

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Programa de Pós-Graduação em Química

Ana Caroline Ferreira Santos

**ELETRODO MODIFICADO COM FILMES DE QUITOSANA-NiTsPc
PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LIPÓICO EM SUPLEMENTO
DIETÉTICO**

São Luís
2013

Ana Caroline Ferreira Santos

**ELETRODO MODIFICADO COM FILMES DE QUITOSANA-NiTsPc
PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LIPÓICO EM SUPLEMENTO
DIETÉTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

São Luís

2013

Ana Caroline Ferreira Santos

**ELETRODO MODIFICADO COM FILMES DE QUITOSANA-NiTsPc
PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LIPÓICO EM SUPLEMENTO
DIETÉTICO**

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

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka (Orientador)

Prof. Dr. Flavio Santos Damos

Prof. Dr. Paulo Roberto Brasil Oliveira Marques

São Luís

2013

Dedico este trabalho

A DEUS

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta todos os momentos ao meu lado.

A minha família, pela ajuda incondicional ao longo destes anos e pelo estímulo constante à minha formação profissional.

Ao professor Dr. Auro Atsushi Tanaka e a Prof. Dr^a. Sônia Maria Carvalho Neiva Tanaka, meu especial agradecimento pela orientação, paciência, incentivo e por contribuir com minha formação desde a graduação.

Aos ex. e atuais colegas, companheiros e amigos do Laboratório de Eletroquímica da UFMA com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado e momentos de alegria.

Ao LEEDS-UNICAMP, em especial ao professor Dr. Lauro Kubota pelos ensinamentos e receptividade.

Aos meus amigos da turma de mestrado 2011.1, pela amizade, convívio, e por momentos de ajuda e distração.

A todos meus professores da Pós-Graduação em Química, pelos conhecimentos transmitidos e por muito ter contribuído para minha formação profissional.

A CAPES pela bolsa concedida.

*"Retém a instrução e não a largues: guarda-a,
porque ela é a tua vida."
Provérbios 4:13*

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de ácido α -lipóico (ALA) em suplemento dietético utilizando um eletrodo de carbono vítreo (CV) modificado com quitosana (QT) e ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc). Os voltamogramas de varredura linear da oxidação de ALA sobre os eletrodos CV/QT-NiTsPc apresentaram um pico irreversível com potencial próximo a 0,85 V vs Ag/AgCl e mostraram um deslocamento do início da corrente de oxidação em cerca de 100 mV para potenciais menos positivos, bem como um aumento significativo na magnitude da corrente de pico, quando comparados aos eletrodos CV e CV-QT. A caracterização do filme QT-NiTsPc foi realizada por espectroscopia ultravioleta visível e observou-se um deslocamento na banda Q dos espectros NiTsPc, quando comparados com os espectros de NiTsPc 1×10^{-4} mol L⁻¹, e indicando uma possível interação entre os grupos sulfônicos com os grupos amina de QT. As curvas analíticas obtidas com as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ) apresentaram boa linearidade e sensibilidade. A técnica de VC apresentou os melhores valores de limite de detecção ($9,72 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e limite de quantificação ($3,24 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹), portanto foi a técnica escolhida para determinação de ALA em suplemento. A quantificação de ALA em suplemento dietético utilizando o eletrodo de CV/QT-NiTsPc apresentou resultados concordantes com os resultados obtidos com o método cromatográfico, apresentando um nível de confiança de 95%.

Palavras chave: ácido lipóico, ftalocianina tetrassulfonada de níquel, quitosana.

ABSTRACT

This work describes the development of electroanalytical procedures for alpha-lipoic acid (ALA) determination in dietary supplement using a glassy carbon (GC) electrode modified with chitosan (CT) and nickel tetrasulfonated phthalocyanine (NiTsPc) films. The linear sweep voltammograms of ALA oxidation on the GC/CT-NiTsPc electrode presented an irreversible peak near 0,85 V vs Ag/AgCl, a value about 100 mV less positive than those recorded on the unmodified GC and GC/CT electrodes. In addition, the modification resulted in a pronounced increase in the peak current value. Ultraviolet-visible spectroscopic characterization of the CT-NiTsPc film showed a shift in the Q band of the NiTsPc, when compared to the spectrum recorded in a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ NiTsPc aqueous solution, and indicated a possible interaction of the sulfonic groups with the positively charged amine groups in the CT film. From cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) data, analytical curves were constructed and showed good linearity and sensitivity for the dependence between the oxidation peak current and the ALA concentration in solution. The CV technique showed the best detection ($9,72 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) and quantification ($3,24 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) limit values for ALA in solution. Determination of ALA in dietary supplement using the GC/CT-NiTsPc electrode showed results in accordance with the obtained using a chromatographic method at a 95% confidence level.

Keywords: lipoic acid, nickel tetrasulfonated phthalocyanine, chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do ácido lipóico	3
Figura 2. Estrutura da ftalocianina na forma ácida	8
Figura 3. Estrutura de uma metaloftalocianina	9
Figura 4. Estrutura de uma metaloftalocianina tetrassulfonada	9
Figura 5. Estrutura da quitosana	12
Figura 6. Célula eletroquímica	18
Figura 7. Voltamogramas cíclicos do eletrodo CV (a) e CV/QT-NiTSPc (b) na ausência de ALA e dos eletrodos CV (c), CV/QT (d) e CV/QT-NiTSPc (e) na presença de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de ALA em uma solução 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato pH 7, $v = 0,05$ V s ⁻¹	24
Figura 8. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de ALA sobre um eletrodo CV /QT-NiTSPc a partir de soluções contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de NiTSPc e diferentes concentrações de QT. Eletrólito tampão fosfato pH 7 contendo 1×10^{-3} mol L ⁻¹ de ALA, $v = 0,05$ V s ⁻¹	26
Figura 9. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de ALA sobre um eletrodo CV /QT-NiTSPc a partir de soluções contendo $1,55 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de QT e diferentes concentrações de NiTSPc. Eletrólito tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L ⁻¹ de ALA, $v = 0,05$ V s ⁻¹	27
Figura 10. Espectros de absorção das soluções de QT-filme (a), NiTSPc 1×10^{-4} mol L ⁻¹ (b) e QT-NiTSPc-filme (c)	29
Figura 11. Voltamogramas de varredura linear da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTSPc em diferentes velocidades de varredura do potencial. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L ⁻¹ de ALA, saturada com N ₂	30
Figura 12. Gráfico da dependência de I_{pa} com $(v)^{1/2}$	31
Figura 13. Gráfico da dependência de E_p com Log v ..	32
Figura 14. Voltamogramas de varredura registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTSPc em soluções Britton-Robinson de diferentes pH's contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de ALA, $v = 0,05$ V s ⁻¹ . Temperatura ambiente	33

Figura 15. Voltamogramas de varredura registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes solução tampão de pH 7 contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de ALA, $v = 0,05$ V s^{-1} . Temperatura ambiente	34
Figura 16. Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, após 21 adições consecutivas de 20 μ L de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L de ALA, $v = 0,05$ V s^{-1} e temperatura ambiente	36
Figura 17. Curva analítica da detecção de ALA sobre um eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7.....	36
Figura 18. Voltamograma de pulso diferencial registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA. $v = 0,005$ V s^{-1} e temperatura ambiente	38
Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes velocidades de varredura do potencial. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA, saturada com N_2	39
Figura 20. Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes tempo de duração de pulso. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA, $v = 0,005$ V, saturada com N_2	40
Figura 21. Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de amplitude. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA, $v = 0,005$ V, saturada com N_2	41
Figura 22. Voltamogramas de pulso diferencial registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, na concentração de $9,99 \times 10^{-7}$ a $3,38 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de ALA, $v = 0,005$ V s^{-1} , saturada com N_2	42
Figura 23. Curva analítica da detecção de ALA sobre um eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7.....	43
Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA	44

- Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de frequência. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA, saturada com N₂ 45
- Figura 26. Dependência da corrente de pico com a frequência de onda quadrada para a oxidação do ALA. Dados extraídos da Figura 26 46
- Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de amplitude. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA, saturada com N₂..... 47
- Figura 28. Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de incremento de varredura. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA, saturada com N₂..... 48
- Figura 29. Voltamogramas de onda quadrada registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, na concentração de $9,996 \times 10^{-7}$ a $8,17 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ALA, saturada com N₂ 49
- Figura 30. Curva analítica da detecção de ALA sobre um eletrodo CV/QT-NiTsPc. Dados extraídos da Figura 29 50
- Figura 31. Voltamogramas de varredura linear obtidos para a determinação de ALA em suplemento alimentar. (1) amostra suplemento dietético; (2) amostra suplemento dietético + $3,98 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de solução padrão de ALA; (3) amostra suplemento dietético + $7,93 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de solução padrão de ALA; (4) amostra suplemento dietético + $1,18 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de solução padrão de ALA..... 52
- Figura 32. Cromatograma para o ALA na concentração de $4,36 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.. 53
- Figura 33. Curva analítica obtida para o ALA empregando HPLC. 53
- Figura 34. Gráfico de barra de erro para as médias ajustadas utilizando o método cromatográfico e método CV/QT-NiTsPc 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da concentração de QT na resposta do eletrodo CV/QT-NiTsPc.....	26
Tabela 2. Efeito da concentração de NiTsPc na resposta do eletrodo CV / QT-NiTsPc	28
Tabela 3. Valores de I_p referentes a diferentes pH's na oxidação de ALA	33
Tabela 4. Dependência da corrente de pico (I_p) da oxidação de ALA com a natureza da solução tampão pH 7, sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc. Dados extraídos da Figura 15	34
Tabela 5. Comparação das técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada para a determinação do ALA	51
Tabela 6. Determinação de ALA em cápsulas de suplemento alimentar.....	54
Tabela 7. Teste estatístico	54
Tabela 8. Comparação de diferentes sensores para a determinação de ALA ..	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μA - Microampère

μL - Microlitro

μm – Micrômetro

A - Área

Ag/AgCl - Prata/ cloreto de prata

ALA - Ácido α -lipóico

b - Coeficiente angular da reta

CV - Carbono vítreo

CV/QT- Carbono vítreo modificado com quitosana

CV/QT-NiTsPc - Carbono vítreo modificado com quitosana e ftalocianina tetrassulfonada de níquel.

ECS – Eletrodo de calomelano saturado

E_p - Potencial de pico

EQM's - Eletrodos quimicamente modificados

FTO - Eletrodo de oxido de estanho dopado com flúor

H_2Pc - Ftalocianina ácida

H_2SO_4 - Ácido sulfúrico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta eficiência

I_p - Corrente de pico

I_{p_a} - Corrente de pico anódica

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ - Tampão fosfato

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ - Tampão Fosfato-hidróxido de sódio

KMNO_4 - Permanganato de potássio

L - Litro

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

MeTsPc - Metaloftalocianina tetrassulfonada

mg - miligrama

mL - mililitro

MPc - Metaloftalocianina

mUA - Mili unidades de absorbância

mV - milivolts

N₂ - Gás nitrogênio

Na₂HPO₄/ KH₂PO₄ - Tampão sorensen

Na₂HPO₄/C₆H₈O₇ - Tampão mcllvaine

NCT - Nanotubos de carbono

NiTsPc - Ftalocianina tetrassulfonada de níquel

nm - Nanômetro

QT- Quitosana

s - Segundo

Sd - Desvio padrão de medidas de corrente do branco

UV-Vis - Ultravioleta visível

v - Velocidade

V - Volts

VC - Voltametria cíclica

VOQ - Voltametria de onda quadrada

VPD - Voltametria de pulso diferencial

VVL - Voltametria de varredura linear

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Antioxidantes.....	2
1.2 Ácido α-lipóico	2
1.3 Sensores Eletroquímicos	5
1.4 Eletrodos Quimicamente Modificados	5
1.5 Sensores a base de metalofalocianinas.....	7
1.6 Quitosana.....	10
1.7 Determinações eletroquímicas de ácido lipóico.....	13
1.8 Objetivos	15
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	18
2.1 Instrumentação.....	18
2.2 Reagentes e Soluções.....	19
2.2 Pré-tratamento das superfícies dos eletrodos CV.....	19
2.4 Modificação da superfície do eletrodo CV	20
2.5 Espectroscopia no ultravioleta visível	20
2.6 Técnicas eletroquímicas	20
2.7 Preparação da amostra comercial	21
2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência	21
2.9 Limpeza dos materiais de vidro	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 Comportamento voltamétrico do ácido lipóico sobre o eletrodo CV modificado com QT-NiTsPc.....	24
3.2 Otimização das condições experimentais para a modificação do eletrodo CV com filmes QT-NiTsPc	25
3.3 Espectroscopia na região do UV-Visível	28

3.4	Estudo da velocidade de varredura sobre o eletrodo CV/ QT- NiTsPc	29
3.5	Otimização de Parâmetros Analíticos	32
3.6	Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade	34
3.7	Curva Analítica utilizando a técnica de VC	35
3.8	Voltametria de pulso diferencial (VPD)	37
3.8.1	Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial	38
3.8.2	Curva Analítica utilizando a técnica de VPD	41
3.9	Voltametria de onda quadrada (VOQ)	43
3.9.1	Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	44
3.9.2	Curva Analítica utilizando a técnica de VOQ	48
3.10	Comparação das técnicas VC, VPD e VOQ para a determinação de ALA sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc	50
3.11	Determinação de ALA em suplemento alimentar e validação do procedimento analítico proposto com base em análises com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	51
3.11.1	Teste estatístico	54
3.12	Comparação das técnicas de VC, VPD e VOQ com valores reportados na literatura	55
4.	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” [1].

A utilização de compostos antioxidantes naturais ou sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e na medicina [2].

Um poderoso antioxidante que vem se destacando nos últimos anos devido as suas propriedades químicas que atuam não só na estética como também no tratamento de doenças é o ácido α -lipóico.

1.2 Ácido α -lipóico

O ácido α -lipóico (1,2-ditiolano-3-pentanoico) é um composto organosulfurado, de ocorrência natural e sintetizado em pequenas quantidades por plantas e animais. Sua estrutura (Figura 1) é constituída de uma cadeia de 8 carbonos, com uma carboxila em uma das extremidades como grupo funcional e um anel ditiolano, com início no carbono 6, na outra. O anel ditiolano consiste de um anel heterociclo de cinco membros contendo dois átomos de enxofre vizinhos [3,4,5]. O carbono 6 do ácido lipóico é um carbono quiral (está ligado a quatro substituintes diferentes entre si) e, portanto, a molécula se apresenta sob a forma dos enantiômeros R ou S. No entanto, o ácido lipóico biologicamente ativo e presente na natureza existe somente na forma R, chamado de ácido R-(+)-lipóico.

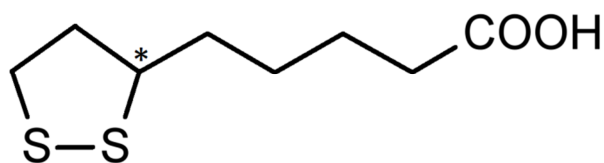


Figura 1. Estrutura molecular do ácido lipóico

O ácido α -lipóico foi descoberto em 1937 por Snell et al. [6], inicialmente como um fator de crescimento para bactérias presente em batatas. Em 1951, o composto foi isolado e caracterizado por Reed et al. [7,8]. A capacidade antioxidante está localizada no grupamento tiol, que reage diretamente com os radicais oxidantes e que pode ser de valor terapêutico em patologias relacionadas à superprodução de radicais livres [9]. Ao contrário da maioria dos antioxidantes, que são apenas hidrofílicos ou lipofílicos, o ácido lipóico é capaz de atuar tanto em água como em meio lipídico [10,11], o que confere um amplo espectro de ação antioxidante.

Nutricionalmente, o ácido lipóico é encontrado no germe de trigo, no levedo de cerveja e na carne vermelha [12]. Este ácido aumenta o fluxo sanguíneo para os nervos e melhora a condução dos impulsos nervosos, sendo indicado no tratamento de problemas neurológicos como dormências e formigamentos de qualquer origem, não apenas os decorrentes do diabetes [10].

O ácido lipóico e sua forma reduzida têm sido referidos como antioxidantes universais [13]. As propriedades do ácido lipóico também incluem a capacidade de quelar metais e reter espécies reativas ao oxigênio, regenerar antioxidantes endógenos, além da participação no reparo de sistemas [14].

Um grande número de trabalhos e estudos clínicos [15-21] apontam para a utilidade do ácido lipóico como agente terapêutico para diversos distúrbios, como:

isquemia cerebral e do miocárdio, intoxicação por metais, diabetes, síndrome da imunodeficiência adquirida, esclerose múltipla e distúrbios neurodegenerativos, como mal de Alzheimer e demências relacionadas, bem como para o tratamento de cirrose hepática.

O ácido lipóico é utilizado em humanos pela via tópica, oral ou endovenosa. A via tópica é preferencialmente utilizada em dermatologia, com efeito, antienvhecimento de pele. Apesar do ácido lipóico não ter efeito tóxicos, a sua administração não deve exceder a dose recomendada de 200 -300 mg / dia para efeito antioxidante e de 400 - 600 mg / dia para tratamento de diabete. Uma overdose pode causar ansiedade, fadiga e convulsão [22].

Com a importância médica do ácido lipóico e seu potencial para o tratamento de várias doenças, em um futuro próximo, faz-se necessário um método de detecção e quantificação da concentração de ácido lipóico nos diversos tipos de amostra para que haja um controle dessa substância. Assim, metodologias analíticas como cromatografia e espectrometria de massa têm sido utilizadas para determinar a presença e a concentração do ácido lipóico [23-27]. Geralmente esses métodos fornecem resultados reprodutíveis, com grande sensibilidade e seletividade. Porém, essas técnicas requerem instrumentos sofisticados e muita manipulação das amostras. Os sensores químicos por outro lado possuem resultados precisos, reprodutíveis e rápidos. Por isso, técnicas eletroquímicas [4,28-30], têm sido utilizadas para a determinação deste ácido em medicamentos e amostras de alimentos, mas ainda há poucos trabalhos descritos na literatura. Neste sentido, a detecção eletroquímica é um método promissor, por envolver uma instrumentação bem mais barata e poder distinguir entre a forma oxidada e reduzida do ácido lipóico.

1.3 Sensores Eletroquímicos

Os sensores químicos são baseados na transformação da informação química em um sinal elétrico. Eles contêm três unidades básicas de funcionamento: 1) a parte receptora reconhece o evento químico, 2) transdutor que converte em um sinal mensurável e o 3) comunicador que conduz o sinal mensurável até o sistema de detecção. Os sensores eletroquímicos representam a classe que mais se destaca dentre os sensores químicos. Nesses sensores o transdutor é eletroquímico e pode ser de íon-seletivo, metálico, de carbono, de vidro, entre outros. São indicados para detectar e responder ao analito em estado sólido, líquido ou gasoso [31].

Nas últimas décadas, os sensores eletroquímicos têm se destacado na Química Analítica, devido ao fato de que satisfazem a necessidade de expansão com métodos rápidos, simples, eficientes e econômicos para a determinação de muitos analitos [32-34].

Neste sentido, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos á base de eletrodos quimicamente modificados tem sido difundido não apenas para determinações analíticas, mas também para a investigação de processos eletroquímicos e mecanismos reacionais tanto de espécies orgânicas como inorgânicas [35].

1.4 Eletrodos Quimicamente Modificados

O termo “Eletrodos Quimicamente Modificados” (EQM's) foi inicialmente utilizado com o intuito de designar eletrodos com espécies quimicamente ativas e convenientemente imobilizadas nas suas superfícies de modo a poder pré-estabelecer e monitorar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução e controlar sua reatividade e/ou seletividade [35]. Desta forma, EQM's têm sido

propostos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até a transferência de elétrons em moléculas.

Um EQM consiste de um eletrodo base (substrato) e uma camada do modificador químico. Este substrato deve apresentar características que dependem tanto do tipo de modificador quanto do método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais mais utilizados destacam-se a platina, ouro, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono, grafite pirolítico e pasta de carbono. A variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um grande campo de atuação destes dispositivos [36-41]. De forma geral, um dos métodos mais utilizado para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base consiste em adsorção, por ser um método simples e rápido.

Em processos eletrocatalíticos onde a oxidação ou redução de uma molécula reagente envolve uma cinética de transferência de elétrons lenta na superfície do eletrodo, a modificação química pode acelerar a troca de elétrons entre o eletrodo e a espécie envolvida e até mesmo, antecipar o início da reação, reduzindo o sobrepotencial de ativação [42,43]. Além disso, o ato de imobilizar uma determinada substância na superfície de um eletrodo representa um artifício simples e eficaz para o desenvolvimento de procedimentos e técnicas eletroanalíticas mais eficientes, permitindo obter maior sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e estabilidade ao sistema, quando comparado com o comportamento do eletrodo base [32,44].

Inicialmente, o desenvolvimento de EQM's a base de compostos biológicos (biossensores) foi motivo de crescentes esforços na pesquisa, devido a sua elevada seletividade em meios complexos e a possibilidade de desenvolvimento

de analisadores compactos e portáteis. Entretanto, a maioria destes dispositivos sofre limitações severas devido ao elevado custo das macromoléculas biológicas e a instabilidade operacional e de armazenamento devido ao componente biológico.

Uma alternativa muito difundida consiste na imobilização de complexos metálicos que imitam a estrutura ou atividade catalítica dos compostos biológicos. Estes compostos biomiméticos devem ser estáveis em meio aquoso ou orgânico e, entre os vários análogos dos compostos biológicos, as metaloftalocianinas aparecem como umas das classes mais utilizadas para o desenvolvimento de sensores biomiméticos.

1.5 Sensores à base de metaloftalocianinas (MPc)

O termo “ftalocianina” é originado da composição dos termos gregos “nafta” (óleo de pedra) e “cyanine” (azul escuro), sendo primeiramente usado em 1933, por Linstead para se referir a uma classe de compostos orgânicos com coloração azul intenso [45]. Ftalocianina e seus derivados foram extensivamente usados como corantes e tintas. Hoje, eles são comumente empregados na alta tecnologia, como em células foto voltaicas, eletrônica e sensores.

Ftalocianinas têm sido facilmente depositadas sobre diferentes tipos de material suporte, incluindo eletrodos. A imobilização desses compostos pode modificar a sua superfície formando eletrodos modificados com atividades eletrocatalíticas. Mais de 70 tipos diferentes de íons metálicos podem formar complexos pela coordenação com o anel da ftalocianina. A estrutura do anel aromático pode ser oxidada e/ou reduzida e se o metal central for um elemento de transição, ele pode sofrer oxidação ou redução em potenciais próximos ao do anel [46].

As ftalocianinas são macrocíclicos de compostos de coordenação altamente conjugados cujas propriedades físicas e químicas os tornaram alvo de imensa pesquisa nos mais variados campos da ciência. Além da intensa pigmentação, característica que proporcionou sua primeira aplicação como corante, destacam-se as altas estabilidades térmica e química, a não toxicidade, a atividade redox bem definida e o caráter semicondutor predominante nessas moléculas.

A ftalocianina na sua forma ácida (H_2Pc) é um sistema de anel com quatro unidades isoladas unidas por átomos de nitrogênio e com dois átomos centrais de hidrogênio (Figura 2). Os dois átomos de hidrogênio centrais da estrutura podem ser substituídos por uma variedade de metais e metalóides para a formação de metaloftalocianinas (Figura 3). As metaloftalocianinas são compostos geralmente estáveis e apresentam estruturas similares às porfirinas de origem natural, que apresentam funções características em muitos sistemas biológicos, como clorofila, hemoglobina, citocromos e várias oxidases. Devido a estes motivos, vários estudos com importância biológica têm sido realizados usando-se as metaloftalocianinas [47-50].

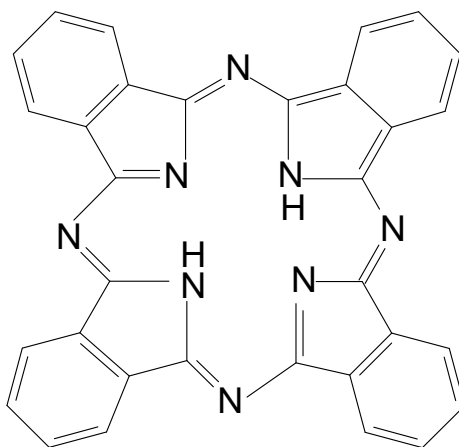


Figura 2. Estrutura da ftalocianina na forma ácida

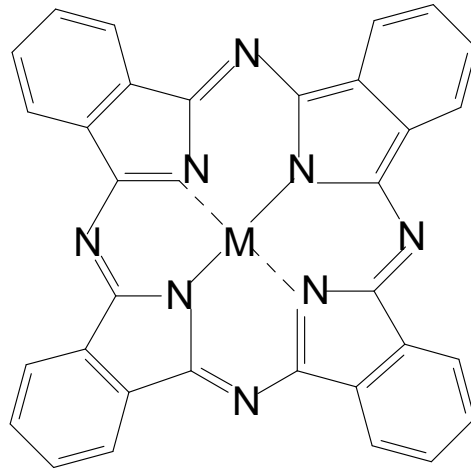


Figura 3. Estrutura de uma metalofteralocianina

As metalofteralocianinas são pouco solúveis em solventes polares; tal solubilidade pode ser aumentada através de substituições nos anéis benzênicos, utilizando-se substituintes que apresentem caráter polar, como o grupo sulfônico, resultando na obtenção de metalofteralocianinas tetrassulfonadas (MeTsPc) (Figura 4) que são extremamente solúveis em solventes polares, como a água [51].

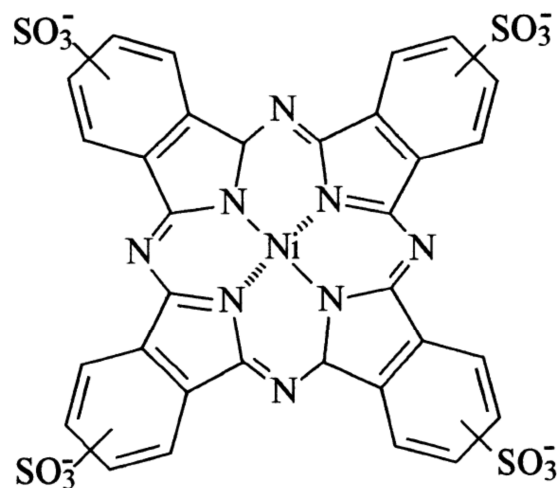


Figura 4. Estrutura de uma metalofteralocianina tetrassulfonada

As ftalocianinas tetrassulfonadas se adsorvem muito fortemente sobre as superfícies de carbono e grafite em níveis de monocamadas [52,53]. Esses eletrodos modificados exibem atividade eletrocatalítica para uma grande variedade de reações eletroquímicas de interesse prático, como as reações de redução de oxigênio e peróxido de hidrogênio [54,55], dióxido de carbono [56,57] e oxidações de mercaptanas, hidrazina, cisteína, íons nitrito e óxido nítrico [58-62].

A atividade catalítica da metaloftalocianina está relacionada com a natureza do metal central na ftalocianina, onde os orbitais moleculares externos da molécula reagente interagem com os orbitais externos localizados no metal central, facilitando a transferência de elétrons entre as moléculas [45,46]. A atividade catalítica da ftalocianina adsorvida pode, então, ser correlacionada com a densidade de elétrons localizados no metal central e com o potencial formal do par redox correspondente [44,63].

Em resumo, as ftalocianinas tetrassulfonadas constituem uma importante classe de catalisadores e são compostos que apresentam uma variedade de aplicação. No presente trabalho, a utilização de um eletrodo modificado com metaloftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc) em conjunto com o biopolímero quitosana foi investigada no desenvolvimento de um sensor eletroquímico.

1.6 Quitosana (QT)

A síntese da quitosana foi descrita em 1894 por Hoppe-Seyler [64], quando quitina foi submetida a um refluxo a 453 K em solução concentrada de hidróxido de potássio e resultando num produto bastante solúvel em ácido acético e ácido clorídrico. Além disso, o produto solubilizado precipitava por adição de álcalis,

e a este produto solubilizado se denominou quitosana, sendo assim obtida uma substância que possuía quantidade de nitrogênio igual à quitina original.

Devido às semelhanças estruturais, uma confusão se estabeleceu entre quitina e quitosana até o início do século XX, quando as pesquisas comprovaram que se tratavam de substâncias diferentes. Atualmente, estes compostos são bastante utilizados em decorrência de grande versatilidade e campos de aplicações que eles oferecem. Além do Japão, os Estados Unidos também produzem esses biopolímeros em grande escala, sendo esses países os maiores produtores, consumidores e pesquisadores desses polissacarídeos e derivados, seguidos da China, Noruega, Islândia, Canadá, Itália, Brasil e outros [65].

O mercado mundial envolvendo quitina e quitosana está relacionado aos segmentos de tratamento de água, cosméticos, alimentos, saúde, agroquímicos, biotecnologia, papel, têxtil, fotografia etc, e está distribuído em empresas localizadas nos EUA, no Canadá, no Japão, na Europa, na Ásia-Pacífico e no resto do mundo. As empresas que mais têm se destacado são Advanced Biopolymers AS (Noruega), Biothera Inc. (EUA), CarboMer Inc. (EUA), Dalian Xindie Chitin Co. Ltd. (China), Heppe GmbH (Alemanha), Kunpoong Bio Co. Ltd. (Coréia do Sul), Meron Biopolymers (Índia), Navamedic ASA (Noruega) e Primex Ehf (Islândia) [65].

Devido à baixa ocorrência natural, observada em apenas alguns microorganismos, a quitosana é normalmente obtida por desacetilação da quitina. As fontes mais viáveis economicamente para a obtenção da quitina e, conseqüentemente, da quitosana são os rejeitos industriais dos processamentos de crustáceos, principalmente de caranguejos, camarões e lagostas, já que a produção de quitina e quitosana por microorganismos ainda é complexa, devido ao alto custo

e problemas técnicos. Entretanto, para evitar problemas futuros, cada vez mais crescem as investigações em busca de novas fontes para obtenção de quitina e quitosana [66-68]. A extração de quitina e quitosana a partir de crustáceos envolve basicamente três etapas: desproteinização, desmineralização e desacetilação [69].

A quitosana é um polímero linear, a unidade primária é o 2- deoxi-2- (acetilamino) glicose, que se une a outras unidades, formando uma longa cadeia linear (Figura 5). Quitosana é solúvel em ácidos diluídos, sendo possível solubilizá-la em soluções de ácido clorídrico e de ácidos orgânicos como acético, fórmico, oxálico e láctico [70].

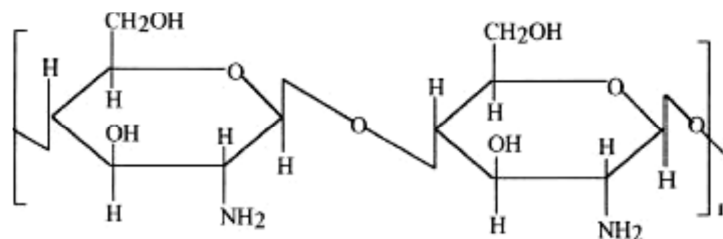


Figura 5. Estrutura da quitosana

A quitosana é uma base fraca com pKa entre 6,2 – 7,0, insolúvel em pH neutro e alcalino, no entanto, em meio ácido os grupos amino são carregados positivamente, conferindo ao biopolímero uma alta densidade de carga [71].

A quitosana se torna solúvel apenas em pH < 4,0, ou quando o grau de desacetilação for maior que 85 %, tornando a cadeia polimérica predominantemente hidrofílica, acarretando assim na sua dissociação em pH em torno de 6,5 [71].

Estudos têm demonstrado que a quitosana é um excelente sorvente para íons metálicos, com maior capacidade de sorção que a maioria das resinas quelantes comerciais [72,73]. A alta afinidade da quitosana por íons metálicos se

deve principalmente aos grupos amino (-NH₂) e hidroxila (-OH) distribuída na matriz polimérica, que servem como sítios de coordenação e interação eletrostática, respectivamente [74].

A grande habilidade em formar complexos com diversos íons metálicos é favorecida pela estrutura flexível da cadeia polimérica da quitosana, que possibilita ao polímero adotar uma configuração adequada para a complexação [75].

1.7 Determinações eletroquímicas de ácido lipóico

Poucos trabalhos têm sido publicados na literatura sobre a determinação de ácido lipóico utilizando técnicas eletroquímicas. ZIYATDINOVA e colaboradores [29], em 2004, determinaram ácido lipóico utilizando um eletrodo de carbono vítreo em uma solução de H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹, com a técnica de voltametria de varredura linear. Um pico anódico irreversível bem definido foi observado em 0,72 V vs ECS, a faixa linear obtida para a determinação de ácido lipóico foi de 1,15x10⁻⁵ a 1,73x10⁻⁴ mol L⁻¹ e o limite de detecção foi de 5,75x10⁻⁶ mol L⁻¹. O método proposto não foi aplicado em amostras reais. Este mesmo autor e colaboradores [30], em 2009, propuseram a utilização de um eletrodo de carbono vítreo modificado com multicamadas de nanotubos de carbono para a determinação de ácido lipóico. Experimentos foram realizados em uma solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ com a técnica de voltametria de varredura linear e velocidade de 25 mV/s. A faixa linear para a determinação de ácido lipóico foi de 2,6x10⁻⁵ a 1,8x10⁻⁴ mol L⁻¹ e o limite de detecção foi de 1,9x10⁻⁵ mol L⁻¹. A determinação do ácido lipóico foi realizada em amostras farmacêuticas (Oktyabr e Marbiofarm) os valores rotulados foram de 12 e 25 mg e os valores encontrados foram de 11,09±0,2 e 24,8±0,6 mg, respectivamente. O eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de

carbono e o eletrodo não modificado apresentaram um potencial de pico em 0,81 V e 0,91 V, respectivamente, apesar dessa redução de potencial de pico em 0,1 V, o eletrodo modificado não apresentou diferença no valor do limite de detecção em relação ao eletrodo não modificado.

BRETT e colaboradores [4], em 2007, empregaram um eletrodo de carbono vítreo na determinação de ácido lipóico em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,9 e utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. O pico de oxidação do ácido lipóico foi registrado em 0,8 V vs Ag/AgCl, o eletrodo de carbono vítreo apresentou uma faixa de resposta linear variando entre 1,0 x 10⁻⁶ a 7,5 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (r= 0,9997), limite de detecção de 1,8 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e limite de quantificação de 6,1 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. A determinação de ácido lipóico foi realizada em amostras de suplemento dietético Poly-MVATM e Solgar-ALA utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial com método de adição padrão. A amostra de Poly- MVATM não apresentava a quantidade de ácido lipóico no seu rotulo e a quantidade encontrada pelo método proposto foi de 118,60 mg L⁻¹. Na amostra Solgar- ALA a quantidade de ácido lipóico especificado no rotulo era de 60 mg por capsula e o valor encontrado pelo método proposto foi de 58,97 mg por capsula. Apesar de boa sensibilidade, o eletrodo de carbono vítreo apresentou problemas de estabilidade devido a adsorção de produtos da oxidação de ácido lipóico na superfície do eletrodo de carbono vítreo, sendo necessária a sua renovação.

MIRANDA e colaboradores [5], em 2012, utilizaram um eletrodo de oxido de estanho dopado com flúor para a determinação de ácido lipóico em amostra farmacêutica e suplemento dietético. A técnica empregada foi a de voltametria de onda quadrada em eletrólito H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, pH 2. Sob as condições otimizadas

uma faixa de resposta linear de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi obtida com o limite de detecção de $3,68 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A determinação de ácido lipóico em amostra farmacêutica e suplemento foi realizado utilizando o método de adição padrão. Comprimidos comerciais e sol-gel contendo capsulas de 2,5 mg (Policolinossil, Nupel SL, Spain) e 100 mg (Alpha Lipoic Acid 100, GNC, USA) respectivamente. Os resultados obtidos com o eletrodo de oxido de estanho dopado com flúor concordam com os valores rotulados no intervalo de $\pm 4,1\%$.

1.8 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi realizar um estudo das propriedades eletroquímicas de um eletrodo de carbono vítreo modificado com quitosana e ftalocianina tetrassulfonada de níquel para a determinação de ácido lipóico.

Para se atingir o objetivo proposto, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Estudar as respostas eletroquímicas do eletrodo de carbono vítreo não modificado (CV), modificado com quitosana (CV/QT) e modificado com quitosana e ftalocianina tetrassulfonada de níquel (CV/QT-NiTsPc) na ausência e presença de ácido lipóico;
- Estabelecer as melhores concentrações experimentais na preparação de filmes QT e NiTsPc sobre CV;
- Caracterizar o filme utilizando a análise de espectroscopia de ultravioleta visível;

- Estabelecer as melhores condições analíticas e parâmetros experimentais utilizando as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada na determinação de ácido lipóico;
- Aplicar a melhor técnica e o eletrodo CV/QT-NiTsPc na determinação de ácido lipóico em suplemento alimentar e comparar com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

CAPÍTULO 2
PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato/galvanostato EcoChemie modelo μ AUTOLAB Tipo II acoplado a um microcomputador dotado de uma interface GPES para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

O sistema utilizado foi constituído de uma célula eletroquímica, com uma tampa de Teflon e entradas para o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar de platina, como mostrada na Figura 6. O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo de carbono vítreo (CV) com uma área geométrica de aproximadamente $0,2 \text{ cm}^2$ e foi utilizado após o pré-tratamento com polimento de alumina e a modificação com os filmes de Quitosana (QT) e ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc). Antes das medidas eletroquímicas, as soluções eletrolíticas foram mantidas saturadas com gás nitrogênio (N_2) do tipo 5.0 – Gases Especiais da White Martins S.A. (São Luis-MA), para eliminação de possíveis interferências causadas pelo oxigênio nas curvas corrente-potencial.

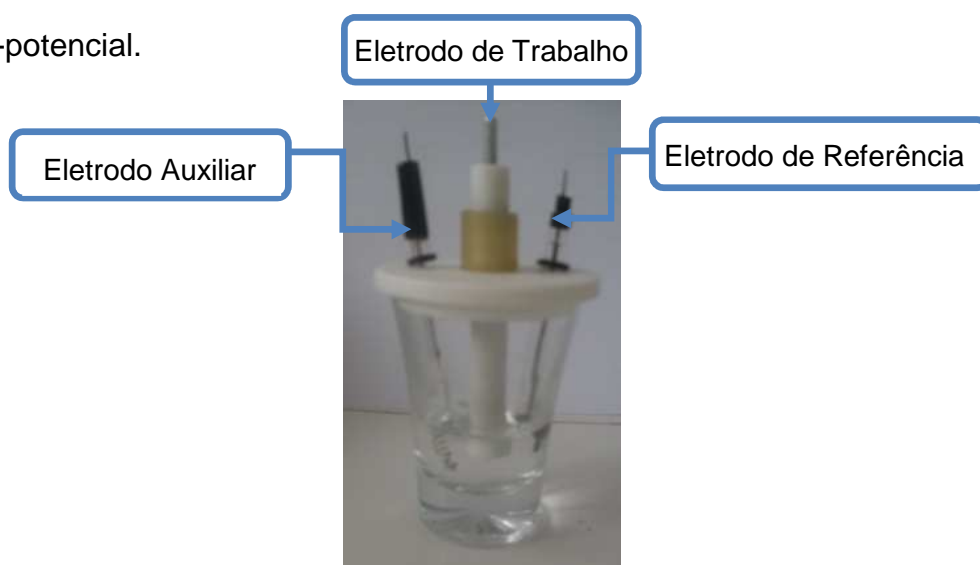


Figura 6. Célula eletroquímica

2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica e preparados com água destilada e purificada, num sistema Human UP 500 UV da Bio Human e o pH das soluções tampão, medido em um pH-metro modelo 300 da Analyser (São Paulo-Brasil).

Os reagentes ácido lipóico, ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc), acetonitrila e metanol foram adquiridos da Aldrich, Quitosana da FLUKA, KH_2PO_4 e K_2HPO_4 foram adquirido da Merck. A solução tampão Britton-Robinson $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (constituída de ácido acético glacial, ácido fosfórico e ácido bórico) preparada de acordo com os procedimentos descritos por ENSAFI, KHAYAMIAN e KHALOO [76]. As soluções tampão fosfato-hidróxido de sódio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$), McIlvaine ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), Sorensen ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$), foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos na literatura [77].

2.3 Pré-tratamento da superfície do eletrodo de carbono vítreo

Inicialmente, a superfície do eletrodo de carbono vítreo (CV) foi lixada sequencialmente com lixas de carbetto de silício de granulometria 600, 1200 e 2000 (3M do Brasil, São Paulo-SP). Em seguida, o eletrodo foi lavado com água purificada e, posteriormente, imerso em água em um sistema de banho ultra-som Unique modelo USC - 1400, por cerca de dez minutos, para a remoção de possíveis partículas de carbetto de silício impregnadas na superfície do eletrodo.

Em seguida, o eletrodo CV foi submetido a um polimento manual, com suspensão aquosa de granulações de alumina 1,00; 0,30 e 0,05 μm (Micropolishing Material, Buehler Ltda). Após o polimento, o eletrodo foi lavado com água purificada, e posteriormente, imerso em água purificada e levado para um sistema de banho

ultra-som por cerca de dez minutos, para a remoção de possíveis partículas de alumina da sua superfície.

2.4 Modificação da superfície do eletrodo CV

O eletrodo CV pré-tratado foi modificado com a deposição de 20 μL sobre a superfície do eletrodo de uma solução preparada pela mistura da solução NiTsPc $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e da solução QT $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, seguido de evaporação do solvente num dessecador acoplado a uma bomba de vácuo. No estudo da composição do filme, as concentrações de QT utilizadas foram: $6,21 \times 10^{-3}$; $4,66 \times 10^{-3}$; $3,10 \times 10^{-3}$; $1,55 \times 10^{-3}$ e $6,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e as concentrações de NiTsPc: $1,0 \times 10^{-3}$; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2.5 Espectroscopia no ultravioleta visível

Os experimentos de espectroscopia ultravioleta foram realizados em espectrofotômetro Varian modelo Cary 50, o comprimento de onda foi variado de 200 a 800 nm. Para os espectros de QT e QT-NiTsPc foram realizados filmes depositados sobre uma das faces de uma cubeta de quartzo de 1 mm, seguido de secagem por 24 horas num dessecador acoplado a uma bomba de vácuo. Os espectros de NiTsPc foram obtidos com uma solução de NiTsPc $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico.

2.6 Técnicas eletroquímicas

Para a escolha da melhor técnica eletroanalítica otimizou-se os parâmetros experimentais e operacionais das medidas realizadas com as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. Após as otimizações, curvas analíticas foram obtidas e comparados os resultados, a técnica que apresentou melhor sensibilidade foi utilizada para os estudos posteriores.

2.7 Preparação da amostra comercial

A amostra de suplemento dietético utilizada foi o ácido α -lipóico 300 mg, contendo 60 comprimidos, lote nº 1032119, fabricado na Empresa MRM (Metabolic Response Modifiers). Na preparação da amostra, foram macerados 3 comprimidos até a obtenção de um pó fino e diluído em uma solução de etanol 25% e filtrada (filtro com membrana DU rapore 0,45U de poro, 13 mm).

2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica mais comumente utilizada para a determinação do ácido lipóico é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Assim sendo medidas cromatográficas foram realizadas usando o método da USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA) [78] e um cromatógrafo modelo Agilent 1200 Series, equipado com bomba quaternária, com detector UV-VIS e coluna Microsorb-MV 100 C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m). A fase móvel utilizada foi composta de metanol, solução fosfato monobásico 5×10^{-3} mol L⁻¹ e acetonitrila (116: 92 : 18) mL e o pH 3,25 ajustado com uma solução de ácido fosfórico 8,3%, temperatura 35°C, vazão de 1 mL por minuto, com comprimento de onda de 215 nm e volume da injeção de 20 μ L, método isocrático.

Na diluição da amostra e do padrão foi utilizado um solvente tampão, preparado pela mistura de acetonitrila e solução de fosfato monobásico 5×10^{-3} mol L⁻¹ (1v:1v), e o pH ajustado para 3,9 com uma solução de ácido fosfórico 8,3% . Em seguida a solução foi filtrada.

2.9 Limpeza dos materiais de vidro

Antes de serem utilizados, a célula eletroquímica e os materiais de vidro utilizados nos experimentos foram imersos numa solução alcalina de permanganato

de potássio, por cerca de 30 min, depois lavados com solução ácida de peróxido de hidrogênio ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$, 1:1) e finalmente lavados com água purificada.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comportamento voltamétrico do ácido lipóico sobre o eletrodo CV modificado com QT-NiTSPc

A Figura 7 (a,b) mostra os voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo (CV) e do eletrodo de carbono vítreo modificado com quitosana e ftalocianina tetrassulfonada de níquel (CV/QT-NiTSPc) na ausência do ácido α -lipóico (ALA) em uma solução tampão fosfato pH 7. O eletrodo CV também foi modificado com NiTSPc mas, não apresentou estabilidade devido sua alta solubilidade em solução aquosa. Os voltamogramas cíclicos na presença de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ALA em uma solução tampão fosfato pH 7 do eletrodo CV, eletrodo CV modificado com quitosana (CV/QT), do eletrodo CV/QT-NiTSPc, são apresentados na Figura 7 (c,d,e) respectivamente.

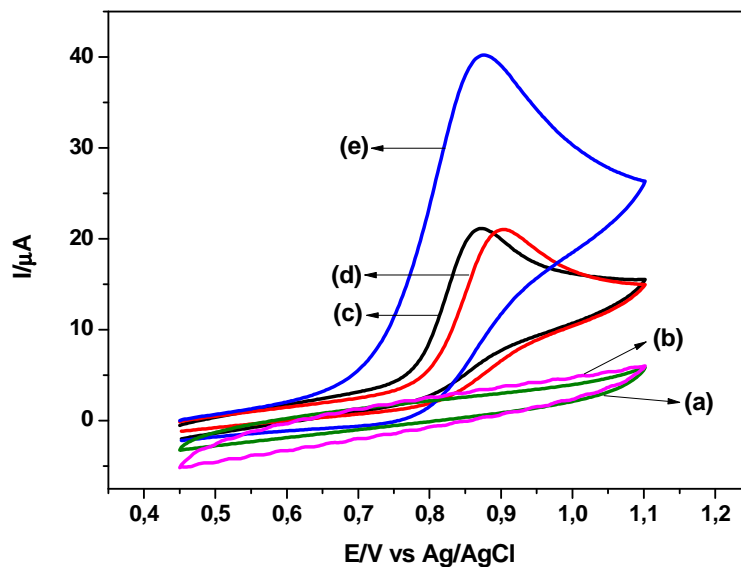


Figura 7. Voltamogramas cíclicos do eletrodo CV (a) e CV/QT-NiTSPc (b) na ausência de ALA e dos eletrodos CV (c), CV/QT (d) e CV/QT-NiTSPc (e) na presença de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ALA em uma solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7, $v = 0,05$ V s⁻¹.

Os voltamogramas na Figura 7 (a, b) não apresentam nenhum pico voltamétrico (processo faradaico), ou seja, não se observa transferência de elétrons na interface eletrodo-eletrólito e que a corrente observada é de natureza capacitiva. Os voltamogramas na Figura 7 (c, d, e) mostram um pico anódico irreversível com potencial de pico (E_p) em torno de 0,85V sobre o eletrodo CV (Figura 7c) e 0,90 V sobre o eletrodo CV/QT (Figura 7d) na presença de ALA em solução. Estes valores indicam um deslocamento de 50 mV no valor de E_p para valores mais positivos, ou seja, que a modificação do eletrodo CV com QT diminui a sua atividade catalítica para a oxidação de ALA. Esta observação pode ser atribuída a um aumento na resistividade da interface eletrodo/solução com a presença do biopolímero sobre a superfície do eletrodo.

Por outro lado, quando o eletrodo CV foi modificado com QT-NiTsPc e colocado no eletrólito contendo ALA (Figura 7e), o potencial do início da oxidação deslocou-se para valores menos positivos (cerca de 100 mV) em relação ao eletrodo CV/QT e apresentou um valor de corrente de pico (I_p) cerca de 1,6 vezes maior, mostrando um aumento na atividade catalítica do eletrodo CV para a oxidação de ALA.

3.2 Otimização das condições experimentais para a modificação do eletrodo CV com filmes QT-NiTsPc

Para a modificação da superfície de um eletrodo é essencial estabelecer as melhores condições experimentais da metodologia adotada. Neste sentido, estudos do desempenho do eletrodo CV/QT-NiTsPc para a oxidação de ALA em função da variação nas concentrações de QT e de NiTsPc utilizadas no processo de modificação do eletrodo CV foram realizados.

Inicialmente, a concentração de NiTsPc foi fixada em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e soluções de QT com concentrações de $6,21 \times 10^{-3}$; $4,66 \times 10^{-3}$; $3,10 \times 10^{-3}$; $1,55 \times 10^{-3}$ e $6,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas. Os resultados da oxidação de ALA sobre os eletrodos CV/QT-NiTsPc modificados sob estas condições são apresentados na Figura 8. Estes resultados mostram que o maior valor de I_p foi registrado para uma concentração de QT de $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 1); portanto, foi a concentração escolhida para continuidade do trabalho.

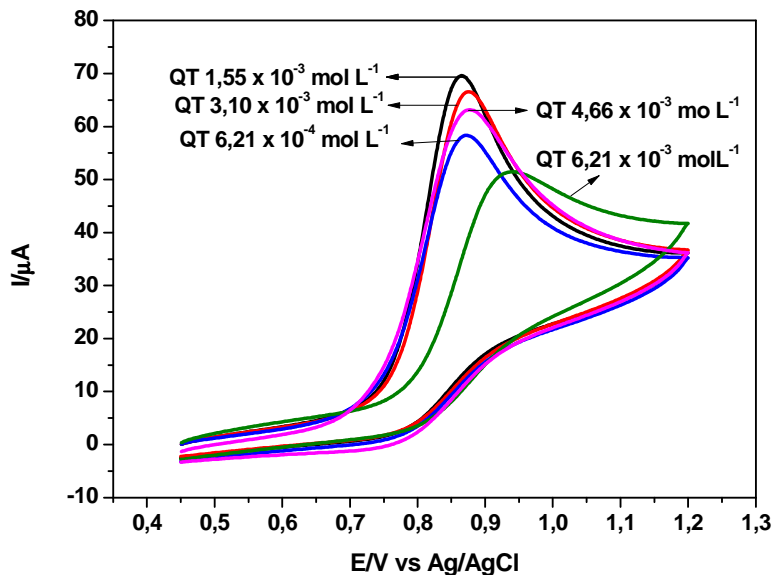


Figura 8. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de ALA sobre um eletrodo CV /QT-NiTsPc a partir de soluções contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NiTsPc e diferentes concentrações de QT. Eletrólito tampão fosfato pH 7 contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Tabela1. Efeito da concentração de QT na resposta do eletrodo CV / QT- NiTsPc.

[QT] / mol L ⁻¹	I_p / μA
$6,21 \times 10^{-3}$	51,44
$4,66 \times 10^{-3}$	63,14
$3,10 \times 10^{-3}$	66,54
$1,55 \times 10^{-3}$	69,56
$6,21 \times 10^{-4}$	58,31

Na etapa seguinte, com a concentração de QT fixada em $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a concentração de NiTsPc na solução utilizada para modificação do eletrodo CV foi variada entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e os voltamogramas de varredura linear registrados são apresentados na Figura 9. O maior valor de I_p para a oxidação de ALA sobre estes eletrodos modificados foi obtido com a solução de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NiTsPc (Tabela 2). Experimentos realizados com concentrações de NiTsPc de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ resultaram em modificações que indicaram lixiviação de NiTsPc (identificado por coloração azul do eletrólito a partir da superfície do eletrodo modificado), bem como descolamento do filme de QT. Assim sendo, o eletrodo CV passou a ser modificado a partir de soluções $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NiTsPc.

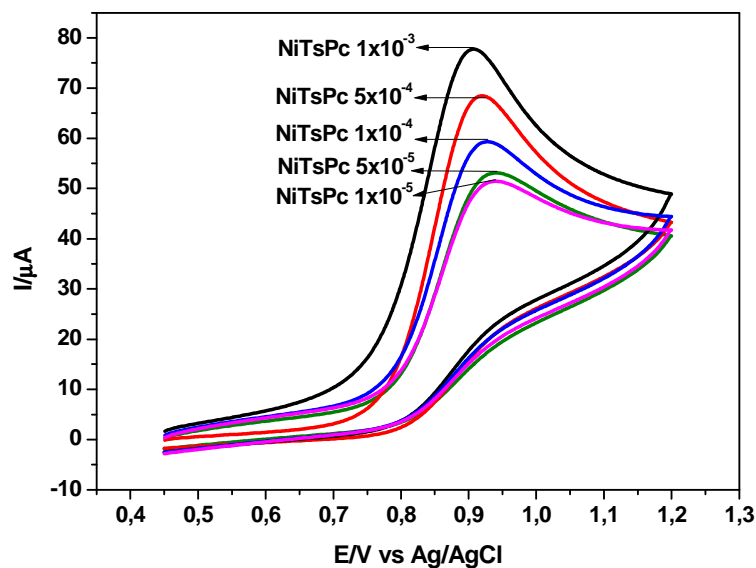


Figura 9. Voltamogramas cíclicos para a oxidação de ALA sobre um eletrodo CV /QT-NiTsPc a partir de soluções contendo $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de QT e diferentes concentrações de NiTsPc. Eletrólito tampão fosfato pH 7, contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Tabela 2. Efeito da concentração de NiTsPc na resposta do eletrodo CV/QT-NiTsPc.

[NiTsPc] / mol L ⁻¹	Ip/ μ A
$1,0 \times 10^{-3}$	77,73
$5,0 \times 10^{-4}$	68,48
$1,0 \times 10^{-4}$	59,32
$5,0 \times 10^{-5}$	53,09
$1,0 \times 10^{-5}$	51,44

3.3 Espectroscopia na região do UV-Visível

A análise por espectroscopia na região ultravioleta visível (UV-Visível) foi feita para comparar as características de absorção das moléculas nessa região, as quais dependem das transições eletrônicas dos átomos presentes nos sistemas estudados [79]. Por fim, a presença de novas bandas de absorção ou suas modificações observadas nos espectros pode indicar o tipo de ligação ou interação entre os grupos estudados [80-81].

O espectro UV-Vis de absorção da quitosana (Figura 10a) apresenta máximo de absorção na região de comprimento de onda (λ) de 200 a 250 nm, atribuídos ao grupamento amina presente na sua estrutura [82].

No espectro de absorção no UV-Vis da solução de NiTsPc (Figura 10b) podemos ver duas bandas de absorção, estão relacionadas às transições eletrônicas diretas entre os orbitais moleculares [53] e são conhecidas como banda B ou Soret na região entre 250-500 nm e banda Q na região entre 600-800 nm. Estas bandas relacionam-se com as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ permitidas. Quanto à banda Q, o máximo em 655 nm corresponde à absorção eletrônica das espécies monoméricas enquanto o máximo em 624 corresponde à absorção eletrônica das espécies diméricas [53]. Resultados semelhantes foram observados para o sistema de QT-NiTsPc (Figura 10c), no entanto, as bandas apresentaram um deslocamento

de 624 para 605 nm para as espécies diméricas e de 655 para 669 nm para as espécies monoméricas. Tal deslocamento pode ser atribuído às interações iônicas entre os grupos sulfônicos (SO_3) de NiTsPc com grupos protonados amina (NH_3^+) da quitosana.

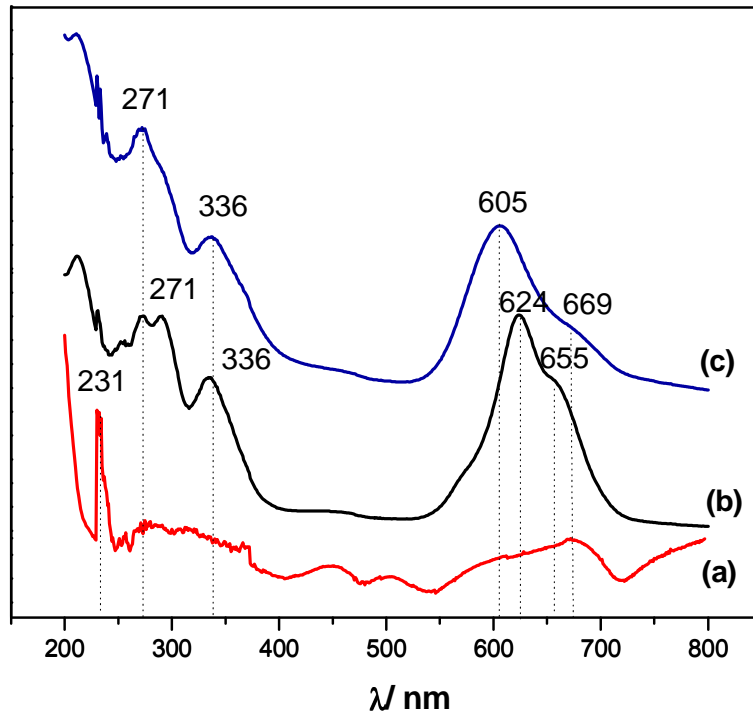


Figura 10. Espectros de absorção das soluções de QT-filme (a), NiTsPc 1×10^{-4} mol L^{-1} (b) e QT-NiTsPc-filme (c).

3.4 Estudo da velocidade de varredura sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc

A Figura 11 apresenta os voltamogramas de varredura linear registrados em diferentes velocidades de varredura do potencial (v) para a reação de oxidação de ALA sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato (pH 7) contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA, saturada com nitrogênio. Os voltamogramas apresentados mostram que há um aumento do sinal analítico (correntes anódicas) com aumento da velocidade de varredura do potencial. A partir destes dados foi

construído o gráfico de I_p em função de $(v)^{1/2}$, o qual resultou numa dependência linear (Figura 12), ou seja, de acordo com o esperado para um processo eletroquímico irreversível, com controle difusional expresso pela Equação 1 [83]:

$$I_p = (2,99 \times 10^{-5}) n A (\alpha n_0)^{1/2} C_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

onde n representa o número total de elétrons envolvidos na reação de oxidação de ALA; A a área do eletrodo de trabalho ($0,2 \text{ cm}^2$); " αn_0 " o parâmetro que reflete a irreversibilidade da reação e; " D_o " ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) o coeficiente de difusão da espécie eletroativa em solução; C_o^* (mol cm^{-3}) a concentração dessas espécies. No presente estudo, o valor do coeficiente de difusão utilizado foi de $D_o = 1,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [4].

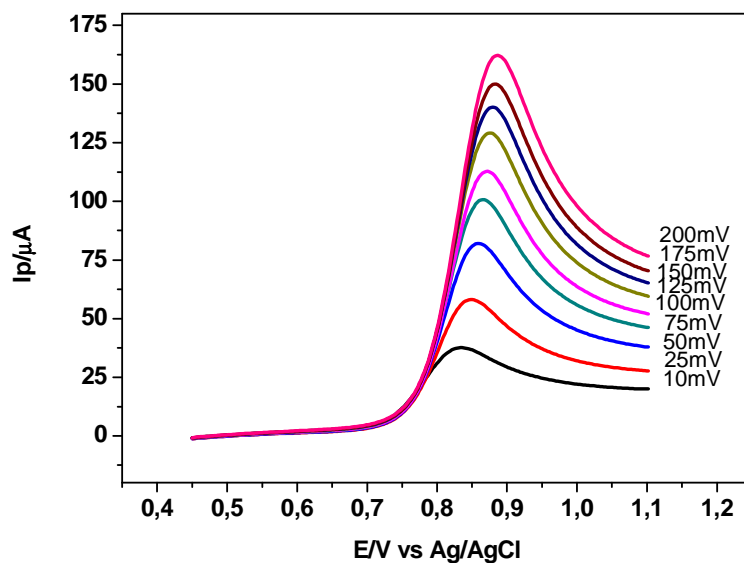


Figura 11. Voltamogramas de varredura linear da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes velocidades de varredura do potencial. Solução tampão fosfato (pH7) contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, saturada com N_2 .

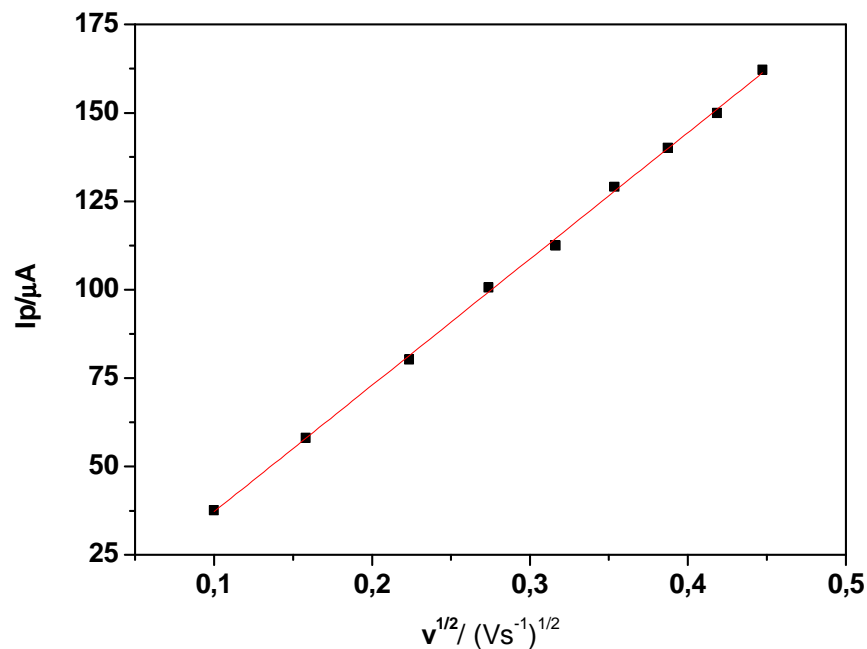


Figura 12. Gráfico da dependência de I_{p_a} com $(v)^{1/2}$.

O parâmetro αn_0 na Equação 1 pode ser determinado através da dependência linear do potencial de pico (E_p) com o logaritmo da velocidade de varredura do potencial ($\text{Log } v$) [83], ou seja, de acordo com a Equação 2:

$$E_p = K + [0,03/(\alpha n_0)] (\text{Log } v) \quad (2)$$

onde K é uma constante, R a constante dos gases, T a temperatura absoluta e F a constante de Faraday. Assim, o gráfico de E_p vs. $\text{Log } v$ foi construído (Figura 13) e o valor para αn_0 foi determinado como sendo de aproximadamente 0,68. Substituindo-se este valor na Equação 1, foi possível obter um valor para n de aproximadamente 2, o que sugere que a reação de oxidação de ALA sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc ocorre segundo um mecanismo envolvendo 2 elétrons, ou seja, de acordo com a equação [5]:

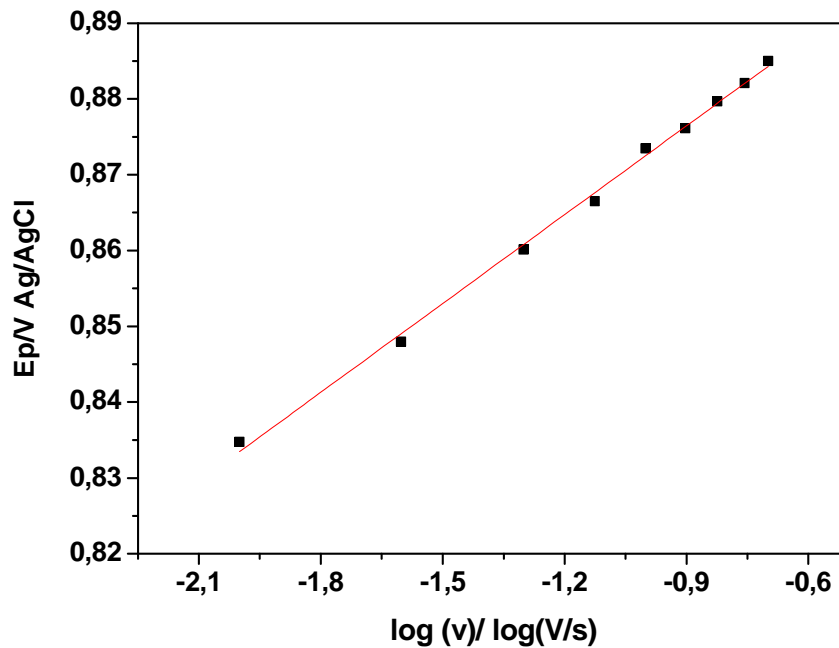
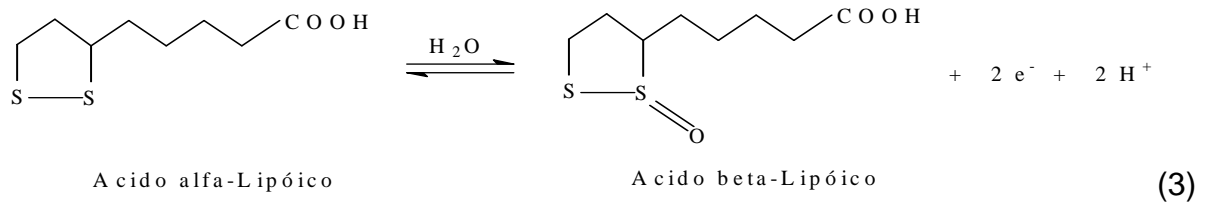


Figura 13. Gráfico da dependência de E_p com $\text{Log } v$.

3.5 Otimização de Parâmetros Analíticos

Para investigar a possibilidade da aplicação do eletrodo CV/QT-NiTsPc como um sensor eletroquímico para a detecção de ALA, experimentos para estabelecer as melhores condições eletroanalíticas foram realizados. Inicialmente, medidas de voltametria de varredura linear em uma solução tampão Britton-Robbinson de diferentes pH's contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA (Figura 14 e Tabela 3) mostraram um valor máximo de corrente de pico (I_p) em pH 7.

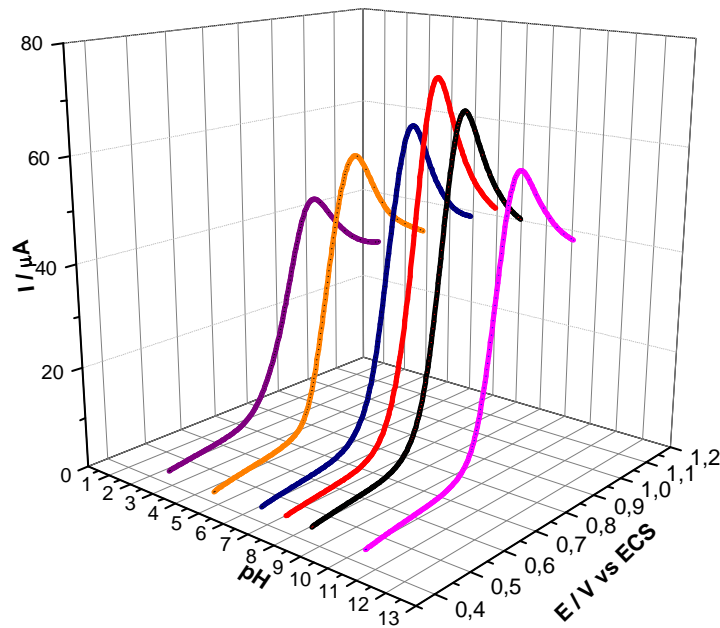


Figura 14. Voltamogramas de varredura registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em soluções Britton-Robinson de diferentes valores de pH, contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. Temperatura ambiente.

Tabela 3. Valores de I_p referentes a diferentes pH's na oxidação de ALA.

pH	$I_p / \mu\text{A}$
2	45,0
4	55,8
6	62,8
7	75,4
8	69,6
10	57,5

Em seguida, para se avaliar a influência da natureza da solução tampão no comportamento do eletrodo CV/QT-NiTsPc na presença de ALA, experimentos similares foram realizados em 5 (cinco) soluções tampão: 1) Fosfato-hidróxido de sódio, 2) Sörensen, 3) McIlvaine, 4) Fosfato de potássio e 5) Britton-Robinson, de pH 7, e os resultados são apresentados na Figura 15. Uma comparação dos valores de

I_p extraídos desta figura (Tabela 4) mostra que a solução tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/KH_2PO_4) foi a que apresentou maior magnitude de corrente.

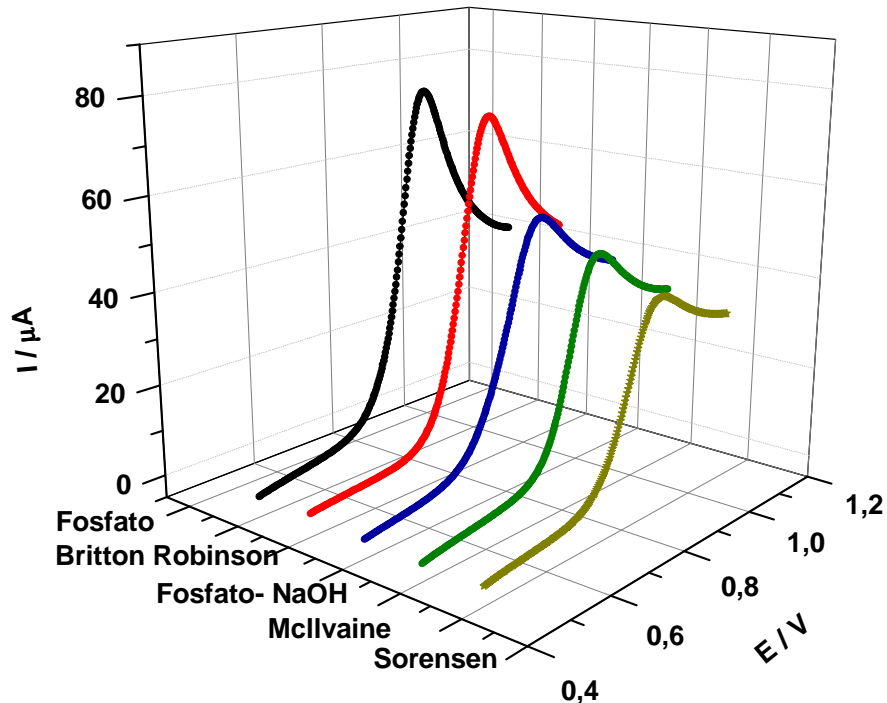


Figura 15. Voltamogramas de varredura registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes solução tampão de pH 7 contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. Temperatura ambiente.

Tabela 4. Dependência da corrente de pico (I_p) da oxidação de ALA com a natureza da solução tampão pH 7, sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc. Dados extraídos da Figura 15.

Solução Tampão	$I_p / \mu\text{A}$
Fosfato de potássio	76,7
Britton Robinson	72,4
fosfato-hidróxido de sódio	52,9
McIlvaine	47,7
Sörensen	41,3

3.6 Estudo de repetibilidade

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções padrão ALA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O

estudo de repetibilidade intra dias foi feito por medidas sucessivas realizadas com o eletrodo CV/ QT-NiTsPc no mesmo dia (n=10) e o desvio padrão relativo obtido foi de 0,67%.

No estudo de repetibilidade inter dias foram realizadas 5 medidas em dias alternados, com o eletrodo CV/QT- NiTsPc preparado diariamente (n=5) e testado em soluções de ALA 1×10^{-3} mol L⁻¹. Os resultados apresentaram desvio padrão relativo de 1,15%.

3.7 Curva Analítica utilizando a técnica de VC

Após estabelecer as condições analíticas otimizadas para a detecção voltamétrica de ALA com o eletrodo CV/QT-NiTsPc, voltamogramas cíclicos em uma solução tampão fosfato de pH 7, antes e após adições consecutivas de 20 µL de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ALA, foram registrados e são apresentados na Figura 16. A partir dos valores de I_p extraídos desta Figura, uma curva analítica foi obtida e é apresentada na Figura 17. Em seguida, uma análise da curva analítica para calcular os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foi realizada, de acordo com IUPAC [84].

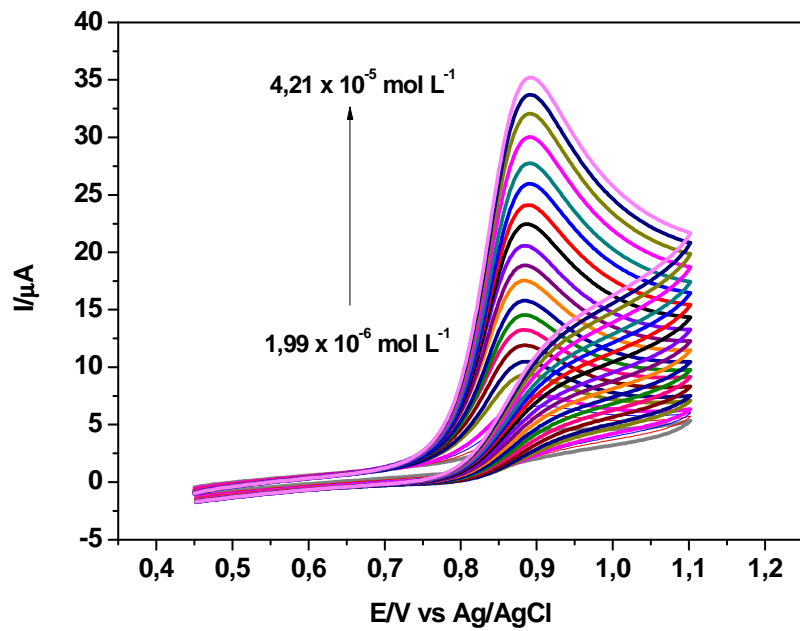


Figura 16. Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, após 21 adições consecutivas de 20 μL de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ e temperatura ambiente.

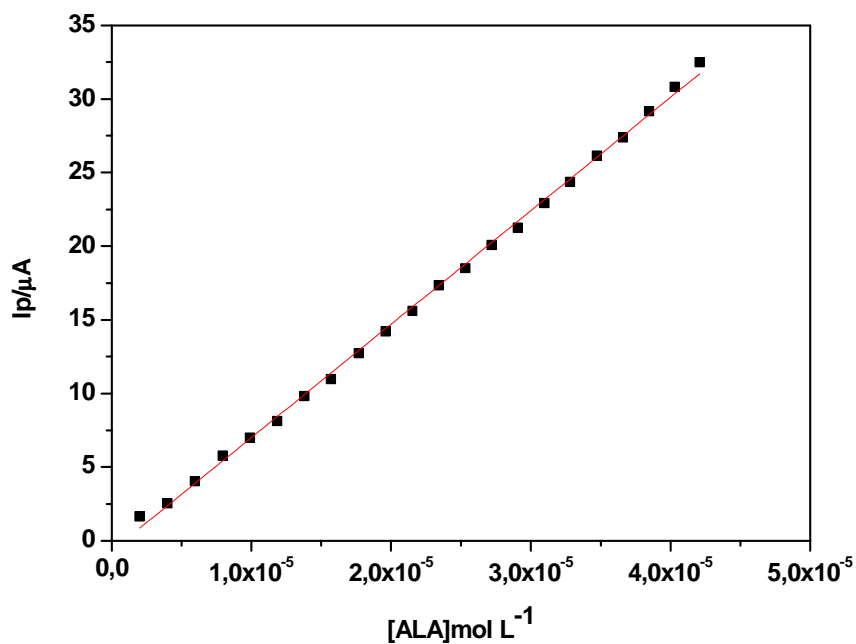


Figura 17. Curva analítica da detecção de ALA sobre um eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7.

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação, utilizou-se o desvio padrão da média aritmética de 10 voltamogramas do branco. A partir destes valores, calculou-se o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o ALA de acordo com as Equações 4 e 5:

$$LD = \frac{3 \times Sd}{b} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{10 \times Sd}{b} \quad (5)$$

onde Sd é o desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e b o valor do coeficiente angular da curva analítica. Os limites de detecção e de quantificação obtidos para o intervalo de concentração $1,99 \times 10^{-6}$ a $4,21 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ foram de $9,72 \times 10^{-8}$ e $3,24 \times 10^{-7}$, respectivamente, com comportamento linear e de acordo com a equação: (Ipa/μA): $6,88 + 0,832 \times 10^7$ [ALA] mol L⁻¹, e um coeficiente de correlação de 0,998.

3.8 Voltametria de pulso diferencial (VPD)

Continuando os estudos da avaliação analítica do eletrodo de CV/QT-NiTsPc, verificou-se o comportamento deste eletrodo utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). O voltamograma apresentou um pico de oxidação para o ALA em torno de 0,81V vs Ag/AgCl, como pode ser observado na Figura 18.

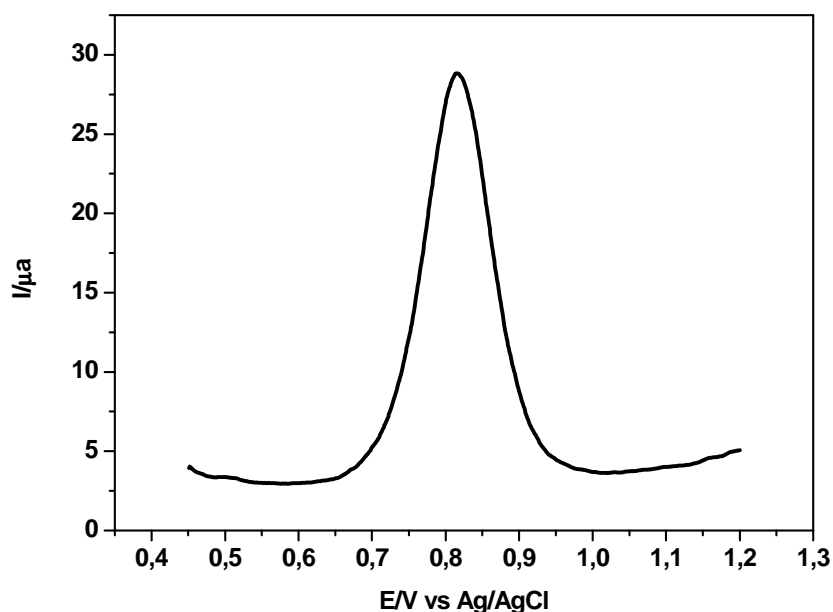


Figura 18. Voltamograma de pulso diferencial registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA. $v = 0,005$ V s⁻¹ e temperatura ambiente.

3.8.1 Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial é de grande importância a otimização dos parâmetros desta técnica para se obter as melhores respostas. Desta forma, os parâmetros velocidade de varredura, tempo de duração de pulso e amplitude de pulso foram avaliados. Inicialmente estudou-se a velocidade de varredura no intervalo de 0,005 a 0,015 V s⁻¹, e foram mantidos em 70 ms e 0,050 V os parâmetros de tempo de duração do pulso e amplitude de pulso, respectivamente. Na Figura 19 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial obtido sob diferentes velocidades de varredura de potencial. Observa-se que os picos se mostraram bem definidos em todas as velocidades, foi escolhida a velocidade de 0,007 V s⁻¹ para dar prosseguimento ao trabalho.

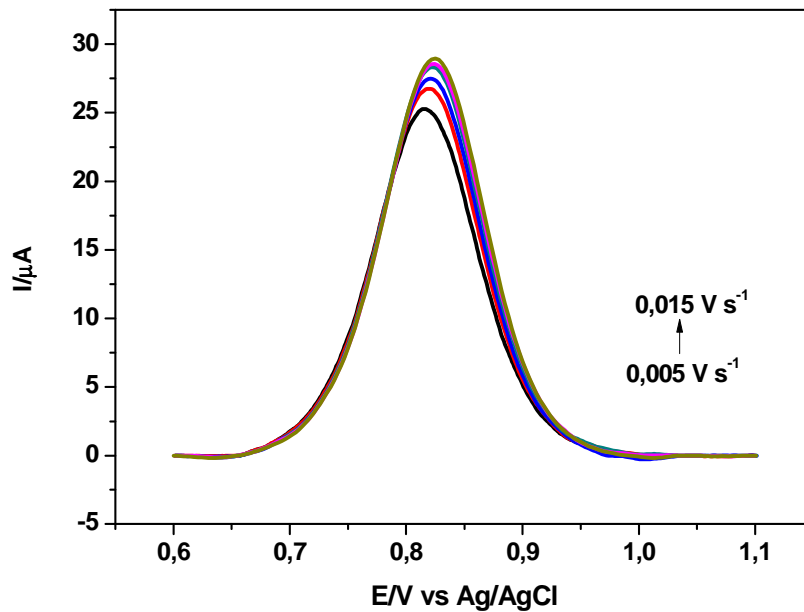


Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTSPc em diferentes velocidades de varredura do potencial. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA, saturada com N₂.

Para o estudo do tempo de duração de pulso foi avaliado um intervalo de tempo entre 20 a 70 ms, mantendo-se constante a velocidade de varredura em $0,007 \text{ V s}^{-1}$ e a amplitude de pulso em 0,050 V. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para ALA nos diferentes valores de duração de pulso para o eletrodo CV/QT-NiTSPc são apresentados na Figura 20.

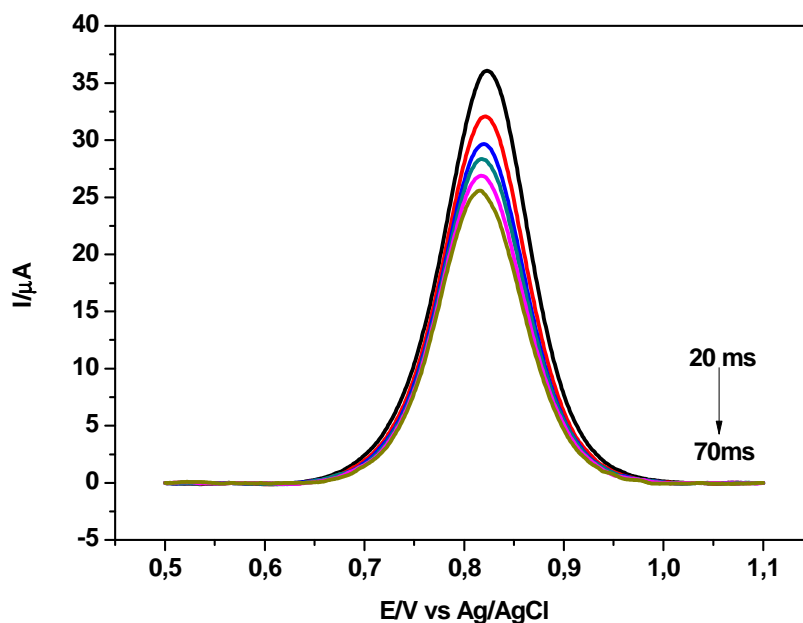


Figura 20. Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes tempo de duração de pulso. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA, $v=0,005$ V, saturada com N₂.

A partir dos voltamogramas verifica-se uma diminuição na corrente de pico com o aumento dos valores de tempo de duração do pulso e consequentemente uma perda na sensibilidade analítica. No tempo de 20 ms foi o que apresentou um alto valor de corrente de pico, portanto, esse foi o tempo de duração de pulso selecionado.

O ultimo parâmetro a ser otimizado na técnica de VPD foi a amplitude do pulso. Este estudo foi realizado no intervalo de 0,010 a 0,1 V, com variação de 0,010V, sendo fixados os valores de tempo de duração de pulso e velocidade de varredura em 20 ms e $0,007 \text{ V s}^{-1}$, respectivamente.

A Figura 21 mostra os voltamogramas de pulso diferencial ALA obtido em diferentes amplitudes de pulso no eletrodo. Observa-se que a medida que é aumentada a amplitude de pulso ocorre um aumento na intensidade de corrente de

pico, assim como um deslocamento de potencial. Neste caso, para os estudos subsequentes, foi escolhida a amplitude de pulso de 0,050 V devido o alto valor de corrente sem deslocamento de potencial.

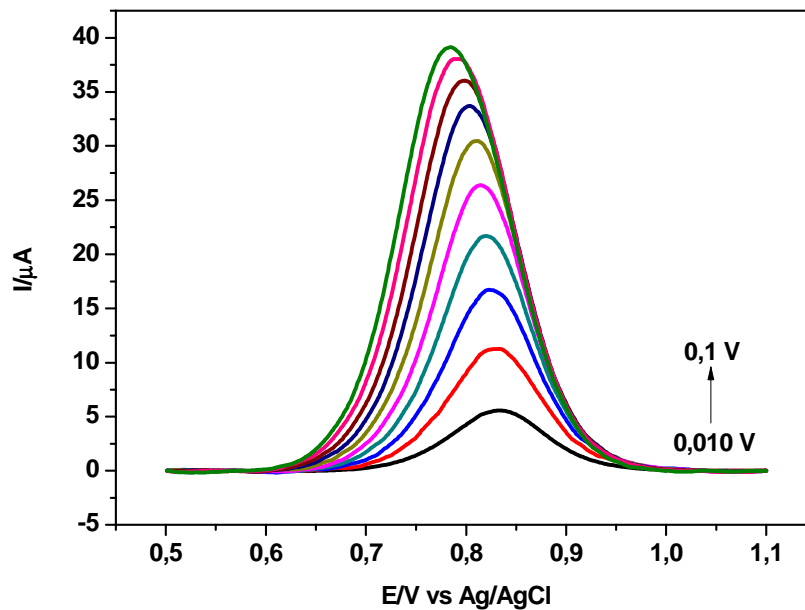


Figura 21. Voltamogramas de pulso diferencial da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de amplitude. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L⁻¹ de ALA, $v=0,005$ V s⁻¹, saturada com N₂.

3.8.2 Curva analítica utilizando a técnica de VPD

Após a otimização dos parâmetros experimentais para o eletrodo de CV/QT-NiTsPc utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, a curva analítica foi construída para verificar a resposta eletroquímica deste eletrodo em função da concentração de ALA. Adições de 20 μL foram realizadas a partir de uma solução padrão $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ALA em 20 mL de tampão fosfato pH 7.

Na Figura 22 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc após sucessivas adições de ALA no intervalo de $9,99 \times 10^{-7}$ a $3,38 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e na Figura 23 é apresentada a

respectiva curva analítica. O comportamento linear apresentou um coeficiente de correlação (r) de 0,999 e de acordo com a equação ($I_{pa}/\mu A$): $2,77 + 0,4 \times 10^7 [ALA]$ mol L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação obtidos para o intervalo de concentração estudado foram de $3,49 \times 10^{-7}$ e $1,16 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

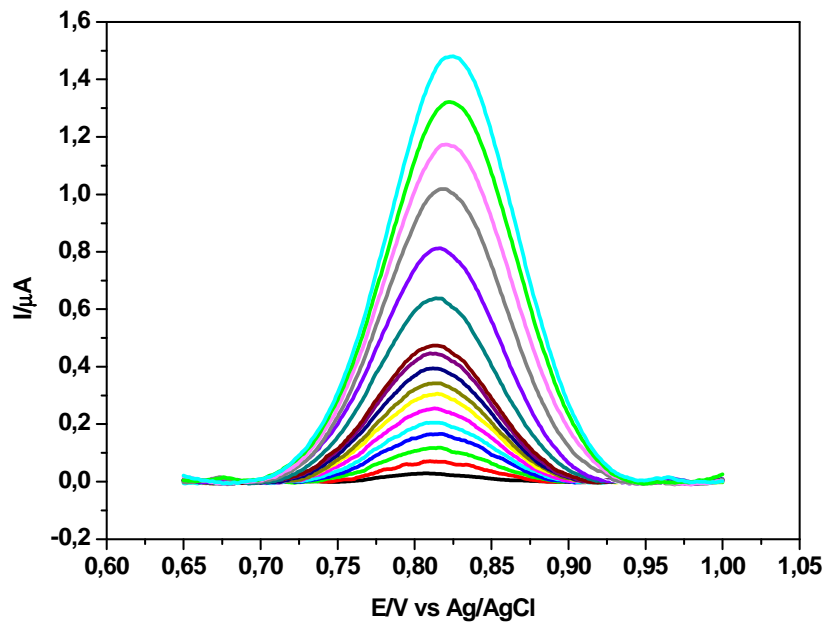


Figura 22. Voltamogramas de pulso diferencial registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, na concentração de $9,99 \times 10^{-7}$ a $3,38 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ALA, $v = 0,005$ V s⁻¹, saturada com N₂.

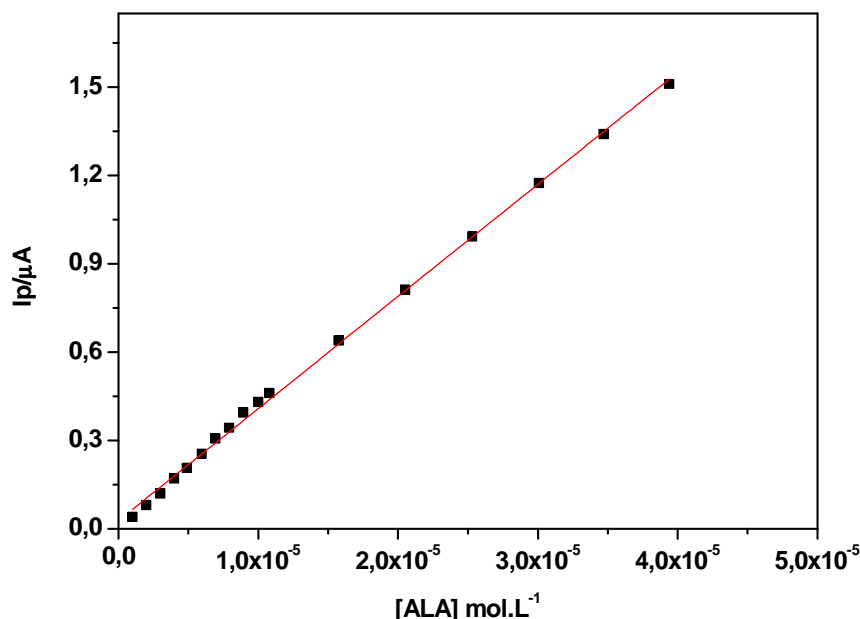


Figura 23. Curva analítica da detecção de ALA sobre um eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7.

3.9 Voltametria de onda quadrada (VOQ)

Os voltamogramas de onda quadrada apresentaram um comportamento semelhante aqueles obtidos por voltametria de pulso diferencial, apresentando um pico de oxidação para o ácido lipóico em torno de 0,8 V vs Ag/AgCl. Na técnica de VOQ, a corrente medida é uma resultante entre as correntes de varredura no sentido direto e no sentido reverso de aplicação dos pulsos de potencial. A separação destes componentes pode ser utilizada para se observar a presença de picos em ambos os sentidos e, assim, realizar uma avaliação prévia do tipo de reação redox que esta ocorrendo na superfície do eletrodo. A Figura 24 apresenta a separação dos componentes de corrente para o ALA sobre o eletrodo CV-QT/NiTsPc. Observa-se que a corrente resultante é semelhante à corrente direta e ainda a corrente reversa apresenta pico no sentido anódico no lugar onde não deveria aparecer pico, uma vez que o processo é irreversível, como visto no estudo de voltametria cíclica.

Este tipo de comportamento é geralmente observado quando a velocidade de varredura de potencial (frequência x incremento de varredura) é relativamente alta restando na superfície do eletrodo pequena concentração de espécie eletroativa que é oxidada, apesar da inversão do pulso de potencial ter sido aplicado no sentido catódico.

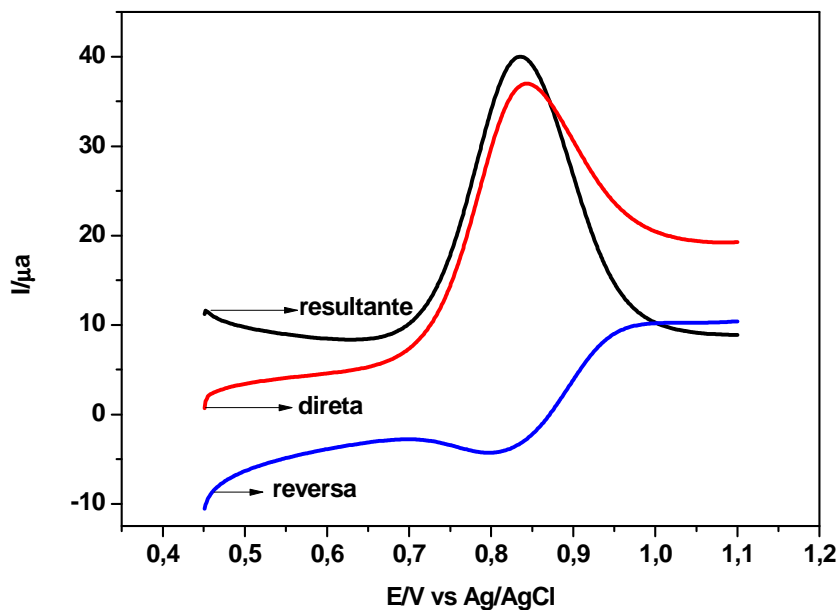


Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA.

3.9.1 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Para avaliar o desenvolvimento de um procedimento analítico empregando a técnica de voltametria de onda quadrada, otimizações de parâmetros como a frequência de aplicação de pulsos de potencial, amplitude de pulso de potencial e o incremento de varredura de potencial, devem ser realizadas para melhorar de forma significativa a resposta voltamétrica. A frequência de aplicação dos pulsos de potencial é uma das mais importantes variáveis na voltametria de

onda quadrada, pois é ela que determina a intensidade dos sinais e conseqüentemente a sensibilidade do método. Nesse sentido, estudou-se a variação da frequência no intervalo de 10 a 50 s^{-1} e foram mantidos a amplitude de pulso e o incremento de varredura em 0,050 V e 0,001 V, respectivamente.

A Figura 25 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ALA com a variação da frequência. Observa-se que à medida que se aumentou a frequência de aplicação de pulsos de potenciais ocorreu também um aumento na intensidade da corrente de pico e um pequeno deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos. Portanto, a frequência escolhida foi a de 20 s^{-1} , uma vez que apresentou maior valor de corrente sem deslocamento de potencial.

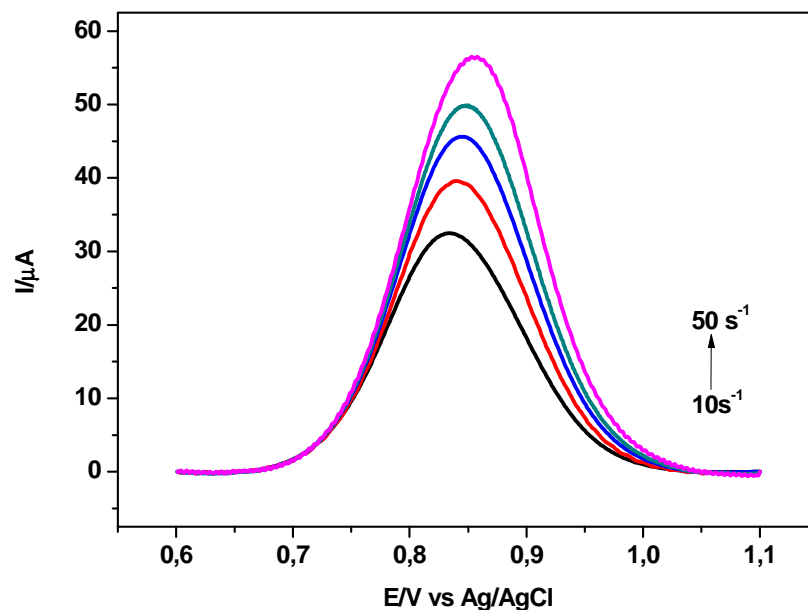


Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de frequência. Solução tampão fosfato pH 7, contendo 1×10^{-3} mol L^{-1} de ALA, saturada com N_2 .

Segundo a teoria da voltametria de onda quadrada [85,86] para sistemas irreversíveis controlados por difusão, a intensidade de corrente de pico varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos de potencial. A Figura 26 mostra o comportamento da corrente de pico em função da variação da frequência (f), para o sistema estudado e a linearidade obtida, confirmou que o processo de oxidação do ALA sobre o eletrodo de CV/QT-NiTsPc é irreversível.

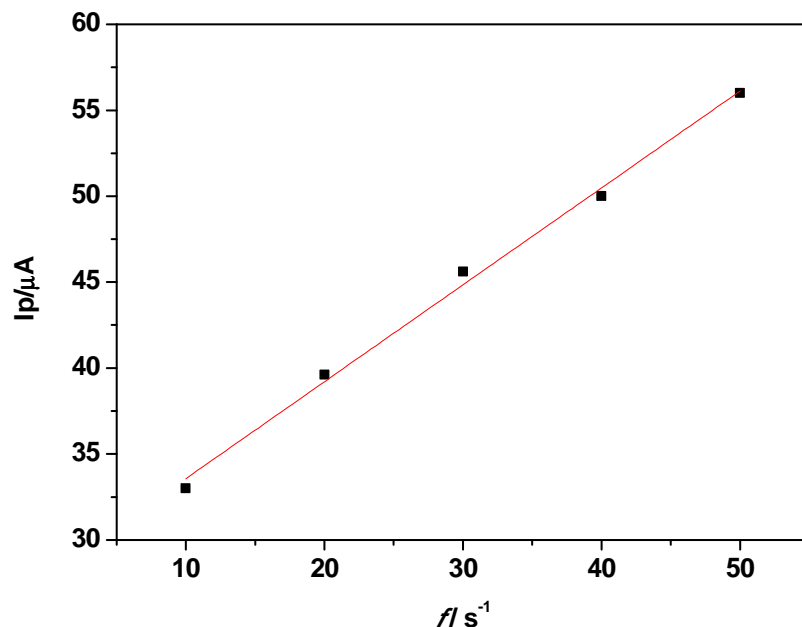


Figura 26. Dependência da corrente de pico com a frequência de onda quadrada para a oxidação do ALA. Dados extraídos da Figura 25.

Outro parâmetro avaliado foi a influência da amplitude de pulso de potencial na corrente de pico para a oxidação do ALA, uma vez que pode ser útil definir o tipo de processo redox envolvido, já que para sistemas totalmente irreversíveis, o aumento da amplitude pode deslocar os valores de potenciais de pico, provocar mudanças significativas nas larguras de meia-altura dos voltamogramas, e, além disto, o aumento da amplitude também pode provocar

aumento da corrente de pico. O estudo foi realizado no intervalo de 0,010 a 0,1 V, com variação de 0,010V sendo fixados os valores de frequência e incremento de varredura igual a 20 s^{-1} e $0,009 \text{ V s}^{-1}$, respectivamente e os voltamogramas obtidos para o ALA nos diferentes valores de amplitude estão apresentados na Figura 27. O aumento da intensidade de corrente foi linear para valores de amplitudes menores que 0,05 V. Adicionalmente, amplitudes maiores que 0,05 V resultaram na distorção e alargamento dos picos voltamétricos, não atuando de modo significativo na sensibilidade para propósitos analíticos. Assim a amplitude selecionada para continuidade deste trabalho foi de 0,05 V.

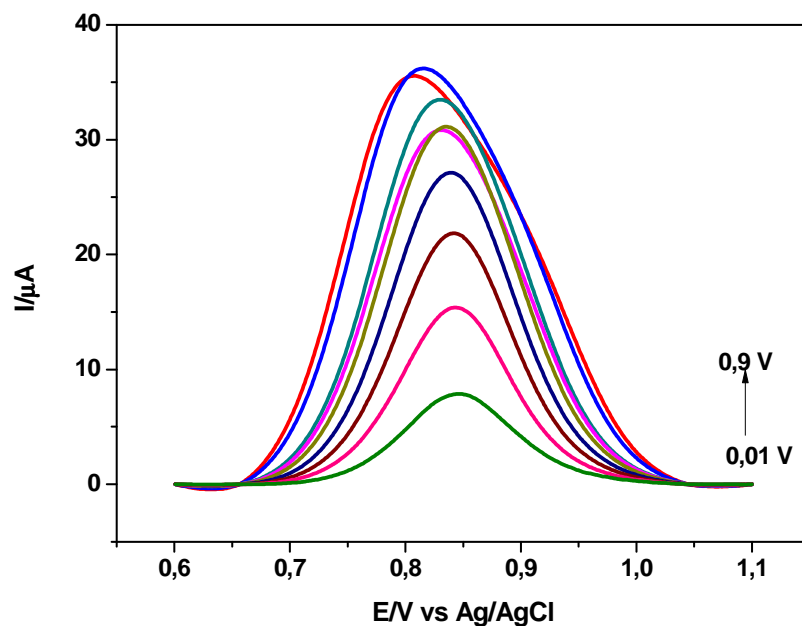


Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de amplitude. Solução tampão fosfato pH 7, contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, saturada com N_2 .

Na voltametria de onda quadrada a velocidade efetiva é resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura. Deste modo, o incremento de

varredura é um parâmetro que também deve ser analisado e foi realizado no intervalo de 0,001 a 0,005 V, sendo fixados os valores de frequência e amplitude igual a 10 s^{-1} e 0,05 V, respectivamente. A Figura 28 apresenta os voltamogramas obtidos para a oxidação do ALA e mostra que os valores de incremento de varredura acima de 0,002 V resultaram num pequeno alargamento do voltamograma, assim como um deslocamento para potenciais mais positivos. Sendo assim, o incremento de varredura de potencial empregado neste trabalho foi de 0,002 V.

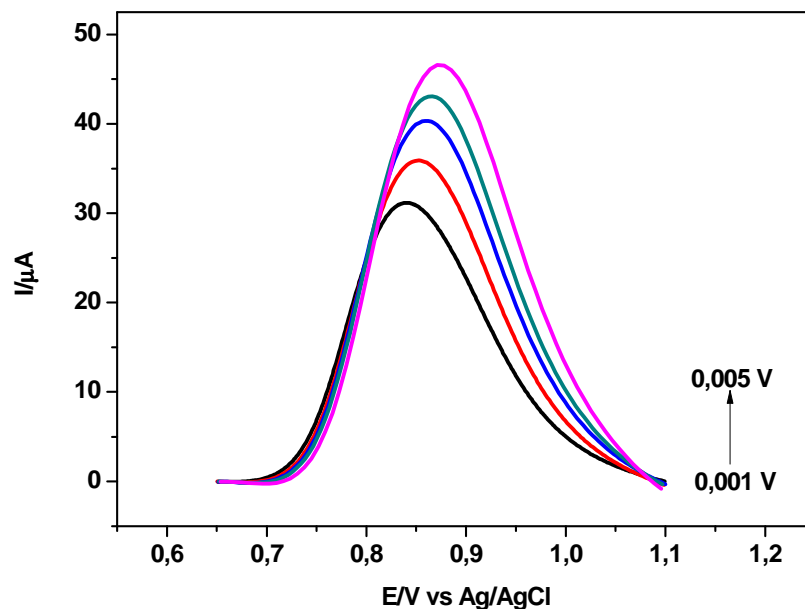


Figura 28. Voltamogramas de onda quadrada da oxidação de ALA registrados sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em diferentes valores de incremento de varredura. Solução tampão fosfato pH 7, contendo $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, saturada com N_2 .

3.9.2 Construção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros envolvidos na técnica de voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída. Para isso alíquotas de $20 \mu\text{L}$ de uma solução padrão de ALA na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram

adicionadas em 20 mL de tampão fosfato 1,0 mol L⁻¹. A Figura 29 mostra os voltamogramas de onda quadrada registrados variando-se a concentração de ALA de 9,9 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ a 8,17 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ e a curva analítica resultante é apresentada na Figura 30. O comportamento é linear de acordo com a equação: $(I_{pa} / \mu A) = 1,4 + 0,77 \times 10^7 [ALA] \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,998. A partir desses dados os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 1,69 x 10⁻⁷ e 5,62 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, respectivamente.

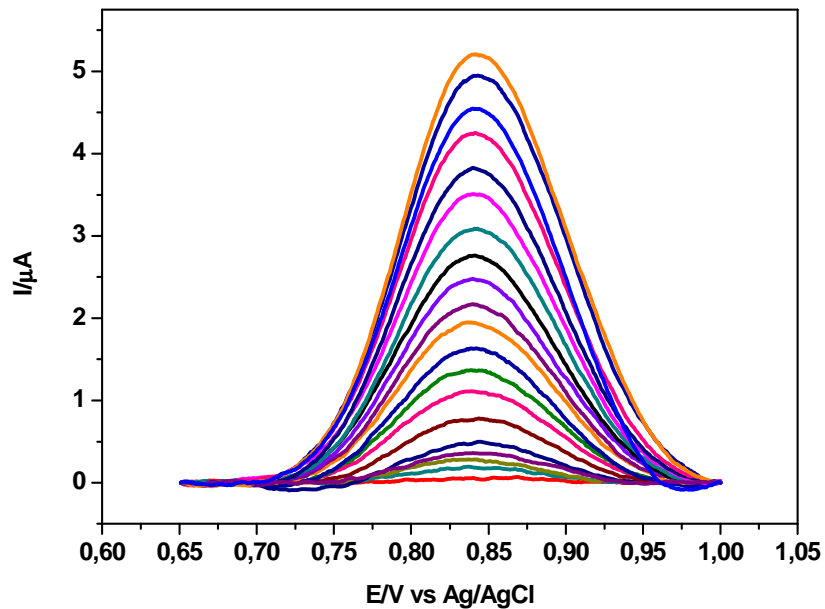


Figura 29. Voltamogramas de onda quadrada registrado sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc em uma solução tampão fosfato pH 7, na concentração de 9,996 x 10⁻⁷ a 8,17 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de ALA, saturada com N₂.

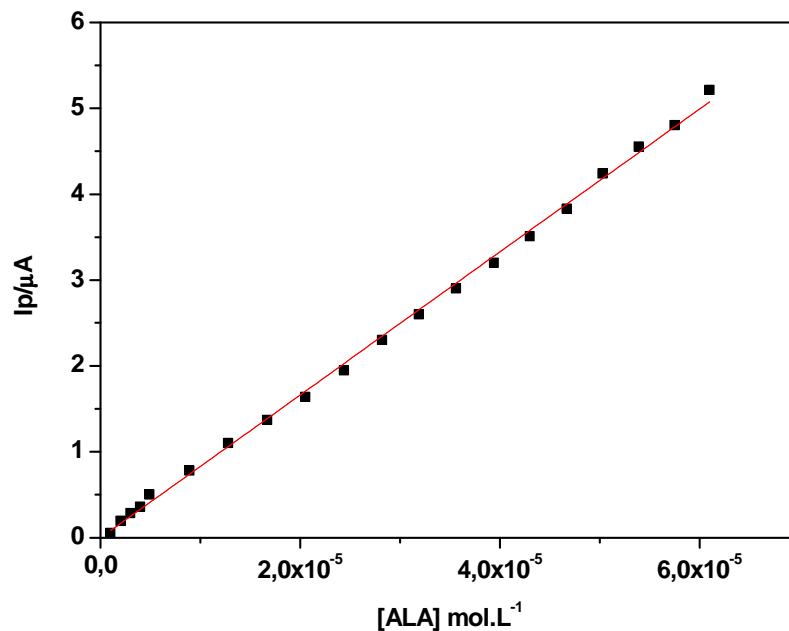


Figura 30. Curva analítica da detecção de ALA sobre um eletrodo CV/QT-NiTsPc. Dados extraídos da Figura 29.

3.10 Comparação das técnicas VC, VPD e VOQ para a determinação de ALA sobre o eletrodo CV/QT-NiTsPc

Após os estudos e otimizações de todos os parâmetros de voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada, e a construção das curvas analíticas para a determinação do ALA por essas três técnicas, foi possível fazer uma comparação entre os resultados obtidos (Tabela 5).

De acordo com a tabela, as técnicas aplicadas obtiveram valores de sensibilidade da mesma ordem de grandeza, no entanto a técnica de voltametria cíclica foi a técnica que apresentou os melhores valores para LD e LQ.

Tabela 5. Comparação das técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada para a determinação do ALA.

Parâmetros	VC	VPD	VOQ
Equação da reta (Ipa/ μ A)	$6,88 + 0,83 \times 10^7$ [ALA]	$2,77 + 0,40 \times 10^7$ [ALA]	$1,40 + 0,77 \times 10^7$ [ALA]
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	$9,72 \times 10^{-8}$	$3,49 \times 10^{-7}$	$1,69 \times 10^{-7}$
Limite de quantificação (mol L ⁻¹)	$3,24 \times 10^{-7}$	$1,16 \times 10^{-6}$	$5,62 \times 10^{-7}$
Intervalo de resposta linear (mol L ⁻¹)	$1,99 \times 10^{-6}$ a $4,21 \times 10^{-5}$	$9,99 \times 10^{-7}$ a $3,38 \times 10^{-5}$	$9,9 \times 10^{-7}$ a $8,17 \times 10^{-5}$

3.11 Determinação de ALA em suplemento alimentar e validação do procedimento analítico proposto com base em análises com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Com o objetivo de avaliar o desempenho do procedimento analítico proposto, determinações de ALA foram realizadas em suplemento alimentar. Com o método de adição padrão em três comprimidos. A Figura 31 mostra os voltamogramas obtidos pelo método de adição padrão para uma amostra de suplemento dietético. O procedimento desenvolvido se mostrou simples rápido e eficiente para a determinação de ALA em suplemento dietético.

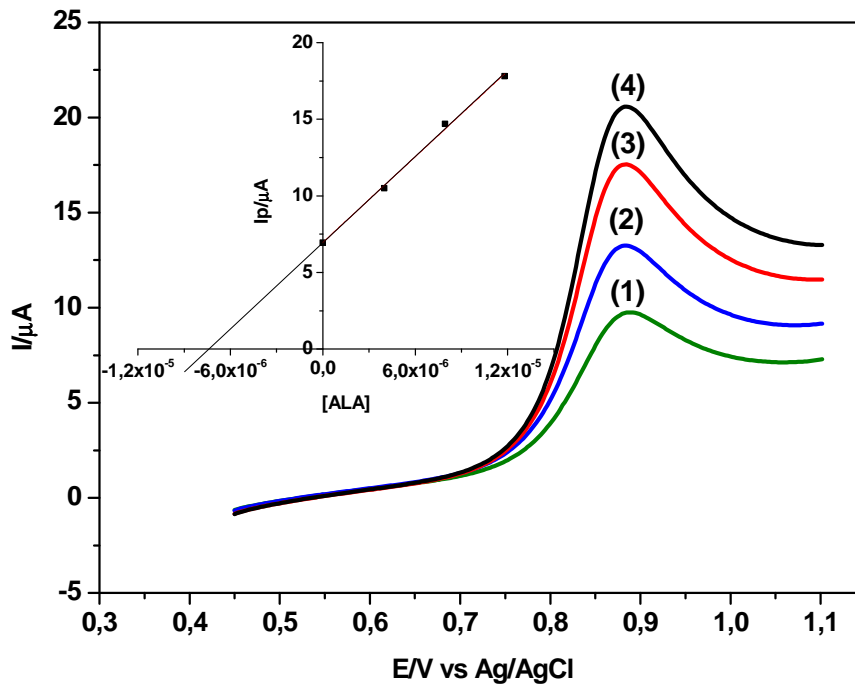


Figura 31. Voltamogramas de varredura linear obtidos para a determinação de ALA em suplemento alimentar. (1) amostra suplemento dietético; (2) amostra suplemento dietético + $3,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de ALA; (3) amostra suplemento dietético + $7,93 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de ALA; (4) amostra suplemento dietético + $1,18 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de ALA.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para fazer uma comparação com os resultados obtidos na determinação de ALA em suplemento dietético com a voltametria cíclica utilizando o eletrodo CV/QT-NiTsPc. Nas condições experimentais empregadas (parte experimental), o ALA apresentou um tempo de retenção de 4,35 minutos. Um cromatograma típico é apresentado na Figura 32.

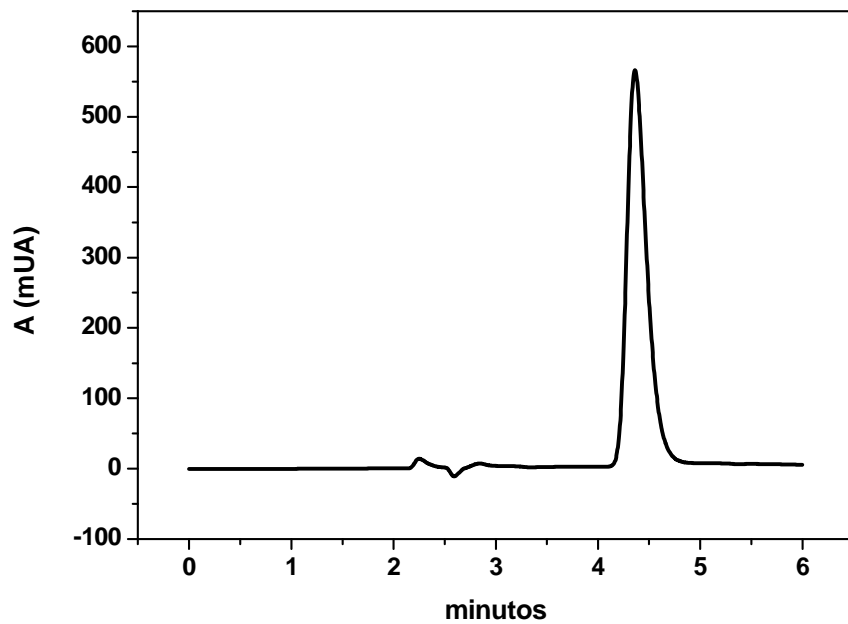


Figura 32. Cromatograma para o ALA na concentração de $4,36 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A curva analítica (Figura 33) obtida por HPLC para o ALA no intervalo de concentração de $4,85 \times 10^{-6}$ a $4,36 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ também apresentou comportamento linear de acordo com a equação: $A (\text{mUA}) = 4,54 + 1,82 \times 10^6 [\text{ALA}] \text{ mol L}^{-1}$.

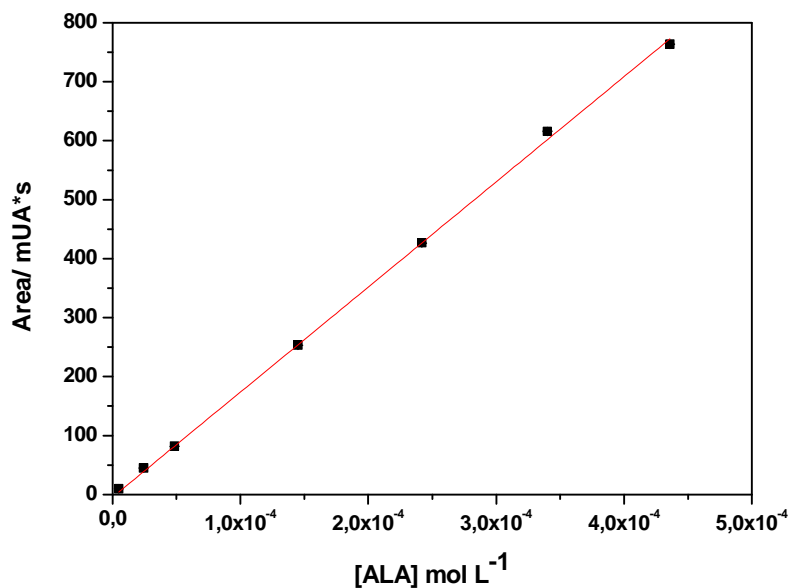


Figura 33. Curva analítica obtida para o ALA empregando HPLC.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados obtidos para a determinação de ALA no suplemento dietético analisado com as técnicas de por HPLC e por VC. Observa-se que os resultados obtidos pelo método proposto empregando VC estão em concordância com os resultados obtidos pelo método de referência empregado, HPLC.

Tabela 6. Determinação de ALA em cápsulas de suplemento alimentar.

Amostra	Valor rotulado / mg	CV/QT-NiTsPc / mg	Método oficial / mg
Suplemento Alimentar	300	303,88 ($\pm 1,75$)	303,48 ($\pm 1,59$)

*medidas realizadas em triplicatas

3.11.1 Teste estatístico

A comparação entre os dois métodos aplicados foi realizada através do teste t de Student, utilizando delineamento para amostras equivalentes ou pareadas. Este procedimento foi realizado, visando a avaliação de diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas nos métodos.

Neste sentido, os dados da Tabela 6, permitiram construir a Tabela 7 o teste de significância estatística (teste t). A partir do ganho médio e do erro padrão, para a diferença entre as médias [87], o T_{cal} (t calculado) foi de 4,01. Este valor é menor que o T_{tab} (t tabelado) 4,30, indicando que as médias não são significativamente diferentes, para nível de significância estatística inferior a um ponto percentual ($ns < 5\%$) e grau de confiança de 95%.

Tabela 7. Teste estatístico

Teste aplicado	Graus de liberdade	Ganho médio	Erro padrão	T_{cal}	T_{tab}^* (95%)
T student pareado	2	0,23	0,10	4,01	4,30

Além disso, a diferença entre as médias ajustadas obtidas para o método cromatográfico e o método proposto, foi comparada através de barras de erro (Figura 34), onde cada barra se estende por um desvio padrão da média (erro padrão) em torno de cada uma das médias. A análise da Figura 34 permitiu concluir que os resultados obtidos na determinação de ALA por VC e por HPLC não apresentaram diferenças significativas e estão dentro de um erro relativo aceitável, esta conclusão é perfeitamente coerente com o teste estatístico empregado.

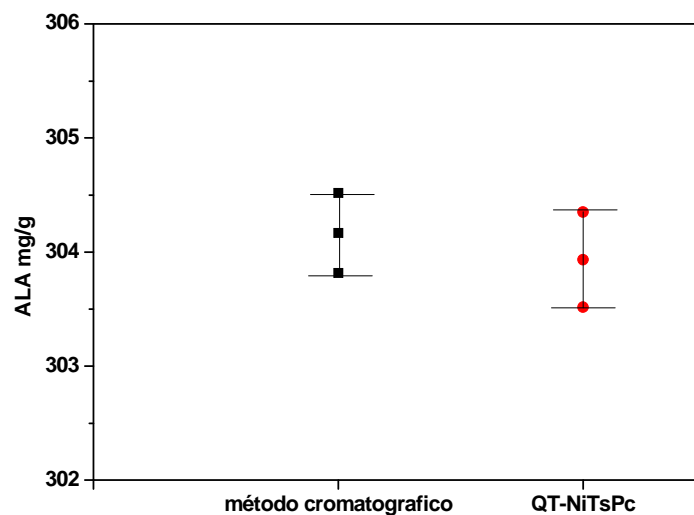


Figura 34. Gráfico de barra de erro para as médias ajustadas utilizando o método cromatográfico e o método CV/QT-NiTsPc.

3.12 Comparação das técnicas de VC, VPD e VOQ com valores reportados na literatura

Os resultados obtidos para a determinação de ALA pelo método proposto foram comparados com dados reportados na literatura para diversos eletrodos e são apresentados na Tabela 8. Estes dados indicam um melhor desempenho do eletrodo CV/QT-NiTsPc em relação aos resultados encontrados na literatura utilizando as

técnicas voltamétricas como método de determinação eletroanalítica de ALA em soluções aquosas.

Tabela 8. Comparação de diferentes sensores para a determinação de ALA.

Eletrodo	Técnica	Eletrólito	LD/ mol L⁻¹	LQ/ mol L⁻¹	Ref
CV-QT/ NiTsPc	VC	Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	9,72 x 10 ⁻⁸	3,24 x 10 ⁻⁷	Este trabalho
CV-QT/ NiTsPc	VPD	Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	3,49x10 ⁻⁷	1,16 x 10 ⁻⁶	Este trabalho
CV-QT/ NiTsPc	VOQ	Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	1,69x10 ⁻⁷	5,62 x 10 ⁻⁷	Este trabalho
CV	VOQ	Tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	1.8 x10 ⁻⁶	6,1 x10 ⁻⁶	4
FTO	VOQ	H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	3,68x10 ⁻⁶	1,27x10 ⁻⁵	5
CV	VVL	H ₂ SO ₄ 0,05 mol L ⁻¹	5,75x 10 ⁻⁶	_____	29
CV /NTC	VC	H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	1,9x10 ⁻⁵	_____	30

*FTO: Eletrodo de oxido de estanho dopado com flúor;

*CV/ NCT: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono;

*VVL: Voltametria de varredura linear;

CAPÍTULO 4
CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

Os estudos voltamétricos realizados permitiram concluir que o eletrodo de carbono vítreo modificado com filmes de quitosana e ftalocianina de níquel (CV/QT-NiTsPc) apresentou melhor resposta analítica para a determinação de ácido lipóico (ALA) em relações ao eletrodo não modificado (CV) ou modificado somente com filmes de quitosana (CV/QT).

Voltamogramas cíclicos registrados em soluções tampão fosfato (pH 7) na presença de ALA apresentaram um pico de oxidação irreversível com potencial próximo a 0,85 V sobre os eletrodos CV/QT-NiTsPc e CV em torno de 0,8 V vs. Ag/AgCl sobre o eletrodo CV/QT. Além disso, o eletrodo CV/QT-NiTsPc mostrou um deslocamento do início da corrente de oxidação em cerca de 100 mV para potenciais menos positivos, bem como um aumento significativo na magnitude da corrente de pico.

A caracterização do filme, utilizando a técnica de espectroscopia na região do UV-Visível mostrou que o espectro da solução de QT-NiTsPc apresentou deslocamento de banda quando comparado a solução de NiTsPc, indicando uma possível interação de QT com NiTsPc.

Os resultados indicaram um comportamento linear utilizando as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, no entanto a técnica de voltametria cíclica foi a que apresentou os melhores valores de limite de detecção e limite de quantificação, portanto foi a técnica utilizada para aplicação a amostra.

Para efeito de comparação, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e o método proposto na determinação de ácido lipóico em

suplemento alimentar, e os resultados obtidos foram concordantes com os resultados obtidos pelo método proposto ao nível de confiança de 95%.

Os resultados obtidos foram comparados com resultados publicados na literatura que também utilizaram técnicas voltamétricas para a determinação do ácido lipóico, verificou-se que o método proposto nesse trabalho, obtiveram menores valores de limite de detecção e limite de quantificação.

Diante dos resultados expostos, o eletrodo CV/QT-NiTsPc pode ser utilizado para a determinação de ácido lipóico em suplemento alimentar. Levando ainda em consideração que o procedimento proposto apresenta algumas vantagens sobre o método padrão (HPLC) como, por exemplo, baixo custo, menor tempo de análise e menor quantidade de reagentes gastos em todo o procedimento analítico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- [1] SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315-1321, 1995.
- [2] DOROSHOW, J. H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v. 43, p. 460-472, 1983.
- [3] ALARFAJ, N. A. Adsorptive stripping anodic voltammetric determination of thioctic acid in bulk and pharmaceutical formulations. **International Journal of Biomedical Science**, v. 5, p. 54-58, 2009.
- [4] BRETT, A. M.; CORDUNEANU, O.; GARNETT, M. Anodic oxidation of α -lipoic acid at a glassy carbon. Electrode and its determination in dietary supplements. **Analytical letters**, v. 40, p. 1763-1778, 2007.
- [5] MIRANDA, M. P.; FAUNDEZ, M.; ARMIJO, F. Use of fluorine-doped tin oxide electrodes for lipoic acid determination in dietary supplements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 668, p. 1-6, 2012.
- [6] SNELL, E. E.; STRONG, F. M.; PETERSON, W. H. Growth factors for bacteria: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. **Biochemical Journal**, v. 31, p. 1789-1799, 1937.
- [7] REED, L. J.; DEBUSK, B. G.; GUNSALUS, I. C.; HORNBERGER, C. S. Crystalline α -lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. **Science**, v. 114, p. 93-94, 1951.
- [8] REED L. J. The chemistry and function of lipoic acid. **Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry**, v. 18, p. 319-347, 1957.

-
- [9] ZHANG, S. J.; GE, Q. F.; GUO, D. W.; HU, W. X.; LIU, H. Z. Synthesis and anticancer evaluation of α -lipoic acid derivatives, **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3078-3083, 2010.
- [10] BILSKA, A.; WLODEK, L. Lipoico acid- the drug of the future?. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 570-577, 2005.
- [11] ABBAS, M. N.; RADWAN, A. A. Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of α -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine. **Talanta**, v. 74, p. 1113-1121, 2008.
- [12] MORIKAWA, T.; YASUNO, R.; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid. Identification of a mouse cDNA encoding α -lipoic acid synthase located in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 498, p. 16-21, 2001.
- [13] KULKAMP, I. C.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.
- [14] BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **General Pharmacology**, v. 29, p. 315-331, 1997.
- [15] HOLMQUIST, L.; STUCHBURY, G.; BERBAUM, K.; MUSCAT, S.; YOUNG, S.; HAGER, K; ENGEL. J.; MUNCH, G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 154-64, 2007.
- [16] HAGEN, T. M.; INGERSOLL, R. T.; LYKKESFELDT, J.; LIU, J.; WEHR, C. M.; VINARSKY, V.; BARTHOLOMEW, J. C .; AMES, A. B. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. **FASEB Journal**, v. 13, p. 411- 418, 1999.

-
- [17] HAGER, K.; MARAHRENS, A.; KENKLIES, M.; RIEDERER, P.; MÜNCH, G. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 32, p. 275-282, 2001.
- [18] FUCHS, J.; PACKER, G.; ZIMMER, G. **Lipoic Acid in Health and Disease**, Marcel Dekker, p. 113-130, 1997.
- [19] GURER, H.; OZGUNES, H.; OZTEZCAN, S.; ERCAL, N. Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 75-81, 1999.
- [20] MORINI, M.; ROCCATAGLIATA, L.; DELL'EVA, R.; PEDEMONTE, E.; FURLAN, R.; MINGHELLI, S.; GIUNTI, D.; PFEFFER, U.; MARCHESE, M.; NOONAN, D. Alpha-lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 148, p. 146-15, 2004.
- [21] ZIEGLER, D.; HANEFELD, M.; SCHUTTE K.; KERUM G.; MALESSA R. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid. **Diabetes Care**, v. 8, p. 1296-30, 1999.
- [22] SARNO, M. C.; DELFINO, M.R. Cuantificación de ácido alpha-lipoico en comprimidos por coulombimetria. **Facena**, v. 20, p. 23-29, 2004.
- [23] KATAOKA, H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 717, p. 247-262, 1998.
- [24] KATAOKA, H.; HIRABAYASHI, N.; MAKITA, M. Analysis of lipoic acid in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography**, v. 615, p. 197-202, 1993.
- [25] PRATT, K. J.; CARLES, C.; CARNE, T. J.; DANSON, M. J.; STEVENSON, K. J. Detection of bacterial lipoic acid. A modified gas-chromatographic- mass-spectrometric procedure. **Biochemical Journal**, v. 258, p. 749-754, 1989.

-
- [26] KATAOKA, H.; HIRABAYASHI, N.; MAKITA, M. Analysis of lipoic acid by gas chromatography with flame photometric detection. **Methods in Enzymology**, v. 279, p. 166-76, 1997.
- [27] WOŁYNIEC, E.; KARPIŃSKA, J.; ŁOSIEWSKA, S.; TURKOWICZ, M.; KLIMCZUK, J.; KOJŁO, A. Determination of lipoic acid by flow-injection and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 96, p. 223-229, 2012.
- [28] SIANGPROH, W.; RATTANARAT, P.; CHAILAPAKUL O. Reverse-phase liquid chromatographic determination of α -lipoic acid in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7699-7705, 2010.
- [29] ZIYATDINOVA, G. K.; BUDNIKOV, G. K.; POGOREL'TSEV, V. I. Electrochemical Determination of Lipoic Acid, **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, p. 288-290, 2004.
- [30] ZIYATDINOVA, G. K.; GRIGOR'EVA, L. V.; BUDNIKOV, G. K. Electrochemical Determination of Unithiol and Lipoic Acid at Electrodes Modified with Carbon Nanotubes, **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, p. 185-188, 2009.
- [31] BAKKER, E.; QUIN, Y. Electrochemical sensors, **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3965-3983, 2006.
- [32] STRADIOTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 159-173, 2003.
- [33] ALEXIOU, C.; LEVER, A. P. L. Tuning metalloporphyrin and metallophthalocyanine redox potentials using ligand electrochemical (E_L) and Hammett. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 216-217, p. 45-54, 2001.

-
- [34] CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 441-456, 2002.
- [35] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalítica. **Química Nova**, v. 25, p. 1012-1021, 2002.
- [36] DAMOS, F. S.; SOTOMAYOR, M. D. T.; KUBOTA, L. T.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A. Iron (III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin as a biomimetic catalyst of horseradish peroxidase on the electrode surface: An amperometric sensor for phenolic compound determinations. **Analyst**, v. 128, p. 255-259, 2003.
- [37] SOUZA, M. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletrocatalise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 191-198, 1997.
- [38] GOLABI, S. M.; ZARE, H. R. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a chlorogenic acid (CGA) modified glassy carbon electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 465, p. 168-176, 1999.
- [39] BARROS, S. B. A.; RAHIM, A.; TANAKA, A. A.; ARENAS, L. T.; LANDERS, R.; GUSHIKEM, Y. In situ immobilization of nickel(II) phthalocyanine on mesoporous SiO₂/C carbon ceramic matrices prepared by the sol gel method: Use in the simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 140-147, 2013.
- [40] ZHANG, J.; TSE, Y.; PIETRO, W. J.; LEVER, A. B. P. Electrocatalytic activity of - tetramethyltetra-3-4-pyridoporphyrinocobalt (II) adsorbed on a graphite electrode towards the oxidation of hydrazine and hydroxylamine. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 406, p. 203-211, 1996.
- [41] OLIVEIRA, A. X.; SILVA, S. M.; LEITE, F. R. F.; KUBOTA, LAURO, T.; DAMOS, F. S.; DE'CÁSSIA'SILVA'LUZ, R. Highly Sensitive and Selective Basal Plane

Pyrolytic Graphite Electrode Modified with 1,4-Naphthoquinone/MWCNT for Simultaneous Determination of Dopamine, Ascorbate and Urate. **Electroanalysis**, v. 25, p. 723-731, 2013.

[42] O`SHEA, T. J.; LUNTE, S. M. Chemically modified microelectrodes for capillary electrophoresis/electrochemistry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66, p. 307-311, 1994.

[43] NAHUZ, M. S. S.; REIS, A.P.; ARAUJO, M.F.A.; TANAKA, A.A. **Influências das orientações “basal” e “edge” e do pré-tratamento superficial nas propriedades eletroquímicas de eletrodos de grafite pirolítico modificados com ftalocianina de cobalto**. Cadernos de Pesquisa – UFMA, São Luís, v. 11, Jan./Jun. 2000.

[44] ZAGAL, J. H. Metallophthalocyanines as catalysts in electrochemical reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 119, p. 86-136, 1992.

[45] MOSER, H. F.; THOMAS, A. L. The phthalocyanines: properties. **CRC Press**, v. 2, p. 45-57, 1983.

[46] JIN, J. Y.; MIWA, T.; MAO, L. Q.; TU, H. P.; AND JIN, L. T. Determination of nitric oxide with ultramicrosensors based on electropolymerized films of metal tetraaminophthalocyanines, **Talanta**, v. 48, p. 1005–1011, 1999.

[47] HOWE, L.; ZHANG, J. Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, p. 90-96, 1998.

[48] SKOROBOGATY, A.; SMITH, T. D. Autoxidation of thiols catalyzed by cobalt(II)tetra- sulphophthalocyanine absorbed on an ion exchange resin. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 16, p. 131-147, 1982.

-
- [49] MESHITSUKA, S.; TAMARU, K. J. Photoelectrocatalysis by metal phthalocyanine evaporated films in the oxidation of oxalate ion. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 73, p. 236-242, 1977.
- [50] ZAGAL, J.; SEM, R. K.; YEAGER, E. Oxygen reduction by Co (II) tetrasulfonated phthalocyanine irreversibly adsorbed on a stress-annealed pyrolytic graphite electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 83, p. 207-213, 1977.
- [51] CASTELLANI, A. C. **Investigação do Comportamento da Ftalocianina de Molibdênio e Estudos da Imobilização em Superfície de Sílica Gel Enxertada com Óxido de Nióbio** - Tese de Mestrado – São Carlos, SP (1997).
- [52] BRAUN, A.; KOHLBRECHER, J.; BÄRTSCH, M.; SCHNYDER, B.; KÖTZ, R.; HAAS, O.; WOKAUN, A. Small-angle neutron scattering and cyclic voltammetry study on electrochemically oxidized and reduced pyrolytic carbon. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 1105-1112, 2004.
- [53] LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. **Phthalocyanines: properties and applications**. New York: **VCH Publishers**, 1993.
- [54] CONCEIÇÃO, C. D. C. **Eletrocatalise das reações de redução de oxigênio e oxidação de hidrazina por tetrapiridilporfirina de ferro**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2000.
- [55] SARAPUU, A.; TAMMEVESKI, K.; TENNO, T. T.; SAMMELSELG, V.; KONTTURI, K.; SCHIFFRIN, D. J. Electrochemical reduction of oxygen on thin-film. Au electrodes in acid solution. **Electrochemistry Communications**, v. 3, p. 446-450, 2001.
- [56] ABE, T.; YOSHIDA, T.; TOKITA, S.; TAGUCHI, F.; IMAYA, H.; KANEKO, M. Factors affecting selective electrocatalytic CO₂ reduction with cobalt phthalocyanines incorporated in polyvinylpyridine membrane coated on a graphite electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 412, p. 125-132, 1996.

-
- [57] ZHANG, J.; PIETRO, W. J.; LEVER, A. B. P. Rotating ring disk electrode analysis of CO₂ reduction electrocatalyzed by a cobalt tetramethyl pyridoporphyrazine on the disk and detected as CO on platinum ring. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 403, p. 93-100, 1996.
- [58] CÁRDENAS, G. I.; CARO, C.A.; VENEGAS, D.; ZAGAL, J.H. Theoretical study of the interaction energy profile of cobalt phthalocyanine and 2-mercaptoethanol: effect of the graphite on the global reactivity. **Journal of Molecular Structure**, v. 580, p. 193-200, 2002.
- [59] ARDILES, P.; TROLLUND, E.; ISAACS, M.; ARMIJO, F.; CANALES, J. C.; AGUIRRE, M. J.; CANALES, M. J. Electrocatalytic behavior oxidation of hidrazine at polymeric iron-tetraaminophthalocyanine modified electrodes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 165, p. 169-175, 2001.
- [60] MAREE, S.; NYOKONGO, T. Electrocatalytic behavior of substituted cobalt phthalocyanines towards the oxidation of cysteine. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 492, p. 120-127, 2000.
- [61] CARO, C. A.; BEDIQUI, F.; ZAGAL, J. H. Electrocatalytic oxidation of nitrite on a vitreous carbon electrode modified with cobalt phthalocyanine. **Electrochimica Acta**, v. 47, p. 1489-1494, 2002.
- [62] CARO, C. A.; ZAGAL, J. H.; BEDIQUI, F. Electrocatalytic activity of substituted metalophthalocyanines adsorbed on a vitreous carbon electrode for nitric oxide oxidation. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 150, p. 95-103, 2003.
- [63] ZAGAL, J. H.; GULPPI, M. A.; ISAACS, M.; CÁRDENAS-JIRÓN, G.; AGUIRRE, M. J. Linear versus volcano correlations between electrocatalytic activity and redox and electronic properties of metalophthalocyanines. **Electrochimica Acta**, v. 44, p. 1349-1357, 1998.

-
- [64] AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A.P. **Quitina Y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. Pontificia Universidad Católica Del Peru/ Fondo Editorial, p. 312, 2004.
- [65] LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, **Quimica Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.
- [66] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p.603-632, 2006.
- [67] GUIBAL, E. Interaction of metal ions with chitosan-a review, invited review paper, **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 43-74, 2004.
- [68] NOISHIKI, Y.; TAKAMI, H.; NISHIYAMA, Y.; WADA, M.; OKADA, S.; KUGA, S. Alkali-Induced Conversion of β -Chitin to α -Chitin. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 896-899, 2003.
- [69] NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation and characterization of chitin and chitosan_ A review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 4, p. 27-52, 1995.
- [70] KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1921-1971, 2001.
- [71] RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan, **Polymer**, v. 40, p. 7029-7032, 1999.
- [72] INOUE, K.; YOSHIZUKA, K.; OHTO, K. Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan, **Analytica Chimica Acta**, v. 388, p. 209-218, 1999.

-
- [73] VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2004.
- [74] WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. **Water Research.**, v. 35, p. 613-618, 2001.
- [75] AROF, A. K.; OSMAN, Z.; MORNIN, N. M.; KAMARULZAMAN, N.; IBRAHIM, Z. A; MUHAMAD, M. R. Chitosan-based electrolyte for secondary lithium cells. **Journal of Materials Science**, v. 36, p. 791-193, 2001.
- [76] ENSAFI, A. A.; KHAYAMIAN T.; KHALOO, S. S. Application of adsorptive cathodic differential pulse stripping method for simultaneous determination of copper and molybdenum using pyrogallol red. **Analytical Chimica Acta**, v. 505, p. 201-207, 2004.
- [77] MORITA, T; ASSUNÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. Edgar Blucher Ltda., São Paulo (SP), p. 273-277, 1972.
- [78] THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP 29). THE NATIONAL FORMULARY (NF 24). The United States Pharmacopeia Convention Inc. Official monographs, Rockville: USP, 2009.
- [79] DOMARD, A.; PIRON, E. Interaction between chitosan and uranyl ions. Part 2. Mechanism of interaction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 22, p. 33–40, 1998.
- [80] SOLOMONS, T. G. W. **Organic Chemistry**. 6 ed., New York, 1996.
- [81] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T.C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 5. ed., New York, 1991.

-
- [82] LIU, D.; WEI, Y.; YAO, P.; JIANG, L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 782–785, 2006.
- [83] BARD, A.J. **Electroanalytical Chemistry**, v. 13, New York, p. 191-368, 1984.
- [84] CURIE, L. A. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods Including Detection and Quantification Capabilities. (IUPAC Recommendation 1995), **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 1699-1723, 1995.
- [85] SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspecto teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 6097-706, 1983.
- [86] OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. Square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 101-110, 1985.
- [87] VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. 2. ed., São Paulo: Editora Atlas S. A., 1989.