

INSTITUTO FEDERAL DE ALAGOAS  
CAMPUS MACEIÓ

MONIK TAMÍRES SILVA SANTOS

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO: UM SENSOR ELETROQUÍMICO Á  
BASE DE PASTA DE CARBONO COM 4-NITROANILINA ADSORVIDA EM SILICA  
GEL MODIFICADA**

MACEIÓ-AL

2019

INSTITUTO FEDERAL DE ALAGOAS  
CAMPUS MACEIÓ

MONIK TAMÍRES SILVA SANTOS

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO: UM SENSOR ELETROQUÍMICO À  
BASE DE PASTA DE CARBONO COM 4-NITROANILINA ADSORVIDA EM SILICA  
GEL MODIFICADA**

Projeto de conclusão de curso apresentado à  
Coordenação do Curso em cumprimento às  
exigências legais para formalização da (disciplina)  
do Curso de Licenciatura em Química do Instituto  
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de  
Alagoas – Campus Maceió.

Prof. Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Phabyanno Rodrigues  
Lima

Prof. Co-orientador: Msc. Sarah Kelly Melo  
Cavalcante

MACEIÓ-AL

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

MONIK TAMIREZ SILVA SANTOS

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO: UM SENSOR ELETROQUÍMICO À  
BASE DE PASTA DE CARBONO COM 4-NITROANILINA ADSORVIDO EM SILICA  
GEL MODIFICADA

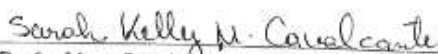
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a  
Coordenação do Curso de Licenciatura em Quími-  
ca do Instituto Federal de Alagoas - IFAL, como  
requisito para obtenção do título de Licenciada em  
Química.

Aprovado em 05 de Dezembro de 2019

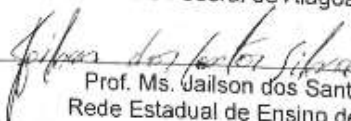
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima (Orientador)  
Instituto Federal de Alagoas - IFAL



Profa. Msa. Sarah Kelly Melo Cavalcante (Examinadora)  
Instituto Federal de Alagoas - IFAL



Prof. Ms. Jailson dos Santos Silva  
Rede Estadual de Ensino de Alagoas

## **AGRADECIMENTO**

Todo caminho em algum momento chega ao fim e consigo traz de tudo um pouco: Lágrimas, sorrisos, lembranças, mas sempre regada de ensinamentos e amadurecimentos. Chegar até aqui é motivo de muita alegria e gratidão, primeiro a Deus por tamanho amor, sabedoria e coragem dada a mim para que tudo fosse concluído no tempo certo. Aos meus pais, Rosemeire Santos da Silva e José Pedro dos Santos Filho, por todo amor e confiança que me deram, fazendo com que eu nunca desistisse dos meus objetivos e por sempre me fazerem acreditar que posso conquistar o mundo, basta apenas confiar em mim mesma.

A meu irmão José Pedro dos Santos Neto, por ser meu colo amigo e por sempre me incentivar a nunca desistir. Ter sua companhia nessa jornada me fez perceber o quanto tudo pode ser transformado.

A toda a minha família, em especial meus avós paternos, José Pedro dos Santos e Maria Ivonete de Oliveira que acreditaram sempre em mim e por meio do seu carinho e dos seus conselhos nunca permitiram que eu desistisse e mesmo não podendo estar comigo fisicamente, sei que estão comemorando essa conquista junto a mim. Guardarei sempre o seu presente vô, um Skoog é sim um ótimo presente!

Ao meu orientador Phabyanno Rodrigues por acreditar em meu potencial e por ser um grande mediador de conhecimentos, os quais trouxeram grande riqueza para meu processo de formação acadêmica. Bem como, por seu carinho e amizade que proporcionaram grandes aprendizados na minha vida.

A minha coorientadora, professora Sarah Kelly, que me auxiliou de forma imprescindível em minha pesquisa e formação. Obrigada por seu cuidado e por sua amizade que foram fundamentais nesse caminho.

A todos os meus professores do IFAL, em especial, Regina Brasileiro, Lauro Pereira, Flavia Serbim, que não somente me ensinaram respaldo científico, mas agregaram momentos incríveis na minha vida por meio da docência e do olhar amigo. Sou muito grata pelo cuidado de vocês e por principalmente, acreditarem e impulsionarem muitas conquistas durante a minha graduação.

As minhas parceiras de graduação, Jéssica Silva e Maria Jisele que eu quero levar para minha vida inteira! Vocês foram bem mais que amigas, mas sim: irmãs! O abraço, sorriso, confiança, choro...cada momento que passamos juntas, foi e sempre será motivo de gratidão, pois sem vocês sei que esse caminho perderia muito de suas cores. Obrigada por me acompanharem, amo vocês!

Ao GPAES (Grupo de Pesquisa em Analítica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores Químicos) pela contribuição de meus colegas durante o desenvolvimento de minha pesquisa, em especial, Carlos Henrique, Sara Souza e Luana Ferreira, que foram imprescindíveis neste caminho.

A Mayrane Carla e Diogo Ferro, companheiros de pesquisa que sempre acreditaram no meu potencial e me ajudaram nesta caminhada. Ter a amizade e o carinho de vocês foi de suma importância para essa conquista e espero que esse laço se estenda por muitos anos.

A todos os meus amigos que contribuíram muito nos momentos que precisei e por terem estado ao meu lado nos momentos de dificuldade, bem como, acreditando na minha capacidade de concluir este ciclo.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

## RESUMO

O presente trabalho descreve, o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono de parede múltiplas (MWCNTPE) à base de 4-nitroanilina (4NA) adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) para detecção de ácido ascórbico (AA). A superfície sensora foi caracterizada por Análise termogravimétrica (TGA), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho (FTIR). A espécie eletroativa, hidroxilamina/nitroso (R-NHOH / R-NO), foi eletrogerada in situ a partir da 4-nitroanilina após ciclagem na faixa de potencial entre 0,5 e -1,0 vs. Ag / AgCl na primeira varredura em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) com taxa de varredura de 0,02 Vs<sup>-1</sup>. O eletrodo modificado apresentou atividade eletrocatalítica eficiente frente à oxidação do ácido ascórbico em 0,3 V vs. Ag / AgCl. Medidas eletroquímicas incluindo Voltametria Cíclica (VC) e Cronoamperometria foram usadas para estudar o comportamento da superfície do eletrodo modificado empregado. Essas técnicas foram utilizadas para otimizar os parâmetros experimentais. Desta forma, sob condições otimizadas, o sensor apresentou uma faixa linear de resposta de 0,5 - 3,0 µmol.L<sup>-1</sup>, LD (0,15 µmol.L<sup>-1</sup>), LQ (0,48 µmol.L<sup>-1</sup>) e sensibilidade de 7,60 (mA.L.mmol<sup>-1</sup>) agregando ao sensor fatores positivos em sensibilidade e seletividade. Este sensor foi aplicado para a determinação amperométrica de AA em amostras de alimentos. Os resultados foram consistentes com os obtidos com o procedimento titulométrico padrão.

**Palavras-chave:** Ácido ascórbico, 4-nitroanilina, sensor amperométrico

## ABSTRACT

The present work describes the development of a multiple wall carbon nanotube paste electrode (MWCNTPE) based on 4-nitroaniline (4NA) adsorbed onto silica gel modified with zirconium oxide (SZ) to detect ascorbic acid (AA). The sensing surface was characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Infrared Spectroscopy (FTIR). The electroactive species, hydroxylamine / nitrous (R-NHOH / R-NO), was electrogenerated in situ from 4Nitroaniline after cycling in the potential range between 0.5 and -1.0 vs. Ag / AgCl in the first scan in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS buffer (pH 7.0) with a scanning rate of  $0.02 \text{ Vs}^{-1}$ . The modified electrode showed efficient electrocatalytic activity against the oxidation of ascorbic acid in 0.3 V vs. Ag / AgCl. Electrochemical measurements including Cyclic Voltammetry (VC) and Chronoamperometry were used to study the behavior of the surface of the modified electrode used. These techniques were used to optimize the experimental parameters. Thus, under optimized conditions, the sensor presented a linear response range of 0.5 -  $3.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , LD ( $0.15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), LQ ( $0.48 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) and sensitivity of  $7.60 \text{ (mA.L.mmol}^{-1}\text{)}$  adding to the sensor positive factors in sensitivity and selectivity. This sensor was applied for the amperometric determination of AA in food samples. The results were consistent with those obtained with the standard titration procedure.

**Keywords:** Ascorbic acid, 4-nitroaniline, amperometric sensor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	9
<b>1.1. Sensores eletroquímicos</b> .....	10
<b>1.2. Eletrodos quimicamente modificados</b> .....	12
<b>1.3. Analito alvo</b> .....	14
1.3.1. Ácido ascórbico.....	14
1.4.1. Voltametria Cíclica .....	16
1.4.2. Cronoamperometria .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	19
<b>2.1.1. Objetivos específicos</b> .....	19
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	20
<b>3.1. Reagentes e Soluções</b> .....	20
<b>3.2. Construção do sensor</b> .....	21
<b>3.3. Preparação da amostra para identificação do analito</b> .....	22
<b>3.4. Equipamentos</b> .....	23
<b>3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	26
<b>4.1. Ativação de 4-nitroanilina em eletrodo modificado MWCNTPE / SZ4NA e oxidação eletrocatalítica de AA</b> .....	26
<b>4.2. Comportamento Eletroquímico de AA por meio do eletrodo modificado</b> 30	
<b>4.3. Caracterização de materiais por MEV, TGA e FTIR</b> .....	34
<b>4.5. Medições cronoamperométricas</b> .....	39
<b>4.6. Aplicação para amostras</b> .....	41
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O ácido ascórbico ( $\text{AsCH}_2$ ) é um ácido orgânico hidrossolúvel, também conhecido amplamente como vitamina C. No entanto, sua designação química é 3-oxo-L-gulofuranolactona (5R)-5-[(1S)-1,2-diidroxietil]-3,4-diidroxifurano-2(5H)-ona (IUPAC), que anteriormente era conhecido como ácido hexurônico (CHANG; IASMAIL; DAUD, 2016). É uma vitamina comumente usada como antioxidante e considerada essencial para o funcionamento do organismo, pois possui ativa participação nos processos metabólicos, celulares e bioquímicos. Além que, possui diferentes aplicabilidades, tais como na: Indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (NASCIMENTO, M. 2019).

Esse antioxidante remove facilmente os radicais livres tóxicos e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas no metabolismo celular, que estão associadas a várias formas de danos e doenças teciduais. Desta forma, esta vitamina se apresenta com um importante papel na prevenção e tratamento de várias doenças, como Alzheimer, aterosclerose, infertilidade, câncer e AIDS (PUTCHALA *et al.*, 2013; DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; CZYZOWSKA, 2016). Contudo, a alteração na concentração de AA no organismo humano pode causar irritação gástrica e problemas renais oriundos de um de seus metabólitos, o ácido oxálico. Dessa forma, a determinação do ácido ascórbico em amostras, como alimentos, frutas frescas, frutas de suco e fluidos biológicos se torna essencial. (PUTCHALA *et al.*, 2013; MAY, 2016)

Nesse sentido, diferentes metodologias de detecção para  $\text{AsCH}_2$  vem sendo reportadas na literatura na qual incluem titulometria redox (KARLSSON, 1975; REVANASIDDAPPA; VEENA, 2007), cromatografia líquida de alta performance - HPLC (MAZUREK e JAMROZ, 2015; OZTEKINE *et al.*, 2010), ressonância magnética nuclear - RMN (EIFF; MONAKHOVA; DIEHL, 2015), eletroforese capilar (FUKUSHI *et al.*, 1997), ultravioleta espectroscopia visível - UV-vis (OZTEKIN *et al.* 2010; PISOSCHI *et al.*, 2014), espectrometria de absorção atômica com chama (YEBRA; CESPÓN E MORENO, 2001), quimiluminescência, fluorimetria, métodos enzimáticos (SHEKHOVTSOVA *et al.*, 2006) no entanto, esses métodos possuem algumas limitações devido aos altos custos de materiais e complexos procedimentos experimentais, demandando um pré tratamento de amostra, além de um maior tempo

para a efetivação de seus respectivos resultados. Desta forma, é necessário propor métodos rápidos e seletivos para determinação de AA.

Frente as metodologias disponíveis para detecção do ácido ascórbico os métodos eletroquímicos apresentam algumas vantagens, como simplicidade, alta sensibilidade, facilidade de operação, análise rápida, baixo custo e potencial de miniaturização (MADRAKIAN; HAGSHENAS E AFKHAMI, 2014; SILVA *et al.*, 2016). Nesse contexto, têm-se percebido a ascensão do desenvolvimento de sensores eletroquímicos tendo em vista sua capacidade de permitir o controle interfacial no mecanismo de resposta podendo melhorar dessa forma os resultados obtidos (NASCIMENTO, 2019).

Tais dispositivos são capazes de transformar uma informação química ou física em sinal analiticamente útil, (KILIAN, 2000) os quais usam princípios da química e da física em sua operação (ARAÚJO, 2009). Desta forma, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono de parede múltiplas (MWCNTPE) à base de 4-nitroanilina (4NA) adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) para detecção de ácido ascórbico (AscH<sub>2</sub>).

### **1.1. Sensores eletroquímicos**

Sensores eletroquímicos é um dos tipos de sensores químicos que podem ser definidos como dispositivos capazes de transformar informações químicas em um sinal analiticamente útil (THEVENOT, 1999). Além disso, permitem a coleta de dados e obtenção de resultados com manipulação mínima do sistema estudado (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Estes dispositivos podem ser aplicados em diferentes contextos, como, na saúde, na indústria de alimentos e bioprocessos, em monitoramentos ambientais, entre outros (NASCIMENTO, 2019; PEREIRA; SANTOS E KUBOTA, 2002).

Conforme demonstrado na Figura 1, as partes principais que compõem um sensor são: elemento de reconhecimento, elemento transdutor e elemento comunicador. O elemento de reconhecimento é o responsável por gerar uma variação de sinal (propriedade do sistema) a partir da interação de uma molécula; o elemento transdutor converte o sinal gerado a partir da interação entre o elemento de reconhecimento e o analito num sinal mensurável; e o elemento de comunicação que transporta o sinal analítico ao equipamento (DORST *et al.*, 2010).

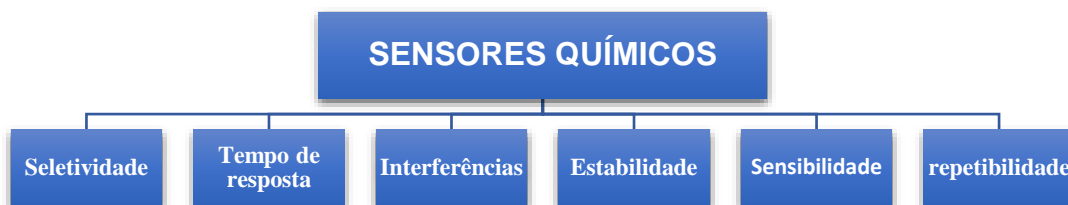
**Figura 1- Representação genérica de um sensor.**



Fonte: COODEIRO, 2017.

Estes sensores possuem várias características que os tornam requeridos em diferentes análises químicas, estas características são fatores que estão relacionados ao seu desempenho enquanto metodologia analítica a ser utilizada, conforme Figura 2 (COORDEIRO, 2017).

**Figura 2- Fatores relacionados ao desempenho de um sensor.**



Fonte: Autor, 2019

Em sensores eletroquímicos o eletrodo é o elemento transdutor e o elétron é utilizado para aquisição de sinal. Nestes dispositivos, as medidas eletroquímicas podem ser efetuadas tanto em condições de equilíbrio, na qual se tem a passagem de corrente elétrica desprezível e os tipos de sensores podem ser potenciométricos ou impedimétricos, como fora do equilíbrio, onde têm-se corrente elétrica ou potencial elétrico de forma expressiva e os sensores são classificados como voltamétrico, condutimétricos ou amperométricos (NUNES, 2013;).

Apesar das vantagens que os sensores podem promover, algumas desvantagens como a falta de seletividade em sistemas complexos, passivação gradual da superfície do eletrodo por adsorção, necessidade de aplicar sobretensões para oxidação ou redução da espécie em estudo, são evidenciadas quando os eletrodos são utilizados individualmente. (FREIRE, 2003; NASCIMENTO, M. 2019; QUITINO, 2003; ROSATTO, 2001).

Nesse sentido, uma área que tem crescido significativamente com potencial para minimizar as desvantagens supracitadas, é a dos eletrodos quimicamente modificados (EQM).

## 1.2. Eletrodos quimicamente modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM), foi introduzido na década de 70 por Murray e colaboradores (1975). A designação foi empregada para caracterizar eletrodos com espécies quimicamente ativas em sua superfície de forma a conseguir pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução (ARAUJO, 2017).

Em sua constituição, um eletrodo quimicamente modificado possui basicamente: um eletrodo base que pode ser de vários tipos de materiais como, carbono vítreo, ouro, platina, pasta de carbono entre outros, bem como, um agente modificador na qual geralmente são utilizadas diferentes espécies orgânicas, nano partículas, óxidos, compósitos, polímeros e outras misturas (NUNES, 2013). A escolha dependerá do método de modificação escolhido na qual destacam-se a adsorção, ligação covalente, materiais compósitos, recobrimento com filmes poliméricos (JÚNIOR, 2016).

Desta forma, a escolha do sensor desde sua base até a técnica de imobilização será escolhida de acordo com a necessidade prevista em um determinado sensor, no entanto, existem alguns materiais que vem recebendo notoriedade como a fibra de carbono (DIMITRIJEVIC *et al.*, 2016; HUEBRA *et al.*, 2001), o carbono vítreo (ĐORĐEVIĆ *et al.*, 2012), o diamante dopado com boro (SIARA *et al.*, 2015) e a pasta de carbono (TASHK HOURIAN E NAMI, 2015).

Porquanto, entre os materiais utilizados para a construção do sensor a pasta de carbono vem recebendo notoriedade, devido a sua facilidade, rapidez na preparação, área com reprodutibilidade, baixa corrente residual, ampla janela de potencial, não reage quimicamente, facilmente modificada para diferentes finalidades e baixo custo (TASHK HOURIAN E NAMI, 2015; ZHU; SUJARI E GHANI, 2013).

Ademais, a inserção de grupos modificadores químicos a base de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), incluindo os a base de pasta de carbono, tem chamado a atenção pois oferecem a possibilidade de ser confeccionados com uma variedade de grupos orgânicos, o que enriquece suas propriedades na superfície, podendo ser incorporados nos compostos,

geralmente com o objetivo de aumentar a capacidade de adsorção e promover a estabilidade das espécies eletroativas imobilizadas, tornando esse material útil como suporte inerte para vários catalisadores (MARCO *et al.*, 2016).

Além disso, essa matriz inorgânica de sílica pode ser modificada com óxidos de metais em sua superfície a fim de imobilizar espécies que atuam como mediador durante o processo de transferência de elétrons (LIMA *et al.*, 2008). Os óxidos de metais como Ti (IV), Zr (IV), Nb (V) e V (V) são os mais utilizados na matriz de sílica devido à alta acidez e forte interação eletrostática que apresentam com o material de superfície. Dessa forma, sílica modificada com óxidos metálicos é considerada uma matriz de alta troca iônica e que promove uma melhor atividade eletroquímica dos mediadores (PEREIRA *et al.*, 2011). Entre estes mediadores destacam-se as espécies nitro aromáticas.

Nos últimos anos, espécies aromáticas que apresentam o grupo nitro (R-NO<sub>2</sub>) tem se destacado por apresentar as características desejáveis para um mediador. As espécies que apresentam o grupo nitro são denominadas nitro compostos. O grupo nitro na forma oxidada não possui efeito catalítico para diferentes espécies químicas, no entanto, quando submetido a um processo de redução *in situ* na superfície do eletrodo, forma o grupo hidroxilamina. A hidroxilamina formada pode ser oxidada reversivelmente através de um processo de 2H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> sobre a superfície eletródica, gerando, portanto, o correspondente grupo nitroso (-NHOH/-NO) (COSTA, 2016; LIMA, 2009; NASCIMENTO, 2019; SANTHIAGO, 2010).

Dentre esses nitros compostos destaca-se a 4-nitroanilina (4-NA), um membro do grupo das nitro anilinas, que apresenta em sua estrutura um grupo nitro e um amino doador de elétrons ligados em posição *para* do anel aromático (OZTEKIN *et al.*, 2010). Tal conformação do grupo nitro e amino promove transições eletrônicas de baixa energia com migração de carga dentro da molécula, o que torna as espécies favoráveis para os sistemas de detecção.

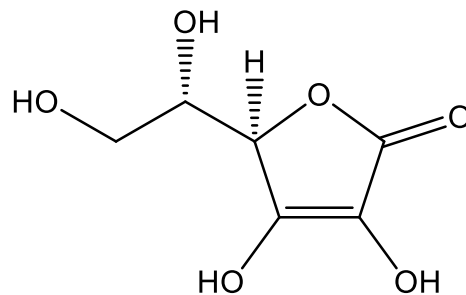
Nesse sentido, o uso de diferentes compostos contendo o grupo nitro como mediadores para o desenvolvimento de novas interfaces tem sido amplamente empregados para detecção de diferentes analitos, principalmente os compostos de interesse biológico como o ácido ascórbico.

### 1.3. Analito alvo

#### 1.3.1. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ( $\text{AscH}_2$ ) é um ácido orgânico hidrossolúvel, também conhecido amplamente como vitamina C. De acordo com a Figura 3, ele é uma estrutura  $\gamma$ -lactona, que possui dois átomos de hidrogênio ionizáveis ( $\text{pK}_a$  4,04 e 11,34) e sob a maioria das condições fisiológicas ( $\text{pH} = 7,4$ ), está presente na forma mono-protonada, o qual é responsável pela sua ação antioxidante, visto que possui a capacidade de doar um  $\text{H}^\cdot$  ou  $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$  para outro radical (KALL,2003; PISOSCHI, 2014; LIMA, 2009).

**Figura 3 - Estrutura química do L - ácido ascórbico**



Fonte: NASCIMENTO, M. 2019.

Essa vitamina é um antioxidante de grande importância para os seres vivos, mas devido à ausência da enzima gulonolactona oxidase os seres humanos não conseguem realizar o processo de sintetização, devido à mutação no gene que codifica a enzima (DAUD; IASMAIL E SARMADI, 2016; VALPUESTA E BOTELLA, 2004). No entanto, ela pode ser sintetizada pela maioria dos animais a partir da glicose. Esse antioxidante remove facilmente os radicais livres tóxicos e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas no metabolismo celular, que estão associadas a várias formas de danos e doenças teciduais. Além de atuar sobre peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion-radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e peroxila ( $\cdot\text{OOH}$ ), por meio da reação de Fenton, o ascorbato também reduz íons como o  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Cu}^{+3}$  gerando radicais livres (ARRIGONI E TULLIO, 2002; SMIRNOFF, 2018; PUTCHALA, *et al.*, 2013).

Apresenta fórmula  $C_6H_8O_6$  e massa molecular de  $176,13 \text{ g mol}^{-1}$ . É descrito como pó cristalino branco, estável enquanto sólido, mas que oxida facilmente quando em solução. É solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (BRASIL, 2010).

Amplamente encontrada em frutas e vegetais, incluindo frutas cítricas, são as fontes predominantes de vitamina C, suprimindo mais de 80% das necessidades diárias (DAUD; IASMAIL E SARMADI, 2016). Ademais, esta vitamina se apresenta com um importante papel na prevenção e tratamento de várias doenças, como Alzheimer, aterosclerose, infertilidade, câncer e AIDS (PUTCHALA *et al.*, 2013; DU; CULLEN E BUETTNER, 2012; CZYZOWSKA, 2016). Contudo, a alteração na concentração de AA no organismo humano pode causar irritação gástrica e problemas renais oriundos de um de seus metabólitos, o ácido oxálico.

É a mais lábil vitamina nos alimentos e parte de sua atividade é perdida através do auto oxidação durante a preparação, cozimento e armazenamento dos alimentos. A reserva de ácido L-ascórbico no organismo de um ser humano adulto é de aproximadamente 1500 mg, sendo considerada a ingestão média diária de 45 a 75 mg. Caso não ocorra ingestão da vitamina e a reserva decresça para menos de 300 mg, quadro clínico como a doença de escorbuto pode surgir no intervalo de 30 a 45 dias (GONÇALVES, 2008).

Dessa forma, a determinação do ácido ascórbico em amostras, como alimentos, frutas frescas, frutas de suco e fluidos biológicos se torna essencial (PUTCHALA *et al.*, 2013; MAY, 2016). Por isso, pesquisas têm sido realizadas na tentativa de se propor novos métodos de determinação com sistemas analíticos mais simples e eficazes (HANSEN *et al.*, 2016).

Nesse contexto, os sensores eletroquímicos especialmente fundamentados em eletrodos de pasta de carbono, têm sido considerados como uma alternativa de detecção e quantificação promissora, uma vez que se tem a possibilidade de se trabalhar com sistemas altamente sensíveis e seletivos ao analito. Com isso, vejamos alguns exemplos de metodologias de modificação de eletrodo para detecção de ácido ascórbico.

Raof, Ojani e Kiani (2001), construíram um eletrodo de pasta de carbono a base de pó de grafite e ácido carboxílico ferroceno. Os autores obtiveram uma redução no potencial de oxidação do ácido ascórbico, cerca de 248 mV menos positivo do que em um eletrodo de pasta de carbono não modificado, com limite de detecção  $1,08 \times$

$10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Já Roy *et al.* (2004) depositaram eletroquimicamente polímeros de N, N-dimetilanina sobre eletrodos de pasta de carbono. O filme formado, carregado positivamente, facilitou a oxidação do ácido ascórbico de forma que se percebeu um deslocamento potencial para uma região menos positiva. E Ardakani *et al.* (2010) desenvolveram um sensor a partir de um eletrodo de pasta de carbono fundamentado em nano partículas de TiO<sub>2</sub> para detecção de ácido ascórbico e ácido úrico, com limite de detecção de 0,3 mmol L<sup>-1</sup>.

## 1.4. Técnicas eletroquímicas

### 1.4.1. Voltametria Cíclica

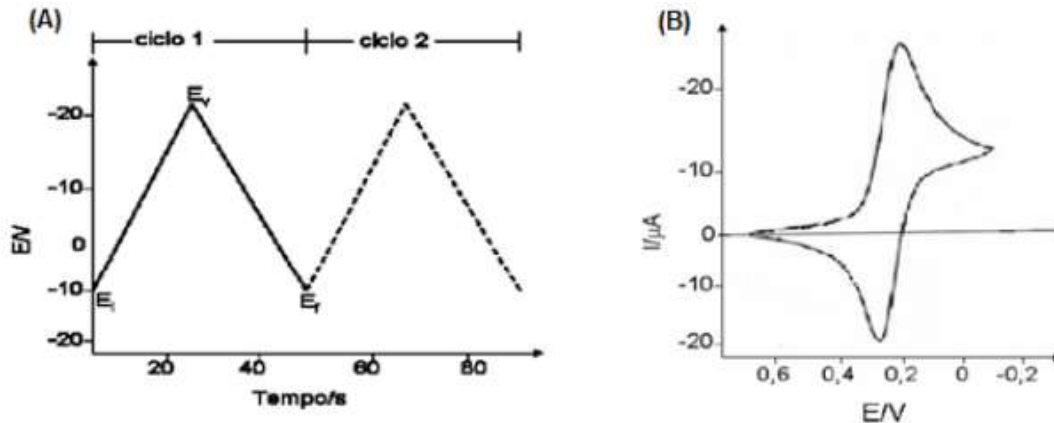
A voltametria cíclica é uma técnica Eletroanalítica que nos dá informações sobre os processos que resultam de reações redox, que possam ocorrer num elétrodo reativo (metal ou liga), por efeito da polarização eletroquímica, entre dois valores de potenciais, E<sub>i</sub> e E<sub>f</sub>. Devido suas atribuições significativas bem como: a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos, ela se tornou uma técnica bastante utilizada para obtenção de dados qualitativos sobre as reações eletroquímicas. (FONSECA; PROENÇA E CAPELO, 2015)

Nesta técnica, a resposta de corrente de um pequeno eletrodo estacionário em uma solução sem agitação é excitada por uma forma de onda de voltagem triangular, como visto na Figura 4a (SKOOG *et al.*, 2015). Ou seja, durante a realização de um procedimento voltamétrico, inicia-se a aplicação do potencial em um valor onde não haja redução. Com a variação do potencial para regiões mais catódicas (negativas) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial (PACHECO *et al.*, 2013).

Segundo Pacheco *et al.*, (2013), no caso de uma reação reversível os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa

para estudos mecanísticos. Durante a varredura do potencial, o potenciostato registra a corrente que é gerada como função do potencial aplicado (Figura.4b).

**Figura 4 - Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica (A). Voltamograma cíclico para um sistema reversível (B).**



Fonte: LOURENÇÃO, 2009. (Adaptado)

Apesar de ser essencial para análises qualitativas em sistemas redox, para testes quantitativos, faz-se necessário o uso de técnicas mais sensíveis, como exemplo, a Cronoamperometria.

#### 1.4.2. Cronoamperometria

A Cronoamperometria, é uma técnica que determina a corrente que flui através do eletrodo de trabalho em função do tempo em um potencial constante. Esse fluxo de corrente é correlacionado com o gradiente de concentração das espécies oxidadas ou reduzidas na superfície do eletrodo de trabalho por meio da equação de Cottrell:

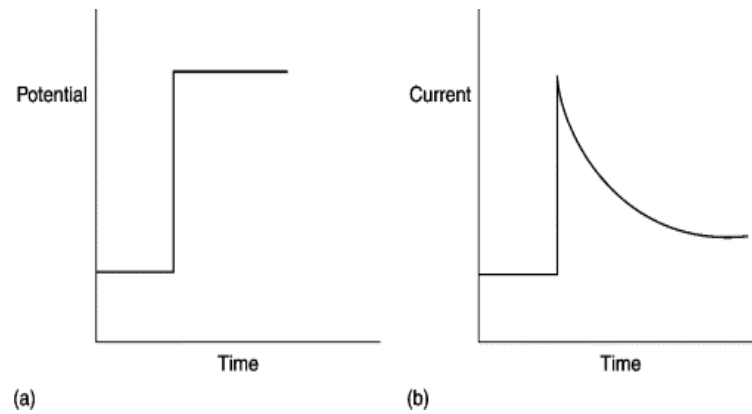
$$I_t = \frac{nFAC_0D_0^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = bt^{-1/2} \quad (\text{Eq.1})$$

Onde:  $I_t$  é a corrente a um tempo  $t$ ,  $n$  é o número de elétrons,  $F$  é a constante de Faraday,  $A$  é a área do eletrodo,  $C$  é a concentração das espécies oxidadas e  $D$  é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas.

Na utilização desta técnica do tipo de potencial-step, são aplicados dois potenciais. O primeiro ( $E_1$ ) é aplicado em uma região onde não haverá a ocorrência

de reações com espécies eletroativas. Já o segundo ( $E_2$ ) é o potencial que irá ocorrer o processo de reação para a espécie de alvo de estudo (FERREIRA, 2009).

**Figura 5 - (a) Aplicação do potencial-step; (b) Comportamento da corrente em função do tempo.**



Fonte: GUY e WALKER, 2016.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver e caracterizar um sensor de pasta de nanotubo de carbono de parede múltiplas (MWCNTPE) à base de 4-nitroanilina (4NA) adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio (SZ) para detecção de ácido ascórbico (AA).

#### **2.1.1. Objetivos específicos**

- a) Imobilizar a 4-nitroanilina em sílica gel modificada;
- b) Incorporar sílica modificada com 4-NA em pasta de nanotubo de carbono;
- c) Otimizar os parâmetros analíticos a partir de testes de velocidade de varredura, tipo de solução tampão e valor de pH;
- d) Caracterizar os materiais sintetizados através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimétrica (TGA) e Espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR);
- e) Obter as figuras de mérito tais como: limites de detecção e quantificação, sensibilidade e faixa de resposta linear.
- f) Realizar estudos de possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade do sensor;
- g) Aplicar o sensor em amostras reais.
- h) Comparar os dados obtidos com outros já reportados na literatura.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (Tabela 1).

**Tabela 1 – reagentes utilizados e seus respectivos fornecedores**

<b>Reagentes</b>	<b>Fornecedores</b>
4 Nitroanilina (4NA)	Aldrich
Ácido Ascórbico (AA)	Sigma-Aldrich
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
Óleo mineral (Nujol)	Mantercop
Sílica gel	Fluka
Fosfato Monossódico	Synth
Fosfato Dissódio	Synth
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich

Fonte: Autor, 2019

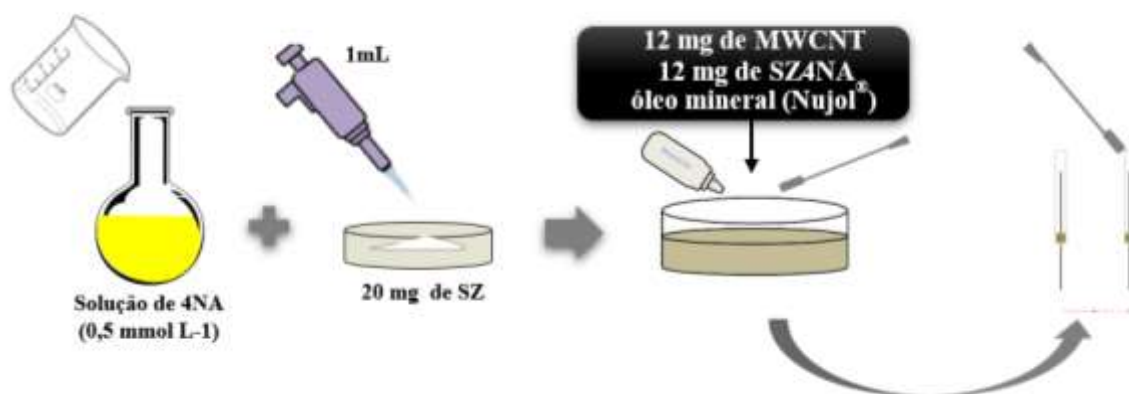
A sílica utilizada para o procedimento possui diâmetro médio de poro de 6 nm e tamanho de partícula de 0,04 - 0,063 mm. As soluções foram preparadas com água purificada em um sistema Milli-Q (18,2 MΩ cm, Millipore (Merck), Darmstadt, Alemanha) e os valores de pH das soluções-tampão foram ajustados com NaOH e determinadas com um pHmetro (Tecnonon mPA 210).

### 3.2. Construção do sensor

Para a confecção do eletrodo inicialmente foi realizado o processo de imobilização de 4-NA em sílica previamente modificada com óxido de zircônio (SZ) de acordo com o procedimento descrito por Yamashita e colaboradores (2003). A imobilização de 4NA em sílica modificada foi realizada através da preparação de uma solução de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  em DMSO. Após este passo, 1 mL desta solução foram adicionados a 20 mg de SZ sob agitação. Após 4 horas, o sólido resultante foi filtrado e lavado várias vezes com DMSO, e depois foi seco a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 min.

Este material é denotado como “4-nitroanilina imobilizada em sílica modificada com óxido de zircônio” (SZ4NA). O eletrodo modificado foi preparado misturando-se 12 mg de MWCNT, 12 mg de SZ4NA e óleo mineral, até que uma pasta homogênea fosse obtida e essa pasta fosse transferida para a cavidade de um tubo de vidro que continha em seu interior um fio de platina (Pt), o qual constitui o eletrodo de trabalho. Em seguida, a pasta foi compactada com a espátula e posteriormente foi-se obtida uma superfície lisa. A área da superfície geométrica do eletrodo de trabalho foi de  $0,0314 \text{ cm}^2$  e foi denominado como EPC / MWCNT / SZ4NA. Todas as respostas obtidas com o sensor proposto são dadas como a corrente observada para uma área geométrica conhecida do eletrodo de trabalho (sensor), determinada como  $(A = \pi \cdot r^2)$ .

**Figura 6: Esquema de preparo para a Imobilização da 4-Nitroanilina na superfície da matriz inorgânica e sua deposição no eletrodo de pasta de nanotubo de carbono**

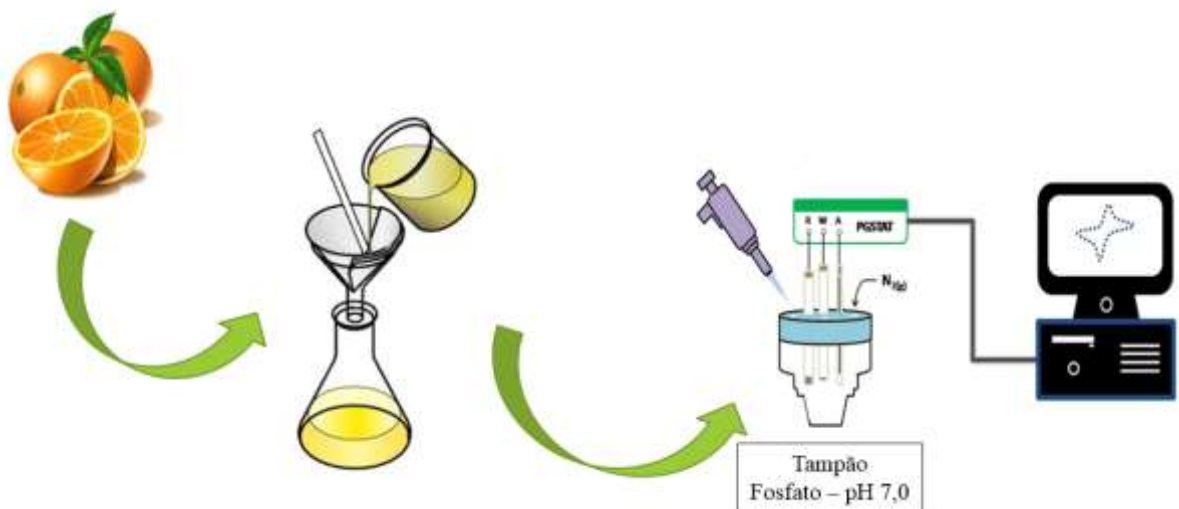


### 3.3. Preparação da amostra para identificação do analito

Para avaliar o método analítico proposto para detecção do AA, foi-se utilizado o sensor proposto em amostras de suco de laranja diluído em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0. O suco da fruta, *in natura* foi obtido da variedade Citrus limettioides, popularmente conhecida como laranja lima, adquirida no comércio varejista da cidade de Maceió. O suco utilizado foi obtido manualmente espremendo a laranja e posteriormente filtrado em um filtro de papel qualitativo. Em seguida, 0,1 mL da solução mais 9,9 mL do tampão (pH 7,0) foi utilizado e diluições sucessivas foram realizadas.

As análises foram feitas sob borbulhamento de nitrogênio na solução por 10 minutos para a retirada de oxigênio dissolvido. Após, a quantidade de vitamina C na amostra foi avaliada pelo método de adição padrão. Para validar o método proposto, utilizou-se o método de titulação iodométrica, realizado de acordo com o procedimento do Instituto Adolf Lutz (ZENEBOON; PASCUET; TIGLEA,2008)

**Figura 7 – Esquema de preparo da amostra para procedimento analítico**



Fonte: Nascimento, D. 2019

### 3.4. Equipamentos

#### 3.4.1. Medidas eletroquímicas

Para a realização das medidas eletroquímicas (voltamétricas e amperométrica) foram utilizados um potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Echo Chemie (Utrecht, Holanda) acoplado a um computador contendo o Software NOVA 1.10.

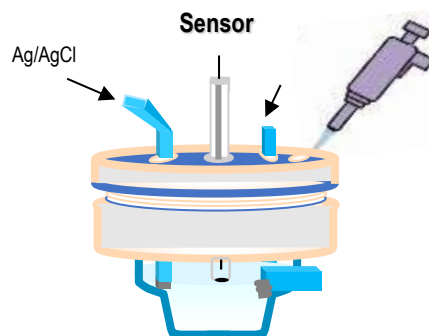
**Figura 8. Potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Echo Chemie**



Fonte: Metrohm.com

Posteriormente foi empregado uma célula eletroquímica com três eletrodos, onde foi utilizado um eletrodo de Ag / AgCl (KCl saturado) como referência, um fio de Pt como auxiliar e o eletrodo de trabalho modificado com pasta de carbono para todas as medidas (Figura 9).

**Figura 9. Modelo esquemático da cela eletroquímica**



Fonte: Autor, 2019.

As medidas foram realizadas, utilizando-se 10,00 mL de solução tampão de fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH = 7,0) como sonda eletroquímica em velocidades de varredura ( $v$ ) de 20 mVs<sup>-1</sup> e 5 mVs<sup>-1</sup>. A avaliação dos voltamogramas permitiu alterar a faixa de potencial aplicado conforme a resposta do sensor.

O oxigênio foi removido fazendo borbulhar através da solução durante pelo menos 10 min. Para os experimentos realizados em potencial constante, a resposta foi registrada em função do tempo, após a adição de AA. A resposta do sensor foi medida como a diferença entre as correntes total e residual.

### **3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia de superfície de SZ4NA foi analisada por microscopia de varredura de emissão (MEV) da TESCAN (Figura 10), modelo VEGA3 tipo câmara LM com um cátodo convencional de tungstênio para operações de alto vácuo com detectores de elétrons secundários (SE), após metalização do ouro (Quorum Technologies LTD, Ashford, modelo Q15OR).

**Figura 10. Microscópio de varredura de emissão (MEV)**



Fonte: Tescan.com

### **3.4.3. Análise termogravimétrica**

A análise térmica gravimétrica foi realizada em um TGA-50 / 50H de Shimadzu (Kyoto, Japão) a uma taxa de aquecimento de 10 ° C / min na faixa de temperatura de 10 a 1000 ° C em atmosfera de nitrogênio (Figura 11).

**Figura 11. TGA – 50/ 50H da shimadzu**



Fonte: Shimadzu.com.br

#### 3.4.4. Transformada de Fourier no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de FTIR foi realizada usando um IRAffinity-1 (Kyoto, Japão), os espectros de infravermelho foram obtidos na faixa de  $4.000-400\text{cm}^{-1}$ , em pastilhas de KBr (2mg de amostra – 200mg de KBr seco) (figura 12).

**Figura 12. FTIR (IRAffinity-1)**



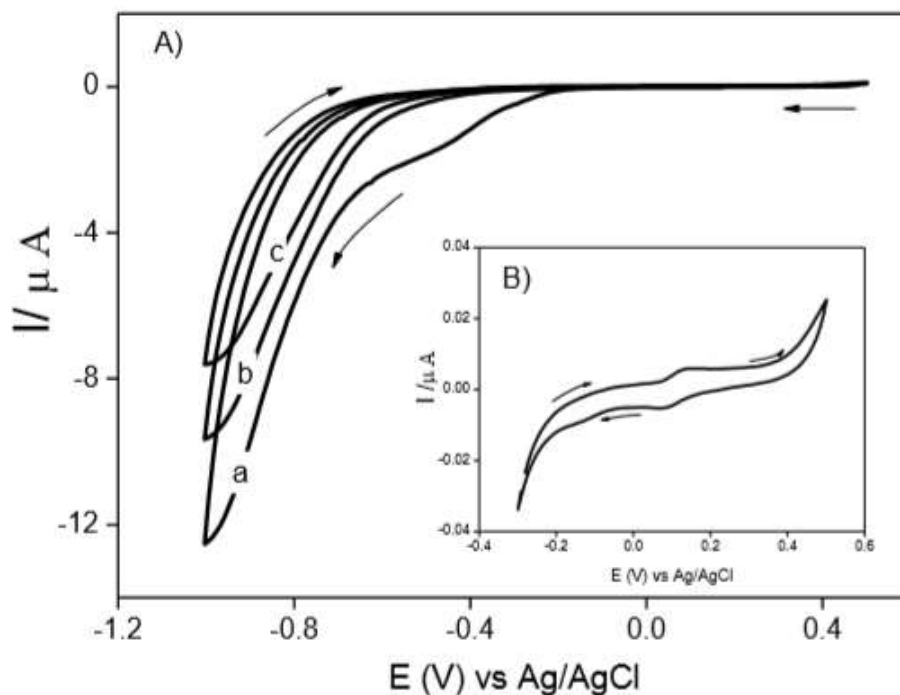
Fonte: shimadzu.com.br

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Ativação de 4-nitroanilina em eletrodo modificado MWCNTPE / SZ4NA e oxidação eletrocatalítica de AA

Com a finalidade de estudar as propriedades eletroquímicas do eletrodo de pasta de carbono com a matriz SZ4NA, observou-se por meio da Voltametria cíclica (VC), que a espécie eletroativa hidroxilamina 4-Nitroanilina (R-NHOH/R-NO) foi eletrogerada *in situ* na superfície do eletrodo modificado a partir da redução do grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) presente na molécula de 4-NA (OZTEKIN et al. 2010), após varredura na faixa de potencial de 0,5 V a -1,0 V vs. Ag/AgCl em solução tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0) e velocidade de varredura ( $v$ ) a  $20 \text{ mVs}^{-1}$ . A ciclagem potencial foi realizada por 10 ciclos.

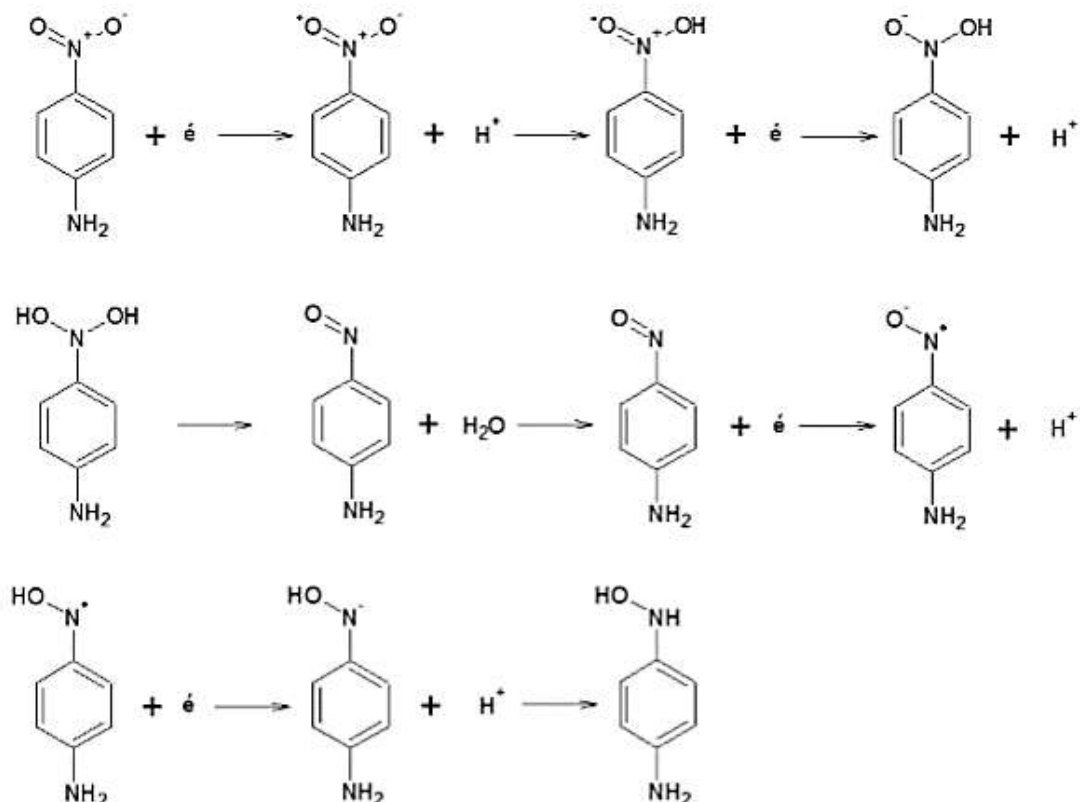
Figura 13. (A) Redução do grupo nitro de 4-NA (a) primeira varredura, (b) segunda varredura e (c) terceira varredura e (B) formação do par redox R – NO / R – NHOH a  $5 \text{ mVs}^{-1}$  em  $0.1 \text{ mol. L}^{-1}$  solução tampão fosfato a pH 7. Formação de espécies eletroativas R – NO / R – NHOH a  $0,02 \text{ Vs}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  a pH 7.  $E_{\text{inicial}} = -0,3 \text{ V vs. Ag / AgCl}$  e  $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$ .



Fonte: Autor, 2019.

Na figura 13(a) há-se a visibilidade do ciclo do grupo nitro que se apresenta como um processo eletroquímico totalmente irreversível reduzido a hidroxilamina (R – NHOH) e oxidado a R – NO. Embora não seja possível observar no segundo e terceiro ciclos, já se torna pertinente a formação de um pico redox definido que pode ser atribuído ao par redox R – NO / R – NHOH (figura 13b e 13c). Sendo assim, ao restringir a faixa de potencial entre -0,3V a 0,5V houve a formação de um par redox proveniente da ativação eletroquímica *in situ* do grupo nitro, onde apresentou-se a sua redução irreversível por meio de quatro elétrons de NO<sub>2</sub> a NHOH (Figura 14). A hidroxilamina (NHOH), por sua vez, é oxidada reversivelmente ao composto nitroso (NO) (MUHAMMAD et al., 2016) formando, portanto, o par redox NO/NHOH na superfície do eletrodo por meio de um processo redox de 2e<sup>-</sup>/2H<sup>+</sup>.

**Figura 14 – Esquema de redução eletroquímica da 4NA e formação de R-NHOH**



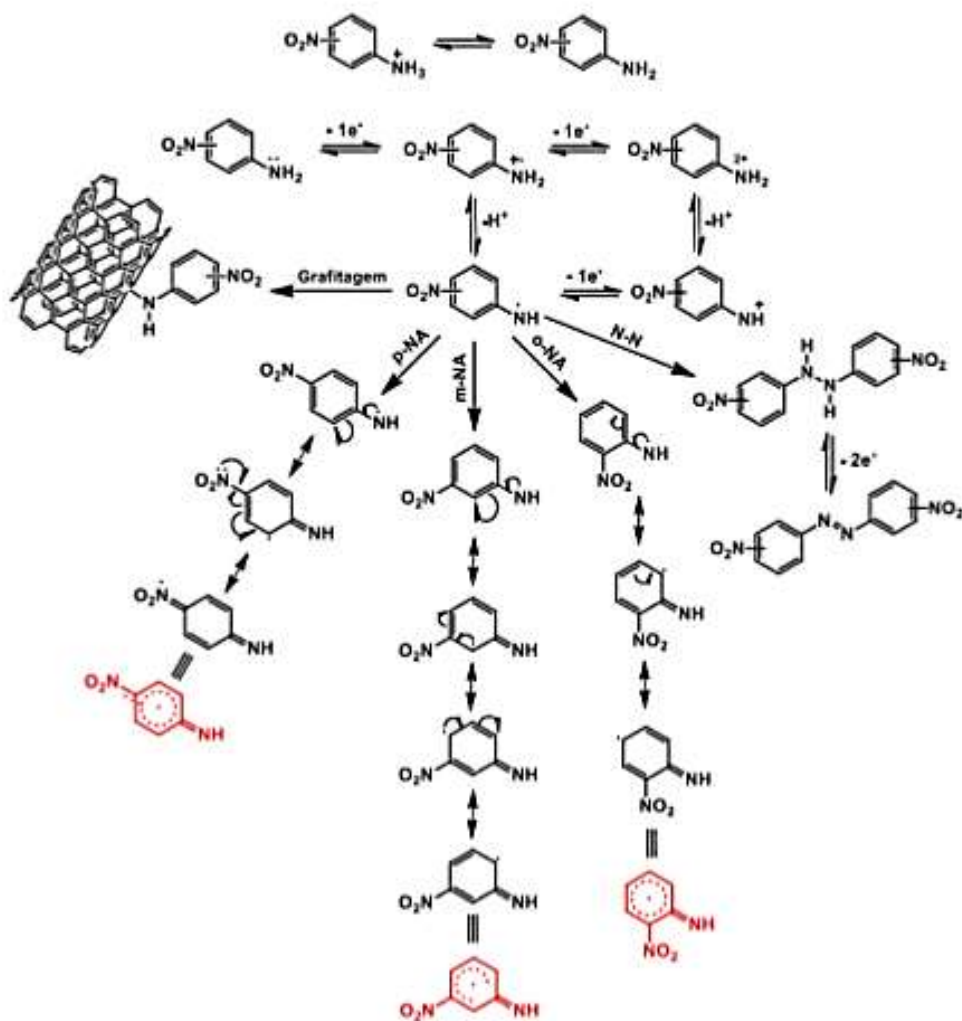
Fonte: NASCIMENTO, D. 2019.

Desta forma, o mediador apresentou características de um sistema, onde há-se um grupo doador de elétrons (amino) e um grupo aceptor de elétrons (nitro), ambos

conectados por um sistema  $\pi$ - $\pi$  conjugado, onde as duas estruturas correspondiam às formas benzenoide e quinóide. (MOHAMMAD et al., 2012)

Além que, para uma melhor explicação sobre a incorporação do 4-NA na matriz de sílica, é necessário a compreensão que há a oxidação dessa molécula e a consequente formação de polímeros. Desta forma, a polimerização e reatividade do 4-NA da oxidação via 1 elétron, após a desprotonação em meio aprótico (Figura 15), pode ser prevista (HAMMERICH et al., 2015) devido aos dímeros de treinamento, estrutura quinóide e trímero (LIANG et al., 2012) das nitroanilinas. Porém, a presença do grupo de retirada de elétrons ( $\text{NO}_2$ ) na posição para (relativo ao grupo amina) deve aumentar a densidade eletrônica na posição para.

**Figura 15 – Mecanismo de oxidação das nitroanilinas**



Fonte: HAMMERICH, O. et al., 2015

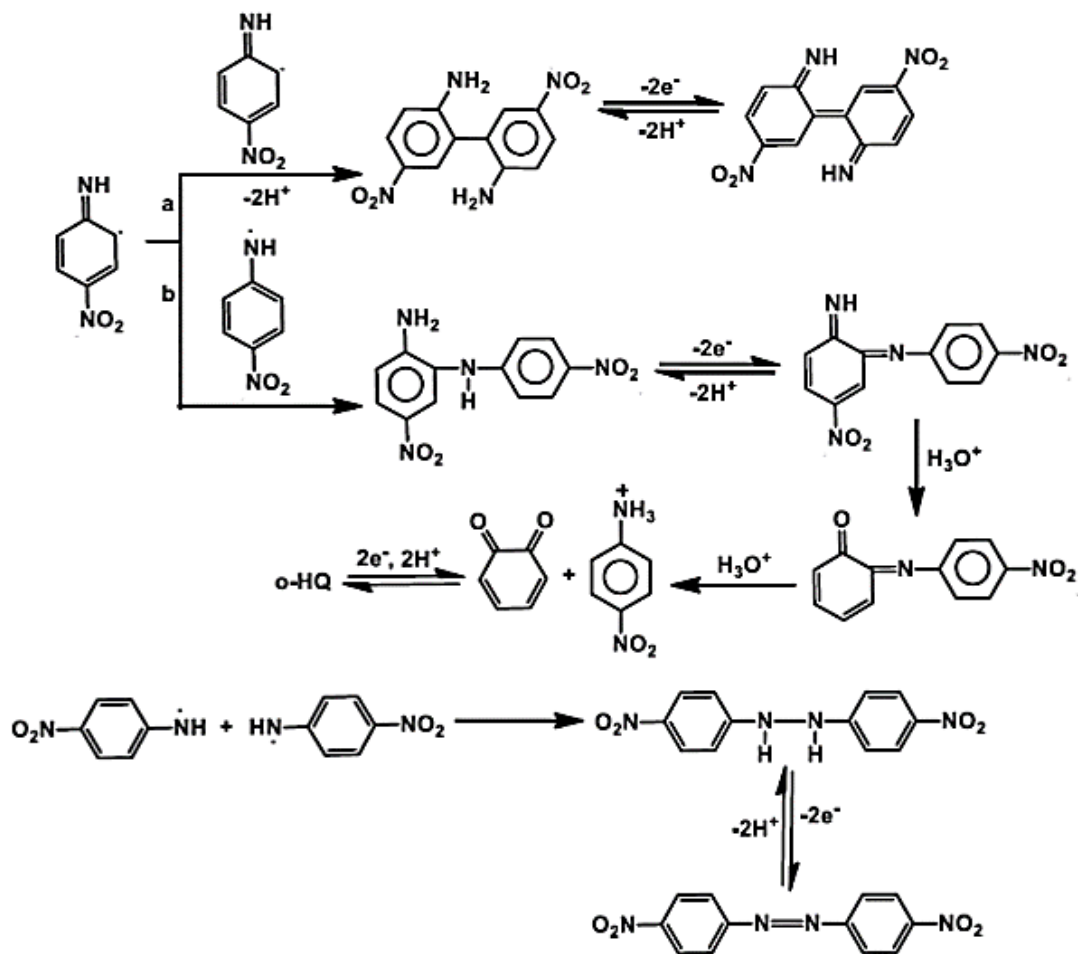
Em compostos nitro e intermediários, após o processo de redução de forma eletroquímica há-se a origem de uma variedade de intermediários, devido a presença de uma ligação polar de N-O. Desta forma, é possível identificar alguns e outros apenas deduzir. (SASSYKOVA *et al*, 2019) Além que, existe uma multiplicidade de caminhos que podem fazer uma conexão entre esses intermediários, materiais de partida e produtos de redução eletroquímica de um dado composto nitro, dependendo do procedimento empregado e suas condições impostas (PATAI, 1996).

Há-se a possibilidade de três rotas principais provindas de compostos nitro (p-NA, m-NA e o o-NA), pois esses compostos ligam três moléculas ao longo dessas rotas. Quando há a diminuição da taxa de redução de nitro compostos hidrogenados, formam-se variados compostos, dentre eles a 4-NA. O grupo responsável para que esse processo seja realizado, ou seja, se comportem como doadores de elétrons é o grupo amino presente na molécula de 4-NA (SASSYKOVA *et al*, 2019).

Além que, existe um fator notório que se deve a compreensão em processos eletroquímicos envolvendo compostos nitro, pois seu processo é exclusivamente catódico, desta forma o alto índice de oxidação do nitrogênio que se encontra presente no grupo nitro significa que, eles em sua maioria não podem ser oxidados. Os compostos nitrosos são rapidamente oxidados e reduzidos, porém estas informações na literatura se encontram de forma limitada (PATAI,1996).

Porquanto, uma possibilidade de mecanismo para a inibição da copolimerização se deve ao fato que os grupos nitro capturam eletrons de partículas do proprio grupo amino da p-nitroanilina, e posteriormente uma estrutura inerte menos propensa a perder esses eletrons é gerada (LIANG, et al. 2012). Sendo assim, é possível inferir um mecanismo para o acoplamento entre radicais formados pela oxidação de 4-NA (Figura 16).

Figura 16. Esquema do mecanismo de oxidação em 4-NA

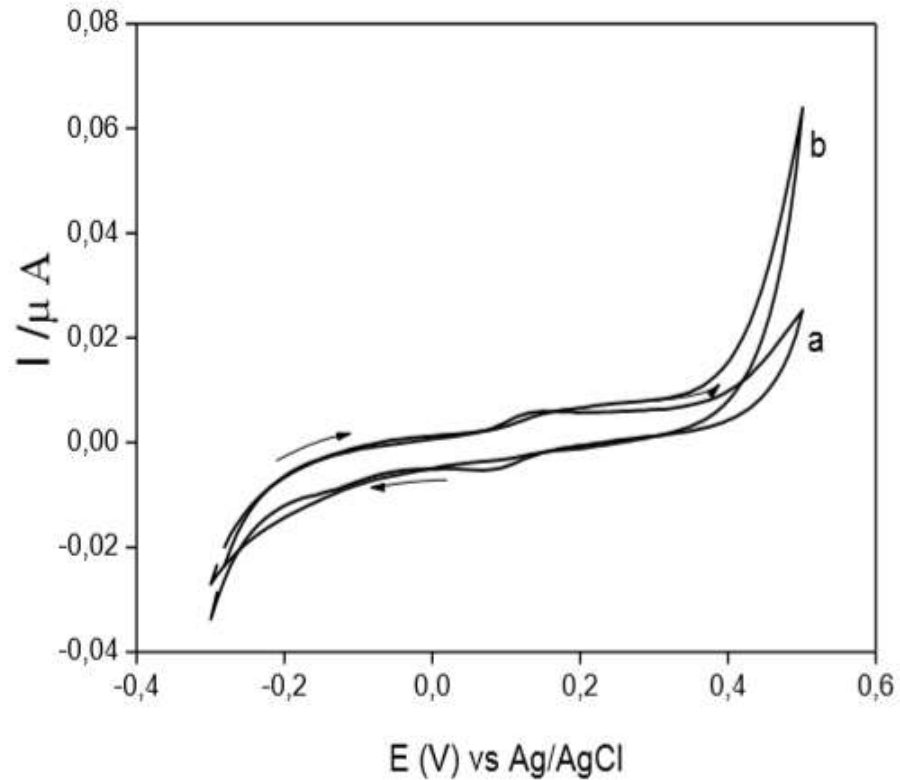


Fonte: Hammerich, O. et al. 2015

#### 4.2. Comportamento Eletroquímico de AA por meio do eletrodo modificado

Para verificar a resposta referente à atividade electrocatalítica de cada etapa de modificação do eletrodo de pasta de carbono, foram realizadas varreduras utilizando a técnica de voltametria cíclica. Na figura 17 (a) é possível observar a formação de picos redox bem definidos devido a presença de R-NO/R-HNOH no eletrodo modificado com a 4NA. No entanto, o eletrodo que não foi modificado com a 4NA não apresentou atividade electroquímica considerável (Figura 17 b). Para o estudo electroquímico foi delimitada uma faixa de potencial de -0,3V a 0,5V vs. Ag/AgCl, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e velocidade de potencial de 0,02 V s<sup>-1</sup>.

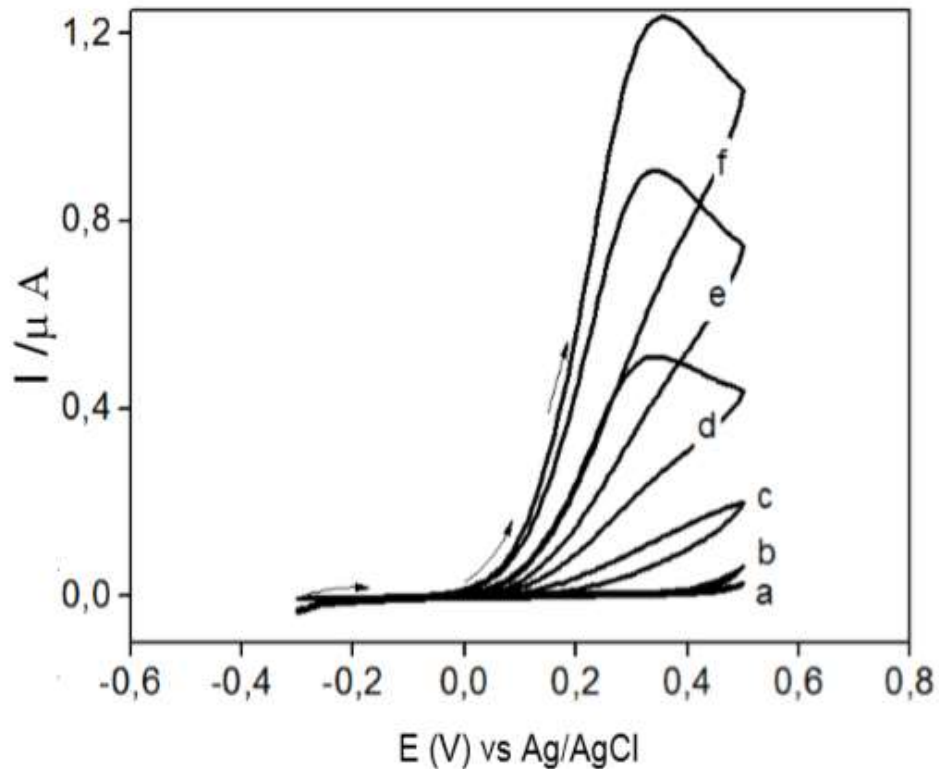
Na figura 17 – formação do par redox (R-NO/R-NHOH) a  $0,02 \text{ V s}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.  $E_{\text{inicial}} = 0,3 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = 0,5 \text{ V}$  vs Ag/AgCl. (a) voltamograma cíclico do eletrodo modificado com 4-NA e (b) eletrodo modificado sem 4-NA.



Fonte: Autor, 2018

Na figura 18, está disposto voltamogramas cíclicos para cada etapa da modificação e utilização do AA, em solução tampão fosfato (pH 7,0), com  $E_{\text{inicial}} = -0,3\text{V}$  e  $E_{\text{final}} = 0,5\text{V}$  com varredura anódica de  $0,005 \text{ V.s}^{-1}$  na ausência e na presença de AA para verificação de atividade eletrocatalítica da 4-NA na presença do analito.

**Figura 18.** Voltamogramas cíclicos obtidos por EPC/MWCNT/SZ e EPC/MWCNT/SZ4NA em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato, pH 7,0 a  $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{initial}} = -0,3\text{V}$  e  $E_{\text{final}} = 0,5\text{V}$  vs. Ag/AgCl. EPC/MWCNT/SZ4NA na ausência de AA (a), EPC/MWCNT/SZ na ausência (b) e presença (c) de AA. EPC/MWCNT/SZ4NA com diferentes concentrações de AA:  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  (d),  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  (e) e  $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$  (f).

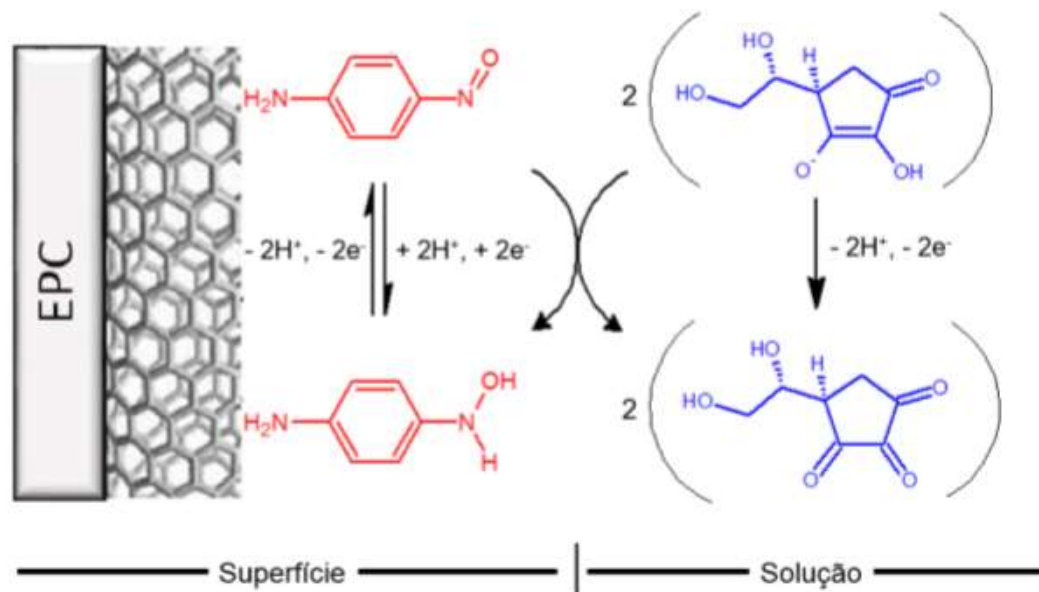


Fonte: Autor, 2019.

Após a inserção de diferentes concentrações ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) de AA, houve um aumento significativo da corrente de pico anódica em um potencial de  $0,3\text{V}$ , ademais, não houve surgimento de corrente catódica na análise reversa (fig. 18 A d, e, f). Porquanto, há-se a obtenção resultante de um forte efeito electrocatalítico, indicando que um aumento na concentração de AA corresponde a um aumento na corrente de oxidação (HSUA et. al., 2017).

O mecanismo electrocatalítico ( $EC_{\text{cat}}$ ) pode ser compreendido a partir da interação entre a 4NA ativada, onde há a formação de espécies eletroativas na plataforma (nanotubo e a sílica gel modificada) e esta interação gera um ciclo catalítico para a oxidação electrocatalítica de AA, o qual envolve o par redox (hidroxilamina/nitroso) (Figura 18), semelhante a mediadores redox reportados na literatura (SILVA, et al, 2016,2018).

Figura 19 – mecanismo proposto para o processo de eletro catálise de AA sobre a plataforma EPC/MWCNT/SZ4NA.



Fonte: NASCIMENTO, D. 2019.

Ademais, sob as mesmas condições experimentais, onde há-se a oxidação direta de AA em um eletrodo de pasta de carbono sem modificação (EPC/MWCNT/SZ) mostra uma onda irreversível em potenciais mais positivos com um pico de 0,4 V é mostrado (Fig. 18 c), indicando que o eletrodo de pasta de carbono sem modificação não possui comportamento eletrocatalítico para o AA.

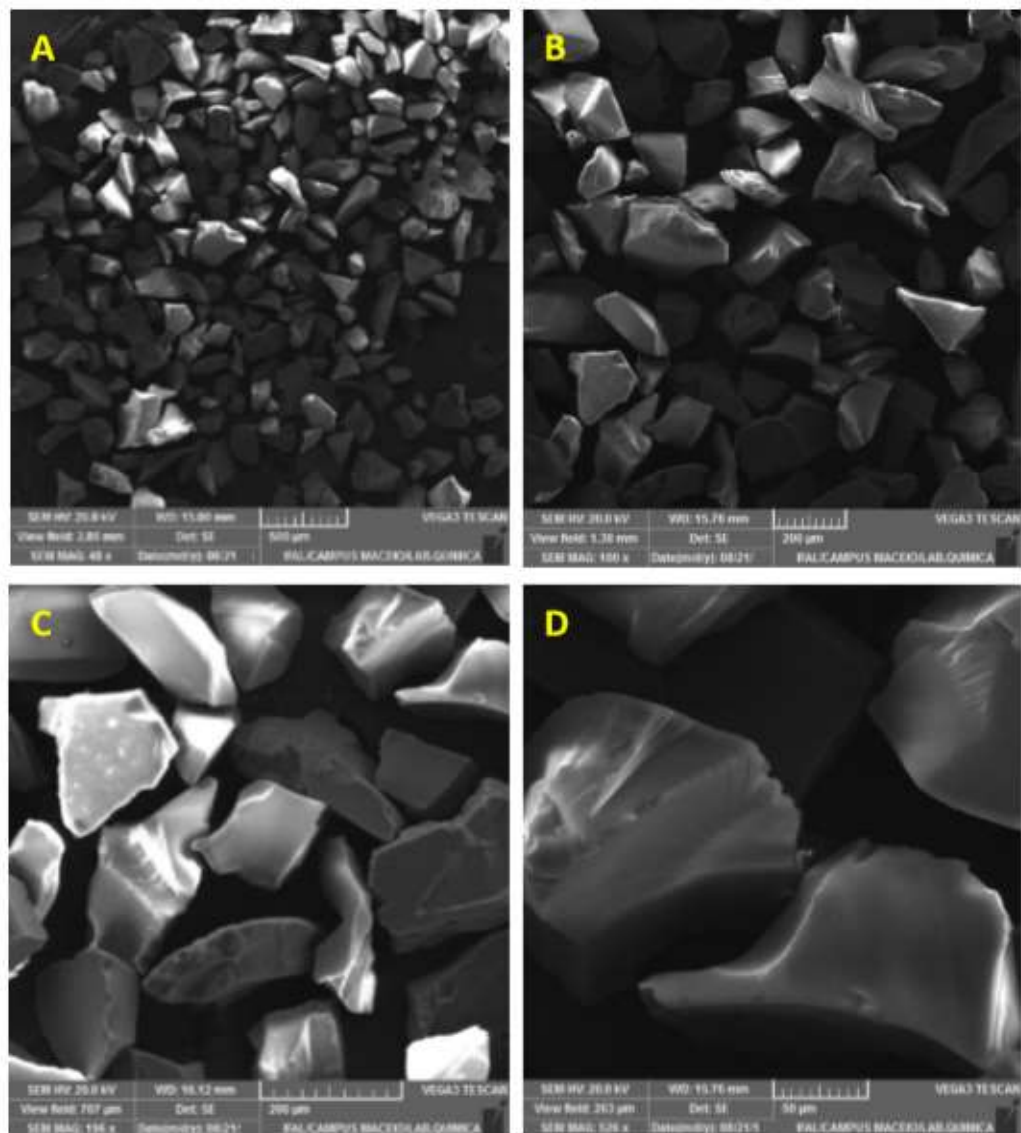
Sendo assim, uma redução no excesso de potencial de aproximadamente 100mV e um aumento da corrente de pico é alcançado no eletrodo de pasta de carbono. A corrente anódica de pico a 0,3V é observada por voltamétrico cíclica na presença de AA é mostrada com um valor satisfatório e abaixo dos relatados em outros trabalhos que se utilizam de sensores de pasta de carbono, (SIARA; *et al.*, 2015; HSUA, *et. al.* 2017; FANG, *et al.* 2015 ) portanto, o eletrodo de pasta de carbono baseado em 4-Nitroanilina absorvida em sílica gel é um bom sensor para detectar AA.

Após os processos de caracterização utilizando os métodos eletroquímicos, outras técnicas foram selecionadas para estudar os comportamentos morfológicos sensor desenvolvido.

### 4.3. Caracterização de materiais por MEV, TGA e FTIR

Para melhor análise da morfologia dos nanomateriais sintetizados, isto é, os filmes de SZ, SZ4NA e EPC / MWCNT / SZ4NA foram realizados estudos utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura, empregando diferentes ampliações. Na figura. 20 (a) mostra diferentes micrografias referentes a morfologia da SZ, onde é possível observar, a obtenção de partículas bem definidas, lisas e de tamanhos uniformes.

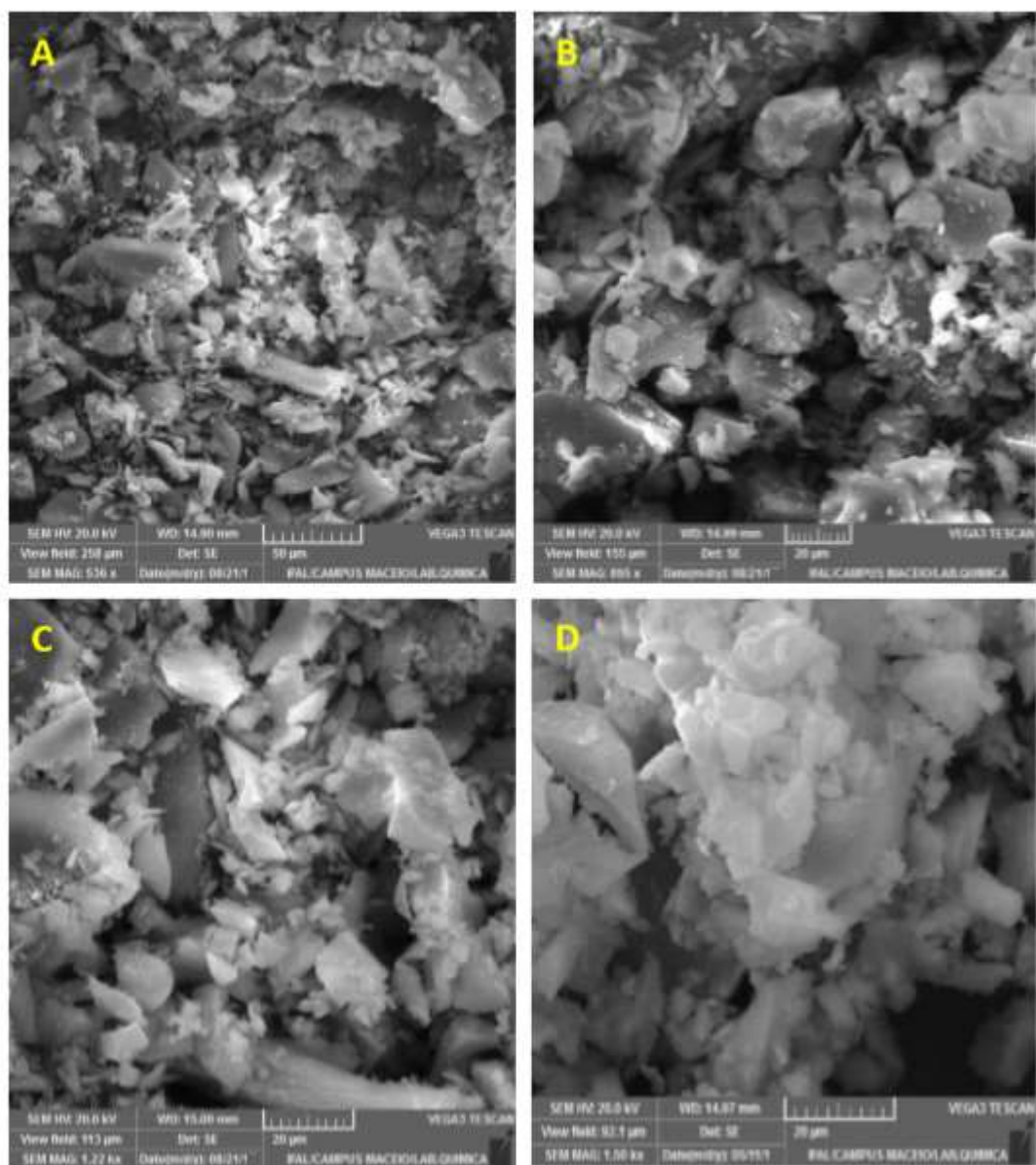
**Figura 20 – Micrografias para sílica em gel modificada com oxido de zircônio (SZ) com diferentes magnitudes. (A) 48x, (B) 100x, (C) 196x e (D) 526x.**



Fonte: Autor, 2019.

As imagens dispostas no MEV mostram que dentre as dimensões utilizadas (48x - 526x) (Figura 20 A – D) indica que o zircônio está uniformemente disperso ao longo de toda a matriz, e não há formação de ilhas ou aglomerados. No entanto, na figura 21 é notório que as partículas não são bem definidas e existem aglomerados de formação, indicando que 4NA alterou a morfologia em sílica. Para visualização mais detalhadas destes aglomerados foi necessária uma grande ampliação (1,50kX).

**Figura 21 – Micrografias para 4NA adsorvida em sílica gel modificada com oxido de zircônio (SZ4NA) com diferentes ampliações: (A) 536x (B)895x, (C)1.220x e (D) 1.500x.**



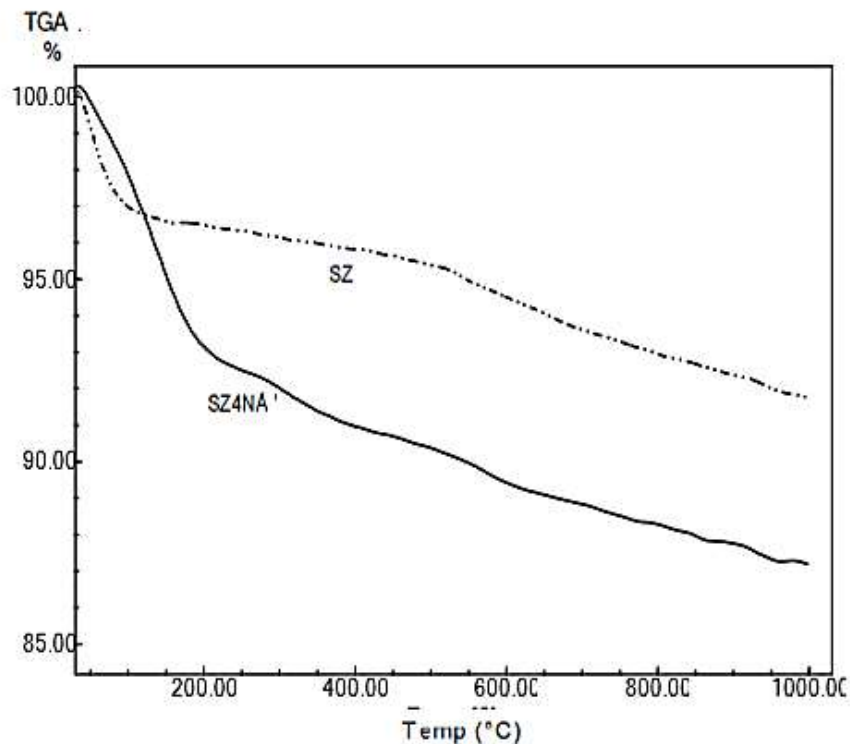
Fonte: Autor, 2019.

Ademais, para a análise da superfície do EPC / MWCNT / SZ4NA (Figura 21) foi utilizada uma ampliação de (192X) e tornou-se possível inferir que se há uma forma de aglomerado irregulares do material, indicando que o SZ4NA foi preparado com sucesso e revestido uniformemente na superfície dos MWCNTs.

#### 4.4. Análise termogravimétrica

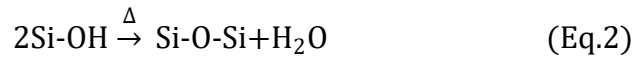
Para fins de análise de estabilidade, bem como verificação das etapas de modificação frente ao perfil de decomposição térmica das matrizes utilizadas foi-se utilizada a técnica termogravimétrica. Desta forma, a fig. 22 mostra as curvas termogravimétricas (TG) para o padrão de 4-NA, para a sílica modificada com zircônio (SZ) na ausência de 4-NA e para a mesma sílica na presença do mediador, SZ4NA desde a temperatura ambiente até 1000 ° C.

**Figura 22 – Medição termogravimétrica para sílica modificada com SZ e SZ4NA.**



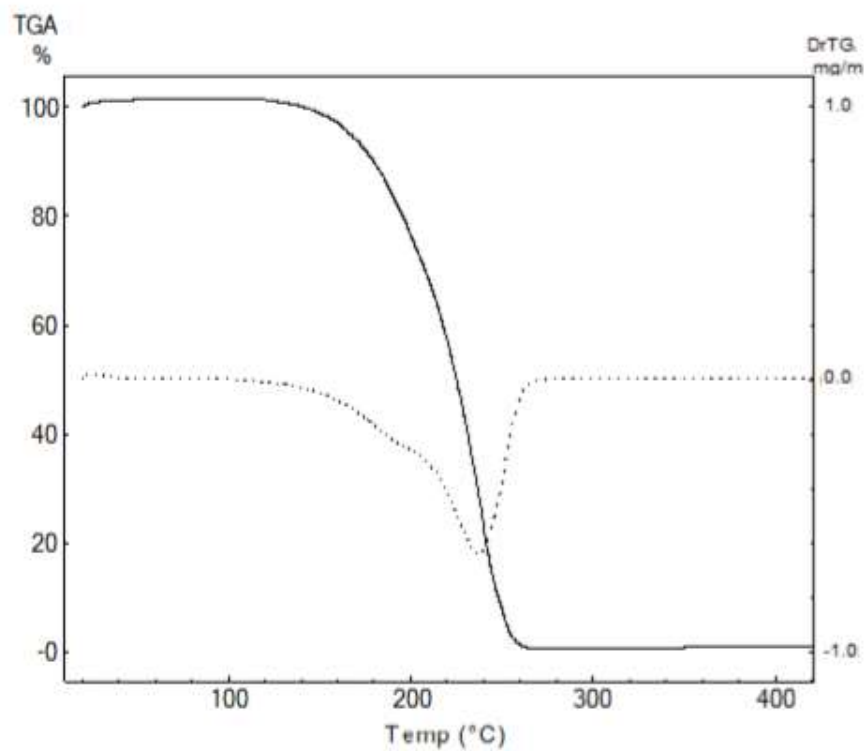
Fonte: Autor, 2019

Na fig.22 é observado uma perda de massa da SZ a 100 °C que pode ser proveniente da reação de condensação (Equação 2) na superfície das nanopartículas, resultando na evaporação das moléculas de água produzidas, embora a quantidade relativa da água gerada ser bem menor que a da espécie orgânica (JIANG et al., 2017).



Uma redução gradual na massa foi registrada para o SZ4NA em torno de 240°C, com uma redução de massa total de 9,70%. Isto pode ser atribuído à decomposição das espécies orgânicas ligadas às superfícies de SiO<sub>2</sub>. Os resíduos foram pós sólidos de SiO<sub>2</sub> produzidos a alta temperatura. Estes dados indicaram que o SZ4NA era composto por cerca de 80 a 85% de SiO<sub>2</sub>, 5 a 10% de espécies orgânicas como 4NA e bem como 1 a 5% de água. A inserção apresenta um resultado experimental típico de maior perda de massa para o padrão 4NA em torno de 200 ° C na curva TG. Pois, como é observado o padrão de degradação da molécula de 4-nitroanilina apresentou uma perda de massa no entorno de 240°C (Figura 23).

**Figura 23 – Medição termogravimétrica para o padrão de 4NA**



Fonte: Autor, 2019

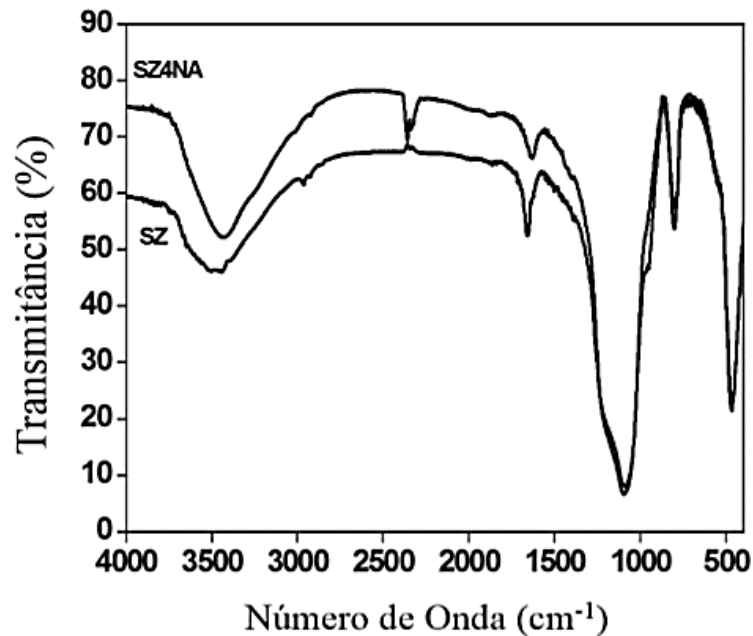
#### 4.5. Caracterização por FTIR

Para a caracterização do material obtido em relação as suas propriedades orgânicas, buscando elucidar os componentes presentes nas estruturas de SZ e SZ4NA, utilizou-se a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Forrier (FTIR).

Na Fig. 24. É notório uma banda larga gravada na região  $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ , o que poderia ser atribuído aos grupos OH na superfície das partículas de nano-SiO<sub>2</sub> que pode atribuído devido à água residual e alongamento de Si-OH (JIANG et al., 2017). Então, uma banda forte em torno de  $1095\text{ cm}^{-1}$  é indicativa de banda de alongamento assimétrica de Si-O-Si e faixa de alongamento simétrico de Si-O a  $805\text{ cm}^{-1}$ , bandas típicas de vibração de materiais de sílica (SHARMA E SHIVANI, 2014).

Assim, vale ressaltar que não há alterações significativas observadas nas estruturas SZ e SZ4NA, o que mostra que a molécula 4NA não é observada nos espectros de FTIR para a sílica modificada e não modificada.

Fig. 24. Espectros infravermelhos de SZ e SZ4NA.

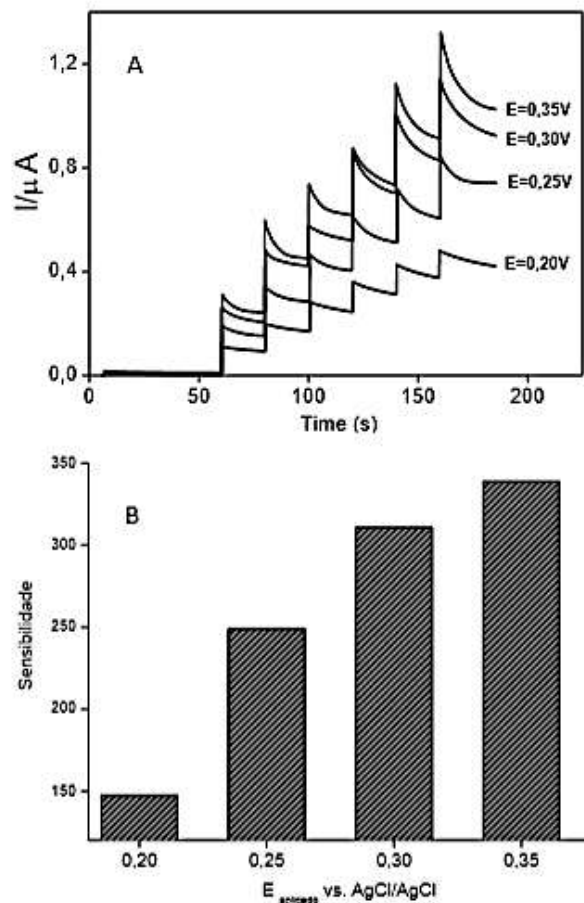


Fonte: Autor, 2019

#### 4.6. Medições cronoamperométricas

O método cronoamperométricas foi empregado para a quantificação do AA. Desta forma, as características do eletrodo de pasta de carbono modificado 4-nitroanilina ativada foram verificadas e estas experiências foram realizadas em tampão fosfato em pH 7,0. Variados potenciais foram utilizados (0,20 V, 0,25 V, 0,30 V, 0,35 V), para identificar qual seria o melhor potencial para ser aplicado no eletrodo (figura.25).

**Figura 25 – Medidas amperométrica para eletrooxidação de AA no eletrodo modificado com 4-nitroanilina ativada, obtida em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 na concentração: (A) (1) 0,50 a (6) 3,0 mmol L<sup>-1</sup> e (B) Sensibilidade vs. Potencial.**



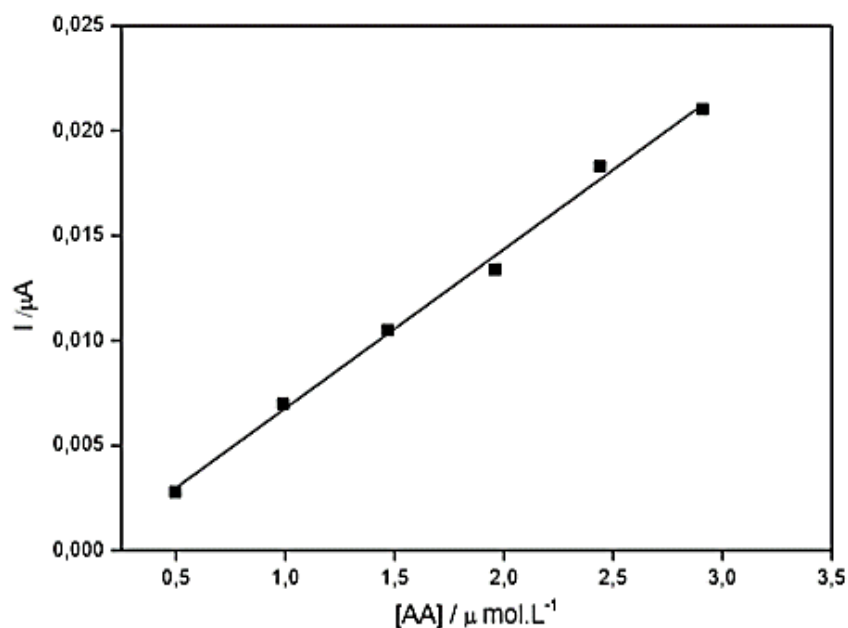
Fonte: Autor, 2019.

A resposta foi registrada a um potencial de 0,3 V versus Ag / AgCl, confirmando o potencial de investigação anterior com voltametria cíclica. Para medições amperométrica, o potencial aplicado tem uma influência importante sobre a resposta

do sensor porque o potencial aplicado contribui para a sensibilidade do sistema (MUHAMMAD et al., 2016)

A fim de obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, os amperogramas para oxidação de AA foram realizados em diferentes concentrações em  $0,1\text{mol L}^{-1}$  de tampão fosfato a pH 7,0, após otimização dos parâmetros experimentais. A curva de calibração foi construída plotando a corrente de pico de oxidação contra a concentração de AA adicionada (Figura. 26). O sensor proposto apresentou uma faixa de resposta linear de  $0,50$  a  $3,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ , com limite de detecção melhor que os relatados na literatura (Tabela 2).

**Figura 26 – Curva analítica para eletrodo modificado EPC/MWCNT/SZ4NA. Potencial aplicado:  $0,3\text{ V vs. Ag/AgCl}$  em tampão fosfato a pH 7,0.**



Essa boa sensibilidade de  $7,60\text{ mA Lmmol}^{-1}$  pode ser atribuída à eficiência da transferência de elétrons entre a 4-nitroanilina e o AA. Um limite de detecção de  $0,15\ \mu\text{mol L}^{-1}$  foi determinado usando uma relação  $3\ \sigma / \text{slope}$  e o limite de quantificação foi de  $0,48\ \mu\text{mol L}^{-1}$  usando  $10\sigma / \text{slope}$ , onde  $s$  é o desvio padrão do valor médio para 10 amperogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC.

**Tabela 2. Parâmetros analíticos para detecção de AA em vários eletrodos modificados.**

<b>Eletrodo Modificado</b>	<b>Método</b>	<b>Faixa Linear (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Limite de Detecção (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Ref.</b>
EPCV	DPV	2.64 -1500	0.8	ÇEVİK; AKPOLAT; ANIK, 2016
ECV	Amperometria	10 - 1800	0.5	ZHANG, et al. 2013
EPCV	Amperometria	1000 -14700	153	ĐORĐEVIĆ, <i>et al.</i> , 2012
ECV	DPV	30 – 500	45	MOTSHAKERI, et. al. 2018
EPC	Amperometria	3.26 – 40.51	0.53	MANJUNATHA, et al.2014
EPNCSDS	Voltamétrico	1 – 28	0.33	MUKDASAI, et al. 2015
EPCFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	DPV	0.6 – 1600	0.22	KINGSLEY; DESAI; SRIVASTAVA, 2015
EPC	Amperometria	0.5 - 3	0.15	SENSOR PROPOSTO

EPCV: eletrodo de pasta de carbono vítreo; ECV: eletrodo de carbono vítreo; EPC: eletrodo de pasta de carbono; EPNCSDS: eletrodo de pasta de nanotubo de carbono com SDS. EPCFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: eletrodo de pasta de carbono com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

#### **4.7. Aplicação para amostras**

Para avaliar o desempenho do sensor eletroquímico proposto, foi-se aplicado o sensor em três amostras de suco *in natura* para a detecção de AA. As três amostras de suco foram da variedade *Citrus limettioides*, o procedimento foi realizado em triplicata, utilizando o método de adição padrão.

Para a realização do método de adição padrão utilizou-se AA adquirido da Sigma Aldrich, preparando-se uma solução padrão de 0,01 M. Posteriormente, retirou-se 1,0 mL de suco de laranja em tampão fosfato a 0,1 mol L<sup>-1</sup> preparado antecipadamente, como amostra inicial. Em seguida, foi adicionada à célula eletroquímica uma alíquota de 50µL da amostra de suco de laranja diluído. Após a obtenção do sinal proveniente, foram adicionadas cinco alíquotas sucessivas de 50µL do padrão de AA 100µmol L<sup>-1</sup>, e, portanto, novos sinais analíticos foram obtidos e usados para a determinação de AA na amostra.

Os valores das análises eletroquímicas obtidas foram comparados com os obtidos seguindo o procedimento de ensaio preconizado pelo Instituto Adolf Lutz, usando o método de titulação iodométrica (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008) (Tabela 3).

**Tabela 3. Determinação do ácido ascórbico em duas amostras de suco de laranja in natura (n = 3).**

Amostra	Este método (mg kg <sup>-1</sup> )	Ensaio de titulometria (mg kg <sup>-1</sup> )
Amostra 1	131,0 ± 2,0	132,0 ± 2,1
Amostra 2	130,0 ± 2,1	132,7 ± 2,2
Amostra 3	131,0 ± 2,0	130,2 ± 2,0

P<0,0002

Ao comparar os dados obtidos provenientes dos dois métodos para a determinação de AA, é importante ressaltar que na titulação iodométrica, há-se um gasto e um descarte maior de AA, bem como a utilização de ácido sulfúrico, iodo e amido durante as análises, sempre que solicitada. Além que, há-se uma desvantagem referente ao tempo gasto neste processo. Os resultados obtidos para o ácido ascórbico pelo ensaio titulométrico comparados com o proposto, sugerem que o método desenvolvido neste trabalho é muito eficiente para determinação de AA em baixos níveis de concentração, demonstrando ser sensível, preciso e rápido.

## 5. CONCLUSÃO

Desta forma, o sensor proposto demonstrou que a 4-nitroanilina imobilizada em óxido de zircônio na superfície de sílica gel foi sintetizada de forma satisfatória e os resultados obtidos com o eletrodo de pasta de carbono modificado é uma possibilidade promissora para a determinação analítica de AA.

Visto a importância biológica que a vitamina C acarreta no funcionamento do organismo, como, sua ativa participação em processos metabólicos, celulares e bioquímicos, o desenvolvimento de sensores para a identificação dela é essencial. Além que, a presença de AA se encontra em diversos componentes desde alimentos, plantas a indústrias, sendo assim sua determinação de forma mais simples e rápida acarreta em maiores desenvolvimentos nesses setores.

Ademais, este trabalho demonstrou um sensor com bons parâmetros de funcionalidade, como: Limite de detecção ( $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), Limite de quantificação ( $0,48 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e sensibilidade ( $7,60 \text{ mA Lmmol}^{-1}$ ). Dentre estes parâmetros, o limite de detecção obtido foi de  $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ , porquanto isto demonstra que o eletrodo modificado EPC/MWCNT/SZ4NA, comparado a outros sensores para a detecção do AA se apresenta com valores bem mais baixos dos reportados na literatura, além que, devido a este baixo valor de limite de detecção e o seu efeito catalítico, o sensor adquire características notórias de sensibilidade e utilidade.

Portanto, este trabalho demonstra que o presente eletrodo modificado EPC/MWCNT/SZ4NA é sensível e útil para uma determinação mais rápida e satisfatória para AA em suco de laranja, devido ao seu baixo limite de detecção e efeito catalítico. Sendo assim, ele abre possibilidade para aplicações importantes e para posteriores estudos envolvendo amostras de alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. L. **Desenvolvimento de sensor potenciométrico baseado em eletrodos de carbono grafite para determinação de ácido cítrico em bebidas.** 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

ARAÚJO, K. R. **O Estudo da determinação de ácido ascórbico em solução utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com Nafion®.** 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

ARDAKANI-MAZLOUM. M., et al. Electrochemical determination of vitamin C in the presence of uric acid by a novel TiO<sub>2</sub> nanoparticles modified carbon paste electrode. **Chinese Chemical Letters.** v. 21, p.1471-1474, 2010.

ARRIGONI, O.; TULLIO, M. C.; Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1569, p.1-9, 2002.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira.** 5<sup>a</sup> ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

ÇEVIK, S., AKPOLAT, O., ANIK, Ü; Ascorbic Acid Detection with MnO<sub>2</sub>-Modified GCPE. **Food Anal. Methods.** v.9, p. 500–504, 2016.

CORDEIRO, W.L. **Desenvolvimento e aplicação de plataformas fundamentadas na tecnologia dos polímeros impressos molecularmente para detecção de 4-nitrofenol.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2017.

CHANG, S. K.; ISMAIL, A.; DAUD, Z. A.M. Ascorbic Acid: Properties, Determination and Uses. **Encyclopedia of Food and Health,** p. 275-284, 2016.

COSTA, Erivaldo de Oliveira Costa. **Desenvolvimento de um sensor nanoestruturado e o biossensor de dsDNA para determinação de substâncias de interesse biológico: nitrotirosina, ácido ascórbico e ácido úrico.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2016.

Czyzowska, A. Vitamin C. Reference Module in Food Science, 2016.

DAUD, Z. A. M; IASMAIL, A; SARMADI, B; Ascorbic Acid: Physiology and Health Effects. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 266-274, 2016.

DIMITRIJEVIC, T. et al. Amperometric ascorbic acid sensor based on doped ferrites nanoparticles modified glassy carbon paste electrode. **Analytical Biochemistry**. v. 504, p.20-26, 2016.

DORĐEVIĆ, J. S. et al. Glassy carbon and boron doped glassy carbon electrodes for voltammetric determination of linuron herbicide in the selected samples. **Central European Journal of Chemistry**. v. 10, p. 1271–1279, 2012.

DORST, B. V. et al. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p.1178-1194, 2010.

DU, J; CULLEN, J. J; BUETTNER, G. R; Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1826, p.443-457, 2012.

EIFF, J; MONAKHOVA, Y. B; DIEHL, B. W. K. Multicomponent Analysis of Fat- and Water-Soluble Vitamins and Auxiliary Substances in Multivitamin Preparations by qNMR. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, n.12, p. 3135–3143, 2015.

FANG, Y; JIANG, Q; DENG, M; TIAN, Y; WEN, Q; WANG, M; Preparation in-situ of carbon nanotubes/polyaniline modified electrode and application for ascorbic acid detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.755, p.39–46, 2015.

FERREIRA, Rafael de Queiroz. **Desenvolvimento e aplicação de um novo ensaio para a determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de compostos modelo e de matrizes complexas**. 2009. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

FONSECA, I; PROENÇA, L; CAPELO, S. A voltametria cíclica e de varrimento linear unidirecional: suas potencialidades na caracterização de processos de corrosão. **Corrosão e Proteção de Materiais**, v. 34, n. 1, 2015.

FREIRE, R.S; PESSOA, C.A; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**. v.26, p.381-389, 2003.

FUKUSHI, K. et al. Determination of ascorbic acid in vegetables by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 772, n.1-2, p. 313-320, 1997.

GONÇALVES, A. A. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2008.

GUY, J.O; WALKER, K.D. In: Silicon Carbide Biotechnology: A Biocompatible Semiconductor for Advanced Biomedical Devices and Applications, Second Edition. **Elsevier**, 2016.

HAMMERICH. O. et al. Organic Electrochemistry Revised and Expanded, 5th, ed. 2015.

HANSEN, S. N, et al. Maternal vitamin C deficiency does not reduce hippocampal volume and  $\beta$ -tubulin III intensity in pre-natal Guineapigs. **Nutrition Research**, v. 36, p. 692-702, 2016.

HSUA S; CHENGA, H; WUA, P; WENGA, C; SANTIAGO, K. S; YEH, J; Electrochemical Sensor Constructed Using a Carbon Paste Electrode Modified with Mesoporous Silica Encapsulating PANI Chains Decorated with GNPs for Detection of Ascorbic Acid. **Electrochimica Acta**, v.238, p.246–256, 2017.

HUEBRA, M. J. G. L; HERNANDEZ, P; BALLESTEROS, Y; HERNANDEZ, L. Determination of linuron in soil by stripping voltammetry with a carbon fiber microelectrode. **Talanta**. v.54, p. 1077–1085, 2001.

JIANG, L. et al. Fabrication, electrochemical and electrocatalytic properties of carbon nanotube@nano-SiO<sub>2</sub>BenV/phosphomolybdic acid polynary nanocomposite materials. **Applied Surface Science**. v.408, p.68–76, 2017.

JÚNIOR, W.P. **Eletrodos quimicamente modificados com nanotubos de carbono e nitroanilinas e sua aplicação na determinação de antioxidantes de importância**

**biológica**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2016.

KALL, M. A; Ascorbic acid: Properties and Determination. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**., p. 316-324, 2003.

KARLSSON, R; Iodometric determination of ascorbic acid by controlled potential coulometry. **Talanta**, v. 22, n.12, p. 989-993, 1975.

KILIAN, C. T. **Modern Control Technology: Components and Systems**, Capítulo 6, 2ª edição, Delmar Thomson Learning, 2000.

KINGSLEY, M. P; DESAI, P. B; SRIVASTAVA, A. K; Simultaneous electro-catalytic oxidative determination of ascorbic acid and folic acid using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified carbon paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.741, p.71–79, 2015.

LIANG, D. et al. Copolymerization of aniline with *m*-nitroaniline and removal of *m*-nitroaniline from aqueous solutions using a polyaniline-modified electrode: A comparative study. **Electrochimica Acta**. v.77, p. 302–308, 2012.

LIMA, P. R. **Eletrodo modificado a base de 4-nitroftalonnitrila: sensor amperométrico para quantificação de alguns antioxidantes de relevância biológica**. 2009. 157 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP.

LOURENÇÃO, B. C. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São Carlos, 2009.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre o mecanismo de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1318-1325, 2006.

MADRAKIAN, T; HAGHSHENAS, E; AFKHAMI, A; Simultaneous determination of tyrosine, acetaminophen and ascorbic acid using gold nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode by differential pulse voltammetric method.

**Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p.451-460, 2014.

MANJUNATHA, J. G. et. al. Sodium dodecyl sulfate modified carbon nanotubes paste electrode as a novel sensor for the simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid. **C. R. Chimie**. v.17, p.465–476, 2014.

MARCO, J. P. et al. Development of a simple, rapid and validated square wave voltametric method for determination of promethazine in raw material and pharmaceutical formulation using DNA modified multiwall carbon nanotube paste electrode. **Sens. Actuators**. v.177, p.251-259, 2016.

MAY, J. M. Ascorbic Acid Repletion: A Possible Therapy for Diabetic Macular Edema? **Free Radic Biol Med**, v.94, p. 47–54, 2016.

MAZUREK, A; JAMROZ, J. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. **Food Chemistry**, v.173, p. 543-550, 2015.

MOHAMMAD, H. A. Z. et al. Electrochemical behavior of para-nitroaniline at a new synthetic crown ether-silver nanoparticle modified carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 4, p.953-958, 2012.

MOSES, P. R.; WIER, P.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode, **Anal Chem.**, v.47, n.12, p. 1882, 1975.

MOTSHAKERI, M; TRAVAS, S. J; PHILLIPS, A. R. J; KILMARTIN, P. A; Rapid electroanalysis of uric acid and ascorbic acid using a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified sensor with application to milk. **Electrochimica Acta**. v.265, p.184-193. 2018.

MUHAMMAD, S. et al. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. **Trends in Analytical Chemistry**. v.76, p.15–29, 2016.

MUKDASAI, S. et al. Electrodeposition of palladium nanoparticles on porous graphitized carbon monolith modified carbon paste electrode for simultaneous enhanced determination of ascorbic acid and uric acid. **Sensors and Actuators**, v.218, p. 280 – 288, 2015.

NASCIMENTO, D. C. F. **Determinação de ácido ascórbico em amostra de alimentos utilizando um sensor amperométrico baseado em nanotubos de carbono e 4-nitroanilina adsorvida em sílica gel modificada com óxido de zircônio**. 2019. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

NASCIMENTO, M. C. M. **Desenvolvimento de sensor eletroquímico fundamentado em monocamadas auto organizadas de nanopartículas de ouro e 4-nitrotiofenol para detecção de ácido ascórbico**. 2019. 96 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019.

NUNES, L. O. **Síntese, caracterização e aplicação do óxido de grafite e grafeno em estudos eletroquímicos envolvendo ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina e epinefrina**. Dissertação (Mestrado) – UFVJM- Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas e Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

OZTEKIN, Y. et al. Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper (II). **Electrochimica Acta**, v.56, n.1, p. 387-395, 2010.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, n.4, p.516-537, 2013.

PATAI, S. (Ed). **The chemistry of amino, nitroso, nitro, and related groups**. John Wiley & Sons Inc, 1996.

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

PEREIRA, A.C. et al. Development of A Carbon Paste Electrode for Lactate Detection Based on Meldola's Blue Adsorbed on Silica Gel Modified with Niobium Oxide and Lactate Oxidase. **Electroanalysis**. v.23, p.1470, 2011.

PISOSCHI, A. M; POP, A; SERBAN, A. I; FAFANEATA, C; Electrochemical methods for ascorbic acid determination. **Electrochimica Acta**, v. 121, p.443-460, 2014.

PUTCHALA, M. C. et al. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. **Archives of Oral Biology**, Vol. 58, p.563-574, 2013.

QUINTINO, Maria do Socorro Maia. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (bia) para aplicações analíticas**. 2003. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

REVANASIDDAPPA, H. D.; VEENA, M. A. Sensitive Spectrophotometric Methods for the Determination of Ascorbic Acid. **E- Journal of chemistry**, v. 5, n. 1, p. 10-15, 2008.

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; KIANI, A. Carbon paste electrode spiked with ferrocene carboxylic acid and its application to the electrocatalytic determination of ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.515, p.45-51, 2001.

ROSATTO, S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24 p.77-86, 2001.

ROY et al. Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly (*N,N*-dimethylaniline) film-coated GC electrode. **Electroanalysis**. v. 561, p. 75-82, 2004.

SANTHIAGO, M. **Construção de plataformas nanoestruturadas para detecção de Cys e NADH**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

SASSYKOVA, L. R. et al. Studying the Mechanisms of Nitro Compounds Reduction (A-Review). **Oriental Journal of Chemistry**, v.35, p. 22-38,2019.

SHARMA, R. K.; SHIVANI, S; Silica nanosphere-supported palladium (II) furfural complex as a highly efficient and recyclable catalyst for oxidative amination of aldehydes. **Dalton Trans.**, v.43, p.1292–1304, 2014.

SHEKHOVTSOVA, T. N. et al. Enzymatic methods in food analysis: determination of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, v.573-574, p.125-132, 2006.

SIARA, L. R; LIMA, F; CARDOSO, C.A.L; ARRUDA, G. J. Electrochemically pretreated zeolite-modified carbon-paste electrodes for determination of linuron in an agricultural formulation and water. **Electrochimica Acta**. v.151, p. 609–618, 2015.

SILVA, B. B. S. et al. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v.62, n.7, p. 680-686, 2016.

SILVA, L. V. et al. Amperometric sensor based on carbon nanotubes and electropolymerized vanilic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, p. 1-5, 2016.

SILVA, L. V. et al. Phenol based redox mediators in electroanalysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.827, p. 230-252,2018.

SKOOG, D. A. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 9ª Edição norte-americana, Editora Cengage Learning, São Paulo, 2015.

SMIRNOFF, N; Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 122, p.116-129, 2018.

TASHKHOURIAN, J; NAMI-ANA, S. F; A sensitive electrochemical sensor for determination of gallic acid based on SiO<sub>2</sub> nanoparticle modified carbon paste electrode. **Materials Science and Engineerin**. v.52, p. 103–110, 2015.

THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Appl, Chem.** v. 71, n.12, p. 2333-2348, 1999.

VALPUESTA, V. BOTELLA, M. A; Biosynthesis of l-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. **Trends Plant**, v. 9, p.573, 2004.

YAMASHITA, M.; PESSÔA, C. A.; KUBOTA, L. T. Electrochemical behavior of pyrroloquinoline quinone immobilized on sílica gel modified with zirconium oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 99-105, 2003.

YEBRA, M. C; CESPÓN, R. M; MORENO, C. A; Automatic determination of ascorbic acid by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.448, n.1-2, p.157-164, 2001.

ZHANG, X; CAO, Y; YU S; YANG, F; XI. P; An electrochemical biosensor for ascorbic acid based on carbon-supported PdNi nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**. v.44, p. 183–190, 2013.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico químicos para análise de alimentos. 4ªed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHU, Q.G., SUJARI, A. N. A., GHANI, S. A. Nafion-MWCNT composite modified graphite paste for the analysis of quercetin in fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. **Food Technology and Biotechnology**. v.177, p. 103-110, 2013.