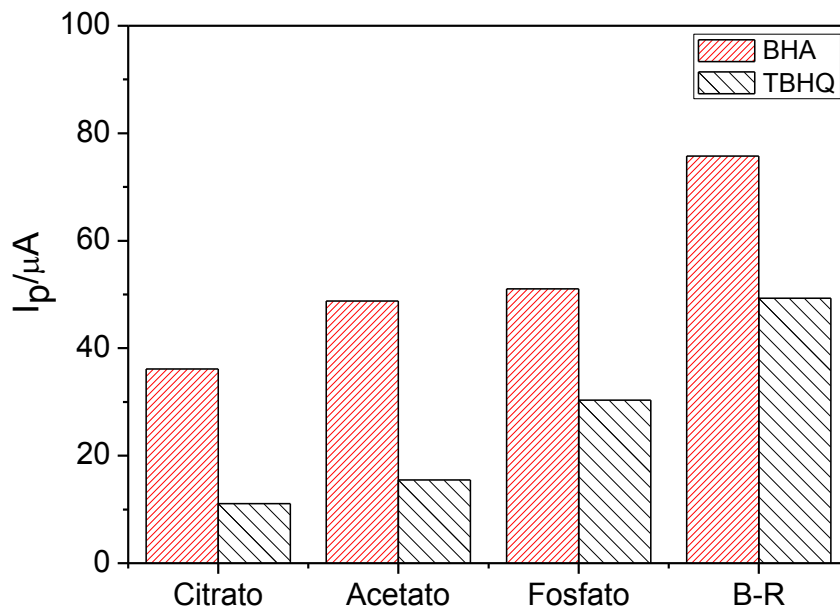


FIGURA 15 - Influência de diferentes soluções tampão de concentração $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4) sobre as correntes de pico anódicas (I_{pa}) referentes à oxidação de BHA e TBHQ. $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. $[\text{TBHQ}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $[\text{BHA}] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$. $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Além disso, o efeito da concentração do tampão B-R sobre a corrente de pico anódica dos analitos foi estudado por voltametria cíclica. O estudo foi realizado nas concentrações $0,024$, $0,040$, $0,10$ e $0,14 \text{ mol L}^{-1}$, conforme apresentado na FIGURA 16. Para BHA e para o TBHQ, a resposta do sensor aumentou nas concentrações do tampão B-R de $0,024$ até $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ e foi quase constante para concentrações entre $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,14 \text{ mol L}^{-1}$. Uma melhor resposta foi observada em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ devido a mesma proporcionar uma maior eletroneutralidade à superfície do sensor, garantindo assim que a resposta dos analitos não seja influenciada pelas cargas que surgem no eletrodo durante a aplicação do potencial ao eletrodo de trabalho. Neste sentido, a concentração da solução tampão B-R foi mantida em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ para os demais experimentos, uma vez que com esta concentração observou-se um valor de corrente mais elevado para ambos analitos.

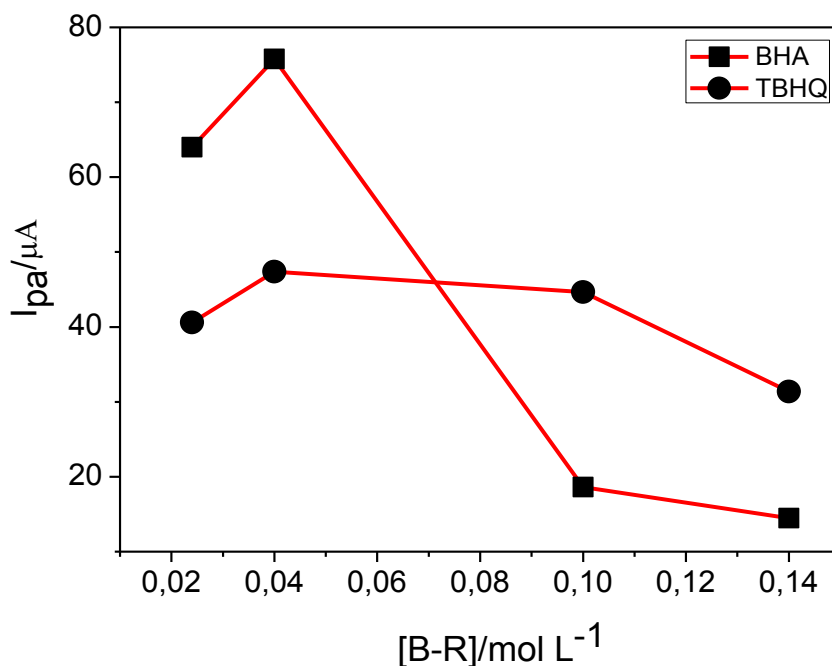


FIGURA 16 -Gráfico da corrente de pico anódica para o BHA e TBHQ em função de diferentes concentrações de solução tampão B-R. [TBHQ]=100 µmol L⁻¹ e [BHA]=100 µmol L⁻¹. $v=0,05$ V s⁻¹.

5.4 Determinações individual e simultânea de BHA e TBHQ empregando a voltametria de pulso diferencial (VPD): Caracterização analítica do sensor à base de OGr/CuTSPc

As determinações individual e simultânea de TBHQ e BHA foram realizadas por VPD em solução tampão B-R, pH 4 utilizando-se o tampão B-R nas condições otimizadas e uma velocidade de varredura de $0,1$ V s⁻¹ com uma amplitude de pulso de $0,06$ V. Essa velocidade e esta amplitude foram escolhidas após estudos prévios envolvendo diferentes velocidades de varredura ($0,01$ a $0,15$ V s⁻¹) e após a escolha desta velocidade, a mesma foi fixada para então realizar-se a variação da amplitude de pulso ($0,01$ a $0,1$ V). As correntes de pico para ambos os analitos aumentaram linearmente até $0,1$ V s⁻¹ emantiveram-se praticamente constante após esta velocidade. Sendo assim, fixou-se a velocidade em $0,1$ V s⁻¹ e variou-se a amplitude a qual forneceu maior valor de corrente de pico entre os valores $0,06$ e $0,1$ V. Entretanto, considerando um melhor compromisso entre o perfil voltamétrico e a sensibilidade do sensor para ambos os analitos optou-se em trabalhar com uma amplitude de $0,06$ V.

Em uma primeira etapa realizou-se a determinação individual de ambos os analitos. Assim as FIGURAS 17 A e 17 B mostram os VPD para a determinação de TBHQ e BHA. Os voltamogramas destas figuras mostram que o aumento da concentração para cada analito proporcionou um aumento na corrente de pico. Este aumento foi proporcionalmente linear no intervalo de concentração de 0,1 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para 8 concentrações de cada analito, com um coeficiente de correlação linear $r^2=0,997$ para o TBHQ e $r^2=0,997$ para o BHA. As curvas analíticas para ambos os analitos estão inseridas nas Figuras 17 A e 17 B.

As equações da reta para o TBHQ e BHA foram respectivamente, $I_p(\mu\text{A})= 1,65 + 1,23C$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e $I_p(\mu\text{A})= 1,98 + 1,54C$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$). De acordo com essas equações observa-se que os coeficientes angulares para o TBHQ e BHA foram, respectivamente, $1,23 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ e $1,54 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$.

Já a FIGURA 18 mostra os VPD para a determinação simultânea de TBHQ e BHA na mesma faixa de concentração estabelecida para a determinação individual de TBHQ e BHA. De acordo com esta figura observa-se também uma correlação linear entre a corrente de pico e a concentração dos antioxidantes numa faixa de concentração entre 0,1 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com as seguintes equações da reta: $I_p(\mu\text{A})= -2,29 + 1,10C$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$), para o TBHQ e $I_p(\mu\text{A})= 1,98 + 1,36C$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$), para BHA para $n=10$ e $r^2=0,998$. Assim as sensibilidades foram, respectivamente, $1,10 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ e $1,36 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$ para TBHQ e BHA. Esses resultados mostram que a determinação simultânea dessas espécies proporcionou coeficientes angulares ou sensibilidades de apenas 14% menores que as obtidas pela determinação individual desses compostos. Entretanto, a determinação simultânea de espécies é mais vantajosa devido ao custo e a economia de tempo para a realização das análises. Portanto, para estimar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) utilizou-se os coeficientes angulares obtidos para a determinação simultânea do TBHQ e BHA. Estes limites foram determinados utilizando-se as relações estatísticas $3 \times \text{DP}_{\text{branco}}/b$, e $10 \times \text{SD}_{\text{branco}}/b$, onde $\text{SD}_{\text{branco}}$ é o desvio padrão para várias medidas do sensor (várias correntes) na ausência de cada analito (THOMPSON *et. al.*: IUPAC, 2002). Para a obtenção dessas correntes utilizou-se o potencial em que ocorre a oxidação dos compostos. O b representa o coeficiente angular das curvas analíticas para o TBHQ e para o BHA.

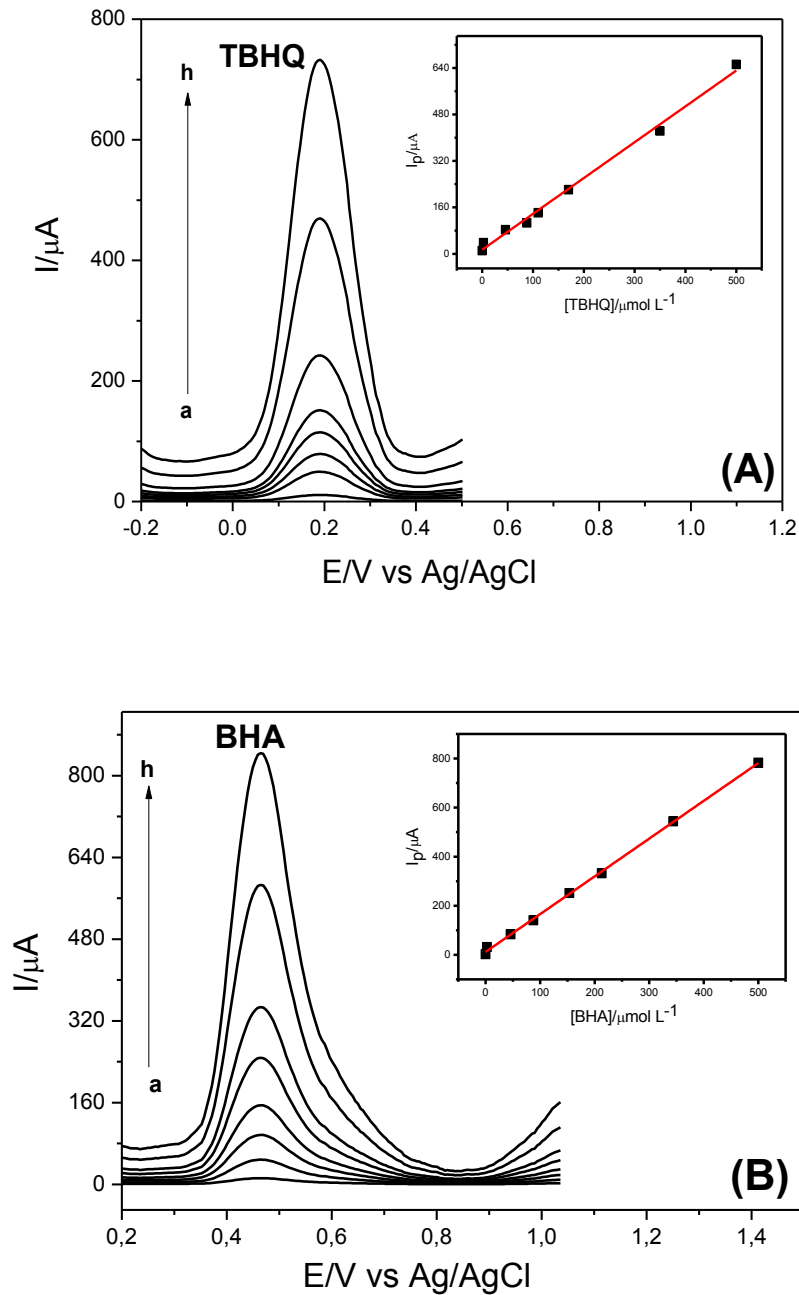


FIGURA 17 - (A) e (B) VPD referentes à oxidação de TBHQ e BHA sobre o eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão B-R (pH 4) nas seguintes concentrações: 0,1; 14,0; 30,0; 55,0; 85,0; 150,0; 300,0 e $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou 0,017 – 83,10 mg L^{-1} de TBHQ (a-h, respectivamente) e 0,1; 2,5; 46,0; 88,0; 154,0; 213,0; 344,0 e $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou 0,018 – 90,12 mg L^{-1} para o BHA (a-h, respectivamente). Inserções das Figuras 17A e 17B: Curvas analíticas para o TBHQ. $v=0,1 \text{ V s}^{-1}$ e Amplitude de pulso= $0,06 \text{ V}$.

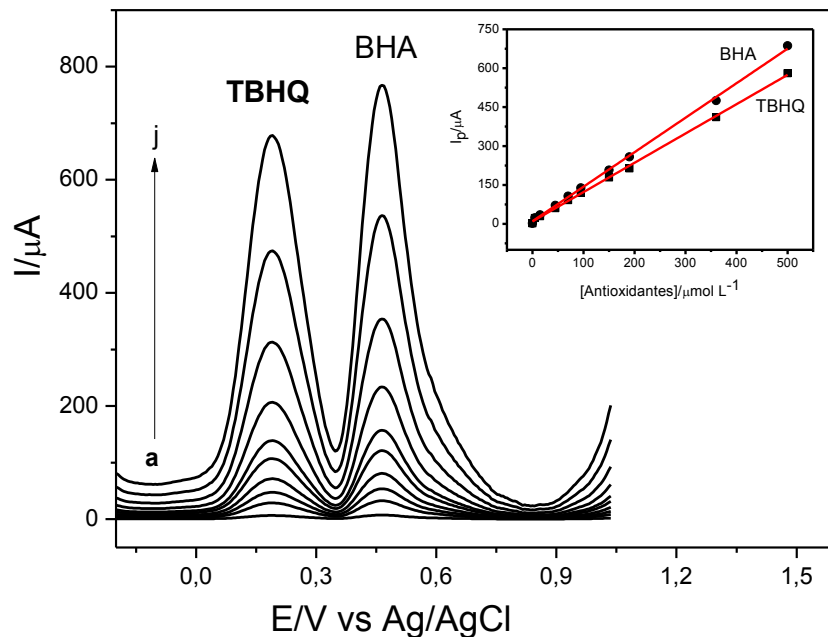


FIGURA 18 -VPD referentes à oxidação da mistura TBHQ e BHA. Inserção: Curvas analíticas para a oxidação do TBHQ e BHA nas seguintes concentrações: 0,1, 2,5, 5,0, 15,0, 35,0, 60,0, 100,0, 190,0, 360,0, e 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para ambos os analitos (a-j, respectivamente), ou 0,017 – 83,10 mg L^{-1} para TBHQ e 0,018 – 90,12 mg L^{-1} BHA. Experimentos conduzidos em 0,04 mol L^{-1} de solução tampão B-R, pH 4. $v=0,1 \text{ V s}^{-1}$ e amplitude de pulso=0,06 V.

Os parâmetros analíticos para o TBHQ e BHA determinados neste trabalho, tais como, a faixa linear de trabalho, as sensibilidades e limites de detecção foram comparados com os obtidos em outros trabalhos descritos na literatura (TABELA 3). De acordo com esta tabela observa-se que, de um modo geral, a maioria desses parâmetros foram melhores quando comparados com os parâmetros obtidos por outros pesquisadores. Das referências apresentadas na TABELA 3, o único trabalho citado que mostra uma sensibilidade para o TBHQ maior do que a obtida no presente trabalho foi a referência Wang et al (2016). A sensibilidade obtida nesta referência para a determinação de TBHQ foi de 1,49 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$, enquanto que neste trabalho foi de 1,10 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$. Estas sensibilidades podem ser atribuídas à eficiência da transferência de elétrons entre o eletrodo modificado com o composto OGr/CuTSPc e os antioxidantes TBHQ e BHA, a qual pode ter sido favorecida por uma forte dispersão do complexo CuTSPc no grafeno.

TABELA 3 - Comparação de algumas características de vários eletrodos modificados para a determinação de TBHQ e BHA

Material	Analito	Faixa linear	LOD	Sensibilidade	Refs.
SPE-MWCNT ^a	TBHQ	0,50– 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,126 A mol ⁻¹ L	CARAMIT et al.,2013
	BHA	0,50 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,176 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,199 A mol ⁻¹ L	
MWCNT/GE ^b	TBHQ	4,0 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,000033 A mol ⁻¹ L	THOMAS et al.,2015
Au-SnO ₂ /GNs-SWCNTs /GCE ^c	TBHQ	0,05 – 230 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,40 A mol ⁻¹ L	DU et al.,2014
GCE/IrOxNPs ^d	BHA	1 – 280 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,11 A mol ⁻¹ L	ROUSHAN I e SARABAE G,2014
AuNPs/GCE ^e	TBHQ	1,20 – 16,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,48 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	LIN et al.,2013
	BHA	0,55 – 8,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	
ECCM-resin-Cu(II) ^f	BHA	0,34 – 41 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,86 A mol ⁻¹ L	FREITAS e FATIBELLO, 2010
Mn(II)Fe(CN) ₆ g	BHA	0,50 – 1429 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,12 A mol ⁻¹ L	JAYASRI e NARAYANAN,2007
NiHCF/GWCE ^h	BHA	1,2 – 1070 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,21 A mol ⁻¹ L	PRABAKAR e NARAYANAN, 2010
AgHCF/PIGE ⁱ	BHA	7,4 – 830 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,062 A mol ⁻¹ L	JAYASRI, e NARAYANAN, 2006
Graphene/Ch/GCE ^j	TBHQ	0,40 – 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,49 A mol ⁻¹ L	WANG et al.,2016
	BHA	0,60 – 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,19 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,57 A mol ⁻¹ L	
NAPCF/PIGE ^l	BHA	0,624 - 219 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,249 $\mu\text{mol L}^{-1}$	-	KUMAR e NARAYANAN, 2008
rGO/CuTSPc/GCE	TBHQ	0,1 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,045 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,10 A mol ⁻¹ L	Este trabalho
	BHA	0,1 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,036 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,36 A mol ⁻¹ L	
	TBHQ	0,017 – 83,10 mg L ⁻¹	7,48 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,0083 A g ⁻¹ L	
	BHA	0,018 – 90,12 mg L ⁻¹	6,49 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,0055 A g ⁻¹ L	

a-nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificado com eletrodos serigrafados, b-nanotubos de carbono de multicamadas modificado com eletrodo de ouro,c-SWCNTsnanotubos de carbono de parede única; GNs,nanofolhas de grafenos; GOs, óxidos de grafeno; GCE, eletrodo de carbono vítreo, d- eletrodo de carbono vítreo modificado por nanopartículas de óxido de irídio, e-eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro, f- eletrodo compósito de carbono modificado com Cu₃ (PO₄)₂ imobilizada em resina de poliéster, g-método de composição de grafite-cera com hexacianoferrato de manganês (II), h-método níquel hexacianoferrato de níquel (NiHCF) modificado com superfície de grafite-cera, i-eletrodo compósito de grafite-cera quimicamente modificado com hexacianoferrato de prata (AgHCF), j- Ch: nanopartículas de coluna, l- eletrodo modificado com aquapentacianoferrato de níquel (NAPCF) preparado pela imobilização mecânica no eletrodo de grafite.

5.5 Aplicação do sensor em amostras de biodiesel

A fim de se avaliar a aplicação do sensor para os antioxidantes TBHQ e BHA, os efeitos da matriz foram avaliados utilizando-se testes de recuperação efetuados com amostras de biodiesel de babaçu e biodiesel de soja. Inicialmente, verificou-se que amostras de biodiesel não apresentaram quaisquer sinais de oxidação para os antioxidantes estudados. Assim, as mesmas foram fortificadas com diferentes concentrações de TBHQ e BHA, as quais foram apresentadas na TABELA 2:

A TABELA 4 mostra as recuperações de TBHQ e BHA obtidas com o método proposto. Os resultados mostram que não há nenhuma influência da matriz sobre a resposta do sensor. As recuperações obtidas variaram entre 99,5 a 100,8% para o TBHQ e entre 99,1 a 100,2% para o BHA, o que indica claramente a aplicabilidade e a boa exatidão do método proposto.

A TABELA 5 mostra também uma comparação entre os resultados obtidos com o método eletroquímico e o método de referência para análise das amostras de biodiesel. Neste sentido, a aplicação do teste t de *Student* pareado foi utilizado para verificar se existe diferença significativa entre esses dois métodos e, foi possível observar que, no nível de confiança de 95%, não houve diferença estatística entre a referência e o método proposto.

TABELA 4 -Valores de recuperação obtidos para o TBHQ e BHA para seis amostras de biodiesel (n = 3).

Amostras	Analitos	[Antioxidante] adicionada (mg L ⁻¹)	[Antioxidante] determinada (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Recupera ção (%)
A*	BHA	64,0	63,9 (±0,1)	0,1	99,8
	TBHQ	59,0	58,8 (±0,3)	0,2	99,7
B**	BHA	60,0	60,1 (±0,5)	0,1	100,2
	TBHQ	55,0	54,7 (±0,2)	0,4	99,5
C*	BHA	55,0	55,1 (±0,1)	0,1	100,2
	TBHQ	50,0	49,9 (±0,5)	0,1	99,8
D**	BHA	50,0	49,8 (±0,4)	0,3	99,6
	TBHQ	45,0	45,2 (±0,2)	0,4	100,4
E*	BHA	45,0	44,6 (±0,4)	0,6	99,1
	TBHQ	41,0	41,2 (±0,5)	0,3	100,5
F**	BHA	40,0	39,7 (±0,1)	0,5	99,3
	TBHQ	36,0	36,3 (±0,3)	0,6	100,8

*biodiesel de babaçu; **biodiesel de soja; DPR=Desvio padrão relativo.

TABELA 5 - Comparação entre o método proposto e o método comparativo.

Amostras de biodiesel	Analito	Método Proposto	Método HPLC (SAAD, 2007)
		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
A*	BHA	63,9 (±0,1)	63,7 (±0,1)
	TBHQ	58,8 (±0,3)	58,8 (±0,5)
B**	BHA	60,1 (±0,5)	60,0 (±0,3)
	TBHQ	54,7 (±0,2)	54,7 (±0,4)
C*	BHA	55,1 (±0,1)	55,1 (±0,6)
	TBHQ	49,9 (±0,5)	50,0 (±0,1)
D**	BHA	49,8 (±0,4)	49,9 (±0,2)
	TBHQ	45,2 (±0,2)	45,2 (±0,3)
E*	BHA	44,6 (±0,4)	44,6 (±0,1)
	TBHQ	41,2 (±0,5)	41,2 (±0,1)
F**	BHA	39,7 (±0,1)	39,7 (±0,3)
	TBHQ	36,3 (±0,3)	36,2 (±0,6)

*biodiesel de babaçu; **biodiesel de soja; Os valores são uma média de três replicatas.

5.6 Repetibilidade das medidas, no preparo do sensor e estudo da estabilidade

A precisão do sensor foi avaliada através do estudo da repetibilidade das medidas voltamétricas, sendo a mesma avaliada por meio dos desvios-padrão relativos (DPR) para oito determinações de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ TBHQ e BHA (TABELA 6). O DPR para o TBHQ e BHA foram, respectivamente, 0,58 e 2,0% mostrando que o sensor apresenta uma boa repetibilidade para as medidas.

TABELA 6 - Avaliação da repetibilidade de medidas obtidas com o ECV/OGr/CuTSPc para os antioxidantes TBHQ e BHA.

	Medida	1	2	3	4	5	6	7	8
TBHQ	i_p (μA)	33,90	33,93	33,95	33,41	33,83	34,01	34,00	33,97
	Média das medidas:	33,87				DPR: 0,58%			
	Medida	1	2	3	4	5	6	7	8
BHA	i_p (μA)	50,64	51,24	51,79	52,14	52,39	52,82	52,99	53,17
	Média das medidas:	52,15				DPR: 2,0%			

Adicionalmente, uma série de oito sensores foram preparados do mesmo modo e testados em solução tampão B-R, pH 4, contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ TBHQ e BHA (TABELA 7). Os resultados apresentados nesta tabela mostram que o sensor proposto forneceu um DPR inferior a 5%, sugerindo que o mesmo apresenta uma boa estabilidade do material na superfície do eletrodo, devido, provavelmente à boa adsorção do óxido de grafeno reduzido na superfície do sensor, bem como à capacidade de fixação do mesmo frente ao complexo CuTSPc.

TABELA 7 - Avaliação da repetibilidade do preparo de ECV/OGr/CuTSPc em diferentes dias para os antioxidantes TBHQ e BHA.

	Sensor	1	2	3	4	5	6	7	8
TBHQ	I_p (μ A)	42,79	43,30	43,77	44,06	44,27	44,64	44,78	44,93
Média das medidas: 44,06					DPR: 1,69%				
	Sensor	1	2	3	4	5	6	7	8
BHA	I_p (μ A)	56,40	55,77	53,35	55,11	51,87	55,76	55,75	53,36
Média das medidas: 54,67					DPR: 3,15%				

A estabilidade do eletrodo modificado com o compósito OGr/CuTSPc foi avaliada realizando-se 100 medidas por VPD referentes à oxidação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ e BHA sobre o eletrodo modificado, nenhuma mudança significativa foi observada no comportamento voltamétrico do eletrodo indicando que o sistema apresentou uma boa estabilidade. Além disso, o sensor foi testado num período de 30 dias para avaliação da sua resposta. O valor da resposta analítica encontrado inicialmente foi considerado como 100% e os valores obtidos nos dias subsequentes foram calculados como porcentagem desse valor inicial e observou-se que não houve variações significativas na resposta analítica do sensor no período de tempo avaliado, o que caracteriza o sensor desenvolvido como estável durante o período avaliado. O sensor foi armazenado em temperatura ambiente durante os trinta dias. Estes estudos foram realizados empregando-se as condições experimentais e operacionais otimizadas.

5.7 Estudo de interferentes

A seletividade do eletrodo modificado foi avaliada examinando a influência de possíveis substâncias interferentes sobre a detecção de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TBHQ e BHA presentes na solução tampão B-R, $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4.

Os resultados indicaram que concentrações 100 vezes maiores das espécies avaliadas (BHT, glicerol, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , I^- e SO_4^{2-}), não interferem na determinação de BHA e (TABELA 8). O maior valor de erro relativo obtido neste estudo foi de 1,25%, sendo, portanto evidente que através da exploração da oxidação das espécies, o sensor eletroquímico foi capaz de fornecer boa seletividade para detecção de BHA e TBHQ, sem qualquer interferência de substâncias comumente coexistentes.

Estes resultados indicaram que a determinação destes compostos em amostras de biodiesel não foi significativamente afetada por esses possíveis interferentes.

TABELA 8 -Influência de substâncias que podem coexistir na determinação de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ BHA e TBHQ (n = 4).

Interferentes	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	BHA	TBHQ
		Erro relativo (%)	Erro relativo (%)
BHT	100	0,10 ($\pm 0,03$)	0,50 ($\pm 0,01$)
Glicerol	100	1,00 ($\pm 0,06$)	0,80 ($\pm 0,01$)
Na ⁺	100	0,80 ($\pm 0,02$)	1,10 ($\pm 0,03$)
K ⁺	100	1,20 ($\pm 0,05$)	1,05 ($\pm 0,02$)
Mg ²⁺	100	0,75 ($\pm 0,01$)	0,45 ($\pm 0,03$)
Ca ²⁺	100	1,25 ($\pm 0,02$)	0,32 ($\pm 0,09$)
I ⁻	100	0,30 ($\pm 0,05$)	0,51 ($\pm 0,03$)
SO ₄ ²⁻	100	1,01 ($\pm 0,10$)	0,08 ($\pm 0,02$)

5.8 Avaliação das figuras de mérito e considerações finais sobre o ECV/OGr/CuTSPc

A validação da metodologia desenvolvida foi realizada com base nas seguintes figuras de mérito: exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e faixa de linearidade, conforme pode ser observado na TABELA 9.

A exatidão do sensor proposto foi atestada pelos satisfatórios resultados dos estudos de adição e recuperação dos analitos obtidos em todas as amostras analisadas. A precisão foi considerada satisfatória após a verificação da repetibilidade das medidas e a repetibilidade no preparo do sensor. Os desvios padrão relativos entre as correntes de pico encontrados em ambos os testes foram inferiores a 5%.

O estudo de interferentes permitiu caracterizar o sensor como seletivo, uma vez que substâncias comumente coexistentes em amostras de biodiesel não afetaram a determinação de TBHQ e BHA nas amostras analisadas.

O sensor proposto apresentou valores de LOD, LOQ, sensibilidade e linearidade melhores ou similares que muitos trabalhos encontrados na literatura para a determinação dos analitos utilizando outros eletrodos. Aspectos que, aliados à simplicidade da modificação, tornam o sensor interessante para a determinação destes analitos.

Analisando a linearidade obtida entre a corrente de pico e a concentração do TBHQ e BHA, observa-se que o valor do coeficiente de correlação linear, r , obtido resulta em um valor de r^2 igual a cerca de 0,998 para ambos os analitos, o que significa que 99,8% das correntes de pico determinadas podem ser explicadas pela relação linear entre a corrente e a concentração dos analitos no intervalo de concentração entre 0,1 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Pelo exposto, ressalta-se que o sensor proposto pode ser considerado válido e, portanto, é adequado para a determinação de TBHQ e BHA.

TABELA 9 -Figuras de mérito determinadas na validação do método analítico proposto.

Figura de mérito	Teste realizado	Resultados	
		TBHQ	BHA
Exatidão	Adição e Recuperação	Satisfatório	
Precisão	Repetibilidade de medidas	DPR= 0,58%	DPR= 2%
	Repetibilidade no preparo do sensor (Reprodutibilidade)	DPR< 5 %	
Seletividade	Estudo de interferentes	Satisfatório	
		0,045 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 7,48 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	0,036 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 6,49 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹
LOD	–	1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	
LOQ	–	16,6 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹	18,02 x 10 ⁻³ mg L ⁻¹
Linearidade	–	0,1 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o presente trabalho apresentou as seguintes conclusões:

- ✓ O sensor à base de grafeno e CuTSPc proporcionou uma excelente resposta eletroquímica para a oxidação dos antioxidantes TBHQ e BHA, a qual foi muito maior que a resposta observada para o eletrodo não modificado;
- ✓ Os espectros obtidos para o OGr, CuTSPc, bem como para o OGr/CuTSPc demonstraram que as moléculas de CuTSPc adsorveram sobre a superfície do grafeno, pois não foi observado o aparecimento de novos picos no espectro do OGr/CuTSPc;
- ✓ O sensor mostrou-se bastante seletivo para a determinação simultânea dos dois analitos estudados na presença de outras espécies comumente encontradas em amostras de biodiesel;
- ✓ As faixas lineares de resposta para o TBHQ e BHA, bem como o LOD e a sensibilidade foram relativamente melhores que os trabalhos descritos da literatura;
- ✓ O sensor também apresentou boa repetibilidade para as medidas e para o preparo do sensor, os quais foram avaliadas em termos de desvio padrão relativo para TBHQ e BHA com DPR < 5%;
- ✓ O sensor proposto foi aplicado em amostras de biodiesel contendo TBHQ e BHA e os resultados estão de acordo com os obtidos pelo método de referência descrito na literatura, mostrando que o sensor proposto é uma boa alternativa para a determinação desses antioxidantes em amostras de biodiesel, bem como para outras matrizes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. Honeycomb carbon: a review of graphene. **Chem. Rev.** 2010, 110: 132-145.

ALMEIDA, E. S.; PORTELA, F. M.; SOUSA, R. M. F.; DANIEL, D.; TERRONES, M. G. H.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Behaviour of the antioxidant tert-butylhydroquinone on the storage stability of corrosive character of biodiesel. **Fuel** 2011, 90: 3480-3484.

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from vegetable oil and waste animal fats in a pilot plant. **Wast Management** 2014, 34: 2146-2154.

AMARANTE Jr., O. P. de; BRITO, N. M.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente** 2003, 13: 129-146.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa** 2001, 12: 116-131.

ARAÚJO, T. A.; BARBOSA, A. M. J.; VIANA, L. H.; FERREIRA, V. S. Voltammetric determination of tert-butylhydroquinone in biodiesel using a carbon paste electrode in the presence of surfactant. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 2010, 79: 409-414.

AROCA, R.; THEDCHANAMOORTHY, A. Vibrational studies of molecular organization in evaporated phthalocyanine thin solid films. **Chemistry of Materials** 1995, 7: 69-74.

ARSLANOGLU, Y.; KOCA, A.; HAMURYUDAN, E. The synthesis and electrochemical study of novel phthalocyanines substituted with a crown ether and alkyl chains. **Dyes Pigments** 2011, 88: 135-142.

BARD, J; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (second ed.) **John Wiley & Sons**, Hoboken, NJ, 2001.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico** 2002, 64: 175-177.

BERMAN, P.; MEIRI, N.; LINDER, C.; WIESMAN, Z. ^1H low field nuclear magnetic resonance relaxometry for probing biodiesel autoxidation. **Fuel**, 2016, 177: 315-325.

BERTONCELLO, P.; PERUFFO, M. An investigation on the self-aggregation properties of sulfonated copper (II) phthalocyanine (CuTsPc) thin films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 2008, 321: 106-112.

BLAKE, P.; BRIMICOMBE, P. D.; NAIR, R. R.; BOOTH, T. J.; JIANG, D.; SCHEDIN, F.; PONOMARENKO, L. A.; MOROZOV, S. V.; GLEESON, H. F.; HILL, E. W.; GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. Graphene-based liquid crystal device. **Nano Letters** 2008, 8: 1704-1708.

BORSATO, D.; CINI, J. R. M.; SILVA, H. C. da; COPPO, R. L.; ANGILELLI, K. G.; MOREIRA, I.; MAIA, E. C. R. Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. **Fuel Processing Technology** 2014; 127: 111-116.

BRODIE, B. C. On the atomic weight of graphite, *Philos. Trans. R. Soc. London* 1859, 149: 249-259.

BURAT, A. K.; KOCA, A.; LEWTAK, J. P.; GRYKO, D. T. Preparation, electrochemistry and optical properties of unsymmetrical phthalocyanines bearing morpholine and *tert*-butylphenoxy substituents. **Synthetic Metals** 2011, 161: 1537-1545.

CAPITAN-VALLVEY, L. F.; VALENCIA, M. C.; NICOLAS, E. A. Monoparameter sensors for the determination of the antioxidants butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in foods and cosmetics by flow injection spectrophotometry. **Analyst** 2001, 126: 897-902.

CARAMIT, R. P.; ANDRADE, A. G. F.; SOUZA, J. B. G.; ARAÚJO, T. A.; VIANA, L. H.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Fuel** 2013, 105: 306-313.

CASTRO NETO, A.; GUINEA, F.; PERES, N.; NOVOSELOV, K.; GEIM, A. The electronic properties of graphene. **Rev. Modern Physics** 2009, 81: 109-155.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chrom.g. B: Biomed. Sci.** 1997, 689: 175-180.

CHAURE, S.; PAUL, D.; VADAGMA, P.; RAY, A. K. Spectroscopic investigation of sulfonate phthalocyanine top robe enzyme reactions for heavy metals detection. **J. Hazard. Mat.** 2010, 173: 253-257.

CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V. Supramolecular assemblies of metallophthalocyanines: Physicochemical properties and applications. **Catalysis and Phytochemistry in Heterogeneous Media, Kerala: Research Signpost** 2007, 27: 1-15.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Pure Appl. Chem.** 1995, 67:1699-1723.

DE LA FUENTE, C.; ACUÑA, J. A.; VÁZQUEZ, M. D.; TASCÓN, M. L.; BATANERO, P. S. Voltammetric determination of the phenolic antioxidants 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone at a polypyrrole electrode modified with a nickel phthalocyanine complex. **Talanta** 1999, 49: 441-452.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion and Management** 2008, 49: 2106-2116.

DING, M.; ZOU, J. K. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. **Food Chem.** 2012, 131: 1051-1055.

DINKOV, R.; HRISTOV, G.; STRATIEV, D.; ALDAYRI, V. B. Effect of commercially available antioxidants over biodiesel/diesel blends stability. **Fuel** 2009, 88: 732-737.

DREYER, R. D.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chem. I Soc. Ver.** 2010, 39: 228-240.

DU, Y.; XIN GAO, X.; YE, X.; ZHENG, Z.; FENG, Q.; WANG, C.; WU, K. Composition and architecture-engineered Au–SnO₂/GNs-SWCNTs nanocomposites as ultrasensitive and robust electrochemical sensor for antioxidant additives in foods. **Sensor Actuat. B** 2014, 203: 926-934.

DUNN, R. O. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). **Fuel Process. Technol.** 2005, 86: 1071-1085.

FREITAS, K. H. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin. **Talanta** 2010, 81: 1102-1108.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Mater.** 2007, 6: 183-191.

GRANGEIRO JUNIOR, S.; ALBURQUERQUE, M.M.; SOARES SOBRINHO, J. L.; BEDOR, D. C.; ROLIM NETO, P.J.; STRATTMANN, R. R. Validação da metodologia analítica de comprimido à base de nevirapina. **Controle de Contaminação** 2004, 65: 24-28.

GUADALUPE, A. R.; ABRUNA, H. D. Electroanalysis with chemically modified electrodes. **Anal. Chem.**1985, 57: 142-149.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 2015, 42: 712-725.

GUZMAN, R.; TANG, H.; SALLEY, S.; SIMON NG, K. I. Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil- and poultry fat-based biodiesel. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 2009, 86: 459-467.

HUMMERS, W.S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **J. Am.Chem. Soc.**1958, 80: 1339-1339.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, rev. 2, 2007.

International Conference on Harmonisation (ICH); Guidance for Industry Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures, March 1995.

International Conference on Harmonisation (ICH); Guidance for Industry International Conference on Harmonisation: ICH Harmanised Tripartite Guideline.Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), nov. 2005.

JAYASRI, D.; NARAYANAN, S. S. Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite–wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst. **Sensors Actuat. B** 2006, 119: 135-142.

JAYASRI, D.; NARAYANAN, S. S. Manganese (II) hexacyanoferrate based renewable amperometric sensor for the determination of butylated hydroxyanisole in food products. **Food Chem.** 2007, 101: 607-614.

KAYA, E. N.;TUNCEL, S.; BASOVAC, T. V.;BANIMUSLEME, H.;HASSANE, A.; GÜREKA, A. G.; AHSENA, V.;DURMUS, M. Effect of pyrene substitution on the

formation and sensor properties of phthalocyanine-single walled carbon nanotube hybrids. **Sensors Actuat. B** 2014, 199: 277-283.

KIM, H.; ABDALA, A. A.; MACOSKO, C. W. Graphene/Polymer Nanocomposites. **Macromolecules** 2010, 43: 6515-6530.

KIVEVELE, T. T.; BARAWA, M. M.; BERECZKYA, A.; LAZA, T.; MADARASZ, J. Impact of antioxidante additives on the oxidation stability of biodiesel produced from Croton Megalocarpus oil. **Fuel Process. Technol.** 2011, 92: 1244-1248.

KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 2006, 83: 823-833.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Process. Technol.** 2007, 88: 669-677.

KULYS, J.; BRATKOVSKAJA, I. Antioxidants determination with laccase. **Talanta** 2007, 72: 526-531.

KUMAR, A. S.; SWETHA, P. Simple adsorption of anthraquinone on carbon nanotube modified electrode and its efficient electrochemical behaviors. **Coll. Surf. A, Physicochem. Eng. Asp.** 2011, 384: 597-604.

KUMAR, A.; BRUNET, J.; VARENNE, C.; NDIAYE, A.; PAULYA, A. Phthalocyanines based QCM sensors for aromatic hydrocarbons monitoring Role of metal atoms and substituents on response to toluene. **Sensor Actuat. B** 2016, 230: 320-329.

KUMAR, S. S.; S. NARAYANAN, S. S. Mechanically immobilized nickel aquapentacyanoferrate modified electrode as an amperometric sensor for the determination of BHA. **Talanta** 2008, 76: 54-59.

LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. Phthalocyanines, Properties and Applications. **VCH Publishers**, 1989.

LI, D.; MULLER, M. B.; GILJE, S.; KANER, R. B.; WALLACE, G. G. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. **Nature Nanotechnol.** 2008, 3: 101-105.

LIMA, K. C. M. S.; SANTOS, A. C. F.; FERNANDES, R. N.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Development of a novel sensor for isoniazid based on 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone and graphene: Application in drug samples utilized in the treatment of tuberculosis. **Microchem. J.** 2016, 128: 226-239.

LIN, H. J.; WANG, M. L.; CHOONG, Y. M.; CHEN, C. W.; HWANG, B.S.; TSAI, S. L., CHUNG, L. C.; YANG, M. H. Effects of extraction solvent on gas chromatographic quantitation of BHT and BHA in chewing gum. **J. Food Drug Anal.** 2003, 11: 141-147.

LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; BECK, J.; KUBOTA, L. T. Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a lithium tetracyanoethylene (LiTCNE) modified glassy carbon electrode. **Talanta** 2004, 64: 935-942.

MAIA, E. C. R.; BORSATO, D.; MOREIRA, I.; SPACINO, K. R.; RODRIGUES, P. R. P.; GALLINA, A. L. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. **Fuel Process. Technol.** 2011, 92:1750-1755.

MALEKI, H.; COJOCARU, C. D.; BRETT, C. M. A.; JENKINS, G. M.; SELMAN, J. R. Changes in the electrochemical behavior of polymeric carbon induced by heat-treatment and doping with lithium ions. **J. Electrochem. Soc.** 1998, 145:721.

MILANO, J.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P. K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renew. Sustainable Energy Ver.** 2016, 58: 180-197.

MIRCESKI, V.; GULABOSKI, R.; LOVRIC, M.; BOGESKI, I.; KAPPL, R.; HOTH, M. Square-wave voltammetry: a review on the recent progress. **Electroanalysis** 2013, 25: 2411-2422.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta** 2008, 77: 593-605.

MORAES, S. S.; AGUIAR, L. F.; CARVALHO, R. M. S.; TANAKA, A. A.; DAMOS, F.S.; LUZ, R. C. S. **Microchim.Acta** 2016, 183: 1251-1259.

MUELLER, N. S.; MORFA, A. J.; ABOU-RAS, D.; ODDONE, V.; CIUK, T.; GIERSIG, M. Growing graphene on polycrystalline copper foils by ultra-high vacuum chemical vapor deposition. **Carbon** 2014, 78: 347-355.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis. **Anal. Chem.** 1987, 59: 379A-390A.

NOVOLSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV; S. V.; JIANG; D ZHANG; Y.; DUBONOS, S.V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science** 2004, 306: 666-669.

OLIVEIRA, R. M.; SANTOS, N. G.; ALVES, L. A.; LIMA, K. C. M. S.; KUBOTA, L. T.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Highly sensitive p-nitrophenol determination employing a new sensor based on N-Methylphenazonium methyl sulfate and graphene: Analysis in natural and treated Waters. **Sensors Actuat. B, Chem.** 2015, 221: 740-749.

OSMANBAS, O. A.; KOCA, A.; OZCESMECI, I.; OKUR, A. I.; GUL, A. Voltammetric, spectroelectrochemical, and electrocatalytic properties of thiol-derivatized phthalocyanines. **Electrochimica. Acta** 2008, 53: 4969-4980.

PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of Graphene. **Nature Nanotechnol.** 2009, 4: 217-224.

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

PEREIRA, N. M.; OLIVEIRA, F. M.; PEREIRA, N. R.; VERLY, R. M.; SOUTO, D. E. P.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, A. A.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Ultrasensitive biosensor for detection of organophosphorus pesticides based on a macrocycle complex/carbon nanotubes composite and 1-methyl-3-octyl imidazolium tetrafluoroborate as binder compound. **Anal. Sci.** 2015, 31: 29-35.

PERRIN, C.; MEYER, L. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. **Food Chem.** 2002; 77: 93-100.

PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. Determination of quercetin in a pharmaceutical sample by square-wave voltammetry using a poly (vinylpyrrolidone)-modified carbon-paste electrode. **J. Braz. Chem. Soc.** 2014, 25: 517-525.

PRABAKAR, S. J. R. S.; SRIMAN NARAYANAN, S. Flow injection analysis of BHA by NiHCF modified electrode. **Food Chem.** 2010, 118: 449-455.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Quím. Nova** 2006, 29: 755-760.

RASHED, M. M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ALABDULKAREM, A., RAHMAN, M. M.; IMDADUL, H. K.; RASHEDU, H. K. Study of the oxidation stability and exhaust emission analysis of Moringa olifera biodiesel in a multi-cylinder diesel engine with aromatic amine antioxidants. **Renew. Energ.** 2016, 94: 294-303.

RASHEDUL, H. K.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ASHRAFUL, A. M.; RAHMAN, S. M. A.; SHAHIR, S. A. The effect of additives on properties, performance and emission of biodiesel fuelled compression ignition engine. **Energ Convers. Manag.** 2014, 88: 348-364.

RATINAC, K. R.; YANG, W.; GOODING, J. J.; THORDARSON, P.; BRAET, F. Graphene and related materials in electrochemical sensing. **Electroanalysis** 2011, 23: 803-826.

RAYMUNDO, M. D.; PAULA, M. M. D.; FRANCO, C.; FETT, R. Quantitative determination of phenolic antioxidants voltammetric techniques. **LWT - Food Sci. Technol.** 2007, 40: 1133-1139.

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

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha De Validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova** 2008 31: 164-171.

RIBER, J.; DE LA FUENTE, C.; VAZQUEZ, M. D.; TASCÓN, M. L.; BATARENO, P. S. Electrochemical study of antioxidants at a polypyrrole electrode modified by nickel phthalocyanine complex. Application to their HPLC separation and to their FIA system detections. **Talanta** 2000, 52: 241-252.

ROUSHANI, M.; SARABAEGI, M. Electrochemical detection of butylated hydroxyanisole based on glassy carbon electrode modified by iridium oxide nanoparticles. **J. Electroanal. Chem.** 2014, 717-718: 147-152.

SAAD, B.; SING, Y. Y.; NAWI, M. A.; HASHIM, N.; ALI, A. S. M.; SALEH, M. I.; SULAIMAN, S. F.; TALIB, K. M.; AHMAD, K. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. **Food Chem.** 2007, 105: 389-394.

SALUJA, R. K.; KUMAR, V.; SHAM, R. Stability of biodiesel – A review. **Renew. Sustain. Energ. Rev.** 2016, 62: 866-881.

SHAHRIARY, L.; ATHAWALE, A. A. Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach. **Internat. J. Renew. Energ. Environ. Engin.** 2014, 2: 58-63.

SIZUN, T.; BOUVETN, M.; SUISSE, J., Humidity effect on ammonia sensing properties of substituted and unsubstituted cobaltphthalocyanines. **Talanta** 2012, 97: 318-324.

SLONCZEWSKI, J. C; WEISS, P. R. Band structure of graphite. **Phys. Rev.**1958, 109: 272.

SOARES SOBRINHO, J. L.; NUNES, L. C. C.; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; ROCA, M. F. DE LA, ROLIM NETO, P. J. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS NO MERCADO FARMACÊUTICO: CASO PARACETAMOL. **CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO** 2005, 73: 35-41.

SORAT, K. A.; BHAL, P. V. Biodiesel properties and automotive system compatibility issues. **Renew. Sustain. Energ. Rev.** 2015, 41: 777-798.

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

STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; DOMMETT, G. H. B.; KOHLLAAS, K. M.; ZIMNEY, E. J.; STACH, E. A.; PINER, R. D.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Graphene-based composite materials. **Nature** 2006, 442: 282-286.

STAUDENMAIER, L. Verfahren zur Darstellung der Graphits aure. **Ber. Deutsche. Chem. Ges.** 1898, 31: 1481-1487.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharma. Technol.** 1998, 2: 12-20.

TABART, J.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Evaluation of spectrophotometric methods for antioxidant compound measure mentin relation to total antioxidant capacity in beverages. **Food Chem.** 2010, 120: 607-614.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Quim. Nova** 2009, 32: 1189-1194.

TETLOWA, H.; POSTHUMA DE BOER, J. B.; FORDE, I. J.; VVEDENSKY, D. D.; CORAUXC, B. J.; KANTOROVICH, D. L. Growth of epitaxial graphene: Theory and experimente. **Physics Rep.** 2014, 542: 195-295.

The Porphyrin Handbook Phthalocyanines: Properties and Materials; K. M.Kadish, K. M. Smith e R. Guilard (Eds.), Academic Press, Nova Iorque, Volume 17, (2003).

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.** 2002, 74: 835-855.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A., MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi.** 2007, 11: 26-31.

VERSARI, A.; PARPINELLO, G. P.; SCAZZINA, F.; DEL RIO, D. Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Control.** 2010, 21: 786-789.

VESSMAN, J.; STEFAN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure Appl. Chem.** 2001, 73: 1381-1386.

WALLACE, P. R. The band theory of grafite. **Phys. Rev.** 1947, 71: 622-634.

WANG, B.; LI, Z.; ZUO, X.; WU, Y.Q.; WANG, X. L.; CHEN, Z. M.; HE, C. Y.; DUAN, W.B. Preparation, characterization and NO₂-sensing properties of Octa-isopentyloxyphthalocyanine lead spin-coating films. **Sensors Actuat. B** 2010, 149: 362-367.

WANG, B.; ZHOU, X. Q.; WU, Y. Q.; CHEN, Z. M.; HE, C. Y.; ZUO, X. Preparation, characterization and NH₃-sensing of 1,8,15,22-Tetra-iso-pentyloxyphthalocyanine copper, nickel, lead spin-coating films. **Sensors Actuat. B** 2012, 161: 498-503.

WANG, G.; SHEN, X.; WANG, B.; YAO, J.; PARK, J. Synthesis and characterization of hydrophilic and organophilic graphene nanosheets. **Carbon** 2009, 47: 1359-1364.

WANG, G.; YANG, J.; PARK, J.; GOU, X.; WANG, B.; LIU, H., et al. Facile synthesis and characterization of graphene nanosheets. **The J. Phys. Chem. C.** 2008, 112: 8192-8195.

WANG, J. Modified electrodes for electrochemical sensors. **Electroanalysis** 1991, 3: 255-259.

WANG, P.; HAN, C.; ZHOU, F.; LU, J.; HAN, X.; WANG, Z. Electrochemical determination of *tert*-butylhydroquinone and butylated hydroxyanisole at choline functionalized film supported graphene interface. **Sensors. Actuators B** 2016, 224: 885-891.

WU, Z-S.; ZHOU, G.; YIN, L-C.; REN, W.; LI, F.; CHENG, H-M. Graphene/metaloxide composite electrode materials for energy storage. **Nano Energ.** 2012, 1: 107-131.

XU, Y.; BAI, H.; LU, G.; LI, G.; SHI, G. Flexible Graphene Films via the Filtration of Water-Soluble Noncovalent Functionalized Graphene Sheets. **J. Am. Chem. Soc.** 2008, 130: 5856-5857.

YANG, M. H; LIN, H. J.; CHOONG, Y. M. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. **Food Research International** 2002, 35: 627-633.

YUE, X.; SONG, W.; ZHU, W.; WANG, J.; WANG, Y. In situ surface electrochemical co-reduction route towards controllable construction of AuNPs/ERGO electrochemical sensing platform for simultaneous determination of BHA and TBHQ. **Electrochim. Acta** 2015, 182: 847-855.

ZHANG, Y.; JIANG, Z.; SMALL, J.; PUREWAL, M.; TAN, Y.-W., FAZLOLLAHI, M.; CHUDOW, J.; JASZCZAK, J.; STORMER, H.; KIM, P. Landau-Level Splitting in Graphene in High Magnetic Fields. **Phys. Rev. Letters.** 2006, 96: 13-96.

ZUCOLOTTO,V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; MOREIRA, W. C.;OLIVEIRA, J. R.O. N. Nanoscale Processing of Polyaniline and Phthalocyanines for Sensing Applications; **Sensors Actuat. B** 2006, 113: 809-815.

ZULETA, E.C.; BAENA, L.; RIOS, L. A.; CALDERÓN, J.A. The oxidative stability of biodiesel and its impact on the deterioration of metallic and polymeric materials: a review. **J. Braz. Chem. Soc.** 2012, 23: 2159-2175.

ANEXOS

A Sensitive Sensor Based on CuTSPc and Reduced Graphene Oxide for Simultaneous Determination of the BHA and TBHQ Antioxidants in Biodiesel Samples

Rita Maria Sousa Carvalho,^[a] Sakae Yotsumoto Neto,^[a] Fernando Carvalho Silva,^[a] Flavio Santos Damos,^[a] and Rita de Cssia Silva Luz*^[a]

Abstract: A novel and sensitive electrochemical sensor voltammetry (LSV). After optimization of the experiw was developed for the simultaneous determination of the mental parameters, the analytical curves for simultaneous butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroqui- determination of BHA and TBHQ by DPV technique none (TBHQ) antioxidants in biodiesel samples employ- demonstrated an excellent linear response from 0.1 to ing the differential pulse voltammetry (DPV). In this 500 mmolL⁻¹ with detection limit of 0.045 mmolL⁻¹ for sense, a glassy carbon electrode (GCE) modified with TBHQ and 0.036 mmolL⁻¹ for BHA. Finally, the procopper (II) tetrasulfonated phthatocyanine immobilized posed method was successfully applied in the simultaneon reduced graphene oxide (CuTSPc/rGO) allowed the ous determination of BHA and TBHQ in six biodiesel detection of BHA and TBHQ at potentials lower than samples, and the results obtained were found to be simithose observed at unmodified electrodes. The sensor was lar to those obtained using the HPLC method with agreecharacterized by cyclic voltammetry (CV) and linear scan ment at 95% confidence level.

Keywords: Antioxidants · biodiesel · reduced graphene oxide · CuTSPc

1 Introduction

Nowadays, biodiesel is an interesting alternative to fossil fuels, since it is renewable energy offering a range of economic, environmental, and social benefits while reducing dependence on oil importations [1]. However, it is composed of saturated fatty acid alkyl ester and unsaturated [1,2] and due to its chemical structure, it is highly susceptible to oxidation in the presence of air, leading to the formation of deposits and corrosive species which can compromise its quality [3,4]. The stability is one of criteria for evaluating the quality of a biofuel and it is affected by storage conditions, including exposure to air, light, high temperatures, hydroperoxides and the presence of foreign species [5]. Thus, the stability is an essential requirement for the successful development and viability of alternative fuels such as biodiesel [6,7]. In this sense, many antioxidants have been used to improve the oxidative stability of biodiesel, because of its ability to retard or inhibit oxidation of lipids and/or other molecules,

preventing the initiation or propagation of oxidation chain reactions [8–12]. Among the most widely used synthetic antioxidants to improve the stability of biodiesel are butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ). In addition, recent studies have shown that the synergistic effect of a combined formulation containing butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ) provided greater oxidative stability for biodiesel [13,14]. Therefore, the analytical methods must be able to simultaneously determine the presence of these antioxidants in biodiesel. There are various analytical techniques that allow the determination of such antioxidants, including spectrophotometry [15], high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection [16], and mass spectrometry-gas chromatography (GC/MS) [17]. However, these methods are of high cost and require specialized users. On the other hand, the electroanalytical methods have become extensively used because they represent a new cost-effective alternative to analysis of these substances [18]. The

Full Paper

electrochemical methods have received great attention due to the various advantages offered, such as low cost, high sensitivity and selectivity, rapid speed, ability and ease of operation. The development of electroanalytical methods based on the modified electrodes is a field of growing interest in analytical chemistry. A variety of efficient materials have been developed to induce the oxidation/reduction of several compounds [6,19–34] because these materials can promote a better electron transfer between the electrode surface and electroactive species in solution. In addition, the sensors based on chemically modified electrodes show better selectivity, electrochemical/electrocatalytic properties, and sensitivity in comparison to unmodified electrodes. The reduced graphene oxide has received a considerable attention due to its excellent electrical conductivity, mainly originated from the delocalized p bonds above

[a] R. M. Sousa Carvalho, S. Yotsumoto Neto, F. Carvalho Silva, F. Santos Damos, R. de Cássia Silva Luz
 Department of Chemistry, Federal University of Maranhão
 65080-805 São Luís – MA, Brazil *e-mail:
 rita.luz@ufma.br

and below the basal plane, its large surface area and low production costs [36,37]. Due to these excellent physical and chemical properties, reduced graphene oxide has been recognized as an interesting alternative for the development of electrochemical sensors [22,38–40]. Graphene-based electrochemical sensors are cost-effective and they show an excellent performance in comparison to glassy carbon, graphite and even carbon nanotubes-based sensors, mainly due to sp²-like planes and edge defects that are more exposed on the graphene nanosheets than other carbon based materials [37]. On the other hand, macrocyclic complexes such as metallophthalocyanines are also used as modifiers due to its high sensitivity, thermal and chemical stability, processability and tunable properties [41–43]. Thus, the present work shows a glassy carbon electrode modified with copper-N4 macrocycle and reduced graphene oxide for simultaneous determination of

tert-butylhydroquinone (TBHQ) and butylated hydroxyanisole (BHA) in biofuels samples.

Experimental

Reagents, Solutions, Materials and Procedures

The graphite powder, TBHQ, butylated hydroxytoluene (BHT), and BHA were acquired from Sigma, St. Louis, USA. Standard stock solutions of BHA and TBHQ were prepared few minutes before each measurement by dissolving appropriate amounts of these chemicals in 1/1 ethanol/water (v/v) mixture. A Britton-Robinson buffer solution (B-R), 0.04 molL⁻¹, was prepared by a mixture of the acetic acid, boric acid, and orthophosphoric acid solutions with an appropriate amount of sodium hydroxide solution to adjust the pH. Working standard solutions were prepared daily with appropriate dilution of the stock solutions with deionized water. All solutions were prepared with water purified in a OS10LXE system from GEHAKA and the actual pH of the buffer solutions was determined with a Q400RS pH meter from Quimis. All used chemical were of analytical grade.

Spectroscopic and Electrochemical Measurements

Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were obtained using a Shimadzu IR Prestige-21 spectrometer, in the region of 2000–500 cm⁻¹. 1% KBr tablets were prepared for analysis of each material (rGO, CuTsPc complex and rGO/CuTsPc composite). The differential pulse voltammetry measurements were carried out with a potentiostat/ galvanostat PGSTAT 128N from Metrohm-Autolab (Utrecht, Netherlands) coupled to a PC computer with GPES 4.9 software. An electrochemical cell of 5.0 mL, an Ag/AgCl (sat.) as reference electrode, a Pt wire as auxiliary electrode, and glassy carbon as working electrode were used for all electrochemical measurements.

Full Paper

2.3 Chromatographic Measurements

The BHA and TBHQ were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using a method proposed by Saad et al. [44] with some adaptations. The HPLC system (from Shimadzu) consisted of multichannel pumps (LC 20AT), an autosampler (SIL 20A), a degasser (DGU 20A5) and a diode array detector (DAD SPD 20A). The separation of antioxidants was performed using a reversed phase column (C-18, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) from Agilent HP. Methanol/acetonitrile (50/50%, v/v) at a flow-rate of 1.0 mL min⁻¹ was used as the mobile phase, and the injection volume was 25 μL.

2.4 Synthesis of Graphite Oxide (GO) and Reduced Graphene Oxide (rGO)

Graphene oxide was prepared by adapting the Hummers and Offemans method [45–47]. Initially, graphite, NaNO₃, and H₂SO₄ were stirred together in an ice bath and KMnO₄ was added to the mixture. After that, the solution was transferred to a water bath and it was stirred. After that, water was added to previous solution and it was stirred while maintaining the temperature at 90 °C. Finally, H₂O₂ (30%) was added to the reaction mixture and it was then filtered and the solid was washed with water. The solid was dispersed in water by mechanical agitation and underwent to low-speed centrifugation to give graphene oxide. The obtained graphene oxide was dispersed in water in presence of appropriated amounts of hydrazine and ammonia [22]. The dispersion was stirred and it was kept in a water bath for 1 h. Finally, the resulting mixture was filtered and washed to get the reduced graphene oxide and characterized according to Oliveira et al. [22].

2.5 Preparation of Modified Electrode with rGO/CuTsPc

A glassy carbon electrode was polished with alumina suspension (particle diameter 0.03 μm) and rinsed with pure water. After cleaning the electrode, a

rGO/CuTsPc suspension was prepared with 3 mg of reduced graphene oxide and 1 mg CuTsPc in 1 mL of deionized water. Then, 20 mL of this suspension was placed directly on the surface of the glassy carbon electrode and allowed to dry at 50 °C for 20 min to effect modification. The effective surface area of the rGO/DDQ modified electrode was estimated as described by Siswana et al. [48] using Fe[(CN)₆]^{3/4}, applying the Randles Sevcik theory [49]. The effective area was about of 0.28 cm². Finally, the modified electrode was thoroughly rinsed with distilled water and placed into the electrochemical cell.

2.6 Preparation and Analysis of Biodiesel Samples

1.0 g of soybean or babassu biodiesel samples were diluted in 100.0 mL of pure ethanol containing BHA and TBHQ at several concentrations and vigorously agitated for 30 min. 0.45 mL of each sample solution was diluted in 4.55 mL of 0.04 mol L⁻¹ B-R buffer (pH 4) and the solution was analyzed by the voltammetric procedure in triplicate. The resulting sample was then directly analyzed, recording differential pulse voltammograms. Then, the TBHQ and BHA present in the biodiesel samples were quantified using the standard addition method.

Results and Discussion

Composite Characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

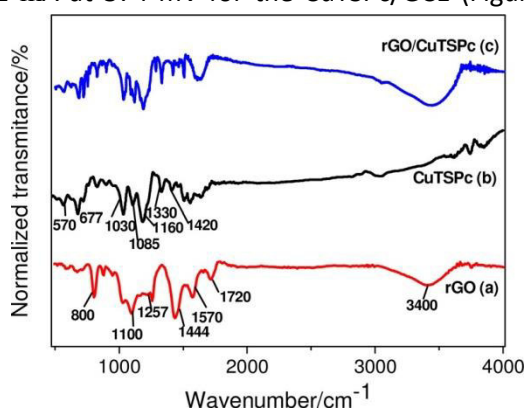
Figure 1 shows FTIR spectra of reduced graphene oxide (rGO) (Figure 1a), the CuTsPc complex (Figure 1b), and the rGO/CuTsPc composite (Figure 1c). In Figure 1a was observed the presence of different type of oxygen functionalities in reduced graphene oxide. The presence of these oxygen-containing groups reveals that the graphite has been oxidized. These groups were confirmed at 800 cm⁻¹ and 1630 cm⁻¹ (which can be attributed to the stretching vibration of C=O of carboxylic acid and carbonyl groups present at the edges of graphene) [50]; at 1100 cm⁻¹ (CO stretching

Full Paper

vibrations) [51] and at 1257 cm^{-1} (COH stretching vibrations) [52]; The band at 1440 cm^{-1} corresponds to the stretching vibration of CC of carboxylic acid [39]; at 1570 cm^{-1} (skeletal vibrations from unoxidized graphitic domains); at 1712 cm^{-1} (stretching vibrations from C=O) and 3400 cm^{-1} (OH stretching vibrations). These polar groups, especially the surface hydroxyl groups, result in the formation of hydrogen bonds between graphite and water molecules; which explains the hydrophilic nature of graphene oxide [50]. The bands observed in the spectrum obtained for the CuTSPc complex (Figure 1b) corresponds to vibrations of specific groups found in the molecular structure of the compound [53], such as: the bands at about 570 cm^{-1} and 677 cm^{-1} (CH out-of-plane bending vibrations); at 1030 cm^{-1} (SO_3 stretching); at 1160 cm^{-1} (CH in-plane bending vibration) [54]. Finally, at 1085 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} and at 1420 cm^{-1} (CN stretchings) [53].

3.2 Electrochemical Behavior of TBHQ and BHA on rGO/CuTSPc/GCE

The electrochemical behavior of TBHQ and BHA at various electrodes in the potential range of 0.7 to 0.9 V vs. Ag/AgCl in 0.04 molL^{-1} BR buffer solution, pH 4, was investigated by cyclic voltammetry. Figure 2A shows the behavior of 16.62 mgL^{-1} TBHQ on: bare GCE (curve 1), CuTSPc/GCE (curve 2), rGO/GCE (curve 3) and rGO/CuTSPc/GCE (curve 4). Considering the anodic scan for all modified electrodes, the TBHQ presented a anodic peak current of 10.23 mA at a anodic peak potential (E_{pa}) of 395 mV for the bare GCE (Figure 2A, curve 1); 13.21 mA at 374 mV for the CuTSPc/GCE (Figure 2A,



curve 2); 31.6 mA at 195 mV for the rGO/GCE (Figure 2A, curve 3) and 48.0 mA at 260 mV for the rGO/CuTSPc/GCE (Figure 2A, curve 4). The peak current for the GCE modified with CuTSPc, rGO and rGO/CuTSPc were respectively, 1.3; 3.0 and 4.7 fold higher than that observed for the bare GCE.

It is worth noting that the GCE modified with rGO shows a lower peak potential for the TBHQ oxidation (about 67 mV) than that observed to rGO/CuTSPc/GCE, however, taking into account the importance of a high sensitivity for the analytical system it was preferred the simultaneous use of rGO and CuTSPc. The cyclic voltammogram inserted in Figure 2A shows the voltammetric behavior of the rGO/CuTSPc/GCE in absence of TBHQ. In this cyclic voltammogram is observed a redox couple Cu(I)TSPc/Cu(II)TSPc at an oxidation and reduction potential about 0 and 200 mV Ag/AgCl, respectively. It is important to note that the oxidation of TBHQ begins next to the redox potential of the rGO/CuTSPc/GCE.

Figure 2B shows the behavior of BHA (18.02 mgL^{-1}) on: bare GCE (curve 1), CuTSPc/GCE (curve 2), rGO/GCE (curve 3) and rGO/CuTSPc/GCE (curve 4). Taking into account the anodic scan, it is observed that BHA presented a peak current of 5.1 mA at anodic peak potential of 600 mV vs. Ag/AgCl for the bare GCE (Figure 2B, curve 1); 26.8 mA at 490 mV for the CuTSPc/GCE (Figure 2B, curve 2); 37.1 mA at 480 mV for the rGO/GCE (Figure 2B, curve 3) and 97.4 mA at 467 mV for the rGO/

Fig. 1. FT-IR spectra of rGO (a, red line), the CuTSPc complex (b, black line) and the rGO/CuTSPc composite (c, blue line). CuTSPc/GCE (Figure 2B, curve 4).

As can be seen, the peak current for TBHQ and BHA on GCE modified with CuTSPc, rGO and rGO/CuTSPc were higher than that observed to bare GCE. In addition, if the rGO and CuTSPc are not simultaneously used, the TBHQ and BHA exhibit a peak current lower than that observed for the composite material (rGO/CuTSPc/GCE) (Figure 2A, curve 4). Indeed, the synergic effect between rGO and CuTSPc as co-

Full Paper

catalysts makes the rGO/ CuTSPc/GCE the best electrocatalytic material to TBHQ and BHA among the modified electrodes. This result suggests that the composite material rGO/CuTSPc improves the charge transfer between the electrode surface and the TBHQ and BHA molecules.

Figure 2C shows the linear sweep voltammograms (LSVs) of the BHA and TBHQ mixture on GCE in B-R

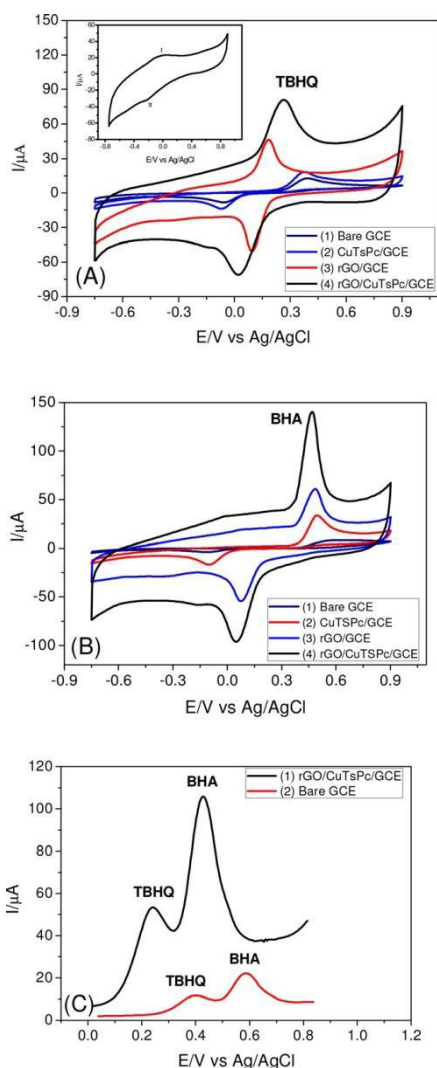


Fig. 2. CVs of TBHQ (A) and BHA (B) on: bare GCE (curve 1), CuTSPc/GCE (curve 2), rGO/GCE (curve 3) and rGO/ CuTSPc/GCE (curve 4). Inset in Figure 2 A: CV of rGO/GCE in absence of TBHQ. (C) LSVs of the TBHQ and BHA mixture on rGO/CuTSPc/GCE (curve 1) and bare GCE (curve 2). Experiments were carried out in 0.04 molL^{-1} B-R buffer solution, pH 4. [BHA]= 18.02 mgL^{-1} ; [TBHQ]= 16.62 mgL^{-1} ; scan rate= 0.05 Vs^{-1} .

buffer (pH 4). Both analytes have produced low peak currents on bare GCE (Figure 2C, curve 2). However, to the same process on rGO/CuTSPc/GCE (Figure 2C, curve 1), the redox peak currents of both analytes were considerably enhanced, and their anodic peak profiles were relatively well defined. In addition, the rGO/CuTSPc/GCE was able to simultaneously identify the BHA and TBHQ with high selectivity as well as it also significantly enhanced the detection of these analyte with high sensibility. These observations suggest that rGO/CuTSPc/GCE has a large surface area, more active sites and improved conductivity, all of which help to enhance the electrocatalytic properties of the electrode to simultaneous determination of BHA and TBHQ.

More detailed studies of peak current were carried out by cyclic voltammetry to obtain new insights to the TBHQ and BHA oxidation on the sensor surface. In a first step, the plot of logarithm of peak current versus logarithm of the potential scan rate ($0.01\text{--}0.1 \text{ Vs}^{-1}$) results in a straight line of equation: $Y=3.46+0.64X$ ($r^2=0.998$) for TBHQ and $Y=3.88+0.58X$ ($r^2=0.998$) for BHA. According to these equations the slopes values of the plot $\log I_{pa}$ versus \log scan rate for the TBHQ and BHA were, respectively, 0.64 and 0.58 which is closer to that expected for a diffusion controlled behavior [55]. In this sense, the BHA and TBHQ reactions on the modified electrode are mass transport controlled.

3.3 Optimization of Experimental Parameters for Determination of TBHQ and BHA

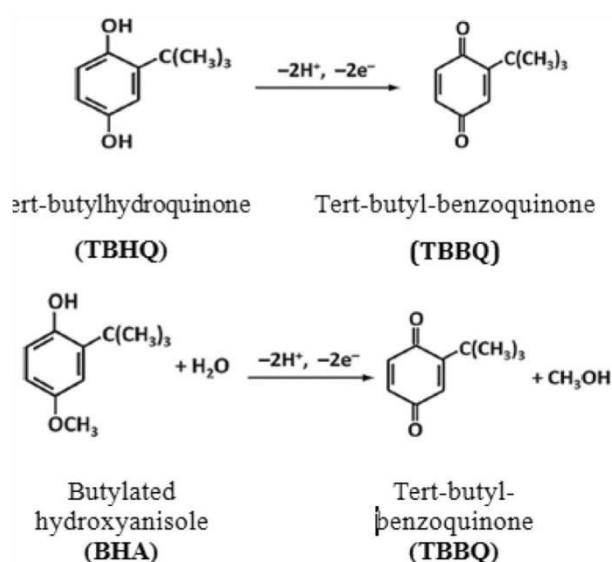
The experimental conditions were optimized considering the most favorable conditions for simultaneous detection of the antioxidants BHA and TBHQ by comparing the peak current values, shapes and reproducibility of the recorded cyclic voltammograms. Thus, in order to optimize the sensor response for TBHQ and BHA oxidation, the influence of the solution pH on the electrochemical response of these analytes using 0.04 molL^{-1} B-R buffer solution at pH 3, 4, 5, 6, 7, and 8 was studied. This study showed

Full Paper

that the peak current for TBHQ and BHA oxidation was affected by the pH of the solution in the investigated range of pH (Figure 3A). The peak current for TBHQ and BHA increases from pH 3 up to pH 4 and decreases considerably from pH 4. It is possible that the current of these analytes on CuTSPc/rGO sensor is higher and more stable at pH values 4 due to the better stability of the CuTSPc/rGO as well as it is due to the better interaction between BHA and TBHQ with this composite material. In this context, the optimum pH value for further studies was set in pH 4. The plot of E_{pa} vs. pH for TBHQ and BHA (Figure 3B) showed that the peak potential (E_p) was shifted in the negative direction when the pH increased, indicating that the process was influenced by protonation [56]. A linear relationship was observed for

TBHQ and BHA following the equations $E_p = 0.6800 - 0.053 \text{ pH}$ (with $r^2 = 0.997$) and $E_p = 0.4640 - 0.050 \text{ pH}$ (with $r = 0.998$), respectively. These slopes were similar to theoretical value (0.059 V/pH), indicating that the oxidation processes of TBHQ and BHA occur with the involvement of two electrons and two protons [57].

Therefore, a possible reaction mechanism of TBHQ can be shown in Figure 4, which showed that TBHQ was oxidized to tert-butylquinone through a 2H^+ and 2e^- reaction. Similar phenomena can also be observed for the study of BHA. The proposed mechanism is similar to those described by Wang et al. [34]. The effect of the type of buffer solution on the peak current obtained with the sensor for TBHQ and BHA was also investigated (Figure 3C). The sensor response was verified in four different buffer solutions (citrate, acetate, phosphate, and Britton-Robinson) at concentration of 0.04 mol L^{-1} , pH 4.



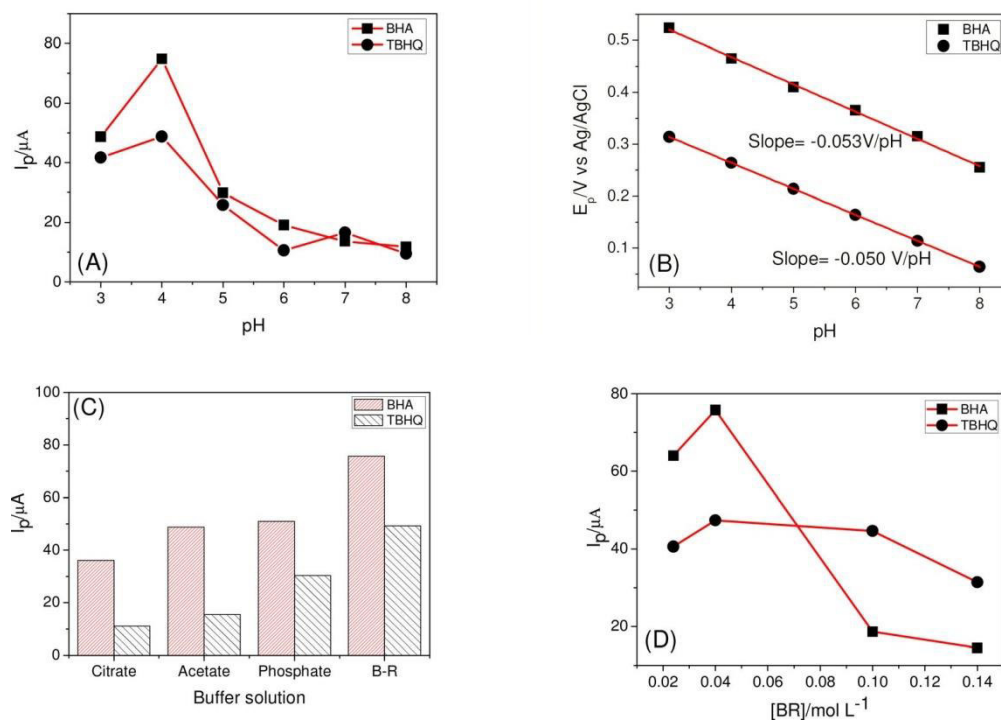


Fig. 3. Effect of the pH (3, 4, 5, 6, 7, and 8) on: Anodic peak current (A); Anodic peak potential (B). Types of buffer solutions (C) for TBHQ and BHA. Effect of different concentrations of B-R buffer solution on the anodic peak current of TBHQ and BHA (D) in B-R buffer solution, pH 4. [BHA]=18.02 mgL⁻¹; [TBHQ]=16.62 mgL⁻¹; scan rate=0.05 Vs⁻¹.

Fig. 4. Proposed oxidation mechanism for the TBHQ and BHA antioxidants on the CuTSPc/rGO modified electrode.

The values of peak current obtained to citrate, acetate, phosphate, and B-R are shown in Figure 3C. The best response to BHA and TBHQ at B-R buffer may be associated to the high ionic mobility of the ions in B-R buffer, making possible a better electronic transfer between the electrode and the solution. In this sense, the BR buffer was chosen for further experiments. In addition, the peak current was obtained by cyclic voltammetry to several concentrations of B-R buffer at following concentrations 0.024, 0.040, 0.10, and 0.14 molL⁻¹ (Figure 3D). For BHA, the sensor response increased from B-R buffer concentrations from 0.024 up to 0.04 molL⁻¹ and it was almost constant for concentrations between 0.10 molL⁻¹ and 0.14 molL⁻¹. For TBHQ, the peak current increased from 0.024 up to 0.04 molL⁻¹ and presented almost constant current between 0.10 and 0.14 molL⁻¹. In this sense, the concentration of B-R buffer solution was maintained at 0.04 molL⁻¹ for further experiments since, at this

concentration, a higher response was observed for both analytes.

Individual and Simultaneous Determination of BHA and TBHQ by DPV: Analytical Characterization of the Sensor

The individual and simultaneous determination of TBHQ and BHA was carried out by Differential Pulse Voltammetry at B-R buffer, pH 4 employing the rGO/CuTSPc modified glass carbon electrode. Figure 5A and 5B shows the DPVs for the individual determination of TBHQ and BHA. The increase in the oxidation peak current of 0.1 up to 500 mmolL⁻¹ ($n=10$, $r^2=0.998$) was linearly propor-

Full Paper

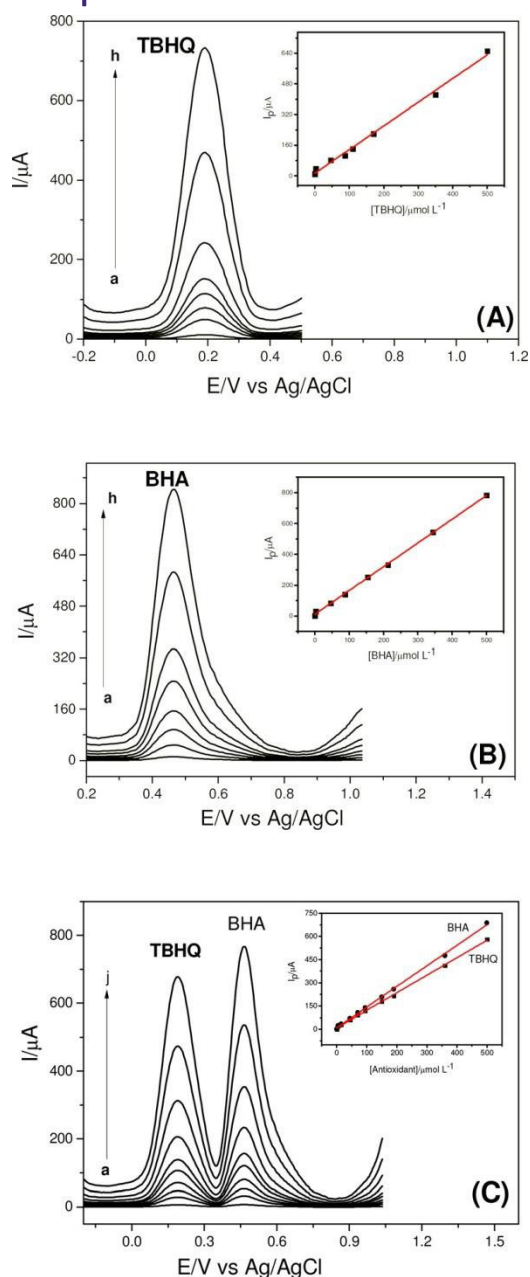


Fig. 5. DPVs of : (A) TBHQ in the concentrations: 0.1; 14.0; 30.0; 55.0; 85.0; 150.0; 300.0, and 500.0 mmolL⁻¹ or 0.017– 83.10 mgL⁻¹ TBHQ (a–h, respectively). Inset of Figure 5A: Analytical curve for TBHQ; (B) BHA in the concentrations: 0.1; 2.5; 46.0; 88.0; 154.0; 213.0; 344.0 and 500.0 mmolL⁻¹ or 0.018– 90.12 mgL⁻¹ (a–h, respectively). Inset of Figure 5B: Analytical curve for BHA; (C) The TBHQ and BHA mixture. Inset of Figure 5C: Analytical curves for oxidation of TBHQ and BHA, containing: 0.1, 2.5, 5.0, 15.0, 35.0, 60.0, 100.0, 190.0, 360.0, and 500.0 mmolL⁻¹, for both analytes (a–j, 3.5 respectively), or 0.017– 83.10 mgL⁻¹ TBHQ and 0.018–90.12 mgL⁻¹ BHA. Experiments carried out in 0.04 molL⁻¹ B-R buffer solution (pH 4). Scan rate=0.1 Vs⁻¹ and Pulse amplitude=0.06 V.

tional to the increase of the concentration of TBHQ (Figure 5A) and BHA (Figure 5B).

The inset of figures shows the analytical curves obtained from voltammograms of the Figures 5A and 5B.

The straight equations for the TBHQ and BHA were respectively, $I_p(\text{mA})=1.65+1.23C$ (mmolL⁻¹), with $n=8$; $r^2=0.997$, and $I_p(\text{mA})=1.98+1.54C$ (mmolL⁻¹), with $n=8$ and $r^2=0.998$. Figure 5C shows the DPVs and the analytical curves for both analytes (inset of Figure 5C). The sensor response was linear for the TBHQ and BHA concentrations in the same concentration range of the Figures 5A and 5B with $r^2=0.998$. The straight equations for the simultaneous determination of TBHQ and BHA were respectively, $I_p(\text{mA})=2.29+1.10C$ (mmolL⁻¹), with $n=10$; $r^2=0.998$, and $I_p(\text{mA})=1.98+1.36C$ (mmolL⁻¹), with $n=10$ and $r^2=0.998$. These results show that the simultaneous determination provided slopes (b) or sensibilities only about 14% less than the slopes obtained by individual determination of the antioxidants. However, the simultaneous determination of species is more advantageous due the cost of analysis and time-saving, therefore, to estimate the limit of detection (LOD) was utilized the slopes of the simultaneous determination for the analytes. LOD was estimated using the statistical relations $3xSD/b$, where SD is the standard deviation of the peak current for the blank (measured at the same potential of the target antioxidants) and b is the slope of the analytical curve.

The LODs calculated were 0.046 mmolL⁻¹ for TBHQ and 0.035 mmolL⁻¹ BHA, respectively. The linear range, LOD and the sensitivity of the proposed method were compared with others reported method in literature (Table 1) and the results were satisfactory.

Application of Sensor in Real Samples

In order to evaluate the application of the sensor to the TBHQ and BHA antioxidants, the matrix effects were evaluated using recovery tests carried out to biodiesel samples. Initially, biodiesel samples did not exhibit any oxidation signals for the target antioxidants. Thus, the

Full Paper

Table 1. Comparison of some characteristics of several modified electrodes for determination of TBHQ and BHA.

Material		Linear range	LOD		Reference
Analyte					Sensitivity
SPE-MWCNT [a]	TBHQ	0.50–10 mmolL ⁻¹	0.34 mmolL ⁻¹	0.126 Amol ¹ L	[6]
	BHA	0.50–10 mmolL ⁻¹	0.176 mmolL ⁻¹	0.199 Amol ¹ L	
MWCNT/GE [b]	TBHQ	4.0–100 mmolL ⁻¹	0.32 mmolL ⁻¹	0.000033 Amol ¹ L	[26]
Au-SnO ₂ /GNs-SWCNTs/GCE [c]	TBHQ	0.05–230 mmolL ⁻¹	0.02 mmolL ⁻¹	0.40 Amol ¹ L	[27]
GCE/IrOxNPs [d]	BHA	1–280 mmolL ⁻¹	0.6 mmolL ⁻¹	0.113 Amol ¹ L	[28]
AuNPs/GCE [e]	TBHQ	1.20–16.8 mmolL ⁻¹	0.48 mmolL ⁻¹	–	[29]
	BHA	0.55–8.32 mmolL ⁻¹	0.22 mmolL ⁻¹	–	
ECCM-resin-Cu(II) [f]	BHA	0.34–41 mmolL ⁻¹	0.6 mmolL ⁻¹	0.86 Amol ¹ L	[30]
Mn(II)Fe(CN) ₆ [g]	BHA	0.50–1429 mmolL ⁻¹	0.05 mmolL ⁻¹	0.12 Amol ¹ L	[31]
NiHCF/GWCE [h]	BHA	1.2–1070 mmolL ⁻¹	0.6 mmolL ⁻¹	0.21 Amol ¹ L	[32]
AgHCF/PIGE [i]	BHA	7.4–830 mmolL ⁻¹	3.7 mmolL ⁻¹	0.062 Amol ¹ L	[33]
Graphene/Ch/GCE [j]	TBHQ	0.40–120 mmolL ⁻¹	0.14 mmolL ⁻¹	1.49 Amol ¹ L	[34]
	BHA	0.60–200 mmolL ⁻¹	0.19 mmolL ⁻¹	0.57 Amol ¹ L	
NAPCF/PIGE [k]	BHA	0.624–219 mmolL ⁻¹	0.249 mmolL ⁻¹	–	[35]
	rGO/CuTSPc/GCE	TBHQ	0.1–500 mmolL ⁻¹	0.045 mmolL ⁻¹	
	BHA	0.1–500 mmolL ⁻¹	0.036 mmolL ⁻¹	1.36 Amol ¹ L	This work
	TBHQ	0.017–83.10 mgL ⁻¹	7.4810 ³ mgL ⁻¹	0.0083 Ag ¹ L	
	BHA	0.018–90.12 mgL ⁻¹	6.4910 ³ mgL ⁻¹	0.0055 Ag ¹ L	

[a] multi-walled carbon nanotube modified screen-printed electrodes, [b] multiwalled carbon nanotube modified gold electrode, [c] SWCNTs, single-walled carbon nanotubes; GNs, graphene nanosheets; GOs, graphene oxides; GCE, glass carbon electrode, [d] glassy carbon electrode modified by iridium oxide nanoparticles, [e] gold nanoparticles modified glassy carbon electrode, [f] carbon composite electrode modified with Cu₃(PO₄)₂ immobilized in polyester resin, [g] graphite-wax composite method with manganese(II) hexacyanoferrate, [h] nickel hexacyanoferrate (NiHCF) surface modified graphite, [i] graphite-wax composite electrode chemically modified with silver hexacyanoferrate (AgHCF), [j] Ch: choline, [k] Nickel aquapentacyanoferrate NAPCF modified electrode prepared by me-

biodiesel samples were spiked with different TBHQ and BHA concentrations. The simultaneous determination of TBHQ and BHA in biodiesel samples was performed on the sensor utilizing the DPV technique. The determination of the analytes was taken in 4.55 mL of 0.04 molL⁻¹ B-R, pH 4 containing 0.45 mL sample containing TBHQ and BHA. The B-R buffer concentrations of the analytes in the biodiesel samples are presented in Table 2 and the results show that there is no influence of the matrix on the sensor response.

The recoveries obtained were 99.5 to 100.8% for TBHQ and 99.1 to 100.2 for BHA, which clearly indicated the applicability and reliability of the proposed method. Table 3 shows a comparison between the proposed and the reference method for

biodiesel samples. Applying a paired Students-t test to compare these methods, we could observe that, at the 95% confidence level, there was no statistical difference between the reference and the proposed methods.

chanical immobilization on the graphite electrode.

Table 2. Recovery values of TBHQ and BHA obtained for six biodiesel samples (n=3)

Samples	Analyte	Spiked (mgL ⁻¹)	Found (mgL ⁻¹)	RSD (%)	Recovery (%)
A*	BHA	64.0	63.9 (0.1)	0.1	99.8
	TBHQ	59.0	58.8 (0.3)	0.2	99.7
B**	BHA	60.0	60.1 (0.5)	0.1	100.2
	TBHQ	55.0	54.7 (0.2)	0.4	99.5

Full Paper

C*	BHA	55.0	55.1 (0.1)	0.1	100.2	B**	BHA	60.1 (0.5)	60.0 (0.3)
	TBHQ	50.0	49.9 (0.5)	0.1	99.8		TBHQ	54.7 (0.2)	54.7 (0.4)
D**	BHA	50.0	49.8 (0.4)	0.3	99.6	C*	BHA	55.1 (0.1)	55.1 (0.6)
	TBHQ	45.0	45.2 (0.2)	0.4	100.4		TBHQ	49.9 (0.5)	50.0 (0.1)
E*	BHA	45.0	44.6 (0.4)	0.6	99.1	D**	BHA	49.8 (0.4)	49.9 (0.2)
	TBHQ	41.0	41.2 (0.5)	0.3	100.5		TBHQ	45.2 (0.2)	45.2 (0.3)
F**	BHA	40.0	39.7 (0.1)	0.5	99.3	E*	BHA	44.6 (0.4)	44.6 (0.1)
	TBHQ	36.0	36.3 (0.3)	0.6	100.8		TBHQ	41.2 (0.5)	41.2 (0.1)
						F**	BHA	39.7 (0.1)	39.7 (0.3)
							TBHQ	36.3 (0.3)	36.2 (0.6)

Biodiesel samples obtained from: *babasu oil; **soybean oil. The values are the average of three replicate measurements.

Table 3. Comparison between the proposed and comparative methods.

Biodiesel samples	Analyte	Proposed method (mgL ⁻¹)	HPLC method [44] (mgL ⁻¹)
A*	BHA	63.9 (0.1)	63.7 (0.1)
	TBHQ	58.8 (0.3)	58.8 (0.5)

Values obtained without considering the dilution factor for samples; Biodiesel samples obtained from: *babasu oil; **soybean oil.

3.6 Interferences Studies

The selectivity of the modified electrode was evaluated by examining the influences of several possible interfering substances on the detection of 1 mmolL⁻¹ TBHQ and BHA in 0.04 molL⁻¹ B-R buffer solution, pH 4. The electrochemical results indicated that 100-fold higher concentrations of different species (BHT, glycerol, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, and SO₄²⁻), did not interfere in the BHA and TBHQ determination in the potential window studied. The biggest relative error value obtained in this study was 1.25%. It was therefore apparent that by exploiting the oxidation of the species, the rGO/CuTSPc/GCE was able to provide good selectivity for the detection of BHA and TBHQ, without any interference from commonly coexisting substances. These results indicated that the determination of these compounds in biodiesel samples was not significantly affected by interferents substances.

4 Conclusions

The electrochemical behavior of rGO/CuTSPc/GCE with respect to TBHQ and BHA oxidation has been investigated in this work. The electrochemical oxidation behavior of TBHQ and BHA was improved greatly by using rGO/CuTSPc/GCE. In addition a

sensitive and selective sensor for these analytes was developed based on rGO/ CuTSPc/GCE, which shows good characteristics, such as a wide linear response range, low detection limits and good long-term stability. The sensitivity for TBHQ and BHA were better than those described in the literature. This sensor showed good repeatability for the measurements and electrode preparation evaluated in terms of relative standard deviation for TBHQ and BHA lower than 2%. The proposed sensor was applied in biodiesel samples and the results were in agreement to those obtained by the reference method described in the literature. In this sense, this work demonstrated that rGO/ CuTSPc/GCE is a sensitive, selective and stable sensor showing great potential for antioxidant determination in biodiesel samples.

References

- [1] R. U. Owolabi, A. L. Adejumo, A. F. Aderibigbe, *Int. J. Energy Eng.* 2012, 2, 223–231.
- [2] B. Divya, V. K. Tyagi, *J. Oleo Sci.* 2006, 55, 487–502.
- [3] M. R. Monteiro, A. R. P. Ambrozini, L. M. L. A. A. G. Ferreira, *Talanta* 2008, 77, 593–605.
- [4] I. M. Atadashi, M. K. Aroua, A. A. Abdul, *Renew. Sust. Energy Rev.* 2010, 14, 1999–2008.
- [5] R. A. Ferrari, W. L. Souza, *Quim. Nova* 2009, 1, 106–111.
- [6] R. P. Caramit, A. G. F. Andrade, J. B. G. Souza, T. A. Araffljo, L. H. Viana, M. A. G. Trindade, V. S. Ferreira, *Fuel* 2013, 105, 306–313.

Full Paper

- [7] T. F. Tormin, R. R. Cunha, E. M. Richter, R. A. A. Munoz, *Talanta* 2012, 99, 527–531.
- [8] E. C. Zuleta, L. Baena, L. A. Rios, J. A. Caldern, J. Braz. Chem. Soc. 2012, 23, 2159–2175.
- [9] R. O. Dunn, *Fuel Process. Technol.* 2005, 86, 1071–85.
- [10] G. Knothe, *Fuel Process. Technol.* 2007, 88, 669–677.
- [11] G. Knothe, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2006, 83, 823–833.
- [12] E. S. Almeida, F. M. Portela, R. M. F. Sousa, D. Daniel, M. G. H. Terrones, E. M. Richter, R. A. A. Muçoz, *Fuel* 2011, 90, 3480–3484.
- [13] E. C. R. Maia, D. Borsato, I. Moreira, K. R. Spacino, P. R. P. Rodrigues, A. L. Gallina, *Fuel Process. Technol.* 2011, 92, 1750–1755.
- [14] R. Guzman, H. Tang, S. Salley, K. I. Simon Ng, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2009, 86, 459–467.
- [15] U. Viplava-Prasad, T. E. Divakar, K. Hariprasad, C. S. P. Sastry, *Food. Chem.* 1987, 25, 159–164.
- [16] C. Perrin, L. Meyer, *Food Chem.* 2002, 77, 93–100.
- [17] M. Ding, J. Zou, *Food Chem.* 2012, 131, 1051–1055.
- [18] A. M. Pisoschi, C. Cimpeanu, G. Predoi, *Open. Chem.* 2015, 13, 824–856.
- [19] N. M. Pereira, F. M. Oliveira, N. R. Pereira, R. M. Verly, *Anal. Sci.* 2015, 31, 29–35.
- [20] J. C. Duarte, R. C. S. Luz, F. S. Damos, A. B. Oliveira, L. T. Kubota, *J. Solid State Electrochem.* 2007, 11, 631–638.
- [21] D. M. Pimentel, F. M. Oliveira, W. T. P. Santos, L. T. Kubota, F. S. Damos, R. C. S. Luz, *J. Braz. Chem. Soc.* 2015, 26, 2035–2045.
- [22] R. M. Oliveira, N. G. Santos, L. A. Alves, K. C. M. S. Lima, L. T. Kubota, F. S. Damos, R. C. S. Luz, *Sens. Actuators. B, Chem.* 2015, 221, 740–749.
- [23] F. S. Damos, R. C. S. Luz, A. A. Sabino, M. N. Eberlin, R. A. Pilli, L. T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* 2007, 601, 181–193.
- [24] S. M. Silva, L. F. Aguiar, R. M. S. Carvalho, A. A. Tanaka, F. S. Damos, R. C. S. Luz, *Mikrochim. Acta* 2016, 183, 1251–1259.
- [25] W. Wang, R. Li, X. Hua, R. Zhang, *Talanta* 2015, 138, 169–175.
- [26] A. Thomas, A. E. Vikraman, D. Thomas, K. G. Kumar, *Food Anal. Methods* 2015, 8, 2028–2044.
- [27] Y. Du, X. Gao, X. Ye, Z. Zheng, Q. Feng, C. Wang, K. Wu, *Sens. Actuators B* 2014, 203, 926–934.
- [28] M. Roushani, M. Sarabaegi, *J. Electroanal. Chem.* 2014, 717–718, 147–152.
- [29] X. L. Lin, Y. Ni, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta* 2013, 765, 54–62.
- [53] P. Bertonecello, M. Peruffo, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2008, 321, 106–112. Tascn, P. S. Batanero, *Talanta* 1999, 49, 441–452. [54] R. Aroca, A. Thedchanamoorthy, *Chem. Mater.* 1995, 7, 69–74.
- [55] A. S. Kumar, P. Swetha, *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Aspects* 2011, 384, 597–604.
- [56] E. Borrego, D. Sicilia, S. Rubio, D. Prez-Bendito, *TrAC Accepted: June 12, 2016 Trends, Anal. Chem.* 2001, 20, 241–54. Published online: &&&&, 0000
- [30] H. G. Freitas, O. Fatibello, *Talanta* 2010, 81, 1102–1108.
- [31] D. Jayasri, S. S. Narayanan, *Food Chem.* 2007, 101, 607–614.
- [32] R. S. J. Prabakar, S. S. Narayanan, *Food Chem.* 2010, 118, 449–455.
- [33] S. S. Kumar, S. S. Narayanan, *Sens. Actuators B* 2006, 119, 135–142.
- [34] P. Wang, C. Han, F. Zhou, J. Lu, X. Han, Z. Wang, *Sens. Actuators B* 2016, 224, 885–891.
- [35] S. S. Kumar, S. S. Narayana, *Talanta* 2008, 76, 54–59.
- [36] K. R. Ratinac, W. Yang, J. J. Gooding, P. Thordarson, F. Braet, *Electroanalysis* 2011, 23, 803–826.
- [37] M. Najafi, S. Darabi, *Electrochim. Acta* 2014, 121, 315–320.
- [38] E. T. Vilela Junior, R. C. S. Carvalho, S. Yotsumoto Neto, R. C. S. Luz, F. S. Damos, *J. Electroanal. Chem.* 2015, 752, 75–81.
- [39] K. C. M. S. Lima, A. C. F. Santos, R. N. Fernandes, F. S. Damos, R. C. S. Luz, *Microchem. J.* 2016, 128, 226–239.
- [40] J. G. M. Castro Jfflnior, G. M. M. Ferreira, F. G. Oliveira, F. S. Damos, R. C. S. Luz, *J. Electroanal. Chem.* 2014, 732, 93–100.
- [41] G. Torre, W. Blau, T. Torres, *Nanotechnology* 2003, 14, 765–771.
- [42] K. Kasuga, M. Tsutsuo, *Coord. Chem. Rev.* 1980, 32, 67–95.
- [43] A. B. P. Lever, E. R. Milaeva, G. Speier, *The redox chemistry of metallophthalocyanines in solution*. In: C. C. Leznoff, A. B. P. Lever, *Phthalocyanines – properties and applications*. New York-NY: John Wiley & Sons; 1989, p. 5.
- [44] B. Saad, Y. Y. Sing, M. A. Nawli, N. Hashim, A. S. M. Ali, M. I. Saleh, S. F. Sulaiman, K. M. Talib, K. Ahmad, *Food. Chem.* 2007, 105, 389–394.
- [45] W. S. Hummers, R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 1339–1339.
- [46] S. Stankovich, R. D. Piner, X. Q. Chen, N. Q. Wu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *J. Mater. Chem.* 2006, 16, 155–158.
- [47] S. Gilje, S. Han, M. Wang, K. L. Wang, R. B. Kaner, *Nano. Lett.* 2007, 7, 3394–3398.
- [48] M. P. Siswana, K. I. Ozoemena, T. Nyokong, *Electrochim. Acta* 2006, 52, 114–122.
- [49] J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (second ed.) John Wiley & Sons, Hoboken, NJ (2001).
- [50] L. Shahriary, A. A. Athawale, *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.* 2014, 2, 58–63.
- [51] Y. Xu, H. Bai, G. Lu, C. Li, G. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5856–5857.
- [52] D. Li, M. B. Muller, S. Gilje, R. B. Kaner, G. G. Wallace, *Nature Nanotechnol.* 2008, 3, 101–105.
- [57] C. De La Fuente, J. A. Acuça, M. D. Vzquez,

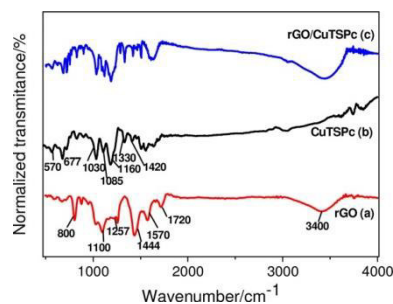
Received: March 22, 2016

FULLPAPERS

R.M.SousaCarvalho,
S.YotsumotoNeto,F.CarvalhoSilva,
F.SantosDamos,
R.deCssiaSilvaLuz*

&&-&&

A Sensitive Sensor Based on
CuTSPc and Reduced Graphene
Oxide for Simultaneous
Determination of the BHA and
TBHQ Antioxidants in Biodiesel
Samples



Electroanalysis 2016, 28, 1 – 10