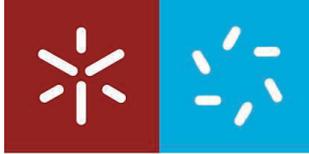


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Kateryna Kasyanenko **Otimização de um sensor de polifenóis**

Kateryna Kasyanenko

Otimização de um sensor de polifenóis



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Kateryna Kasyanenko

Otimização de um sensor de polifenóis

Tese de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização
e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Fátima Bento
e de
Professora Doutora Dulce Geraldo

Outubro de 2018

DECLARAÇÃO

Nome: Kateryna Kasyanenko

Endereço eletrónico: cateriina19@gmail.com

Telefone: 912454143

Número do Bilhete de Identidade: 31309023

Título dissertação: Otimização de um sensor de polifenóis

Orientadoras: Professora Doutora Fátima Bento
Professora Doutora Dulce Geraldo

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, 31 de outubro de 2018

Assinatura: _____



Agradecimentos

Quero agradecer especialmente à Professora Doutora Fátima Bento e à Professora Doutora Dulce Geraldo por me terem convidado a participar e realizar este projeto. Quero agradecer por todo o apoio, orientação, transmissão de conhecimentos, incentivo e motivação mesmo nos momentos mais complicados quando os resultados tomam o rumo indesejado. Obrigada pela confiança depositada em mim.

Queria agradecer à TecMinho pelo financiamento e acompanhamento deste projeto.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Pedro Rocha, Marta Ferreira e Luís Lema pelo vosso apoio, constante ânimo e bons momentos passados durante este tempo.

Por último, agradeço à minha família e ao meu namorado por terem apoiado sempre as minhas escolhas. Obrigada por terem ajudado a concretizar mais uma etapa na minha vida. Agradeço todo o vosso apoio, incentivo e contributo para a minha formação pessoal e profissional.

Resumo

Os polifenóis são compostos naturais abundantemente presentes no vinho, em maior quantidade no vinho tinto. Além das propriedades antioxidantes são responsáveis pelas propriedades organoléticas (sabor, aroma e cor) de um vinho e da sua capacidade de envelhecimento, estando intimamente relacionados com a sua qualidade.

Atualmente, os métodos óticos são utilizados para a quantificação dos polifenóis, no entanto, apresentam limitações significativas, uma vez que sofrem a interferência por parte de uma grande diversidade de outros compostos que não contribuem para as propriedades organoléticas do vinho, tais como o dióxido de enxofre, o ácido ascórbico e o ácido sórbico. Outras técnicas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Eletroforese Capilar (CE), que permitem a quantificação de polifenóis sem interferências significativas, raramente são utilizadas fora de um ambiente de investigação por serem muito demoradas e dispendiosas.

Neste trabalho, são apresentados os estudos relativos ao desenvolvimento de um sensor eletroquímico seletivo de polifenóis com desempenho semelhante à dos protótipos laboratoriais já testados no nosso laboratório. Os elétrodos *Glassy Carbon Electrode* (GCE) e *Screen Printing Carbon Electrode* (SPCE) foram modificados com CNT funcionalizados. As condições experimentais foram otimizadas relativamente à natureza dos grupos funcionais introduzidos nos CNT e massa de CNT em ensaios eletroquímicos com polifenóis padrão e amostras de vinhos, recorrendo a diferentes variáveis experimentais (volume de solução de amostra, tempo de contacto com a amostra, técnica de deteção).

Foram desenvolvidos e testados protótipos de sensores impressos por técnicas de *inkjet-printing*, *screen-printing* e *stencil-printing*, como também módulos de modificação de elétrodos comerciais (SPCE) em diferentes substratos (aglomerados de nanotubos de carbono, substrato celulósico e diferentes substratos poliméricos).

Apesar destes sensores desenvolvidos mostrarem-se adequados e com resultados promissores, o objetivo deste trabalho não foi alcançado por completo, pelo que a otimização dos mesmos requer a realização de ensaios adicionais.

Abstract

Polyphenols are natural compounds abundantly present in wine, in greater quantity in red wine. In addition to the antioxidant properties are responsible for the organoleptic properties (flavour, aroma and colour) of a wine and its aging ability, being closely related to its quality.

Currently, optical methods are used for the quantification of polyphenols, however they have significant limitations, since they are subject to interference by a large diversity of other compounds that do not contribute to the organoleptic properties of the wine, such as sulphur dioxide, ascorbic acid and sorbic acid. Other techniques such as High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Capillary Electrophoresis (EC), which allow the quantification of polyphenols without significant interference, are rarely used outside a research environment because they are very time consuming and expensive.

In this work the studies related to the development of a selective electrochemical sensor of polyphenols with similar performance to the laboratory prototypes already tested in our laboratory are presented. The *Glassy Carbon Electrode* (GCE) and *Screen Printing Carbon Electrode* (SPCE) electrodes were modified with functionalized CNTs. The experimental conditions were optimized with respect to the nature of the functional groups introduced in CNT and mass of CNT in electrochemical tests with standard polyphenols and wine samples, using different experimental variables (sample solution volume, contact time with sample, detection technique).

Sensor prototypes printed by inkjet-printing, screen-printing and stencil-printing techniques, as well as commercial electrode modulating modules (SPCE) on different substrates (carbon nanotube agglomerates, cellulosic substrate and different polymer substrates) were developed and tested.

Although these sensors have been shown to be adequate and with promising results, the objective of this work has not been fully achieved, so the optimization of these sensors requires additional tests.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Tabelas.....	XII
Lista de abreviaturas.....	XIV
1. Introdução	2
1.1 Antioxidantes	2
1.2 Vinho – definição, classificação e produção.....	4
1.3 Polifenóis.....	7
1.3.1 Compostos flavonoides	8
1.3.2 Compostos não flavonoides	10
1.4 Importância do vinho e polifenóis na saúde humana.....	11
1.5 Métodos de quantificação de compostos fenólicos	12
1.5.1 Métodos óticos.....	12
1.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	13
1.5.3 Métodos eletroquímicos	13
2. Parte experimental	18
2.1 Reagentes e soluções.....	18
2.2 Amostras de vinho.....	20
2.3 Suspensão 1,0 mg/mL de CNT	20
2.4 Ensaio eletroquímico	20
2.5 Tratamento estatístico e cálculo de incertezas.....	23
3. Resultados e discussão.....	26
Parte 1: Desenvolvimento do método	26
3.1 Ensaio utilizando um GCE.....	27
3.1.1 Caracterização do ácido gálico usando um GCE	27
3.1.2 Caracterização ácido gálico usando um CNT@GCE	30
3.1.3 Análise voltamétrica de amostras de vinho	33
3.2 Ensaio realizado com eletrodos impressos	38
3.2.1 Caracterização do ácido gálico com SPCE	38
3.2.2 Caracterização do ácido gálico com CNT@SPCE	40
3.2.3 Análise voltamétrica de amostras de vinho branco com SPCE e CNT@SPCE.....	44

Parte 2. Caracterização de protótipos funcionais de eletrodos impressos e de módulos de modificação de eletrodos impressos comerciais	47
3.3 Protótipos de sensores impressos por inkjet-printing e screen-printing	47
3.4 Módulo de modificação de eletrodos comerciais.....	53
3.4.1 Bucky-papers	54
3.4.2 Módulo de modificação à base de substrato celulósico	55
3.4.3 Módulos de modificação à base de substrato polimérico	56
4. Conclusão	63
5. Referências bibliográficas.....	66
6. Anexos.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Alguns exemplos de ROS radicalares e não radicalares ^[1]	3
Figura 2. Esquema de classificação de vinhos	4
Figura 3. Alguns tipos de vinho.....	5
Figura 4. Classes de compostos fenólicos presentes no vinho ^[17]	7
Figura 5. Estrutura base dos compostos flavonoides.....	8
Figura 6. Estruturas químicas dos compostos flavonoides	9
Figura 7. Estrutura molecular da catequina	9
Figura 8. Estrutura molecular de (A) ácido benzoico e (B) ácido cinâmico	10
Figura 9. Estrutura molecular de ácido gálico	10
Figura 10. Estrutura molecular de ácido tânico	11
Figura 11. Célula de três elétrodos: elétrodo de trabalho (centro), elétrodo de referência (direita) e elétrodo secundário (esquerda)	21
Figura 12. Célula de três elétrodos SPCE ligada à interface DropSens (DRP-DSC).....	21
Figura 13. Voltamogramas obtidos com um GCE em soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 por: (A) CV ($v = 100 \text{ mVs}^{-1}$) e (B) DPV ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_p = 100 \text{ mV}$).....	27
Figura 14. Curvas de calibração do AG obtidas com GCE da: (A) intensidade de corrente do primeiro pico obtido por CV; (B) intensidade de corrente do primeiro pico obtido por DPV e (C) área integrada sob o voltamograma obtido por DPV	29
Figura 15. Voltamogramas obtidos em soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 por: (A) CV e (B) DPV com o CNT@GCE	30

Figura 16. Curvas de calibração do AG obtidas com o CNT@GCE da: (A) intensidade de corrente de pico obtida por CV; (B) intensidade de corrente de pico obtida por DPV e (C) área integrada sob o voltamograma obtido por DPV	32
Figura 17. Voltamogramas de DPV de soluções de amostra de vinho branco diluídas obtidos com: (A) GCE (diluição 1:10) e (B) CNT@GCE (diluição 1:400).....	34
Figura 18. Voltamogramas de DPV obtidos numa solução de amostra de vinho tinto obtidos com: (A) GCE (diluição 1:25) e (B) CNT@GCE (diluição 1:2000).....	35
Figura 19. Comparação dos voltamogramas de uma solução de AG, com os de uma solução de amostra de vinho branco e os das amostras fortificadas, obtidas com: (A) GCE e (B) CNT@GCE e uma solução de amostra de vinho tinto e voltamogramas obtidos com: (C) GCE e (D) CNT@GCE.....	36
Figura 20. Voltamogramas obtidos a partir de soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 obtidos por: (A) CV e (B) DPV.....	38
Figura 21. Curvas de calibração do AG obtidas com o CNT@GCE da: (A) intensidade de corrente de pico obtida por CV; (B) intensidade de corrente de pico obtida por DPV e (C) área integrada sob o voltamograma obtido por DPV	39
Figura 22. Estudo das condições experimentais do processo de modificação do eletrodo de trabalho do SPCE e do método de aquisição da intensidade de corrente de pico: (A) Quantidade de CNT depositados; (B) Volume de solução/gota a colocar sobre o conjunto dos eletrodos; (C) Tempo de adsorção; (D) Potencial de adsorção e (E) Modo de aquisição do sinal para uma concentração de ácido gálico de 3 μ M em todas as experiências.....	41
Figura 23. Voltamogramas obtidos a partir de soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 obtidos por: (A) CV e (B) DPV.....	42
Figura 24. Curvas de calibração do AG relativas à intensidade de corrente de pico em função da concentração registados por: (A) CV e (B) DPV; e curva de calibração relativa à área integrada registada por DPV (C)	43
Figura 25. Voltamogramas de DPV de soluções de amostra de vinho branco diluídas obtidos com: (A) SPCE (diluição 1:10) e (B) CNT@SPCE (diluição 1:250).....	45

Figura 26. Comparação dos voltamogramas de uma solução de AG, com os de uma solução de amostra de vinho branco e os das amostras fortificadas, obtidos por: (A) SPCE e (B) CNT@SPCE.....	46
Figura 27. Fotografia dos protótipos produzidos por stencil-printing: (A) Protótipo A (B) Protótipo B.....	48
Figura 28. Fotografia dos protótipos A e B com imperfeições na impressão	49
Figura 29. Voltamogramas de DPV e fotografias dos protótipos de sensores sem defeitos aparentes (fotos à esquerda e resposta voltamétrica a azul) e dos protótipos de sensores funcionais (fotos à direita e resposta voltamétrica a laranja).....	50
Figura 30. Fotografia dos protótipos produzidos em contacto com a solução durante a medição eletroquímica: (A) Protótipo A e (B) Protótipo B.....	51
Figura 31. Voltamogramas de DPV ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_p = 100 \text{ mV}$, a potencial de adsorção 0 v durante 90 s) registados usando o protótipo A ($7,07 \text{ mm}^2$) modificado com CNT funcionalizados. (A) Soluções de ácido gálico de diferentes concentrações em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,2; (B) Comparação com a resposta de um CNT@SPCE comercial ($12,57 \text{ mm}^2$) numa solução 6 μM de ácido gálico em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,251	
Figura 32. Voltamogramas de DPV ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_p = 100 \text{ mV}$, a potencial de adsorção 0 v durante 90 s) registados usando o protótipo B ($7,07 \text{ mm}^2$) modificado com CNT funcionalizados. (A) Soluções de ácido gálico de diferentes concentrações em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,2; (B) Comparação com a resposta de um CNT@SPCE comercial ($12,57 \text{ mm}^2$) numa solução 6 μM de ácido gálico em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,252	
Figura 33. Curvas de calibração de ácido gálico para os três tipos de sensores, utilizando os resultados das medições de DPV apresentados na Figura 31 (A) e Figura 32 (A)	52
Figura 34. Esquema de aquisição de sinal analítico utilizando: (A) BP; a seta vermelha indica o BP flutuando em cima da gota de solução a analisar (B).....	54
Figura 35. (A) Ilustração do modo de utilização do módulo; (B) Resultados obtidos por DPV utilizando o módulo na presença e ausência de CNT, comparativamente às obtidas com o SPCE modificado com CNT. Soluções de ácido gálico, de 3 μM , adsorção 0 V durante 90 s.....	56
Figura 36. Exemplo de espumas utilizadas na produção do módulo	57

Figura 37. Extração por Soxhlet	57
Figura 38. Resposta voltamétrica por DPV dos módulos após 8 e 30 ciclos de extração por Soxhlet, mergulhados na solução de eletrólito	58
Figura 39. Fotografia de módulos de modificação produzidos por drop-casting	58
Figura 40. Fotografia do módulo de modificação produzido	59
Figura 41. (A) Módulo de modificação em contacto com a solução de amostra; (B) Montagem do módulo sobre o SPCE comercial	60
Figura 42. Comparação da resposta voltamétrica obtidos com um SPCE comercial, com um SPCE modificado com CNT (CNT@SPCE) e com o módulo numa solução de ácido gálico 6 μ M	60
Figura 43. Voltamogramas obtidos em soluções padrão de catequina em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 utilizando: (A) SPCE e (B) CNT@SPCE	74
Figura 44. Voltamogramas obtidos em soluções padrão de ácido tânico em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 utilizando: (A) SPCE e (B) CNT@SPCE	74

Índice de Tabelas

Tabela 1. Lista dos reagentes utilizados e respectivas características	18
Tabela 2. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção e sensibilidade para as curvas de calibração apresentadas na Figura 14	29
Tabela 3. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção e sensibilidade para as retas de calibração apresentadas na Figura 16	32
Tabela 4. Concentração de polifenóis totais a partir da reta de calibração e teor total obtido em soluções de amostras de vinho branco e tinto expresso em equivalente de concentração do ácido gálico para a técnica DPV utilizando o elétrodo de GCE e CNT@GCE	35
Tabela 5. Taxa de recuperação obtida nas amostras de vinho com GCE e CNT@GCE fortificadas com AG	37
Tabela 6. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção e sensibilidade para as retas de calibração obtidas com o SPCE apresentadas na Figura 21.....	40
Tabela 7. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção, sensibilidade e a amplificação do sinal para as retas de calibração apresentadas na Figura 24.....	43
Tabela 8. Concentração de polifenóis totais obtida pela reta de calibração da área integrada na solução de vinho branco e teor total obtido em amostras de vinho branco expresso em equivalente de concentração do ácido gálico com a técnica DPV utilizando o SPCE e CNT@SPCE	45
Tabela 9. Taxa de recuperação obtida para as soluções de amostras de vinho com SPCE e CNT@SPCE fortificadas com AG	47
Tabela 10. Comparação entre os valores de sensibilidade da resposta dos sensores produzidos utilizando soluções padrão de AG e medições efetuadas por DPV (Figura 31 (A) e Figura 32(A)).....	53
Tabela 11. Efeito do tempo de adsorção na intensidade de corrente medida nas espumas modificadas com 40 μ L de CNT e solução de ácido gálico 6 μ M.....	58

Tabela 12. Intensidade de corrente de pico para cada sensor apresentado numa solução de ácido gálico 6 μM 61

Tabela 13. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade dos módulos, numa solução de ácido gálico 6 μM , 0V e 90 s 61

Tabela 14. Estudo de influência de tempo de adsorção na otimização da resposta do sensor numa solução de ácido gálico 6 μM e 0V 61

Lista de abreviaturas

AG	Ácido Gálico
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de prata
AO	Antioxidante
BP	<i>Bucky-paper</i>
CNT	Nanotubos de Carbono (do inglês, Carbon Nanotubes)
CNT@GCE	Eléctrodo de Carbono Vítreo modificado com Nanotubos de Carbono (do inglês, <i>Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrode</i>)
CNT@SPCE	Eléctrodo Serigrafado de Carbono modificado com Nanotubos de Carbono (do inglês, <i>Carbon Nanotube Modified Screen Printed Carbon Electrode</i>)
CV	Voltametria Cíclica (do inglês, <i>Cyclic Voltammetry</i>)
DPV	Voltametria Diferencial por Impulso (do inglês, <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
E	Potencial
Ep	Potencial do pico
GCE	Eléctrodo de Carbono Vítreo (do inglês, <i>Glassy Carbon Electrode</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
I	Intensidade de corrente
Ip	Intensidade de corrente do pico
KCl	Cloreto de potássio
Ldd	Limite de deteção
MS	Espetrometria de Massa (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)
MWCNT	Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla (do inglês, <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>)
PET	Polietileno tereftalato
R	Coeficiente de correlação
RE	Eléctrodo de referência (do inglês, <i>Reference Electrode</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)

rpm	Rotações por minuto
SE	Eléctrodo Secundário (do inglês, <i>Secondary Electrode</i>)
SPCE	Eléctrodo Serigrafado de Carbono (do inglês, <i>Screen-Printed Carbon Electrode</i>)
SPE	Eléctrodo impresso na tela (do inglês, <i>Screen-Printed Electrode</i>)
WE	Eléctrodo de Trabalho (do inglês, <i>Work Electrode</i>)
ΔE_s	Incremento de potencial

Capítulo 1

1. Introdução

Hoje em dia, a ciência e tecnologia seguem um rumo de desenvolvimento de novas tecnologias e métodos que visam facilitar e melhorar a qualidade de vida das pessoas.

Um dos avanços importantes foram os sensores, visto que são portáteis, seletivos e mais importante são fáceis de operar por pessoas sem qualquer formação, o exemplo mais conhecido são as “tiras” usadas pelos portadores de diabetes para quantificar a glucose numa só gota de sangue.

O objetivo deste projeto foi desenvolver um dispositivo constituído por um sensor eletroquímico e um método analítico para a quantificação seletiva de polifenóis em vinhos, uma vez que os polifenóis fazem parte do grupo de antioxidantes que são constituintes importantes do vinho. O papel dos polifenóis num vinho está intimamente relacionado com a sua qualidade.

No presente capítulo será feita uma breve descrição acerca dos antioxidantes, a sua importância para saúde humana, com especial destaque dos polifenóis e seu papel nos vinhos e ainda os métodos usados na sua caracterização.

1.1 Antioxidantes

Os antioxidantes (AO) são compostos capazes de prevenir ou retardar a oxidação de outras substâncias, nomeadamente as espécies reativas de oxigénio (ROS). As ROS classificam-se, de acordo com a sua natureza, em dois grupos: as radicalares e as não-radicalares (Figura 1).^[1]

Os mais reativos são os radicais livres que apresentam na sua estrutura eletrões na camada de valência desemparelhados. Estes radicais podem reagir com outras moléculas, oxidando-as e provocando reações em cadeia, que quando ocorrem em células podem danificá-las ou causar a sua morte. Este processo designa-se como *stress oxidativo*.^[2]

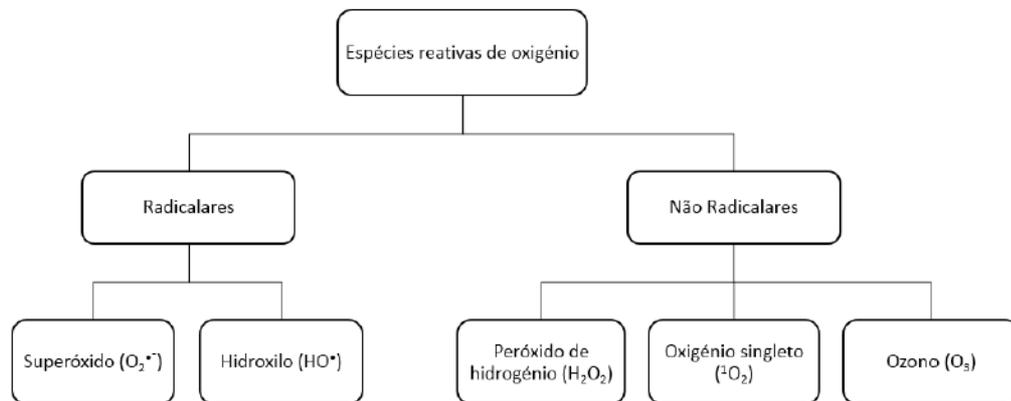
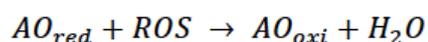


Figura 1. Alguns exemplos de ROS radicalares e não radicalares [1]

O *stress* oxidativo ocorre quando a velocidade de produção de radicais livres é superior à capacidade do organismo de os eliminar e reparar os danos produzidos como consequência, a acumulação destes danos é responsável pelas diversas doenças degenerativas. [2]

O papel principal dos AO é interromper as reações em cadeia eliminando os radicais livres intermediários e inibindo outras reações de oxidação. Os AO convertem os radicais livres em espécies menos reativas, ou redutoras, reduzindo estas espécies por transferência eletrónica, processo de oxidação-redução como representado na Equação 1. [3]



Equação 1

Como foi visto anteriormente, um dos maiores problemas do *stress* oxidativo é o desgaste e envelhecimento celular. O radical hidroxilo é a espécie mais reativa de todas as espécies reativas de oxigénio. Ele é capaz de reagir com a maioria dos constituintes celulares incluindo lípidos, proteínas e DNA. O radical menos reativo é o $O_2^{\bullet-}$. De acordo com os estudos, este radical é responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doença de Parkinson e Alzheimer, cancro e envelhecimento. [4]

Como os AO possuem a capacidade de converter ou neutralizar as espécies reativas de oxigénio, evitando assim a formação de lesões nas células, é aconselhável incluir os antioxidantes numa dieta equilibrada. Vários estudos demonstraram que, uma dieta equilibrada e atividade física regular são fundamentais na prevenção de doenças associadas à acumulação de radicais livres, além de influenciarem positivamente na qualidade de vida do ser humano. [5]

Os antioxidantes estão presentes em quase todos os legumes, hortícolas e frutas, especialmente em citrinos (laranjas, limão, tangerina, etc.). É de destacar os polifenóis, um grupo muito vasto e variado, pelo que estão disponíveis numa grande diversidade de alimentos, nomeadamente na soja e produtos derivados, cacau, vinho tinto, chás e infusões, principalmente chá verde e chá branco. O recurso aos suplementos alimentares à base de AO não é recomendado pela Fundação Portuguesa de Cardiologia.[6]

1.2 Vinho – definição, classificação e produção

O vinho é definido como uma bebida alcoólica que resulta do processo de fermentação, parcial ou completa, do sumo proveniente das uvas esmagadas ou maceradas, com recurso a leveduras.[7] O teor alcoólico do vinho depende da concentração de açúcares presentes no sumo das uvas.[8] Como foi referido anteriormente, o vinho, em especial destaque tinto, é rico em antioxidantes. Os vinhos são classificados de acordo com a origem, classe, cor e teor de açúcar. [9] Na Figura 2 está representado um esquema de classificação de vinhos mais comuns em Portugal.

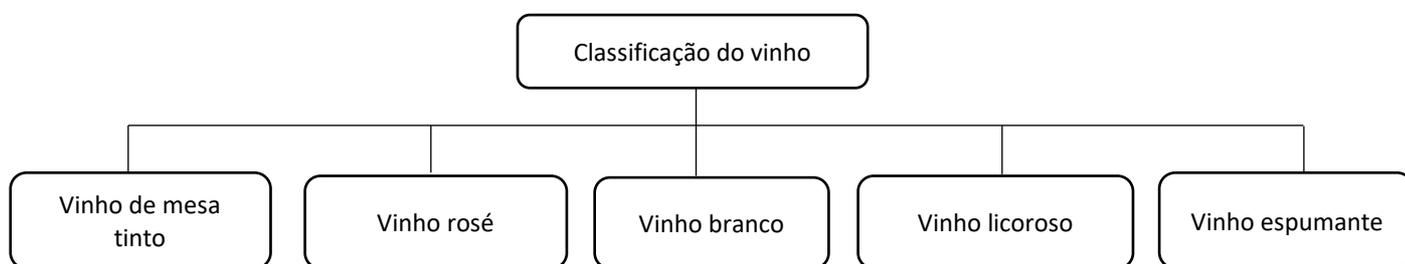


Figura 2. Esquema de classificação de vinhos

Estes tipos de vinho não só diferem na sua composição e tipo de produção como também possuem propriedades organoléticas distintas. Propriedades organoléticas são propriedades químicas e físicas, como a cor, o aroma, o sabor, a textura, etc., características de uma substância/material que podem ser percebidas pelos nossos sentidos. ^[10] Na Figura 3 estão ilustrados os tipos de vinho referidos anteriormente.



Figura 3. Alguns tipos de vinho

O processo de produção dos vinhos é complexo e um pouco demorado e pode variar de acordo com o tipo de vinho. Vários fatores são responsáveis pelas características e a qualidade final do vinho. Destes, destacam-se a casta de uva, os processos de vinificação utilizados, o tipo de solo, o clima e as leveduras utilizadas no processo de fermentação. ^[11]

O processo de vinificação é o processo mais importante na produção do vinho, apesar de ser maioritariamente mecanizado, não exclui a importância e alguns cuidados por parte dos vinicultores. O processo de produção dos vinhos vem desde a colheita até ao engarrafamento, a seguir são descritas as etapas do processo de vinificação.

- **Colheita**- processo em que as uvas são retiradas da videira. Nesta etapa, é importante colher as uvas no seu ponto ideal de amadurecimento para o tipo de vinho desejado. Uma vez que, realizando a colheita mais cedo, obter-se-ão vinhos mais ácidos, com menor teor alcoólico e um aroma mais fresco. Ao contrário do que acontece quando as uvas são colhidas mais maduras, o vinho terá uma acidez reduzida e um maior teor alcoólico. ^[12]

- **Esmagamento-** Nesta etapa é produzido o mosto. As uvas colhidas são colocadas numa máquina onde os engaços dos bagos são removidos e as películas das uvas são rompidas delicadamente. ^[13]
- **Fermentação alcoólica-** É a etapa mais culminante de todo o processo, pois afeta diversas propriedades químicas e sensoriais do vinho. Nesta etapa, o açúcar natural presente nas uvas é transformado em etanol sob ação das leveduras. Nesta fase, é importante controlar a temperatura, pois, para que a fermentação alcoólica ocorra é necessária uma temperatura superior a 12 °C. Também, diferentes tipos de vinhos são produzidos sob condições de temperaturas diferentes, por exemplo, o vinho tinto fermenta a uma temperatura entre 25 e 30 °C, a esta temperatura ocorre uma maior extração dos compostos fenólicos, fazendo com que os vinhos tintos adquiram mais cor, aroma e estabilidade oxidativa. Contrariamente, a temperatura de fermentação de vinhos brancos situa-se entre os 16 e 20 °C, havendo uma menor extração dos compostos fenólicos, no entanto, a baixas temperaturas, os compostos voláteis, responsáveis pelo aroma no vinho, são mais estáveis e, conseqüentemente há menor perda por evaporação. ^[14]
- **Processos de estabilidade-** Após a fermentação alcoólica, o mosto é filtrado para remover todos os resíduos sólidos e orgânicos depositados no fundo do tanque. Dependendo do tipo de vinho, este poderá sofrer diferentes tipos de estabilização. O processo mais comum é adição de dióxido de enxofre na forma de metabissulfito de sódio ou potássio, cuja principal função estabilizar as enzimas e leveduras, evitando uma segunda fermentação do vinho. ^[15]
- **Envelhecimento-** O envelhecimento dos vinhos ocorre normalmente em barris de madeira ou aço inoxidável. Quando é armazenado num barril de madeira, este adquire uma cor mais estável e o paladar mais complexo devido à transferência de substâncias aromáticas presentes na madeira. No entanto, os barris de madeira têm pequenos orifícios que permitem a entrada de oxigênio que vai reagir com compostos fenólicos presentes no vinho. Geralmente, a fim de ultrapassar a exposição do vinho ao oxigênio, este é armazenado nos tanques de aço inoxidável, e para melhorar as suas propriedades organoléticas, é colocado uns pedaços de madeira de carvalho dentro do tanque. ^[16]

- **Engarraamento-** depois de todos estes processos, o vinho é finalmente engarrafado e mantido em repouso até ser comercializado. A qualidade e o preço dos vinhos dependem desse tempo, pois, quanto maior for o tempo de repouso maior será o custo. No entanto, é de realçar que esse tempo depende da estabilidade oxidativa dos vinhos que está relacionada com o tipo e a concentração de compostos fenólicos.

1.3 Polifenóis

Como foi referido anteriormente, os polifenóis são compostos naturalmente presentes no vinho e estão intimamente ligados à qualidade do vinho devido à sua contribuição para as propriedades organoléticas e participação no processo de envelhecimento do mesmo. São substâncias caracterizadas por possuírem um ou mais grupo hidroxilo ligado a um anel aromático. Os polifenóis podem ser divididos em dois grupos principais: flavonoides e não flavonoides (Figura 4).

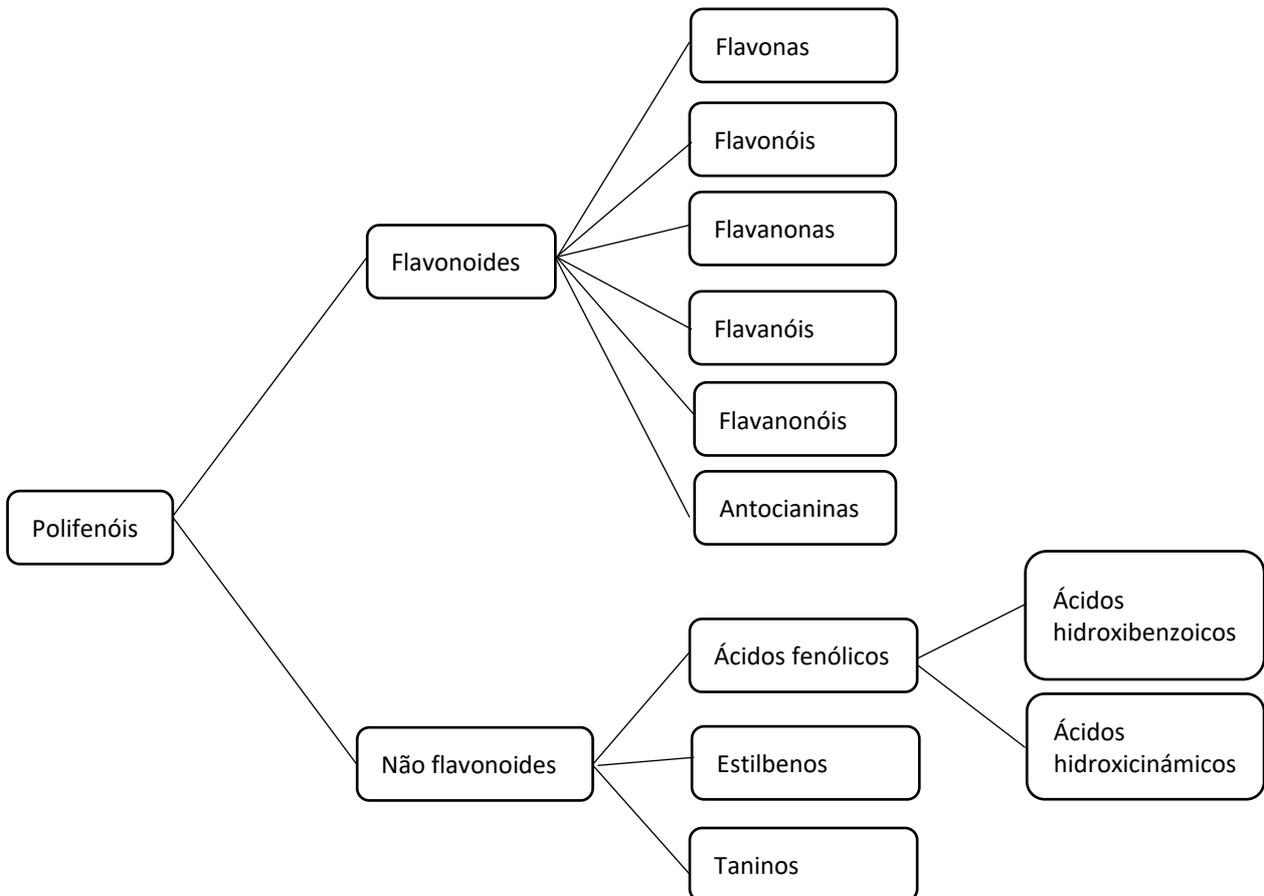


Figura 4. Classes de compostos fenólicos presentes no vinho ^[17]

1.3.1 Compostos flavonoides

O grupo dos flavonoides consiste num vasto grupo de compostos polifenólicos que estão presentes em maiores quantidades nas grainhas, nas polpas e nas películas das uvas. Os principais compostos flavonoides são as flavonas, os flavonóis, as flavanonas, os flavanóis, os flavanonóis e as antocianinas. Estes compostos partilham a mesma estrutura base, um esqueleto de quinze carbonos que forma dois anéis de benzeno (A e B) e um anel heterociclo de pireno (C) (Figura 5).^[18]

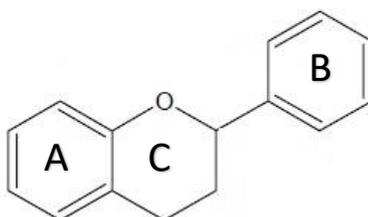


Figura 5. Estrutura base dos compostos flavonoides

As principais propriedades dos flavonoides são a atividade antiviral, anticancerígena e antibacteriana.^[19] Entre os grupos, os compostos flavonoides desempenham funções distintas. Por exemplo, as flavonas e as flavanonas possuem alto poder antioxidante, prevenindo assim a oxidação do vinho. Os flavanóis e os flavanonóis conservam as propriedades organoléticas do vinho, nomeadamente estabilizam a cor e o sabor do vinho. Os flavonóis protegem as antocianinas da condensação e da polimerização oxidativa, preservando a cor avermelhada dos vinhos. As antocianinas são responsáveis pela coloração vermelha e azul das cascas das uvas: elas reagem com os taninos originando estruturas que permitem a estabilidade da cor.^[20,21,22] A Figura 6 mostra as estruturas químicas dos compostos flavonoides referidos anteriormente.

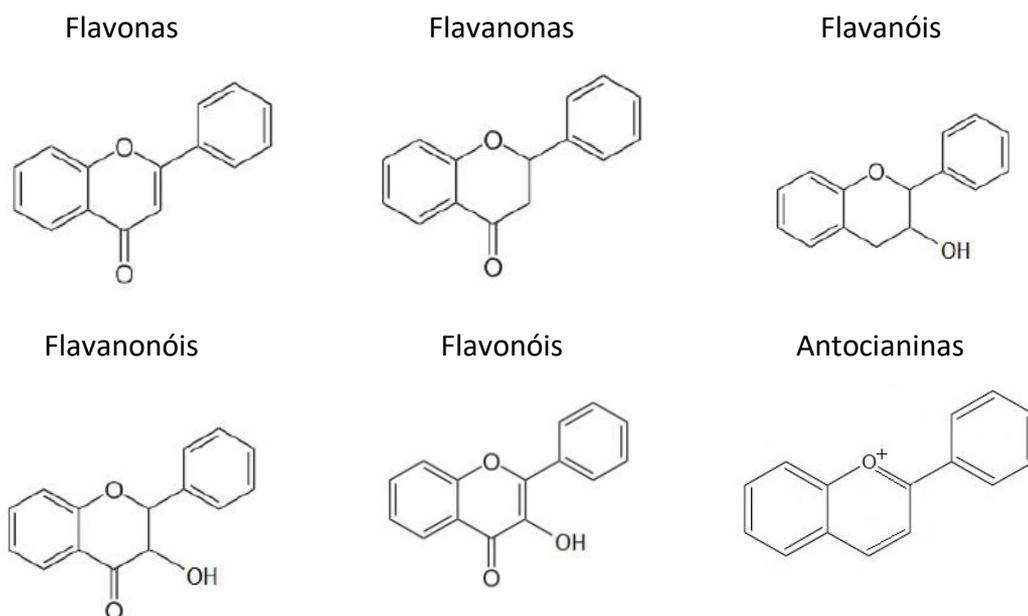


Figura 6. Estruturas químicas dos compostos flavonoides

Um dos polifenóis que pertence ao grupo dos flavanóis e que foi estudado neste trabalho é a catequina. A catequina é um fitonutriente com elevado poder antioxidante que se encontra abundantemente distribuído na natureza, principalmente no chá verde. A sua estrutura, ilustrada na Figura 7, compreende cinco grupos hidroxilo, dos quais quatro se encontram ligados diretamente a anéis aromáticos. Tem propriedades de prevenção das doenças degenerativas e cancerígenas provocadas pelos radicais livres.^[23]

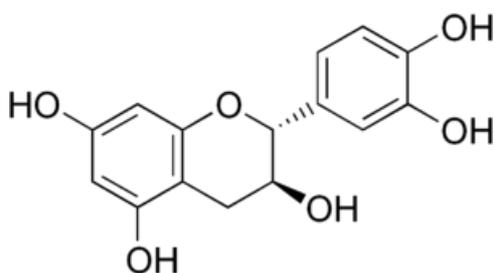


Figura 7. Estrutura molecular da catequina

1.3.2 Compostos não flavonoides

O grupo dos compostos não flavonoides é maioritariamente constituído por ácidos fenólicos, estilbenos e taninos. Estes compostos não possuem cor, no entanto melhoram e estabilizam a cor dos vinhos tintos através das reações intermoleculares, contribuem para o sabor e possuem elevada atividade biológica. [24]

O grupo dos ácidos fenólicos está dividido em dois subgrupos: os ácidos hidroxibenzoicos que são derivados do ácido benzoico (ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico, etc.) e os ácidos hidroxicinâmicos que são derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico, ácido p-coumarico, ácido ferúlico, etc.). Na Figura 8 estão indicadas as estruturas moleculares do ácido benzoico (A) e ácido cinâmico (B).

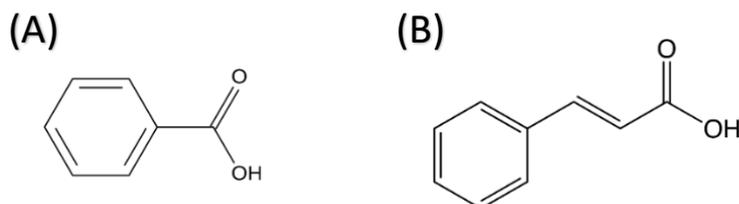


Figura 8. Estrutura molecular de (A) ácido benzoico e (B) ácido cinâmico

Estes compostos estão abundantemente presentes na pele e polpa das uvas e possuem elevado poder antioxidante. Os polifenóis estudados neste trabalho, e que pertencem a este grupo, são o ácido gálico e o ácido tânico.

Ácido gálico é um derivado do ácido benzoico com três grupos hidroxilo em posições *orto* (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) (Figura 9). É usado como um padrão para a quantificação de fenóis em diversos analitos pelo reagente de Folin-Ciocalteu, onde os resultados são dados em equivalentes de ácido gálico. [25] É abundantemente presente em chás e vinho tinto.

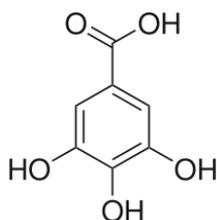


Figura 9. Estrutura molecular de ácido gálico

O ácido tânico é um polifenol que pertence à categoria dos ácidos fenólicos constituído por uma molécula de glicose central à qual estão ligadas cinco cadeias compostas por duas moléculas de ácido gálico ligadas por esterificação (Figura 10).

É encontrado em diversos alimentos tais como, chá verde, chocolate, uvas e vinho e possui propriedades antioxidantes, anticancerígenas e antibacterianas. [26]

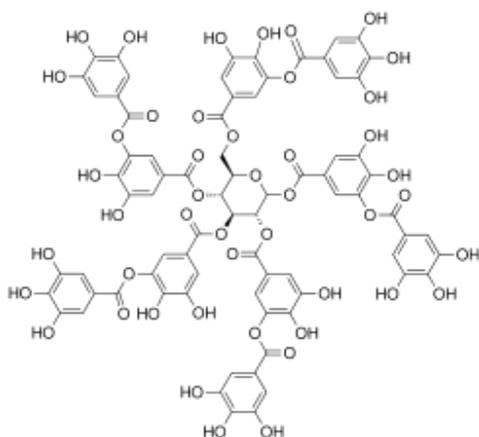


Figura 10. Estrutura molecular de ácido tânico

Deste modo, a informação relativa ao conteúdo de polifenóis é relevante para diferentes entidades no setor da indústria vinícola, nomeadamente vitivinizadores, enólogos e, de uma forma global, as empresas de produção de vinho. A quantificação exata dos polifenóis nas uvas beneficiará os vitivinizadores que podem valorizar as suas uvas quando estas apresentam concentrações superiores de polifenóis, o que se traduzirá em maiores lucros e em vinho de melhor qualidade.

1.4 Importância do vinho e polifenóis na saúde humana

O vinho faz parte da cultura e dieta humana desde a pré-história até aos dias de hoje, sendo um dos símbolos importantes para muitas civilizações. Como foi visto anteriormente, o vinho é um universo de compostos, cujos constituintes principais são os polifenóis. Vários estudos indicam que o consumo de vinho em quantidades adequadas, dose diária recomendada: um copo para as mulheres e dois copos para os homens, apresentam efeitos benéficos para a saúde humana. Alguns autores sugerem que o consumo moderado de vinho previne doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, demência e declínio cognitivo. A quantidade de antioxidantes depende de vinho para

vinho, deste modo o vinho tinto é considerado como tendo mais efeitos benéficos para a saúde quando comparado com outros vinhos, uma vez que possui maior teor de antioxidantes.^[27]

1.5 Métodos de quantificação de compostos fenólicos

Atualmente, os polifenóis são quantificados através de métodos óticos, nomeadamente pelo método de Folin-Ciocalteu, mas estes métodos apresentam importantes limitações por sofrerem interferência por parte de uma grande diversidade de outros compostos que não contribuem para as propriedades organoléticas de um vinho. Apesar de existirem técnicas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) que permite a quantificação de polifenóis sem interferências significativas, esta técnica é muito demorada e dispendiosa, raramente é utilizada fora de um ambiente de investigação. Os métodos eletroquímicos são cada vez mais estudados e desenvolvidos a fim de ultrapassar estas limitações e permitir uma quantificação simples, rápida e pouco dispendiosa.

1.5.1 Métodos óticos

Um dos métodos mais amplamente utilizado na quantificação do conteúdo total de polifenóis e espécies redutoras de um dado analito é o método de Folin-Ciocalteu.^[28] Este método é muito simples e consiste em oxidar os polifenóis utilizando um agente oxidante (permanganato de potássio) e o reagente de Folin-Ciocalteu (mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico), que reagem com os fenóis devido às suas propriedades redutoras.^[29] Quando ao reagente Folin-Ciocalteu é adicionado um antioxidante este perde a sua cor amarela dando origem a uma cor azul. A concentração dos compostos fenólicos é determinada a partir dos valores de absorvância, onde se verifica um aumento da absorvância com a concentração de antioxidante na amostra.^[30]

Outro método utilizado é a medição da absorvância a 280 nm, este método é ainda mais simples porque apenas requer a diluição das amostras. Este método baseia-

se na absorção da radiação ultravioleta das ligações duplas dos anéis de benzeno e átomos de oxigênio neste comprimento de onda.^[31]

Apesar da sua simplicidade, estes dois métodos apresentam baixa sensibilidade e seletividade, são sensíveis a qualquer substância redutora. Ou seja, no caso de vinho que tem uma matriz complexa, o ácido ascórbico, dióxido de enxofre, os açúcares redutores como a glucose e frutose são exemplos de interferentes, devido à presença destes interferentes, a concentração dos compostos fenólicos, obtida por métodos óticos, tende a ser superior à verdadeira.^[32]

1.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica mais indicada para a detecção e quantificação de compostos não voláteis, como é o caso de polifenóis. Esta técnica consiste numa fase móvel, uma coluna de fase reversa e um detetor de UV/Vis ou de díodos.^[33] Muitas vezes, um espectrómetro de massa (MS) é acoplado ao sistema de HPLC, para garantir não só a separação e quantificação, como também a identificação dos polifenóis, porque a MS é uma técnica de análise estrutural.

Apesar de ser uma técnica muito seletiva, o elevado custo dos equipamentos e por ser uma técnica muito demorada e exigir certo nível de conhecimento no seu manuseamento, passa a ser uma técnica pouco escolhida pelos produtores do vinho.^[33,34]

1.5.3 Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos estão cada vez mais estudados na detecção e quantificação dos polifenóis, nos vários alimentos bem como o vinho, nomeadamente técnicas voltamétricas, voltametria cíclica (CV) e voltametria diferencial por impulsos (DPV).^[35] No entanto, estes métodos ainda não são predominantemente utilizados devido às especificações necessárias para a montagem das células eletroquímicas e sua operação, que requerem operadores com alguma especialização na área.

Na técnica de CV, o potencial aplicado varia linearmente com o tempo. A corrente registada resulta de processos faradaicos (transferência de carga resultante

das reações de oxidação-redução) e de uma componente capacitiva (devida à separação de cargas na interface do eletrodo-solução).^[36,37] A técnica de CV não permite uma análise quantitativa precisa da capacidade antioxidante uma vez que não traduz o consumo da espécie oxidante. Deste modo, o CV tem sido principalmente utilizado em estudos preliminares e comparativos, através da análise do potencial de pico de oxidação e da forma do voltamograma.^[38]

Enquanto que, no DPV o potencial é aplicado na forma de impulsos. Os voltamogramas são obtidos a partir da diferença entre as correntes medidas no final do impulso e antes de aplicar o impulso em função do potencial, a corrente é medida imediatamente antes de cada mudança de potencial, diminuindo a corrente capacitiva, pelo que a medição da corrente do pico é mais fácil e mais exata.^[36,37]

Os parâmetros utilizados na caracterização dos polifenóis são a intensidade da corrente de pico e a área integrada sob o pico, que são proporcionais à concentração de espécies redutoras presentes na amostra. A partir da quantificação destes parâmetros é normalmente caracterizada a capacidade antioxidante.^[39] Na sua maioria, os polifenóis apresentam eletroatividade, capacidade em doar elétrons, a sua oxidação eletroquímica permite uma deteção seletiva e boa sensibilidade, mesmo em matrizes complexas.^[40]

Os primeiros estudos efetuados nesta área, foram realizados utilizando um eletrodo de carbono vítreo (GCE). Os trabalhos reportados com este eletrodo indicam que este tem boa capacidade de deteção e quantificação de compostos fenólicos, mas sofre interferências por parte das oxidações do ácido ascórbico e do dióxido de enxofre, afetando a seletividade do GCE. Muitas vezes a superfície do GCE pode sofrer passivação originada pela formação de um filme resultante da oxidação de alguns polifenóis, que provoca diminuição da intensidade de corrente associada à oxidação dos restantes polifenóis.^[41,42]

Outros eletrodos frequentemente utilizados são sensores obtidos por técnicas serigráficas (SPCE). Estes sensores são mais vantajosos em relação ao GCE, pois permitem ultrapassar dificuldades associadas à limpeza/polimento da superfície do GCE bem como uso de sistema de três eletrodos separados (ligação demorada e pouco prática). Os três eletrodos (trabalho, secundário e referência) são impressos no mesmo dispositivo, pequeno, descartável e fácil de utilizar.^[43] Apesar dessas vantagens face ao

GCE, quando utilizados na análise de vinhos, têm as mesmas limitações relacionadas com a falta de reprodutibilidade e seletividade. A falta de reprodutibilidade está relacionada com a camada de passivação que se forma durante a oxidação das espécies e a baixa seletividade tem a ver com a presença de interferentes que se oxidam no mesmo intervalo de potencial que os polifenóis.

A fim de ultrapassar os problemas anteriormente referidos, a modificação da superfície dos elétrodos de carbono tem tido grande interesse por parte da comunidade científica. Estes elétrodos podem ser facilmente modificados com vários substratos, por exemplo com óxidos de grafeno, nanotubos de carbono ou enzimas. Deste modo, conseguimos obter sensores muito versáteis, com um leque de aplicações bastante vasto.^[44, 45]

Como exemplo, a enzima oxidase pode ser utilizada na modificação dos elétrodos. Ela é capaz de oxidar os compostos fenólicos com a redução do oxigénio a água. Ou então, uma peroxidase que reduz o peróxido de hidrogénio a água enquanto os compostos fenólicos sofrem oxidação.^[34, 46]

Alguns dos exemplos que se encontram descritos na literatura para análise de vinhos são o GCE modificado com uma camada de nanopartículas de ouro contendo a enzima tirosinase e o SPE modificado com as duas enzimas oxidase lacase e peroxidase, imobilizadas por reticulação química. Através destas modificações foram desenvolvidos novos biossensores capazes de quantificar os compostos fenólicos com elevada seletividade.^[46,47,48] Por outro lado, estes biossensores apresentam reduzida estabilidade do material biológico, que limita as condições de utilização e de armazenamento. Para além do reduzido tempo de vida destes dispositivos, os custos de produção são normalmente elevados.

Deste modo, a modificação dos elétrodos (GCE e SPCE) com os nanotubos de carbono têm despertado um enorme interesse. O objetivo desta modificação consiste no aumento da área de contacto do elétrodo com o analito, melhorando a seletividade e sensibilidade do método. A seletividade do método é baseada na interação seletiva destes compostos com a superfície do elétrodo modificado com CNT através da adsorção seletiva dos polifenóis na superfície do mesmo.^[49]

As principais vantagens dos elétrodos modificados face aos não modificados são a facilidade de modificação e manuseamento, aumento da seletividade e sensibilidade do método, a um custo relativamente reduzido. Ambos os aspetos científicos e industriais irão acelerar a produção desses elétrodos para análises do mundo real. Os próximos anos não serão apenas prova de princípio em revistas científicas, mas serão uma tecnologia prática, tornando o futuro cheio de possibilidades. ^[50,51]

Deste modo, a possibilidade de desenvolver um sensor e um método analítico seletivos para a quantificação de polifenóis resultará em vantagens diversas, associadas à obtenção de um dos parâmetros químicos mais relevantes em termos da composição de um vinho, com elevada rapidez e baixo custo.

Capítulo 2

2. Parte experimental

2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água ultrapura utilizada foi obtida por purificação de água num sistema *Milli-Q Simplicity 185 (Millipore)*. Na Tabela 1, estão apresentadas algumas características importantes relativas aos reagentes utilizados.

Tabela 1. Lista dos reagentes utilizados e respectivas características

Reagente	Fórmula química	Marca	Massa molar (g/mol)
Hidrogenofosfato de potássio	K_2HPO_4	<i>Acros Organics</i>	174,20
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	<i>Fisher Scientific</i>	136,09
Ácido tartárico	$C_4H_6O_6$	<i>Merck</i>	150,09
Hidróxido de sódio	$NaOH$	<i>Eka Chemicals</i>	39,997
Catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	<i>Sigma-Aldrich</i>	290,26
Ácido tânico	$C_{76}H_{52}O_{46}$	<i>Riedel-deHaen</i>	1701,19
Ácido gálico	$C_7H_6O_5$	<i>Sigma-Aldrich</i>	170,12

A preparação das soluções padrão, soluções tampão e soluções das amostras encontra-se descrito em seguida.

O pH das soluções foi medido e/ou ajustado recorrendo a um medidor de pH da *CyberScan 510 pH*, com um eletrodo de vidro combinado da *Hanna Instruments*, cuja calibração foi efetuada todas as vezes que foi utilizado, usando as soluções tampão de pH 4,01 e pH 7,01.

Solução tampão fosfato 0,15 M, pH 7,40

A solução tampão de fosfato 0,15 M pH 7,40 foi preparada por pesagem cerca de 5,81 g de KH_2PO_4 e de 8,43 g de K_2HPO_4 em água ultrapura para um volume total de 1 L. Esta solução foi utilizada na limpeza eletroquímica dos sensores como também na sua ativação. A ativação do sensor é realizada antes da sua primeira utilização, são colocados 75 μ L da solução tampão e é feito um ciclo de voltametria cíclica no intervalo de potencial entre 0 a 1 V e a velocidade de varrimento de potencial de 100 $mV s^{-1}$.

Solução de ácido tartárico 0,032 M, pH 3,20

A solução de ácido tartárico 0,032 M foi preparada dissolvendo cerca de 4,955 g do composto em água ultrapura num balão volumétrico de 1 L. O pH desta solução foi ajustado para 3,20 utilizando uma solução de NaOH 1,0 M. Esta solução foi utilizada para diluir as soluções *stock* de ácido gálico, catequina e ácido tânico e diluir as amostras de vinho, funcionando igualmente como branco nas análises por técnicas voltamétricas.

Solução *stock* de ácido gálico 0,0030 M

A solução mãe de ácido gálico foi preparada por pesagem de $0,0051 \pm 0,0001$ g em etanol absoluto (*Fischer Scientific*) num balão volumétrico de $10,00 \pm 0,04$ mL. Esta solução foi sempre armazenada no congelador e mantida no gelo para minimizar a sua degradação. A partir desta solução foram preparadas todas as soluções padrão utilizadas neste estudo, recorrendo ao uso de micropipetas.

Solução *stock* de catequina 0,0030 M

A solução mãe de catequina foi preparada por pesagem de $0,0087 \pm 0,0001$ g em etanol absoluto (*Fischer Scientific*) num balão volumétrico de $10,00 \pm 0,04$ mL. Esta solução foi sempre armazenada no congelador e mantida no gelo para minimizar a sua degradação. A partir desta solução foram preparadas todas as soluções padrão utilizadas neste estudo, recorrendo ao uso de micropipetas.

Solução *stock* de ácido tânico 0,0030 M

A solução mãe de ácido tânico foi preparada por pesagem de $0,0510 \pm 0,0001$ g em etanol absoluto (*Fischer Scientific*) num balão volumétrico de $10,00 \pm 0,04$ mL. Esta solução foi sempre armazenada no congelador e mantida no gelo para minimizar a sua degradação. A partir desta solução foram preparadas todas as soluções padrão utilizadas neste estudo, recorrendo ao uso de micropipetas.

2.2 Amostras de vinho

Neste trabalho foram utilizados como amostras vinho branco Borba Sovibor Alentejo DOC 2008 e vinho tinto Adega de Pegões Vinho Regional Península de Setúbal 2013. As soluções de amostra foram preparadas por diluição de porções de amostra, cerca de 25 mL, que foram transferidas da garrafa comercial para um erlenmeyer com tampa do tipo *Suba-Seal* sob atmosfera inerte (árgon) e armazenadas no frigorífico. As amostras de vinho branco foram diluídas de 1:10, 1:250 e 1:400, e as amostras de vinho tinto foram diluídas de 1:25 e 1:2000, com ácido tartárico pH 3,20 num volume total de 10 mL.

2.3 Suspensão 1,0 mg/mL de CNT

As suspensões de nanotubos de carbono (CNT) 1,0 mg/mL foram preparadas por mistura cerca de 10 mg de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT, *Nanocyl* – *NC7000TM*) previamente funcionalizados com 10 mL de uma solução metanol: água (1:1). O metanol (*Fischer Scientific*) utilizado apresentava 99,8 % de grau de pureza. A mistura foi submetida a um processador ultrassónico *Hielscher UP100H* com ponta *M52 UP50/100H* de amplitude 60 % e 0,95 de ciclo para obter uma suspensão de CNT homogénea.

2.4 Ensaios eletroquímicos

Os ensaios voltamétricos foram realizados recorrendo a dois tipos de células eletroquímicas, de acordo com a natureza do eléctrodo de trabalho utilizado.

Com o eléctrodo de carbono vítreo (GCE) (*CHI104, CH Instruments, Inc*) com 3 mm de diâmetro, utilizou-se um eléctrodo de referência tipo Ag/AgCl, 3 M KCl (*CH Instruments, Inc*) e um fio de platina como eléctrodo secundário. Estes 3 eléctrodos ficam imersos num copo com cerca de 10 mL (Figura 11).

A superfície do eléctrodo de trabalho foi polida antes de cada utilização e /ou da sua modificação numa camurça de polimento onde foi colocada uma pequena quantidade de suspensão de diamante policristalino da *Buhler* (*MetaDi Supreme, polycrystalline, 3 µm, No. 406631F*), aplicando uma pequena pressão e movimentos circulares em forma

de “8” durante 15 vezes. Para remover os resíduos de alumina, o eletrodo foi enxaguado com água ultrapura e seco com papel absorvente.



Figura 11. Célula de três eletrodos: eletrodo de trabalho (centro), eletrodo de referência (direita) e eletrodo secundário (esquerda)

Foram também realizados ensaios com células eletroquímicas integradas com eletrodos impressos, tal como comercializado pela *DropSens* (ref. 110). Este tipo de dispositivo (SPCE), ilustrado na Figura 12, também dispõe de ligações elétricas impressas sobre um substrato cerâmico. Os eletrodos de trabalho (diâmetro 4 mm) e auxiliar são de carbono e o eletrodo de pseudo-referência é de prata. Os eletrodos foram ligados a uma interface (*DRP-DSC*, *DropSens*) e os contactos entre os 3 eletrodos foi efetuado colocando uma gota da solução a analisar (75 μ L) sobre estes.



Figura 12. Célula de três eletrodos SPCE ligada à interface *DropSens* (*DRP-DSC*)

O controlo, a aquisição e posterior tratamento de resultados foi efetuado utilizando um potencióstato *AUTOLAB PGSTAT30* controlado pelo *software* “General Purpose Electrochemical System” da *Eco Chemie*, versão 4,9.

A modificação dos elétrodos de trabalho foi realizada por *drop-casting*. A superfície do eletrodo de trabalho do GCE foi modificada por deposição de 5 μL de suspensão de CNT utilizando uma micropipeta adequada. A superfície com a suspensão foi colocada a secar sob uma lâmpada de incandescência. O eletrodo de trabalho do SPCE foi modificado com 7,5 μL de suspensão de CNT pelo mesmo processo. Os elétrodos de GCE e do SPCE modificados com CNT são denominados CNT@GCE e CNT@SPCE, respetivamente.

Os ensaios voltamétricos foram realizados recorrendo a duas técnicas diferentes, voltametria cíclica (CV) e voltametria diferencial de impulsos (DPV). Na voltametria cíclica, os voltamogramas foram registados no intervalo de potencial entre 0 a 1 V, e a velocidade de varrimento de potencial de 100 mV s^{-1} . Nos ensaios de voltametria cíclica o varrimento anódico corresponde ao varrimento direto.

Na voltametria diferencial de impulso, o intervalo de potencial, normalmente, foi definido entre 0 e 0,8 V, amplitude de modulação de 100 mV, degrau de impulso de 4,95 mV e velocidade de varrimento de 9,9 mV s^{-1} . Nos ensaios em que a deteção foi antecedida pela adsorção das espécies à superfície do eletrodo de trabalho, as variáveis experimentais relevantes, tais como potencial aplicado, volume e concentração das soluções foram controladas.

Foi aplicado o potencial constante de 0 V durante 90 segundos. Na célula convencional ($V=10\text{ mL}$) a agitação mecânica foi controlada (velocidade constante a 400 rpm), utilizando uma barra magnética e uma placa de agitação (*P SELECTA, AGIMATIC-E*). No caso de células miniaturizadas, nomeadamente com SPCE, CNT@SPCE e com sensores produzidos por técnicas de impressão no âmbito do projeto PhenolicQuant, desenvolvido em parceria com Instituto de Polímeros e Compósitos da Universidade do Minho e TecMinho, não foi realizada agitação e o volume de solução e de amostras foi de 50 μL .

2.5 Tratamento estatístico e cálculo de incertezas

A concentração, C , de uma solução preparada por dissolução da sua massa para um determinado volume, V , é dada por:

$$C = \frac{m}{MV} M$$

Onde m é a massa e M é a massa molar do composto.

Todos os valores médios apresentados neste trabalho correspondem a duas réplicas.

A reta de calibração é apresentada de acordo com a seguinte expressão:

$$y = (b \pm tS_b)x + (a \pm tS_a)$$

Onde b é o declive e a ordenada na origem. As incertezas associadas ao declive, S_b , e à ordenada na origem, S_a , são determinadas de acordo com as seguintes equações:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

em que $S_{y/x}$ representa o desvio padrão dos pontos experimentais à reta

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Os intervalos de confiança representam o valor corrigido para o t de Student que corresponde à probabilidade de 95 % e um número de graus de liberdade N para $n-2$.

A rejeição de valores em retas de calibração foi baseada nos resultados estatísticos, os que contribuíam para piores dados estatísticos (coeficiente de correlação, limite de detecção, declive, etc.) eram rejeitados.

O cálculo do erro associado à concentração é obtido da seguinte forma:

$$x_0 \pm t S_{x_0}$$

Onde S_{x_0} é calculado a partir da seguinte equação:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \left\{ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Os limites de detecção (Ldd) foram calculados a partir dos parâmetros estatísticos da reta, recorrendo à seguinte equação:

$$Ldd = 3 \frac{s_{y/x}}{b}$$

Capítulo 3

3. Resultados e discussão

Parte 1: Desenvolvimento do método

Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados relativos à deteção de polifenóis utilizando duas células eletroquímicas diferentes, uma convencional e uma célula miniaturizada descartável. A célula convencional compreende um eléctrodo de carbono vítreo, GCE, como eléctrodo de trabalho, um fio de platina como eléctrodo secundário e um eléctrodo de Ag/AgCl (KCl, 3 M) como eléctrodo de referência. A célula miniaturizada, comercializada pela *DropSens* é constituída por eléctrodos planos de trabalho impressos por *screen-printing* sobre um substrato cerâmico. Esta célula denominada SPCE, possui eléctrodos de trabalho e secundário constituídos por uma tinta à base de carbono e um eléctrodo de pseudo-referência composto por tinta de prata.

Os resultados obtidos com estes sistemas eletroquímicos em soluções padrão de um polifenol de referência, o ácido gálico (AG), foram utilizados como referência para comparar com os obtidos com os eléctrodos de trabalho modificados com nanotubos de carbono, CNT. Como já referido na parte experimental, os eléctrodos de trabalho GCE e do SPCE foram modificados por *drop-casting* e foram designados CNT@GCE e CNT@SPCE, respetivamente.

Os dados foram obtidos recorrendo a duas técnicas voltamétricas, nomeadamente a voltametria cíclica, CV, e a voltametria diferencial por impulsos, DPV. Os resultados apresentados são comparados tendo em conta as diferentes variáveis experimentais testadas, bem como os parâmetros de desempenho de sensibilidade e limite de deteção, e também através do aumento da sensibilidade da deteção associada à modificação, designado por amplificação.

Após a caracterização do método, foram realizados ensaios em soluções de amostras de vinhos branco e tinto, de modo a avaliar o teor total de polifenóis destas amostras.

3.1 Ensaios utilizando um GCE

O carbono vítreo é um dos materiais mais extensamente utilizado como substrato na construção de sensores. Para além de apresentar uma janela bastante ampla de potenciais disponíveis, tanto na região das oxidações como das reduções, a sua superfície é facilmente renovada através de polimentos suaves. Assim, o mesmo eletrodo pode ser usado em inúmeros ensaios, reduzindo os custos envolvidos.

O GCE é muito usado para quantificar moléculas orgânicas e inorgânicas. No entanto, este carece de seletividade e apresenta limites de deteção não muito baixos. A modificação do GCE é uma das estratégias que pode ser utilizada para melhorar o seu desempenho. A possibilidade de recuperação da superfície após a sua modificação, por polimento, possibilita a sua utilização no desenvolvimento de sensores.

3.1.1 Caracterização do ácido gálico usando um GCE

O AG, considerado um polifenol modelo, é um derivado do ácido benzoico com três grupos hidroxilo em posições *orto* (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) e é oxidado em dois processos sequenciais que originam dois picos de oxidação. Nestes processos estão envolvidos dois eletrões e dois prótons com a conseqüente formação da quinona. [52]

As respostas voltamétricas obtidas com o GCE, por CV e por DPV, em soluções padrão de AG de 30, 60, 90 e 120 μM em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 estão apresentadas na Figura 13 A e 13 B, respetivamente. Estes voltamogramas foram registados num volume de 10 mL da solução padrão.

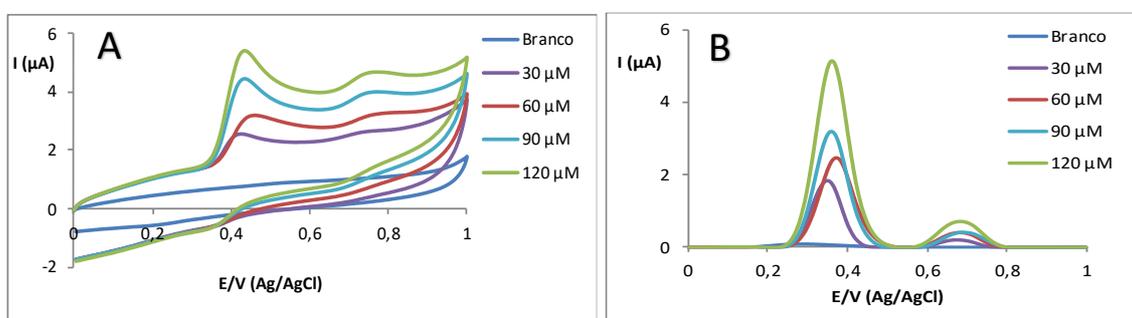


Figura 13. Voltamogramas obtidos com um GCE em soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 por: (A) CV ($v = 100 \text{ mVs}^{-1}$) e (B) DPV ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_p = 100 \text{ mV}$)

Em ambos os casos, os voltamogramas apresentam dois picos de oxidação. No caso dos voltamogramas obtidos por CV, os picos de oxidação são largos e com linha de base mal definida e apresentam uma elevada corrente capacitiva. Ambos os processos de transferência eletrónica têm um carácter irreversível, devido à ausência de picos no varrimento de potencial no sentido inverso. O pico com maior intensidade situa-se a $E_{p1} = 0,45$ V e o de menor intensidade a $E_{p2} = 0,75$ V, sendo a razão entre as intensidades de corrente de ambos os picos cerca de 5. Por DPV, o primeiro pico surge a $E_{p1} = 0,35$ V e o segundo a $E_{p2} = 0,70$ V, e a razão das intensidades de corrente entre os dois picos é cerca de 7. Os picos de oxidação são simétricos, a linha da base está bem definida e não apresenta corrente capacitiva tão elevada como no CV uma vez que no DPV a corrente é medida sempre no final do impulso onde a corrente capacitiva é baixa. O facto de voltamogramas apresentarem dois picos de oxidação, sugere que o processo de transferência de carga ocorre em duas etapas separadas que poderá ser justificada com a estabilização do intermediário formado após a transferência do primeiro eletrão.^[53] A ausência do pico inverso, nesta janela de potencial, pode resultar do facto da quinona formada pela oxidação não ser reduzida, ou então, a oxidação do AG não gera uma quinona estável.

A partir dos voltamogramas obtidos das soluções padrão de diferentes concentrações de AG foram traçadas três curvas de calibração, nomeadamente de intensidade de corrente do primeiro pico por CV e por DPV e de área integrada do voltamograma por DPV, tendo em conta todo o intervalo de potencial, que estão apresentadas na Figura 14. Para cada concentração estão apresentados dois pontos correspondentes a duas réplicas. Os pontos assinalados a vermelho foram desprezados de acordo com o tratamento estatístico efetuado, de modo a obter valores de maior sensibilidade e maior coeficiente de correlação. Na Tabela 2 apresentam-se as equações das retas, coeficiente de correlação (r), limites de deteção (I_{dd}) e sensibilidade das três retas de calibração.

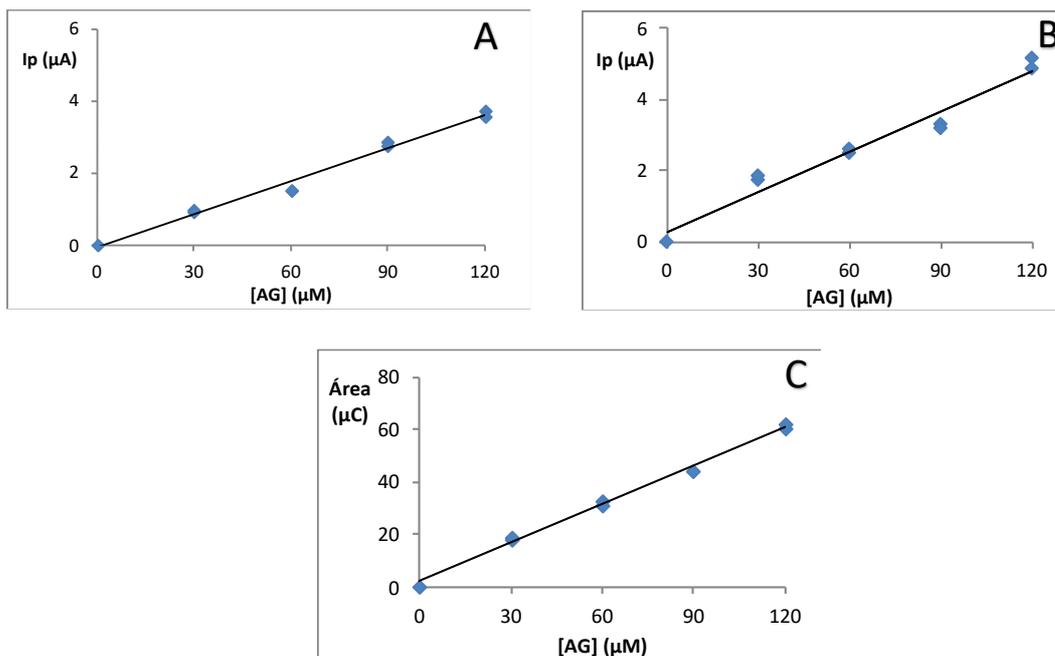


Figura 14. Curvas de calibração do AG obtidas com GCE da: (A) intensidade de corrente do primeiro pico obtido por CV; (B) intensidade de corrente do primeiro pico obtido por DPV e (C) área integrada sob o voltamograma obtido por DPV

Tabela 2. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção e sensibilidade para as curvas de calibração apresentadas na Figura 14

	Equação da reta	r	Ldd (μM)	Sensibilidade (A M^{-1})
CV	$I(A) = (0,031 \pm 0,003)[AG](M) - (0,1 \pm 0,3)$	0,992	19	0,031
DPV	$I(A) = (0,039 \pm 0,005)[AG](M) + (0,3 \pm 0,5)$	0,992	22	0,039
	$\text{Área}(C) = (0,49 \pm 0,04)[AG](M) + (2 \pm 3)$	0,997	12	0,49

Da análise da Tabela 2, pode-se verificar que independentemente da técnica utilizada, os métodos baseados na intensidade de corrente de pico apresentam um coeficiente de correlação, um limite de detecção e uma sensibilidade semelhantes, no entanto os valores obtidos pela avaliação da área integrada por DPV são muito superiores. A incerteza associada aos declives das retas varia entre os 8 e 13 % e é considerada aceitável. A incerteza associada à ordenada na origem engloba o ponto (0,0), demonstrado que esta incerteza também é aceitável.

3.1.2 Caracterização ácido gálico usando um CNT@GCE

A quantificação realizada com o GCE foi repetida com o eletrodo de GCE modificado com CNT, CNT@GCE. A modificação foi efetuada por *drop-casting* depositando 5 μL da suspensão de CNT 1,0 mg/mL preparada em água:metanol 1:1, tal como foi descrito na parte experimental (secção 3).

As respostas voltamétricas obtidas por CV e por DPV em soluções padrão de AG de 1,5; 3,0; 4,5; e 6,0 μM com o CNT@GCE estão apresentadas na Figura 15 (A) e 15 (B), respetivamente. A aquisição destes sinais foi realizada na solução de eletrólito após uma etapa de adsorção, em que foi aplicado durante 90 s um potencial de 0 V ao eletrodo de trabalho em contacto com a solução contendo AG sob agitação controlada (400 rpm). Após a adsorção, o eletrodo foi enxaguado com água destilada antes do registo de cada voltamograma, tal como descrito na parte experimental.

Os valores de potencial e tempo de adsorção usados na adsorção correspondem a valores de referência do laboratório considerados aceitáveis por constituírem um bom compromisso entre a sensibilidade obtida e o tempo do ensaio.

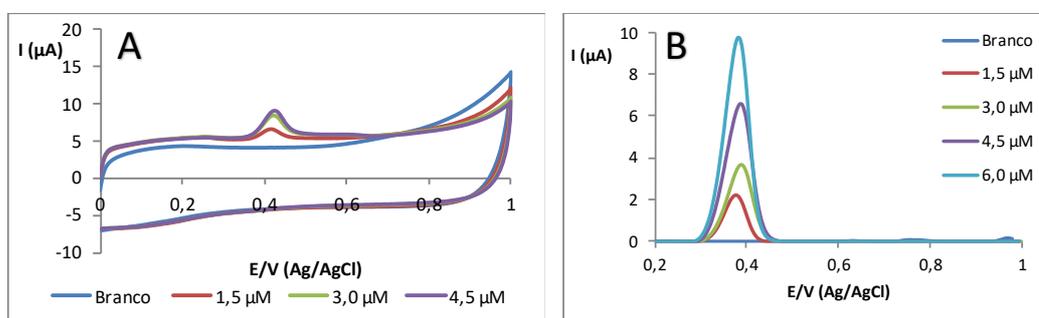


Figura 15. Voltamogramas obtidos em soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 por: (A) CV e (B) DPV com o CNT@GCE

Os voltamogramas obtidos com o CNT@GCE numa solução de AG apresentam apenas um pico simétrico, estreito e com linha de base bem definida, quer em CV quer em DPV. Os picos surgem aproximadamente a $E_p = 0,41$ V e a $E_p = 0,38$ V por CV e DPV, respetivamente.

As alterações da forma do voltamograma estão de acordo com a mudança observada relativamente ao processo de transferência de carga, controlado por difusão quando é utilizado o GCE não modificado. O processo passa a ser controlado por adsorção na presença de CNT na superfície do eletrodo. A presença das espécies

adsorvidas na superfície do eletrodo resulta em sinais mais estreitos e de maior intensidade, comparativamente aos obtidos com a espécie ativa em solução. Este tipo de sinais apresenta vantagens, particularmente no que diz respeito a uma maior sensibilidade de detecção. Por comparação dos declives das retas de calibração obtidos com o CNT@GCE relativamente aos do eletrodo não modificado, verifica-se que na presença dos CNT o sinal eletroquímico sofre um incremento que se traduz numa amplificação do sinal sempre superior a 22 vezes. Este valor atinge 43 vezes quando se comparam as curvas de calibração baseadas na intensidade de corrente obtida por DPV.

A ausência do 2º pico de oxidação nos voltamogramas do AG no eletrodo modificado mostra que o mecanismo de oxidação é diferente nos dois eletrodos. Esta situação pode resultar do facto do AG adsorvido na superfície do eletrodo facilitar a ocorrência dos dois processos ao mesmo potencial, ou alternativamente à não ocorrência do 2º processo de transferência eletrónica por uma estabilização do produto formado na primeira transferência eletrónica. Os dados que dispomos não nos permitem testar estas hipóteses.

Relativamente à qualidade dos resultados analíticos, verifica-se que incerteza associada ao valor dos declives é aceitável (sempre inferior a 18 %). Os coeficientes de correlação são bons e os limites de detecção situam-se entre 0,6 e 1 µM.

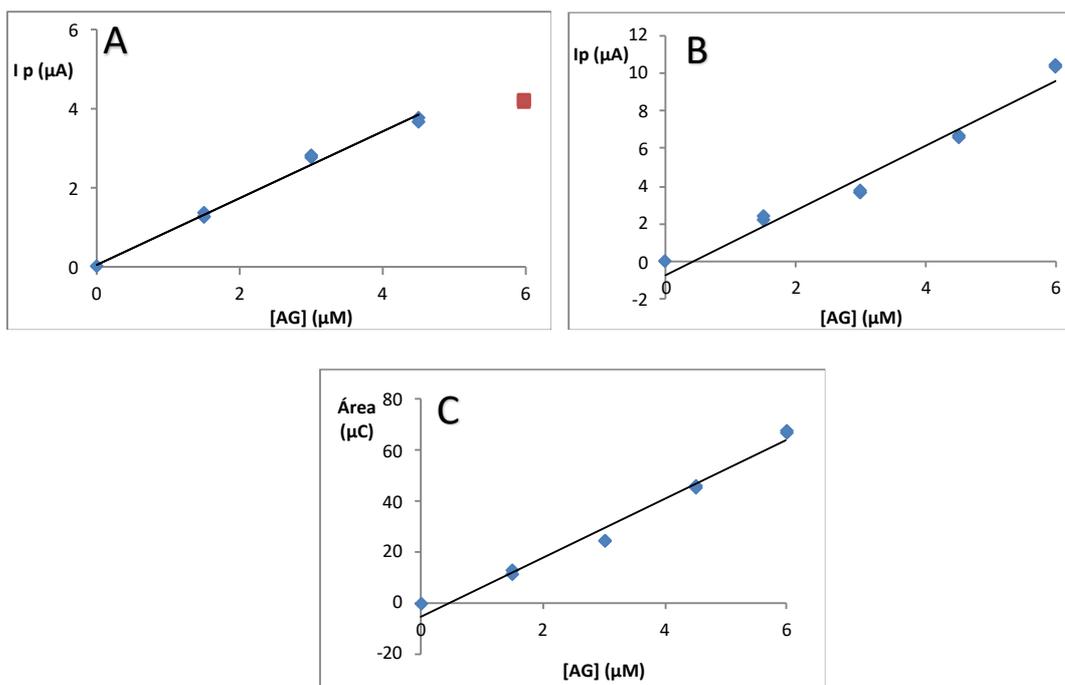


Figura 16. Curvas de calibração do AG obtidas com o CNT@GCE da: (A) intensidade de corrente de pico obtida por CV; (B) intensidade de corrente de pico obtida por DPV e (C) área integrada sob o voltamograma obtido por DPV

Tabela 3. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção e sensibilidade para as retas de calibração apresentadas na Figura 16

	Equação da reta	r	Ldd (μM)	Sensibilidade (A M ⁻¹)	Amplificação do sinal
CV	$I(A) = (0,84 \pm 0,08)[AG](M) + (0,1 \pm 0,2)$	0,995	0,56	0,84	28 x
DPV	$I(A) = (1,7 \pm 0,3)[AG](M) - (0,3 \pm 0,8)$	0,991	1,1	1,7	43 x
	$\text{Área}(C) = (11 \pm 1)[AG](M) - (3 \pm 5)$	0,996	0,81	11	22 x

Da análise da Tabela 3, verifica-se que o método baseado na intensidade de corrente de pico obtido por DPV apresenta um coeficiente de correlação mais baixo e um limite de detecção mais alto, no entanto é o que apresenta melhor amplificação do sinal. Por sua vez, o método baseado na quantificação da área integrada por DPV é o que apresenta melhor coeficiente de correlação e a sensibilidade. O método baseado na intensidade de corrente de pico obtido por CV apresenta um bom coeficiente de correlação e o limite de detecção mais baixo, apesar de ter baixa sensibilidade e amplificação do sinal. A incerteza associada aos declives das retas varia entre os 8 e 13 %. A incerteza associada à ordenada na origem engloba o ponto (0,0).

De acordo com os resultados, pode-se concluir que a presença dos CNT tem uma grande influência na gama de trabalho e no limite de detecção. No GCE, a gama de trabalho é de 30 a 120 μM e limite de detecção é de 20 μM, aproximadamente.

Comparativamente ao GCE modificado com CNT são valores muito elevados, no CNT@GCE a gama de trabalho é de 1,5 a 6,0 μM e limite de deteção aproximadamente 1 μM . A vantagem de trabalhar com a gama de trabalho e limites de deteção baixos é a possibilidade de trabalhar com soluções muito diluídas, ou seja, haverá pouca influência de interferentes.

3.1.3 Análise voltamétrica de amostras de vinho

O método desenvolvido para a avaliação do teor de polifenóis foi aplicado a amostras de vinhos branco e tinto utilizando a técnica de DPV. Esta técnica foi escolhida uma vez que os sinais obtidos em forma de pico simétrico facilitam a leitura e são pouco afetados pela contribuição de correntes residuais, utilizando tanto o GCE como o CNT@GCE.

As soluções de amostra de vinho branco foram preparadas por diluição das amostras provenientes de garrafas comerciais de 75 cL com uma solução de ácido tartárico 0,032 M a pH 3,20. Nos estudos realizados com o GCE efetuou-se uma diluição de 1:10, enquanto com o CNT@GCE a diluição foi de 1:400.

Tal como para o AG, os voltamogramas obtidos na amostra de vinho branco com o CNT@GCE foram traçados na solução de eletrólito (tartárico 0,032 M a pH 3,20) após a realização de um passo de adsorção na solução de amostra de vinho. No passo de adsorção foram controladas a agitação (400 rpm), o tempo de adsorção (90 s) e o potencial de adsorção (0 V).

A partir dos valores da intensidade de corrente de pico e da área integrada dos voltamogramas registados a partir das soluções de amostras de vinho foi avaliado o teor total de polifenóis considerando a interpolação destes valores nas retas de calibração do AG nas mesmas condições experimentais. Deste modo, o valor obtido de teor total de polifenóis é expresso em concentração equivalente de AG.

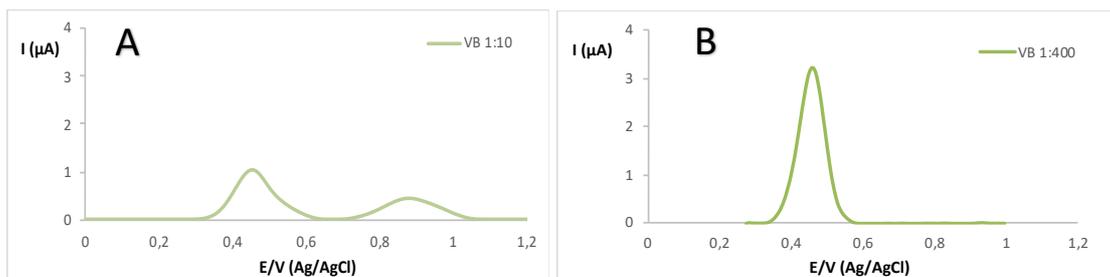


Figura 17. Voltamogramas de DPV de soluções de amostra de vinho branco diluídas obtidos com: (A) GCE (diluição 1:10) e (B) CNT@GCE (diluição 1:400)

Da análise da Figura 17, observa-se que o número de picos e a sua forma dependem do sensor utilizado. Assim, quando o GCE não é modificado obtêm-se voltamogramas com dois picos largos, assimétricos e pouco intensos a 0,45 V e a 0,85 V. Por outro lado, com o CNT@GCE, regista-se apenas um pico a 0,45 V, bem definido e simétrico e com uma intensidade de pico muito mais elevada, ainda que a diluição da amostra seja muito superior.

Os valores do teor total de polifenóis expresso em concentração de AG, obtidos a partir da intensidade de corrente de pico e de área por interpolação, encontram-se apresentados na Tabela 4.

Este estudo foi também efetuado com uma solução de amostra de vinho tinto. Como ilustrado na Figura 18, a forma dos voltamogramas obtidos com o GCE traduz a maior complexidade do perfil químico do vinho tinto. O vinho tinto apresenta uma matriz complexa, rica em polifenóis e outros compostos oxidáveis. Consequentemente, os voltamogramas obtidos com o GCE também apresentam um perfil de oxidação mais complexo com 3 picos largos, pouco separados e de baixa intensidade. O primeiro pico aparece a 0,40 V, o segundo a 0,65 V e o terceiro a 0,85 V. A concentração de compostos fenólicos é também superior nos vinhos tintos, pelo que as amostras foram sujeitas a uma maior diluição mais elevada.

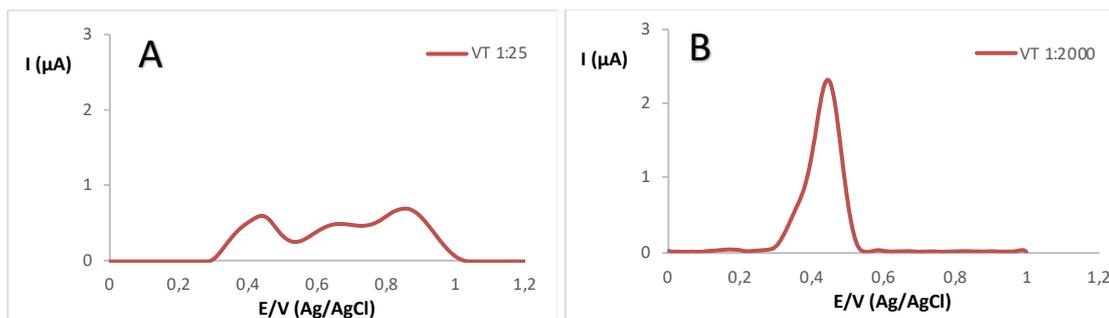


Figura 18. Voltamogramas de DPV obtidos numa solução de amostra de vinho tinto obtidos com: (A) GCE (diluição 1:25) e (B) CNT@GCE (diluição 1:2000)

Em oposição ao verificado no voltamograma registado com o GCE, com o CNT@GCE é apenas registado um pico de oxidação a 0,50 V. Comparativamente com a resposta do AG e da solução da amostra de vinho branco, este pico é mais largo e apresenta uma assimetria do lado esquerdo. A intensidade deste sinal é muito superior à obtida com o GCE, apesar de ser obtido numa solução que é 80 vezes mais diluída.

Na Tabela 4 estão indicados os valores do teor de polifenóis totais presentes no vinho expressos em concentração de ácido gálico obtidos com o GCE e o CNT@GCE para as duas amostras de vinho obtidos por interpolação nas retas de calibração traçadas a partir da área integrada por ser mais fácil e prático de analisar, tendo em conta a diluição respetiva. A forma dos picos nos voltamogramas dos vinhos é assimétrica e irregular, principalmente no vinho tinto e o potencial de pico sofre desvios.

Tabela 4. Concentração de polifenóis totais a partir da reta de calibração e teor total obtido em soluções de amostras de vinho branco e tinto expresso em equivalente de concentração do ácido gálico para a técnica DPV utilizando o eletrodo de GCE e CNT@GCE

Sensor	Teor em polifenóis totais (mM AG)	
	Vinho branco	Vinho tinto
GCE	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2
CNT@GCE	1,1 ± 0,2	5,0 ± 1,0

Da análise da Tabela 4, verifica-se que os valores obtidos variam com o sensor utilizado e são 3 vezes superiores quando se utiliza o CNT@GCE face ao CNT. Verifica-se ainda que os resultados obtidos na amostra de vinho tinto face ao do vinho branco são 4 a 5 vezes superiores no vinho tinto. As diferenças observadas devem-se à riqueza do vinho tinto em polifenóis e à contribuição do mecanismo de adsorção devido aos CNT.

A fim de avaliar a justeza dos resultados obtidos, realizaram-se ensaios de recuperação, fortificando as soluções de amostra de vinho branco e tinto. Assim, a uma solução de amostra de vinho adicionou-se uma quantidade conhecida de solução padrão de AG (30 μM e 1,5 μM para o GCE e para o CNT@GCE, respectivamente) e determinou-se a taxa de recuperação. A taxa de recuperação foi estimada a partir do quociente entre o sinal obtido na amostra fortificada e a soma dos sinais obtidos na solução de AG e na solução de amostra de vinho.

Na Figura 19 (A) e (B) estão comparados os voltamogramas de uma solução de AG, com os de uma solução de amostra de vinho branco (diluição 1:10 ou 1:400) e os das amostras fortificadas, obtidas com o GCE (A) e o CNT@GCE (B). Na Figura 19 (C) e (D) são apresentados os mesmos conjuntos de voltamogramas obtidos no estudo da fortificação de uma solução de amostra de vinho tinto (diluição 1:25 ou 1:2000) com o GCE e o CNT@GCE, respectivamente.

Na Tabela 5 estão indicadas as taxas de recuperação para cada amostra de vinho e sensor, obtidas através da interpolação dos valores de área integrada na correspondente reta de calibração.

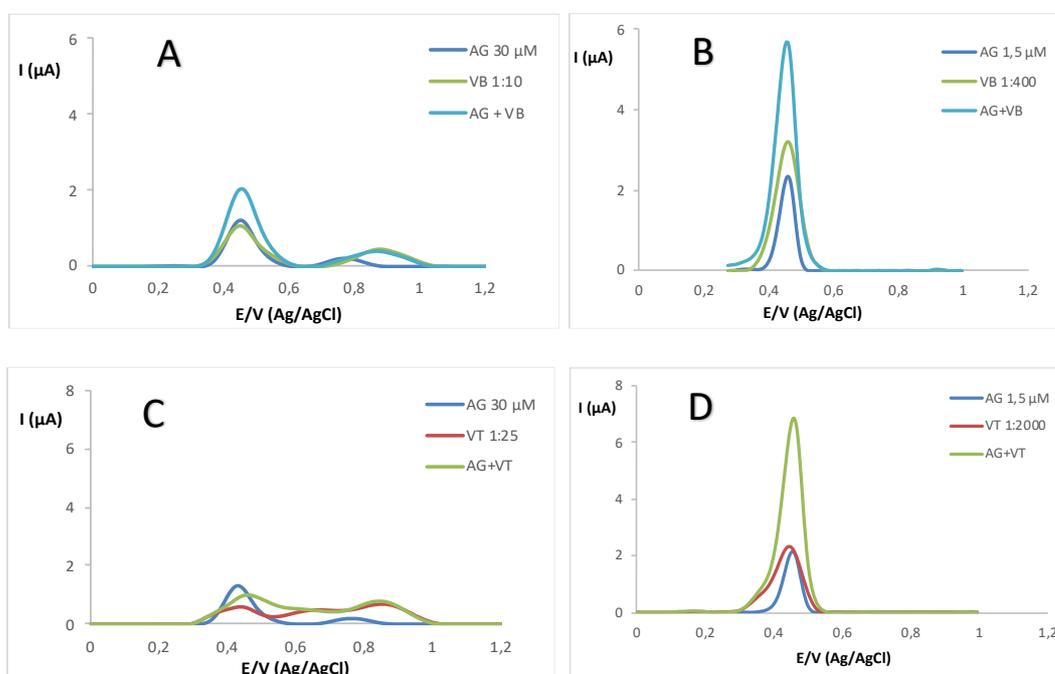


Figura 19. Comparação dos voltamogramas de uma solução de AG, com os de uma solução de amostra de vinho branco e os das amostras fortificadas, obtidas com: (A) GCE e (B) CNT@GCE e uma solução de amostra de vinho tinto e voltamogramas obtidos com: (C) GCE e (D) CNT@GCE

Tabela 5. Taxa de recuperação obtida nas amostras de vinho com GCE e CNT@GCE fortificadas com AG

Sensor	Recuperação (%)	
	Vinho branco	Vinho tinto
GCE	86 ± 3	74 ± 1
CNT@GCE	109 ± 1	129 ± 12

Da análise da Tabela 5, verifica-se que os resultados apresentam valores aceitáveis para a amostra do vinho branco já que as taxas obtidas variam entre os 86 e 109 % estando dentro do valor esperado para este nível de concentração.

No entanto, relativamente à solução de amostra de vinho tinto os valores de taxa de recuperação afastam-se mais do valor esperado, sendo que a diferença obtida com os dois sensores é maior nesta amostra face aos resultados obtidas na amostra de vinho branco. Este afastamento pode dever-se à maior complexidade da matriz do vinho tinto e ao facto de entre cada registo voltamétrico o GCE necessitar de ser limpo e modificado de novo. Acresce ainda que o facto da necessidade de preparar soluções de amostra de vinho serem preparadas novamente antes da realização do ensaio de recuperação.

A maior simplicidade da resposta obtida com o eléctrodo modificado poderá estar associada a alterações dos mecanismos de oxidação dos diferentes componentes presentes na amostra resultantes da sua adsorção nos CNT imobilizados na superfície do GCE. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de alguns componentes não serem detetados por não se adsorver nas condições em que a experiência foi realizada. De modo a testar estas hipóteses é necessária a realização de ensaios em soluções contendo diferentes polifenóis isoladamente e em misturas destes. Estes estudos não foram realizados no âmbito desta tese por questões relacionadas com os objetivos pré-estabelecidos e por limitações de tempo.

3.2 Ensaios realizados com elétrodos impressos

Os elétrodos impressos têm vindo a ganhar maior popularidade em aplicações de química analítica face aos elétrodos tradicionais. Este facto é justificado pela facilidade de utilização dos mesmos devido a estes normalmente integrarem o conjunto de elétrodos que constituem a célula eletroquímica. Por outro lado, sendo descartáveis não requerem o uso de métodos de pré-tratamento para a renovação da superfície, simplificando os ensaios envolvidos na medição. Nesse sentido, os ensaios anteriormente realizados com o GCE foram repetidos com um SPCE comercial.

3.2.1 Caracterização do ácido gálico com SPCE

As condições experimentais utilizadas com o SPCE foram semelhantes às usadas com o GCE (soluções padrão de AG de 30, 50 e 70 μM em ácido tartárico 0,032 M pH 3,20), no entanto, utilizou-se um volume de amostra mais reduzido, de 75 μL , que corresponde ao volume necessário para cobrir os três elétrodos da célula do SPCE. O processo de adsorção foi realizado durante 90 segundos e 0 V de potencial aplicado, sem agitação. Na Figura 20 (A) e 20 (B) estão representados os voltamogramas cíclicos e diferenciais de impulso obtidos com o SPCE, respetivamente.

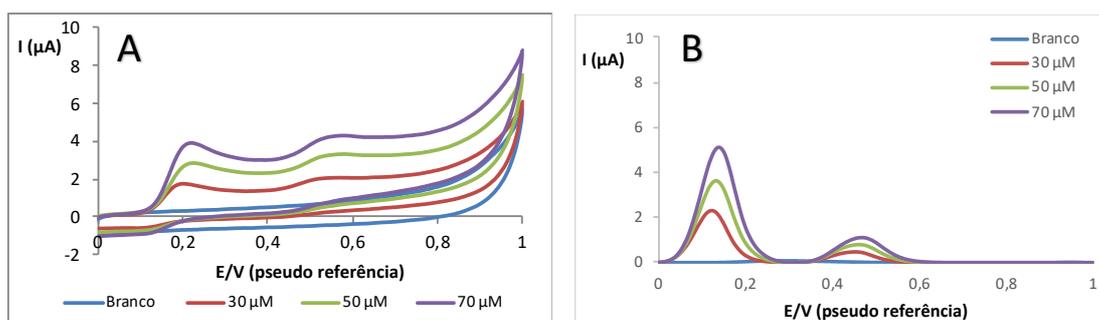


Figura 20. Voltamogramas obtidos a partir de soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 obtidos por: (A) CV e (B) DPV

Os perfis voltamétricos obtidos por dois métodos apresentam semelhanças no que se refere ao número dos picos, dado que em ambos os casos os voltamogramas apresentam dois picos de oxidação. No entanto, há uma diferença significativa na forma. Enquanto no CV a forma dos picos é assimétrica e os picos são bastante largos, os picos registados por DPV são bem definidos e simétricos.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para o AG apresentam dois picos, no varrimento direto (anódico), um de maior intensidade a $E_{p1} = 0,20$ V e outro de intensidade mais baixa a $E_{p2} = 0,55$ V, sendo a razão entre as intensidades de corrente de aproximadamente 3,5. Por DPV, o primeiro pico surge a $E_{p1} = 0,11$ V e o segundo a $E_{p2} = 0,45$ V, e a razão entre as intensidades de corrente é de 4,5. A partir dos voltamogramas obtidos das soluções padrão de diferentes concentrações de AG foram traçadas curvas de calibração de intensidade de corrente e de área integrada que se encontram na Figura 21. Na Tabela 6 apresentam-se as equações das retas, coeficiente de correlação (r), limites de deteção (I_{dd}) e sensibilidade para cada técnica.

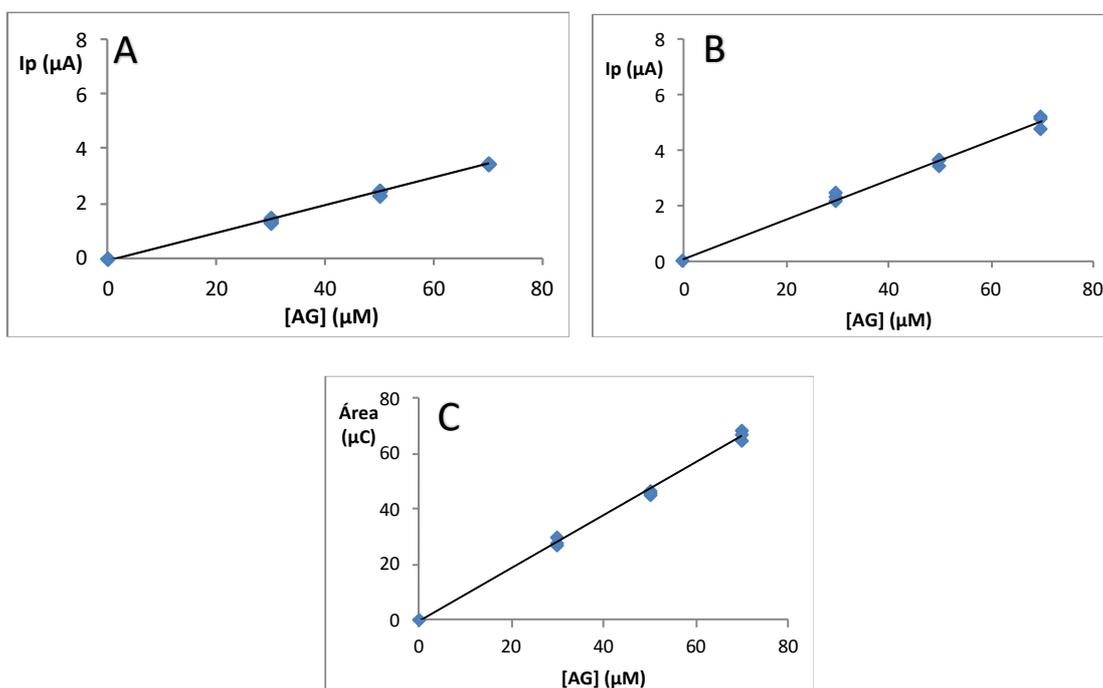


Figura 21. Curvas de calibração do AG obtidas com o CNT@GCE da: (A) intensidade de corrente de pico obtida por CV; (B) intensidade de corrente de pico obtida por DPV e (C) área integrada sob o voltamograma obtido por DPV

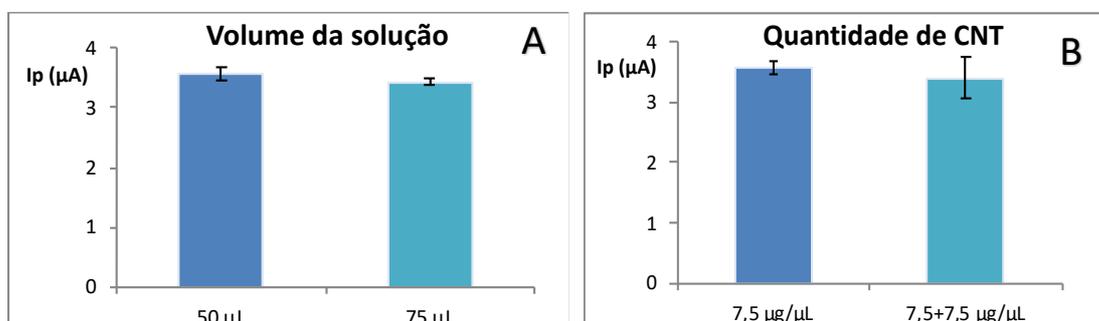
Tabela 6. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção e sensibilidade para as retas de calibração obtidas com o SPCE apresentadas na Figura 21

	Equação da reta	r	Ldd (μM)	Sensibilidade (A M^{-1})
CV	$I(\text{A}) = (0,050 \pm 0,003)[\text{AG}](\text{M}) - (0,1 \pm 0,1)$	0,998	4,8	0,050
DPV	$I(\text{A}) = (0,071 \pm 0,005)[\text{AG}](\text{M}) + (0,1 \pm 0,3)$	0,996	7,5	0,071
	$\text{Área}(\text{C}) = (0,95 \pm 0,05)[\text{AG}](\text{M}) - (0,4 \pm 3)$	0,998	5,5	0,95

Da análise da Tabela 6, pode-se verificar que a reta de calibração obtida com o SPCE apresenta um coeficiente de correlação melhor do que no GCE e um ldd muito mais inferior. Comparando as sensibilidades, tanto da intensidade da corrente como da área integrada, do SPCE com o GCE, estes valores são superiores no SPCE. Relativamente a qualidade dos resultados, como incerteza associada aos declives das retas é sempre inferior a 10 % e incerteza associada à ordenada na origem engloba o ponto (0,0), pode-se concluir que a definição das retas de calibração é satisfatória.

3.2.2 Caracterização do ácido gálico com CNT@SPCE

À semelhança do estudo realizado com o GCE, o eletrodo de trabalho do SPCE foi modificado com 7,5 μL da suspensão de CNT em água:metanol 1:1. As condições experimentais relativas à utilização do CNT@SPCE foram otimizadas considerando a quantidade de CNT depositados, volume da solução/gota a colocar nos eletrodos, tempo de adsorção, potencial de adsorção e modo de aquisição do sinal. Na Figura 22 estão representados os gráficos de barras correspondentes ao cada estudo de otimização das condições experimentais.



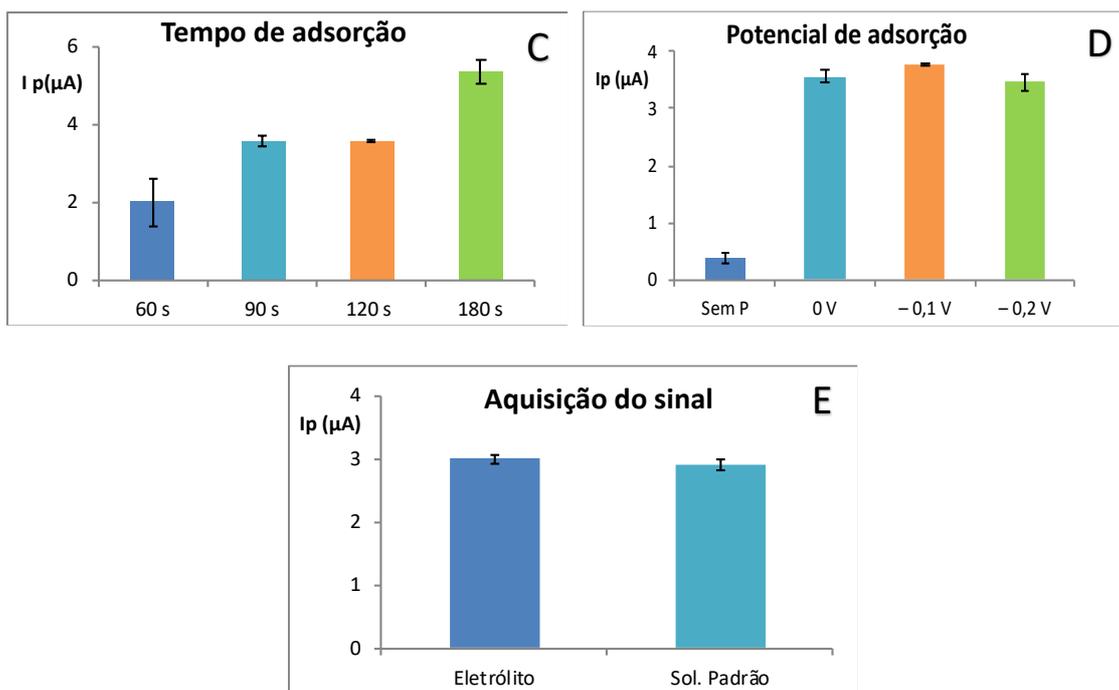


Figura 22. Estudo das condições experimentais do processo de modificação do eletrodo de trabalho do SPCE e do método de aquisição da intensidade de corrente de pico: (A) Quantidade de CNT depositados; (B) Volume de solução/gota a colocar sobre o conjunto dos eletrodos; (C) Tempo de adsorção; (D) Potencial de adsorção e (E) Modo de aquisição do sinal para uma concentração de ácido gálico de 3 μM em todas as experiências

A Figura 22 apresenta as condições testadas na otimização do processo de modificação do eletrodo de trabalho no SPCE e do método para a aquisição do sinal. Assim foi testada a quantidade de CNT: 7,5 e 7,5+7,5 μL de suspensão; volume de solução padrão: 50 e 75 μL ; tempo de adsorção: 60, 90, 120 e 180 s; potencial de adsorção: circuito aberto, 0, -0.1 e -0.2 V e meio onde o sinal é medido: solução de eletrólito e solução padrão.

Tendo em conta os resultados apresentados na Figura 22 conclui-se que as condições ótimas de modificação de eletrodo correspondem a 7,5 μL de suspensão de CNT. Relativamente aos ensaios voltamétricos, selecionou-se o volume de 75 μL de solução para ser colocado no sensor dado que é mais fácil depositar e manipular esse volume no sensor, como também não haver diferença significativa na intensidade do sinal e o erro ser menor. Apesar de se verificar o sinal ser substancialmente superior para um tempo de adsorção de 180 s, o erro associado é muito grande. Optou-se, então, por selecionar o tempo de 90 s por uma questão de redução do tempo da experiência. No caso de potencial de adsorção, não se verifica uma diferença significativa entre 0 V e -0,1 V, tendo-se escolhido o potencial de 0 V, mantendo-se assim a mesma condição

do GCE. Quanto à aquisição do sinal, não se verificaram diferenças significativas entre os modos de aquisição (no eletrólito ou na solução padrão) por isso para evitar quaisquer perdas de analito ou CNT optou-se por fazer a aquisição do sinal na solução padrão.

Depois de otimizar as condições experimentais, realizaram-se estudos subsequentes considerando o processo de adsorção durante 90 segundos e o potencial aplicado de 0 V, sem agitação, com a aquisição do sinal efetuada na solução padrão.

As respostas voltamétricas obtidas por CV e por DPV nas soluções padrão de AG de 3,0; 6,0 e 7,5 μM com o CNT@SPCE em ácido tartárico 0,032 M pH 3,20, estão apresentadas na Figura 23 (A) e 23 (B), respetivamente.

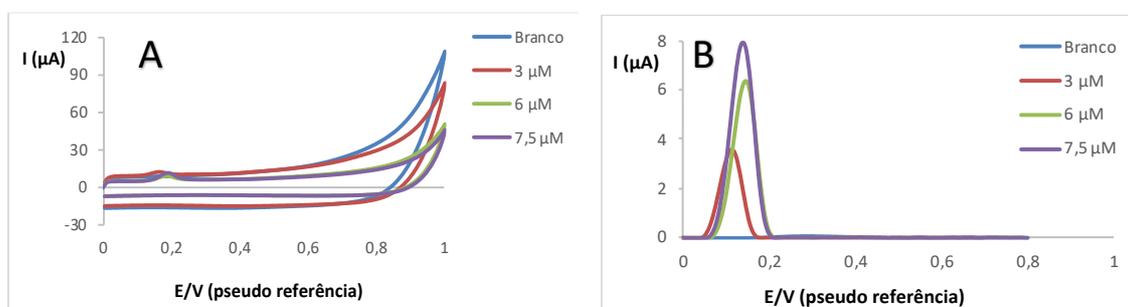


Figura 23. Voltamogramas obtidos a partir de soluções padrão de AG em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 obtidos por: (A) CV e (B) DPV

Os voltamogramas obtidos por CV apresentam uma corrente capacitiva elevada com um pico de intensidade baixa a $E_p = 0,20$ V. Este pico é simétrico e com linha de base bem definida. Por DPV, os voltamogramas apresentam também apenas um pico simétrico, com linha de base bem definida, no entanto o máximo da intensidade da corrente cujo potencial variou nos ensaios com diferentes concentrações de analito, surgindo entre 0,10 a 0,15 V. Este desvio pode ser explicado devido ao eléctrodo de referência usado ser um pseudo eléctrodo de referência e poder variar ao longo das determinações. O processo de transferência eletrónica é também controlado por adsorção. Esta afirmação resulta não só da avaliação visual da forma do pico, como também da sua dependência em relação aos fatores experimentais como o potencial e o tempo de acondicionamento.

A partir dos voltamogramas obtidos para soluções padrão de diferentes concentrações de AG foram traçadas curvas de calibração de intensidade de corrente de pico e de área integrada sob o voltamograma.

As curvas de calibração da intensidade de corrente de pico em função da concentração do AG como área integrada encontram-se na Figura 24 e na Tabela 7 encontram-se as respectivas equações das retas, coeficiente de correlação (r), limites de detecção (Ldd) e sensibilidade para cada técnica.

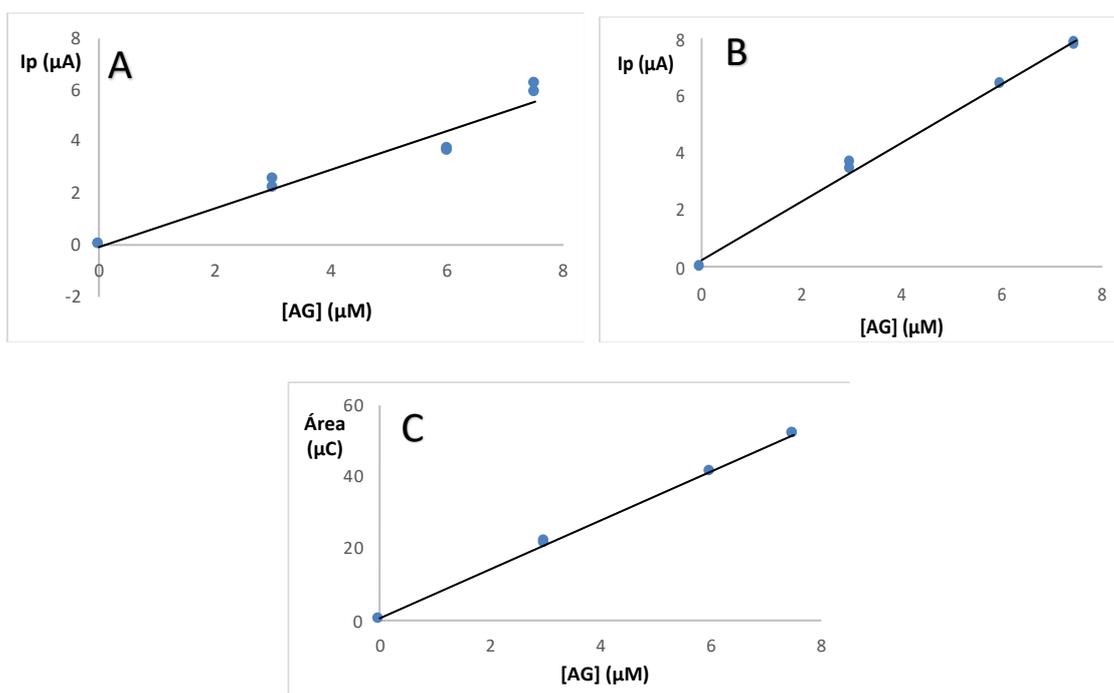


Figura 24. Curvas de calibração do AG relativas à intensidade de corrente de pico em função da concentração registados por: (A) CV e (B) DPV; e curva de calibração relativa à área integrada registada por DPV (C)

Tabela 7. Equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção, sensibilidade e a amplificação do sinal para as retas de calibração apresentadas na Figura 24

	Equação da reta	r	Ldd (μM)	Sensibilidade (A M ⁻¹)	Amplificação do sinal
CV	$I(A) = (0,7 \pm 0,2)[AG](M) - (0,1 \pm 1)$	0,970	2,6	0,7	14 x
DPV	$I(A) = (1,0 \pm 0,1)[AG](M) + (0,3 \pm 0,6)$	0,995	1,0	1,0	14 x
	$\text{Área}(C) = (6,7 \pm 0,6)[AG](M) + (0,5 \pm 3)$	0,997	0,81	6,7	7 x

Da análise da Tabela 7, pode-se verificar que os parâmetros apresentados dependem da técnica utilizada, obtendo-se valores superiores quando se usam os dados de área integrada. Ao modificar o eletrodo com CNT, consegue-se atingir I_{dd} mais baixo e uma maior sensibilidade apesar do coeficiente de correlação ser mais baixo do que no não modificado. A incerteza associada aos declives das retas para o método baseado no DPV é igual a 10 %, mas quando é utilizada a CV a incerteza é igual a 29 %. De facto, esta reta de calibração apresenta um menor valor de coeficiente de correlação, provavelmente devido a dificuldades da leitura das intensidades de correntes de pico. Esta limitação também se traduziu num limite de deteção mais elevado. Na técnica de DPV, a obtenção quer das intensidades de correntes, quer das áreas de pico é facilitada e os dados obtidos apresentam uma qualidade superior. Em todas as curvas de calibração a incerteza associada à ordenada na origem engloba o ponto (0,0). A amplificação do sinal é maior para a intensidade de corrente tanto por CV como por DPV. A amplificação do sinal obtida usando eletrodos de SPCE é 2 ou 3 vezes inferior à amplificação do sinal conseguida com eletrodos de GCE, pois a ausência de agitação e um volume muito reduzido poderão ter influência no mesmo.

3.2.3 Análise voltamétrica de amostras de vinho branco com SPCE e CNT@SPCE

O teor de polifenóis no vinho branco foi avaliado recorrendo aos sensores SPCE e CNT@SPCE através de ensaios voltamétricos por DPV. Devido à boa definição dos sinais e estes não serem afetados pela contribuição da corrente capacitiva, foi possível obter uma fácil leitura das intensidades de corrente de pico e integração da área sob os voltamogramas.

As soluções de amostras de vinho branco foram preparadas em solução de ácido tartárico 0,032 M a pH 3,20. As amostras foram diluídas de 1:10, quando se utiliza o SPCE e de 1:250 para o CNT@SPCE.

Os voltamogramas foram traçados na solução de amostra de vinho após a etapa de adsorção. As condições de adsorção foram as anteriormente otimizadas, nomeadamente tempo de adsorção de 90 s e potencial aplicado de 0 V. Os voltamogramas apresentados na Figura 25 ilustram o perfil típico das respostas obtidas com o SPCE e com o CNT@SPCE. Com o SPCE obtêm-se dois picos muito largos,

assimétricos, com forma irregular e de baixa intensidade. Os picos surgem a $E_{p1}=0,20$ V e a $E_{p2}=0,60$ V. No caso do CNT@SPCE, regista-se apenas um pico, bem definido e simétrico, a 0,10 V e com uma intensidade de pico muito mais elevada mesmo correspondendo à uma diluição muito maior.

Os voltamogramas obtidos na solução de amostra de vinho foram analisados a partir dos valores da área integrada. O teor total de polifenóis foi avaliado a partir da interpolação destes valores na reta de calibração definida a partir do AG nas mesmas condições experimentais. Deste modo, o valor obtido de teor total de polifenóis é expresso em concentração de AG.

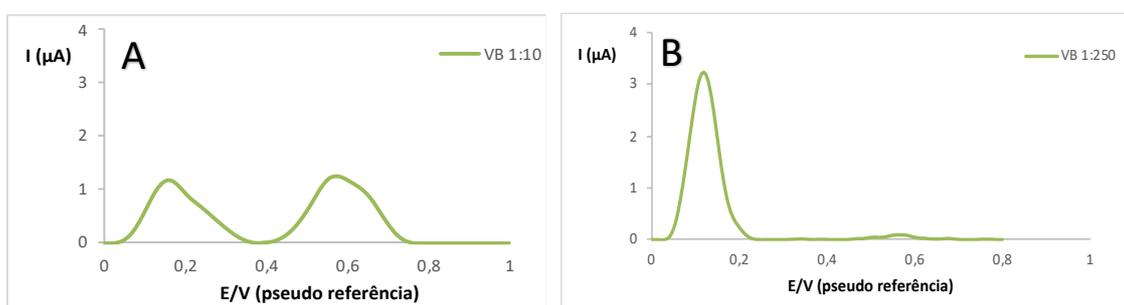


Figura 25. Voltamogramas de DPV de soluções de amostra de vinho branco diluídas obtidos com: (A) SPCE (diluição 1:10) e (B) CNT@SPCE (diluição 1:250)

Os valores obtidos para o teor total de polifenóis, expresso em concentração de AG estão apresentados na Tabela 8. Optou-se por utilizar área integrada pois a forma dos voltamogramas no SPCE indica que os picos resultam da sobreposição de mais do que um sinal em posições próximas, originando um sinal assimétrico. Neste tipo de situações, através da área do voltamograma é possível ter uma quantificação mais equitativa de todos os componentes do que através da medição da intensidade de corrente do pico resultante que tem uma maior contribuição dos picos que ocorrem a um potencial mais próximo do máximo de corrente.

Tabela 8. Concentração de polifenóis totais obtida pela reta de calibração da área integrada na solução de vinho branco e teor total obtido em amostras de vinho branco expresso em equivalente de concentração do ácido gálico com a técnica DPV utilizando o SPCE e CNT@SPCE

Sensor	Teor em polifenóis totais (mM AG)
SPCE	$0,45 \pm 0,03$
CNT@SPCE	$1,1 \pm 0,1$

Da análise da Tabela 8, verifica-se que os valores obtidos variam com o sensor utilizado e são 2 vezes superiores quando se utiliza o CNT@SPCE face ao SPCE devido ao processo de adsorção. As incertezas obtidas do teor de polifenóis são também baixas 6 e 9 %, para o SPCE e CNT@SPCE, respetivamente. Em ambos os casos, os valores da concentração de polifenóis expresso em concentração de ácido gálico obtidos nas soluções diluídas de vinho branco e conseqüentemente interpolados na reta de calibração, 4,3 μM no SPCE e 45 μM no CNT@SPCE, são superiores ao limite de deteção, que para SPCE é 5,5 μM e para CNT@SPCE é 0,81 μM .

A justeza dos resultados obtidos foi avaliada através de ensaios de recuperação, fortificando as soluções de amostra de vinho branco. Assim, a uma solução de amostra de vinho (com uma diluição de 1:10 e 1:250 no SPCE e CNT@SPCE, respetivamente) adicionou-se uma quantidade de concentração conhecida de AG (30 μM no SPCE e 3,0 μM no CNT@SPCE) e determinou-se a taxa de recuperação, do mesmo modo que no GCE. Na Figura 26 estão comparados os voltamogramas de uma solução de AG com os de uma solução de amostra de vinho branco (diluição 1:10 ou 1:250) e os das amostras fortificadas, obtidas com o SPCE (A) e com o CNT@SPCE (B).

Na Tabela 9 estão indicadas as taxas de recuperação relativas a cada sensor, obtidas através da interpolação dos valores de área integrada na correspondente reta de calibração.

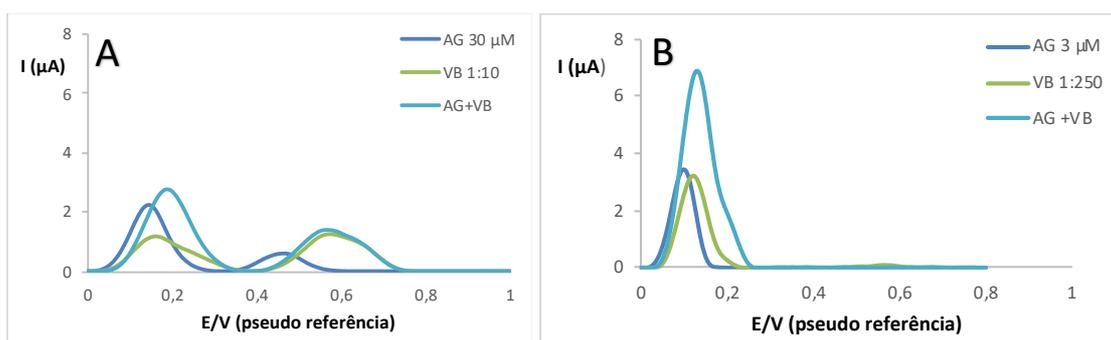


Figura 26. Comparação dos voltamogramas de uma solução de AG, com os de uma solução de amostra de vinho branco e os das amostras fortificadas, obtidos por: (A) SPCE e (B) CNT@SPCE

Tabela 9. Taxa de recuperação obtida para as soluções de amostras de vinho com SPCE e CNT@SPCE fortificadas com AG

Sensor	% Recuperação
SPCE	80 ± 10
CNT@SPCE	125 ± 10

Da análise da Tabela 9, verifica-se que o valor obtido com o SPCE é aceitável. Com o CNT@SPCE o valor obtido encontra-se um pouco mais afastado do valor esperado. Apesar da matriz do vinho branco não ser tão complexa comparando com o vinho tinto, no processo de adsorção outras espécies poderão ter adsorvido irreversivelmente e influenciado o sinal medido.

Dada a complexidade de matriz dos vinhos, contendo compostos fenólicos de diferentes famílias, considerou-se importante testar a resposta do sensor desenvolvido com outros polifenóis, nomeadamente a catequina e o ácido tânico. Estes resultados encontram-se apresentados no Anexo 1.

Parte 2. Caracterização de protótipos funcionais de elétrodos impressos e de módulos de modificação de elétrodos impressos comerciais

3.3 Protótipos de sensores impressos por inkjet-printing e screen-printing

Os resultados apresentados nesta parte do trabalho foram obtidos no âmbito de uma parceria com o Instituto de Polímeros e Compósitos da Universidade do Minho, no âmbito do projeto PhenolicQuant. O objetivo consistiu na produção de sensores idênticos aos SPCE comerciais através das tecnologias de impressão por *inkjet-printing*, *screen-printing* e *stencil-printing*.

3.3.1 Produção e caracterização dos protótipos funcionais

Os protótipos de sensores impressos por *inkjet-printing*, constituídos por um eletrodo de trabalho (WE), um eletrodo auxiliar (CE) em carbono e um eletrodo de referência (RE) em prata foram impressos utilizando as impressoras comerciais sobre um substrato em polietileno de tereftalato (PET) transparente. Os contactos elétricos foram impressos em tinta de prata e o isolamento obtido com uma fita adesiva em material polimérico.

Na produção dos sensores eletroquímicos por *screen-printing* o RE e as ligações elétricas foram impressos utilizando uma tinta comercial de prata, enquanto que o WE e o CE foram impressos utilizando uma tinta de carbono produzida laboratorialmente. O substrato usado foi também o PET e o isolamento dos contactos elétrico foi obtido com uma fita adesiva apropriada.

Devido a diferentes problemas encontrados durante o processo de produção, os protótipos produzidos quer por *inkjet-printing*, quer por *screen-printing* mostraram ser desadequados.

Através da técnica de *stencil-printing* e utilizando o mesmo substrato em PET e o mesmo material para o isolamento dos contactos elétricos, foram desenhadas e produzidas duas configurações alternativas de protótipos de sensores:

- Protótipo A: o eletrodo de trabalho (WE), eletrodo secundário (SE) e contactos elétricos foram impressos com tinta de carbono enquanto o eletrodo de referência (RE) foi impresso com tinta de prata (Figura 27 (A));
- Protótipo B: os WE e SE foram impressos com tinta de carbono e o RE e contactos elétricos foram impressos com tinta de prata (Figura 27 (B)).

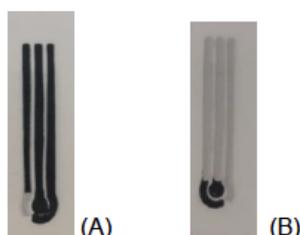


Figura 27. Fotografia dos protótipos produzidos por *stencil-printing*: (A) Protótipo A (B) Protótipo B

Foram produzidos 48 sensores impressos por *stencil-printing*, Protótipo A e Protótipo B. Destes 48 sensores, cerca de 70 % foram rejeitados por inspeção visual. Os defeitos devem-se a imperfeições de impressão que originam um curto-circuito entre elétrodos, tanto ao nível dos contactos elétricos como dos elétrodos. Na Figura 28 estão apresentadas imagens que evidenciam os referidos defeitos. Todos sensores que não apresentavam imperfeições evidentes de impressão (cerca de 14 protótipos de cada tipo) foram testados em soluções contendo um polifenol modelo. Destes, apenas 20%, entre 2 e 3, apresentaram uma resposta adequada.

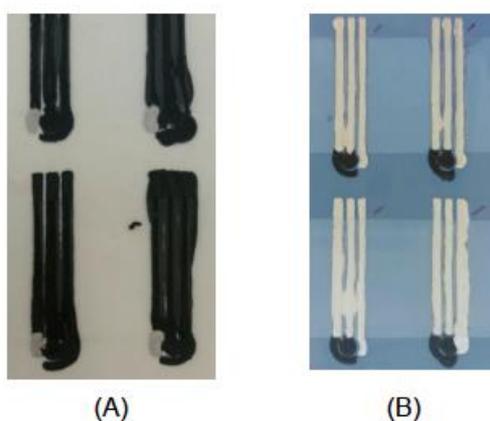


Figura 28. Fotografia dos protótipos A e B com imperfeições na impressão

A Figura 29 apresenta as fotografias e as respostas voltamétricas por DPV (numa solução padrão de ácido gálico 3 μ M em ácido tartárico 0,032 M pH 3,2, adsorção a 0V durante 90 s) dos Protótipos A e B, sem defeitos aparentes.

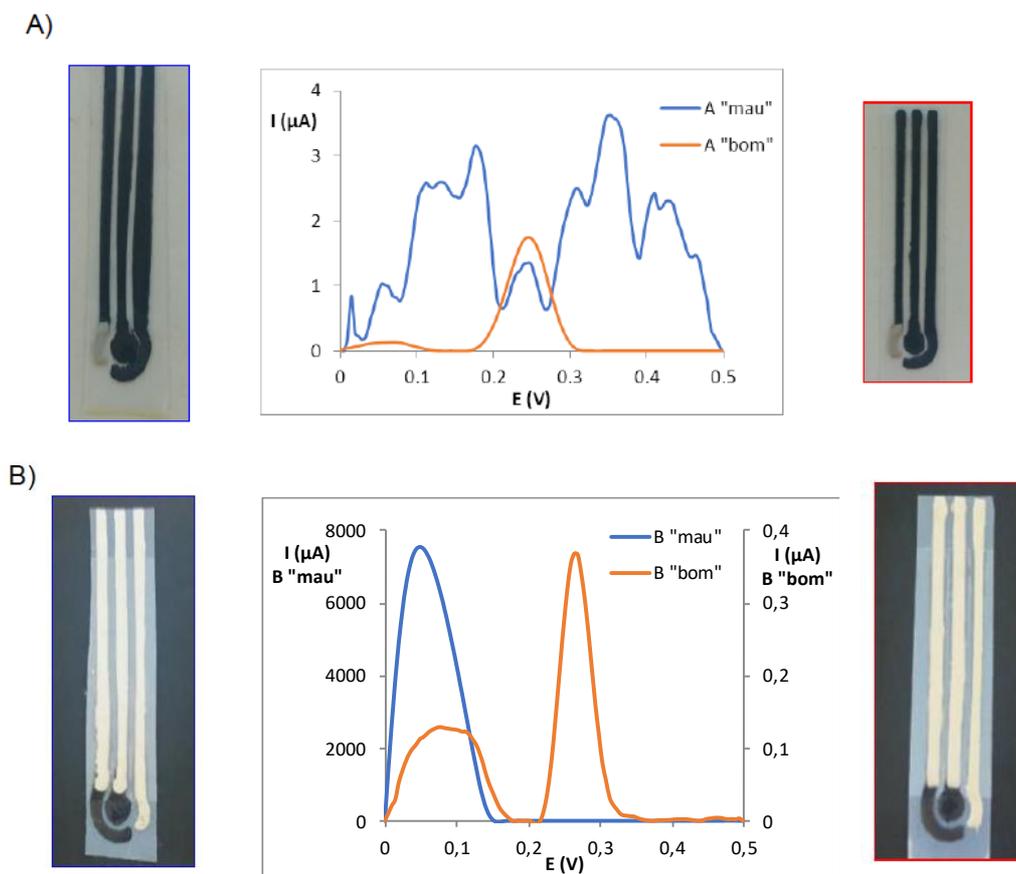


Figura 29. Voltamogramas de DPV e fotografias dos protótipos de sensores sem defeitos aparentes (fotos à esquerda e resposta voltamétrica a azul) e dos protótipos de sensores funcionais (fotos à direita e resposta voltamétrica a laranja)

Os protótipos que mostraram ter melhor funcionamento foram testados electroquimicamente numa solução de AG. Os protótipos produzidos por *stencil-printing* após inspeção visual e teste electroquímico foram modificados seguindo um procedimento idêntico ao desenvolvido para os SPCE comerciais. Assim, WE foi modificado por *drop-casting* com 5 μL de suspensão de CNT funcionalizados (1 mg/mL). A quantidade de CNT depositada foi ajustada à área do WE ($d = 3 \text{ mm}$) que é inferior à de SPCE comercial ($d = 4 \text{ mm}$, $V_{\text{CNT}} = 7,5 \mu\text{L}$). Foi possível estabilizar a gota de solução (75 μL) sobre o conjunto dos 3 eléctrodos, tanto no caso da solução de amostra como da solução de electrólito (Figura 30).

A janela de potencial utilizada nos ensaios electroquímicos também foi ajustada, considerando que o potencial do eléctrodo de referência não era igual ao dos SPCE comerciais. O potencial e o tempo de adsorção não foram modificados, tendo-se mantido os valores de 0 V e de 90 s.

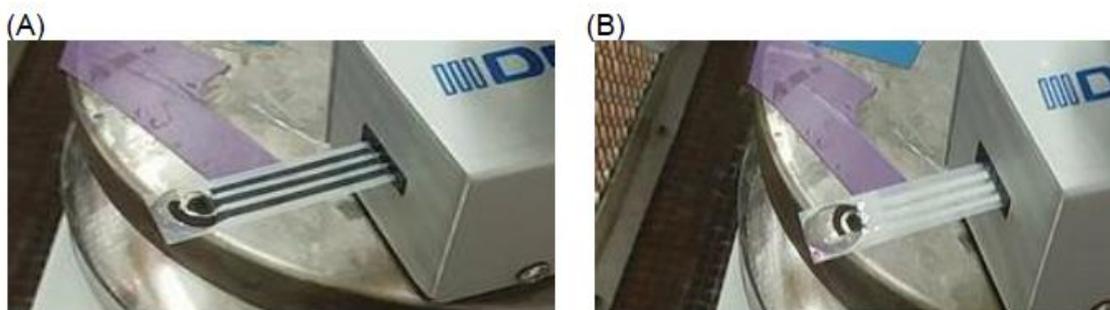


Figura 30. Fotografia dos protótipos produzidos em contacto com a solução durante a medição eletroquímica: (A) Protótipo A e (B) Protótipo B

Nas Figura 31 (A) e Figura 32 (A) encontram-se apresentadas as respostas dos sensores produzidos a partir das soluções padrão de ácido gálico usando os protótipos A e B, respetivamente. Estas respostas encontram-se representadas juntamente com as obtidas utilizando o SPCE comercial, todos modificados com CNT funcionalizados (Figuras 31 (B) e 32 (B)).

A comparação entre o desempenho dos sensores produzidos com o obtido por modificação do SPCE comercial foi efetuada através da sensibilidade das respostas de quatro soluções padrão de ácido gálico.

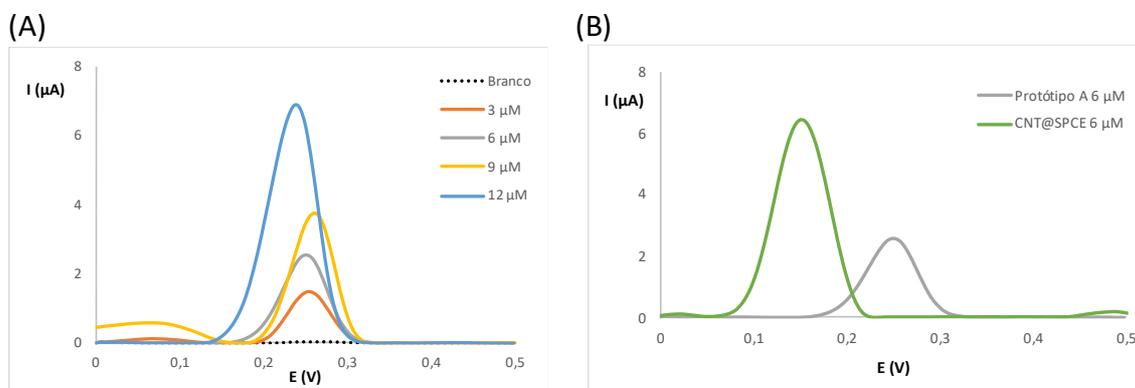


Figura 31. Voltamogramas de DPV ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_p = 100 \text{ mV}$, a potencial de adsorção 0 v durante 90 s) registados usando o protótipo A ($7,07 \text{ mm}^2$) modificado com CNT funcionalizados. (A) Soluções de ácido gálico de diferentes concentrações em ácido tartárico $0,032 \text{ M}$ e $\text{pH } 3,2$; (B) Comparação com a resposta de um CNT@SPCE comercial ($12,57 \text{ mm}^2$) numa solução $6 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido gálico em ácido tartárico $0,032 \text{ M}$ e $\text{pH } 3,2$

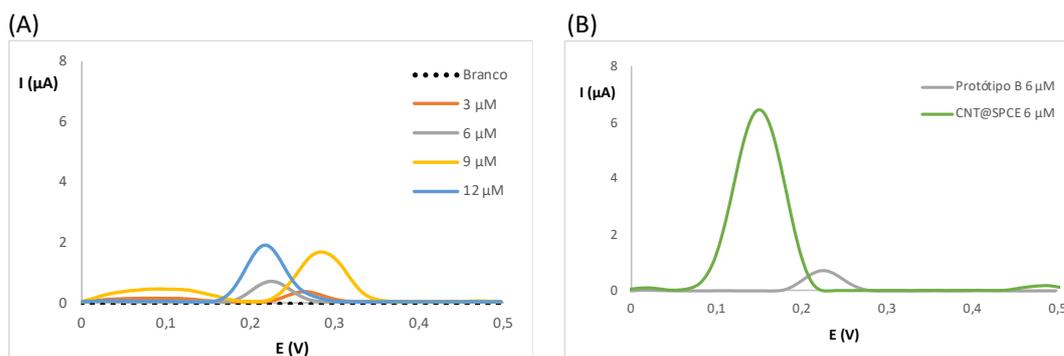


Figura 32. Voltamogramas de DPV ($\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $E_p = 100 \text{ mV}$, a potencial de adsorção 0 v durante 90 s) registados usando o protótipo B (7,07 mm²) modificado com CNT funcionalizados. (A) Soluções de ácido gálico de diferentes concentrações em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,2; (B) Comparação com a resposta de um CNT@SPCE comercial (12,57 mm²) numa solução 6 μM de ácido gálico em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,2

Apesar da forma dos voltamogramas obtidos com os protótipos produzidos ser semelhante às obtidas com o sensor de CNT@SPCE, a intensidade de corrente de pico e sensibilidades aparentam ser bastante diferentes.

A Figura 33 mostra as curvas de calibração resultantes de resposta por DPV em soluções de ácido gálico, de modo a caracterizar a resposta dos protótipos A e B, relativamente à sensibilidade e linearidade da resposta. Para cada concentração está apresentado apenas o resultado de uma única medição uma vez que as réplicas seguintes apresentavam valores muito discrepantes.

Para efeitos de referência, apresenta-se a curva de calibração obtida com um sensor preparado a partir de um SPCE comercial modificado com CNT (CNT@SPCE).

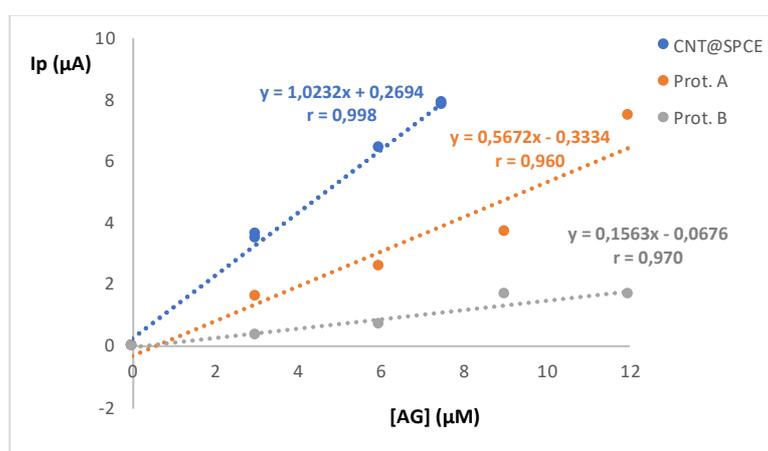


Figura 33. Curvas de calibração de ácido gálico para os três tipos de sensores, utilizando os resultados das medições de DPV apresentados na Figura 31 (A) e Figura 32 (A)

A Tabela 10 compara os dados de sensibilidade dos 2 protótipos com o obtido por modificação de um sensor comercial, CNT@SPCE, tendo em consideração a área de cada elétrodo de trabalho.

Tabela 10. Comparação entre os valores de sensibilidade da resposta dos sensores produzidos utilizando soluções padrão de AG e medições efetuadas por DPV (Figura 31 (A) e Figura 32(A))

	CNT@SPCE	Protótipo A	Protótipo B
Diâmetro (mm)	4	3	3
Sensibilidade (A/M)	1,0	0,57	0,16
Sensibilidade (A/M/mm²)	0,080	0,081	0,023
Desvio relativo da sensibilidade (%)	-	1	71

Os resultados indicam que os sinais medidos com os Protótipos A e B são inferiores aos obtidos com o CNT@SPCE e apresentam baixo valor de coeficiente de correlação. No entanto, quando a sensibilidade é normalizada para a área de elétrodo de trabalho, o Protótipo A tem sensibilidade igual à referência. A diferença observada não é exclusivamente devida à menor área do elétrodo de trabalho dos protótipos produzidos face à área dos SPCE comerciais, mas também devido à ausência de replicas para cada concentração. A sensibilidade expressa por unidade de área é cerca de 1 % superior, para os Protótipos A e 71 % inferior para os Protótipos B, relativamente à do CNT@SPCE. Assim, os resultados obtidos permitem verificar que a resposta do sensor produzido a partir do Protótipo A é a que mais se assemelha com a resposta obtida com o protótipo laboratorial (CNT@SPCE), tendo em conta a sensibilidade expressa por unidade de área.

Estes resultados demonstram que foi possível, apesar de uma taxa de sucesso baixa, produzir protótipos funcionais de sensores de polifenóis por *stencil-printing*.

3.4 Módulo de modificação de elétrodos comerciais

Os módulos de modificação para SPCE constituem uma abordagem alternativa à modificação direta da superfície do WE. Os módulos foram projetados de modo a conterem o material ativo (os CNT modificados), e poderem estabelecer contacto elétrico com a superfície do WE. Esta abordagem de modificação dos SPCE foi testada utilizando diferentes materiais e formas alternativas de contacto com o WE.

Como substratos, onde foram depositados os CNT, referem-se o celulósico (papel de filtro) e os poliméricos (espumas comerciais), para além dos testes efetuados usando camadas auto-sustentadas de CNT, vulgarmente denominadas por *bucky-paper*.

3.4.1 *Bucky-papers*

Os *bucky-papers* (BP) a ser acoplados ao eléctrodo de trabalho (WE) constituem um filme fino de nanotubos de carbono (CNT) enredados aleatoriamente e capaz de ser manuseado como um todo.

Os BP foram produzidos através de filtração por vácuo de suspensões de 1 mg/mL de CNT em água/metanol (1:1). Os BP foram produzidos utilizando máscaras que colocadas no sistema de filtração permitiu a formação de pequenos discos de 3 mm de diâmetro.

Esta abordagem baseada no uso dos BP não foi bem-sucedida uma vez que a sua baixa densidade não permitia que estes se mantivessem em contacto com o WE quando a solução era depositada sobre a superfície dos SPCE (Figura 34 (B)).

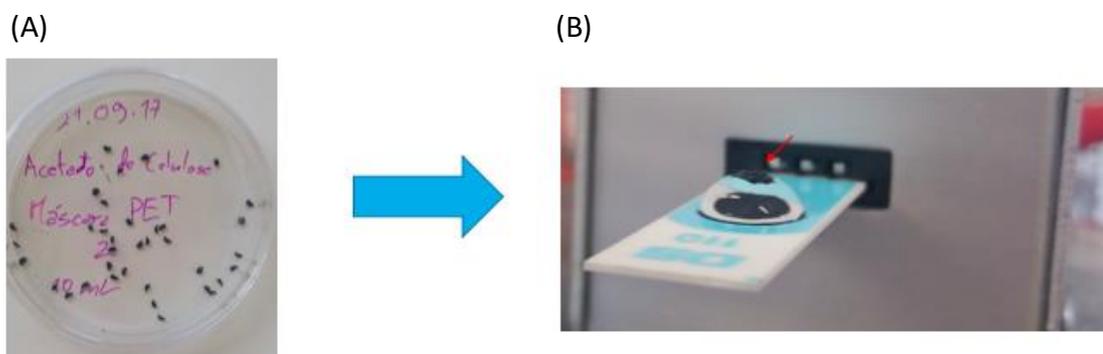


Figura 34. Esquema de aquisição de sinal analítico utilizando: (A) BP; a seta vermelha indica o BP flutuando em cima da gota de solução a analisar (B)

3.4.2 Módulo de modificação à base de substrato celulósico

Uma outra abordagem consistiu no desenvolvimento de um módulo de modificação baseado numa membrana celulósica delimitando a área do depósito dos os CNT por impregnação do material com uma cera. Assim, pequenos discos de dimensão igual ao eléctrodo de trabalho dos SPCE foram delimitados com lápis de cera e subsequentemente submetido a uma temperatura de 60 °C, numa estufa, de modo a espalhar e uniformizar a cera no papel. Uma folha contendo um conjunto de discos foi montada num dispositivo de filtração e sob vácuo, foi feita a deposição dos CNT (7,5 µL/disco) na área não coberta pela cera.

Após secagem, os módulos produzidos, foram testados seguindo o procedimento abaixo referido:

1. Adsorção dos polifenóis: o módulo foi mergulhado na solução padrão ou de amostra diluída contidas num recipiente do tipo *ependorf* num volume de 1 mL, durante um tempo fixo (5 minutos) com agitação mecânica (agitação manual do operador)

2. Medição dos polifenóis: o módulo foi colocado sobre o WE do SPCE de modo a que os CNT ficassem diretamente em contacto com este e evitando que tocasse com os restantes eléctrodos. A medição eletroquímica foi efetuada recorrendo a DPV, nas mesmas condições experimentais que as usadas nos ensaios reportados com o CNT@SPCE.

O modo de utilização do módulo está ilustrado na Figura 35 (A). As respostas obtidas por DPV utilizando o módulo encontram-se apresentadas na Figura 35 (B) comparativamente às obtidas com o SPCE modificado com CNT, para uma solução 3 µM de ácido gálico.

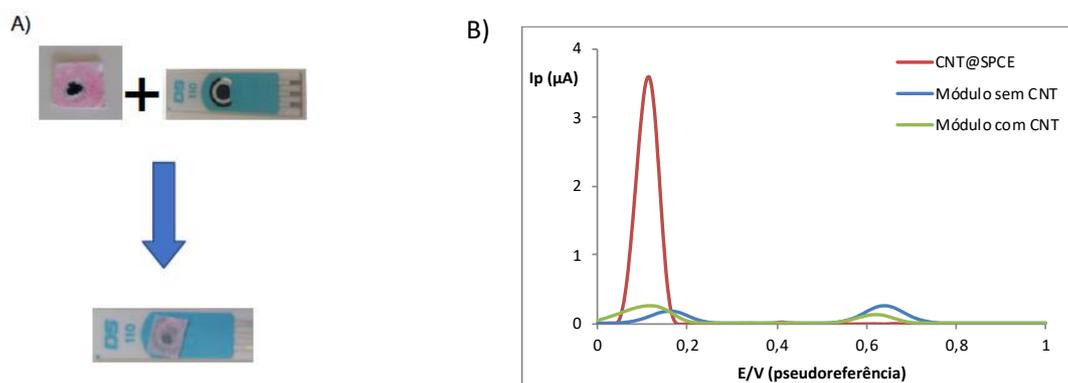


Figura 35. (A) Ilustração do modo de utilização do módulo; (B) Resultados obtidos por DPV utilizando o módulo na presença e ausência de CNT, comparativamente às obtidas com o SPCE modificado com CNT. Soluções de ácido gálico, de $3 \mu\text{M}$, adsorção 0 V durante 90 s

Os resultados apresentados na Figura 35 B mostram que voltamogramas obtidos recorrendo ao módulo com CNT é semelhante à obtida no módulo sem CNT (apresentando dois picos aproximadamente a $E_{p1} = 0,150 \text{ V}$ e $E_{p2} = 0,650 \text{ V}$, com uma menor sensibilidade face ao protótipo comercial, $0,09 \text{ AM}^{-1}$ face a $1,1 \text{ AM}^{-1}$ obtido com o SPCE). Estes resultados sugerem que o contacto entre os CNT do módulo e o WE do SPCE não foi conseguido.

A dificuldade de estabelecer o contacto poderá dever-se ao facto de haver tendência do módulo se libertar da superfície do SPCE. Este comportamento poderá dever-se à flutuabilidade do módulo.

3.4.3 Módulos de modificação à base de substrato polimérico

A fim de ultrapassar as desvantagens do módulo baseado em material celulósico foram utilizados substratos de outros materiais.

As espumas poliméricas podem constituir uma alternativa à celulose. Há uma grande diversidade deste tipo de materiais comercializados na forma de panos para aplicação em limpezas (Figura 36). No entanto, estes encontram-se impregnados de aditivos para manterem características visuais adequadas ao consumidor. A remoção de aditivos e outras impurezas presentes nas espumas foi necessária antes da sua utilização. Os processos efetuados neste tratamento que incluíram a extração por Soxhlet utilizando acetona como solvente com 8 e 30 ciclos de extração (Figura 37), repetidas lavagens com solução de ácido nítrico a 10 % e água oxigenada 30 volumes.



Figura 36. Exemplo de espumas utilizadas na produção do módulo



Figura 37. Extração por Soxhlet

A Figura 38 mostra a resposta voltamétrica por DPV dos módulos após 8 e 30 ciclos de extração por Soxhlet, mergulhados na solução de eletrólito. Após 30 ciclos de extração com o Soxhlet (100 mL de acetona), a resposta voltamétrica registada (para potenciais entre 0.5 e 0.7 V) apresentava intensidades de corrente mais baixas, indicando que a quantidade de impurezas presentes no polímero diminuiu drasticamente. O sinal registado a potenciais próximos de 0 V não sofreu qualquer diminuição. Não se identificou a origem deste sinal, que pode eventualmente corresponder a um grupo funcional da própria espuma ou de outro constituinte que não seja removido pelos tratamentos aplicados.

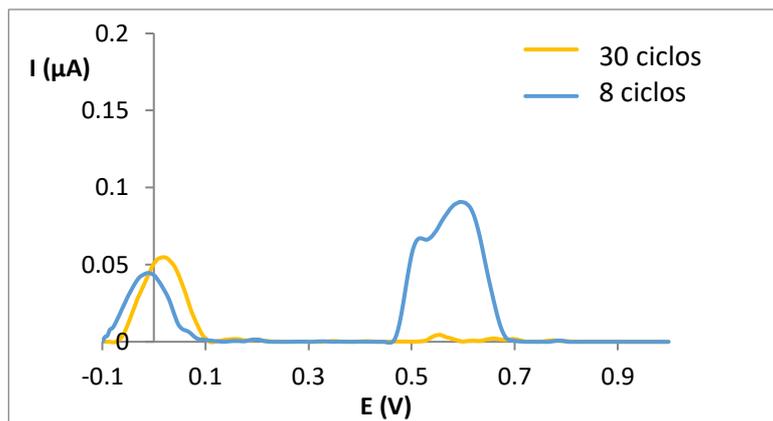


Figura 38. Resposta voltamétrica por DPV dos módulos após 8 e 30 ciclos de extração por Soxhlet, mergulhados na solução de eletrólito

Após os tratamentos de limpeza, a suspensão de CNT funcionalizados foi depositada sobre as espumas por *drop-casting* (com diferentes quantidades de CNT). Após a deposição dos CNT, as espumas foram secas na estufa a 60 °C. A Figura 39 apresenta uns módulos produzidos por *drop-casting*.

Apesar de todas as tentativas de imobilização dos CNT nas espumas adaptadas dos panos de limpeza da loiça, verificou-se que estes ficavam aglomerados formando uma espécie de “ilhas”, e que não comunicavam entre si, dificultando contacto elétrico com a superfície do WE.



Figura 39. Fotografia de módulos de modificação produzidos por *drop-casting*

Nos ensaios voltamétricos realizados foi ainda testado o efeito do tempo de adsorção na intensidade de corrente medida. Na Tabela 11 estão apresentados estes resultados obtidos com espumas modificadas com 40 µL de suspensão de CNT. Os resultados apresentados foram obtidos para uma solução padrão de ácido gálico 6 µM, e adsorção a 0 V.

Tabela 11. Efeito do tempo de adsorção na intensidade de corrente medida nas espumas modificadas com 40 μL de CNT e solução de ácido gálico 6 μM

Tempo de adsorção (s)	Intensidade de corrente do pico (μA)
90	0,097 (1ª)
	1,020 (2ª)
	Sinal muito ruidoso (3ª)
180	1. 3,665
	2.Sinal com ruído
	3. 1,784
270	1. 1,354
	2. 2,484
	3. 0,856

Apesar de todas as tentativas de otimização, foi extremamente difícil obter respostas voltamétricas reprodutíveis devido à dificuldade de manter o contacto entre os CNT do módulo com o WE do SPCE.

Foram ainda testados outros tipos de espumas comerciais destinados ao uso clínico/hospitalar. Estas espumas foram tratadas recorrendo a lavagens em solução de peróxido de hidrogénio 30 volumes e água ultrapura a fim de eliminar quaisquer impurezas.

Após as devidas lavagens, as espumas bolas de espumas, previamente cortadas, foram modificadas mergulhando-as na suspensão de 1 mg/mL de CNT funcionalizados num volume de 4 mL e submetidos ao banho de ultrassons durante 15 minutos. Posteriormente, as espumas foram secas na estufa a 60 °C durante a noite. Após secagem, estas espumas modificadas foram inseridas dentro de uma outra espuma, mas sem modificação (servindo apenas de base). A Figura 40 ilustra o módulo produzido.



Figura 40. Fotografia do módulo de modificação produzido

Antes de efetuar as medições voltamétricas, as espumas foram mergulhadas numa solução padrão de ácido gálico $6 \mu\text{M}$ (Figura 41 (A)) e foi realizada a adsorção dos polifenóis ao potencial de 0 V durante 90 s (Figura 41 (B)). A fim de evitar os problemas de mau contacto entre o módulo e o SPCE, as espumas depois de serem colocadas no SPCE são presas por uma mola e um filme de PET.

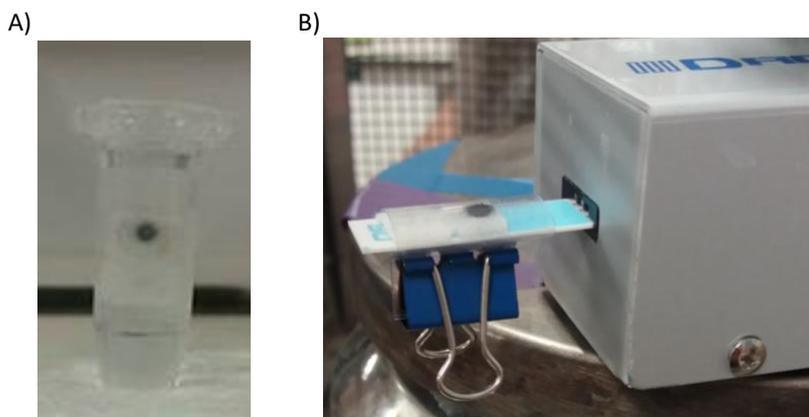


Figura 41. (A) Módulo de modificação em contacto com a solução de amostra; (B) Montagem do módulo sobre o SPCE comercial

Na Figura 42 compara-se a resposta voltamétrica obtida para uma solução padrão de ácido gálico $6 \mu\text{M}$ com módulo, com um SPCE não modificado e com um CNT@SPCE.

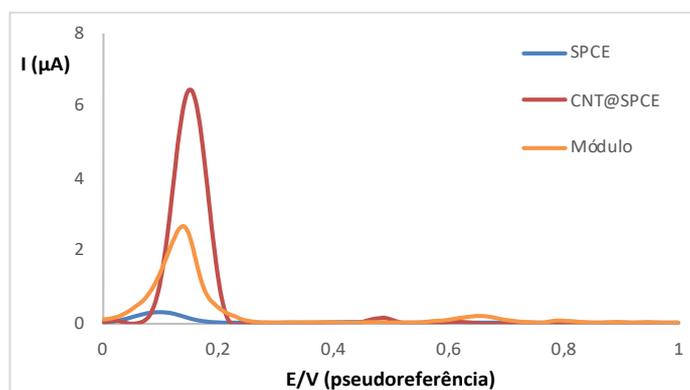


Figura 42. Comparação da resposta voltamétrica obtidos com um SPCE comercial, com um SPCE modificado com CNT (CNT@SPCE) e com o módulo numa solução de ácido gálico $6 \mu\text{M}$

A resposta obtida com o módulo apresenta intensidade de correntes de pico significativamente superiores à do SPCE, cerca de 8 vezes. Este resultado demonstra a eficiência do módulo na adsorção dos polifenóis e amplificação do sinal resultante da sua oxidação. A resposta do módulo representa 42 % do sinal obtido com o obtido com

o CNT@SPCE (que é o valor de referência para o qual temos o melhor desempenho em termos de constituição de sensor). Na Tabela 12 estão indicados os valores de intensidade de corrente de pico para cada sensor apresentado.

Tabela 12. Intensidade de corrente de pico para cada sensor apresentado numa solução de ácido gálico 6 μ M

Sensor	Intensidade de corrente de pico (μ A)
SPCE	0,3176
CNT@SPCE	6,424
Módulo	2,683

Foram efetuados vários estudos de repetibilidade, reprodutibilidade e influência de tempo de adsorção na intensidade de corrente medidos por DPV.

Depois de vários ensaios verificou-se os resultados obtidos não eram reprodutíveis, como também o tempo de adsorção não teve qualquer influência na melhoria destes resultados. Estes resultados estão indicados nas Tabela 13 e Tabela 14, respetivamente.

Tabela 13. Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade dos módulos, numa solução de ácido gálico 6 μ M, 0V e 90 s

Módulo	1	2	3	4
Ip (μA)	0,696	2,836	2,764	1,815
	0,468	4,150	3,780	2,055
	0,518	3,647	4,343	1,937
Desvio padrão (%)	12	66	80	12

Tabela 14. Estudo de influência de tempo de adsorção na otimização da resposta do sensor numa solução de ácido gálico 6 μ M e 0V

Tempo	0 s	90 s	180 s	270 s
Réplicas da Ip (μA)	0,4144	1,929	1,568	1,715
	0,2762	1,704	1,655	1,997
Média (μA)	0,35	1,82	1,61	1,86
Desvio padrão (%)	10	16	6	20

Os resultados reportados indicam que apesar deste módulo ser o mais eficiente de todos previamente abordados, através de várias tentativas não se conseguiu ultrapassar o problema de mau contacto entre os dois sensores e pouca reprodutibilidade dos mesmos. A otimização do módulo requer a realização de ensaios adicionais.

Capítulo 4

4. Conclusão

No âmbito deste projeto foram desenvolvidos sensores eletroquímicos seletivos de polifenóis com desempenho semelhante à dos protótipos laboratoriais (GCE, CNT@GCE, SPCE e CNT@SPCE) já testados. Os protótipos funcionais são sensores impressos por técnicas de *inkjet-printing*, *screen-printing* e *stencil-printing*, como também módulos de modificação de elétrodos comerciais (SPCE) em diferentes substratos (aglomerados de nanotubos de carbono, substrato celulósico e diferentes substratos poliméricos).

As variáveis experimentais da construção e operação do sensor CNT@SPCE foram otimizadas, nomeadamente a quantidade de CNT utilizada na modificação do elétrodo, tempo e potencial de adsorção, bem como o modo de aquisição do sinal. Deste modo, as condições escolhidas foram 7,5 µg/µL de CNT, adsorção realizada a 0 V durante 90 s e aquisição do sinal na solução padrão/ amostra.

Os resultados obtidos com os protótipos laboratoriais demonstraram que parâmetros como a natureza da técnica e do elétrodo influenciam os resultados. Apesar de existir uma boa correlação entre os resultados obtidos pelos diferentes sensores, os elétrodos de GCE e SPCE modificados com CNT apresentam melhores resultados comparando com os não modificados. Limites de deteção mais baixos (12 µM GCE versus 0,81 µM CNT@GCE e 5,5 µM SPCE versus 0,81 µM CNT@SPCE). Valores de sensibilidade mais elevados (0,49 A/M GCE versus 11 A/M CNT@GCE e 0,95 A/M SPCE versus 6,7 A/M CNT@SPCE). Percentagem de recuperação nas amostras de vinho mais elevada, para vinho branco (86 % GCE versus 109 % CNT@GCE e 80 % SPCE versus 125 % CNT@SPCE), para vinho tinto (74 % GCE versus 129 % CNT@GCE). No caso dos elétrodos de GCE, o valor do sinal é amplificado 22 vezes, enquanto que nos elétrodos de SPCE é apenas 7 vezes. Devido a elevada sensibilidade dos sensores modificados é possível analisar soluções de amostra de vinho muito diluídas (> 200 vezes), minimizando o efeito de matriz, diferenciando este método dos outros que têm pior seletividade para os compostos fenólicos. Estes resultados demonstram que a resposta voltamétrica dos polifenóis depende da interação com a superfície do elétrodo, que é maior nos sensores modificados.

Os resultados obtidos com os protótipos funcionais demonstraram a viabilidade da concretização do objetivo original que poderá conduzir à produção e comercialização destes sensores. No entanto, muitos parâmetros são passíveis de ser melhorados, particularmente no que diz respeito à construção dos sensores por *screen-printing*, *stencil-printing* e do módulo de modificação para sensores comerciais.

No primeiro caso, há necessidade de ultrapassar os problemas relacionados com o entupimento das telas e a impressão dos sensores por *stencil-printing* apresenta ainda algumas limitações no que diz respeito à reduzida taxa de sucesso. A baixa adesão entre o substrato e o molde não permitiu uma boa definição do desenho na maioria das impressões realizadas. A resolução deste problema requer a construção de um molde com uma robustez superior à do utilizado.

Relativamente ao módulo de modificação de sensores comerciais, há possibilidade de explorar a utilização de outras espumas com melhores características, com maior hidroflicidade e maior densidade, para otimizar o contacto do módulo com a solução de amostra e com a superfície do eléctrodo de trabalho.

Capítulo 5

5. Referências bibliográficas

1. K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, M. Valko, Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.* 345, 91–104, 2010
2. H. Sies, Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, *Experimental physiology* 82 (2): 291-5, 1997
3. A. L. B. S. Barreiros, J. P. David Stress oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* 29, 113–123, 2006
4. J. M. J. de Vos-Houben et al. Telomere length, oxidative stress, and antioxidant status in elderly men in Zutphen and Crete. *Mech. Ageing Dev.* 133, 373–377, 2012
5. M. de L. P. Bianchi, L. M. Antunes, G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* 12, 123–130, 1999
6. Site oficial da Fundação Portuguesa de Cardiologia, <http://www.fpcardiologia.pt/os-antioxidantes/>, visitado 22-10-2018
7. M. Inglez de Sousa, Vinho de mesa tinto: o prazer é todo seu. (Marco Zero, 2004)
8. J. Nogales-Bueno, J. M. Hernández-Hierro, Rodríguez-Pulido, F. J. & Heredia, F. J. Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: A preliminary approach. *Food Chem.* 152, 586–591, 2014

9. Regulamento (UE) No 251/2014 do parlamento Europeu e do conselho relativo à definição, descrição, apresentação, rotulagem e proteção das indicações geográficas dos produtos vitivinícolas aromatizados e que revoga o Regulamento (CEE) n.o 1601/91 do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia (2014)
10. E. Peynaud, J. Blouin, The Senses and How They Work. In: The Taste of Wine: The Art Science of Wine Appreciation. John Wiley & Sons, Inc., 15-27, 1996
11. L.F. Bisson, A.L. Waterhouse, S.E. Ebeler, M.A. Walker, J.T. Lapsley, The present and future of the international wine industry, *Nature* 418, 696-699, 2002
12. O. Pato, Vinho: sua preparação e conservação, 10th ed. Clássica editora, 1998.
13. S. Navarro, A. Barba, J. Oliva, Navarro, G. & Pardo, F. Evolution of Residual Levels of Six Pesticides during Elaboration of Red Wines. Effect of Wine-Making Procedures in Their. *Food Chem.* 47, 264–270, 1999
14. K.L. Sacchi, L.F. Bisson, D.O. Adams, A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 197-206, 2005
15. A. G. Saluegado, ENOLOGIA PRACTICA Conocimiento y elaboración del vino, 3rd ed. Mundi-Prensa, 1989
16. M. Gay, C. Apetrei, I. Navares, M. Del Almo, J. Zurro, N. Prieto, J. Saja, M. Rodríguez-Méndez, Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine, *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 22, pp. 6782–6788, 2010
17. C.P. Bondonno, K.D. Croft, N. Ward, M.J. Considine, J.M. Hodgson, Dietary flavonoids and nitrate: Effects on nitric oxide and vascular function. *Nutr. Rev.* 73, 216-235, 2015

18. L. Testai, Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sci.* 135, 68–76, 2015
19. Z. Xiao, L. Fang, Y. & Yu H Niu, Effect of cultivar and variety on phenolic compounds and antioxidant activity of cherry wine. *Food Chem.* 186, 69–73, 2015
20. M. Singh, M. Kaur & Silakari, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* 84, 206–239, 2014
21. M. B. Sánchez-Ilárduya, et al. Detection of non-coloured anthocyanin–flavanol derivatives in Rioja aged red wines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 121, 81–88, 2014
22. D. P. Makris, S. Kallithraka, & P. Kefalas, Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Compos. Anal.* 19, 396–404, 2006
23. C. Durães, Atividade antioxidante da catequina e análise comparativa com as vitaminas A e C, III Simpósio de Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário São Camilo, 2014
24. M. Rentzsch, A. Wilkens, P. Winterhalter, Non-flavonoid Phenolic Compounds. In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, 1-735, 2009
25. F. Fernandes, H. Salgado, Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification, *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 46 (3): 257–265, 2016
26. Thiago. Mattos, Mecanismos da ação de antioxidante dos ácidos cafeico e tânico em sistemas contendo íons ferro, Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2009

27. Leeuw, R. Van, Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O. & Dommes, J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *J. Food Compos. Anal.* 36, 40–50, 2014
28. A.L. Waterhouse, Determination of Total Phenolics, *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 11.1.1.-11.1.8, 2002
29. V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent,” *Methods Enzymol.*, vol. 299, no. 1974, pp. 152–178, 1998
30. D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, 2005
31. R.L Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302, 2005
32. A. Sánchez Arribas, M. Martínez-Fernández, M. Moreno, E. Bermejo, A. Zapardiel, and M. Chicharro, “Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes,” *Food Chem.*, vol. 136, no. 3–4, pp. 1183–1192, 2013
33. R. R. Watson, *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*, 1st ed. 2014
34. A. S. Arribas, M. Martínez-Fernández, and M. Chicharro, “The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 34, pp. 78–95, 2012
35. J. Hoyos-Arbeláez, M. Vázquez, and J. Contreras-Calderón, “Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review,” *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1371–1381, 2017

36. P. Monk, *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*, 1st ed. John Wiley and Sons, 2001
37. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed. John Wiley and Sons, 2001
38. G. A. Mabbail, An introduction to cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* 60, 697–702, 1983
39. S. Chevion, M. Roberts, M. Chevion, The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 860–870, 2000
40. J., Teixeira, A., Gaspar, E.M. Garrido, J. Garrido, F. Borges, Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *Biomed Res. Int.*, 2013
41. P. a Kilmartin, H. Zou, and A. L. Waterhouse, “A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 1957–1965, 2001
42. O. Makhotkina and P. A. Kilmartin, “Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 633, no. 1, pp. 165–174, 2009
43. A. Dhroso, S. Laschi, G. Marrazza, and M. Mascini, “A fast electrochemical technique for characterization of phenolic content in wine,” *Anal. Lett.*, vol. 43, no. 7, pp. 1190–1198, 2010
44. L. Xiaoyum, N. Yongnian, S. Kokot, Electrochemical cholesterol sensor based on cholesterol oxidase and MoS₂-AuNPs modified glassy carbon electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233, 100-106, 2016
45. V. Urbanova, A. Bakandristos, P. Jakubec, T. Szambo, R. Zboril, A facile graphene oxide based sensor for electrochemical detection of neonicotinoids, *Biosensors and Bioelectronics* vol.89, part 1, 532-537, 2017

46. C. I. S. Fernandes and M. J. F. Rebelo, "Polyphenolic Biosensors. Application in Red Wines," *Port. Electrochim. Acta*, vol. 27, no. 4, pp. 457–462, 2009
47. M. Rita Montereali, W. Vastarella, L. Della Seta, and R. Pilloton, "Tyrosinase biosensor based on modified screen printed electrodes: Measurements of total phenol content," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 85, no. 9–11, pp. 795–806, 2005
48. M. R. Montereali, L. Della Seta, W. Vastarella, and R. Pilloton, "A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 64, no. 3–4, pp. 189–194, 2010
49. R. Gusmão, E. Cunha, C. Paiva, D. Geraldo, F. Proença, and F. Bento, "Role of Carbonaceous Fragments on the Functionalization and Electrochemistry of Carbon Materials," *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 12, pp. 2138–2145, 2016
50. A. Filho, Funcionalização de nanotubos de carbono, *Quim. Nova*, vol. 30, No. 7, 1695-1703, 2007
51. J. Mettakoonpitak, K.Boehle, S.Nantaphol, P. Teengam, J.A. Adkins, M. Srisa-Art, C.S. Henry, *Electrochemistry on Paper-based Analytical Devices: A Review*, Wiley-vch *Electroanalysis*, 28, 1420-1436, 2016
52. R. Abdel-Hamid, E.F. Newair, Voltammetric determination of polyphenolic content in pomegranate juice using a poly(galic acid)/multiwalled carbon nanotube modified electrode, *Beilstein J Nanotechnol*, vol. 7, 1104-1112, 2016
53. B. Badhani, N. Sharma, and R. Kakkar, "Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 35, pp. 27540–27557, 2015

Capítulo 6

6. Anexos

Anexo 1. Análise voltamétrica da catequina e ácido tânico com SPCE e CNT@SPCE

Dada a complexidade de matriz dos vinhos, contendo compostos fenólicos de diferentes famílias, considerou-se importante testar a resposta do sensor desenvolvido com outros polifenóis, nomeadamente a catequina e o ácido tânico.

Foram traçados voltamogramas cíclicos para ambos os polifenóis usando o SPCE e o CNT@SPCE utilizando as condições experimentais idênticas às utilizadas na caracterização do ácido gálico.

Na Figura 43 estão representados os voltamogramas de catequina, 30 e 60 μM obtidos com um SPCE e 1,5 e 3,0 μM obtidos com um CNT@SPCE. Figura 44 representa voltamogramas do ácido tânico, 30 e 60 μM obtidos com um SPCE e 3,0 e 6,0 μM com um CNT@SPCE, respetivamente.

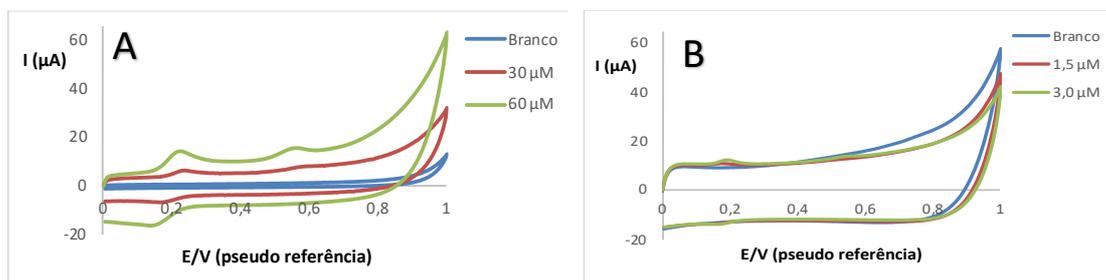


Figura 43. Voltamogramas obtidos em soluções padrão de catequina em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 utilizando: (A) SPCE e (B) CNT@SPCE

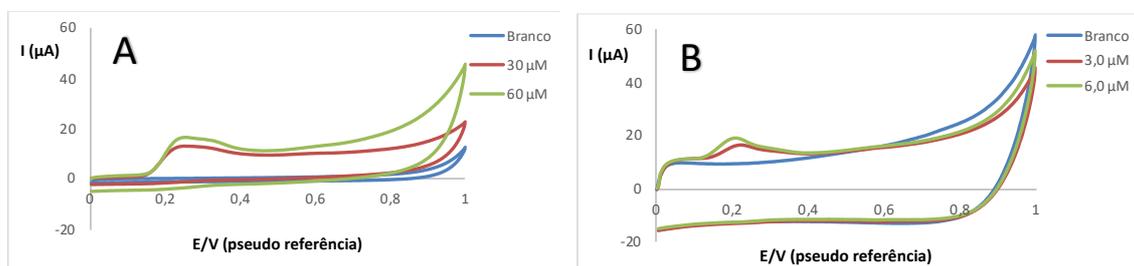


Figura 44. Voltamogramas obtidos em soluções padrão de ácido tânico em ácido tartárico 0,032 M e pH 3,20 utilizando: (A) SPCE e (B) CNT@SPCE

Os voltamogramas obtidos por CV para catequina com o SPCE apresentam 3 picos, dois picos que ocorrem no varrimento direto surgem aos potenciais $E_{p1} = 0,220$ V e $E_{p2} = 0,580$ V. O pico inverso surge ao potencial $E_{p3} = 0,180$ V. A presença do pico inverso na catequina sugere que o composto formado por oxidação pode ser reduzido, em oposição ao anteriormente observado no caso do AG.

No entanto, quando o SPCE é modificado com CNT o perfil dos voltamogramas cíclicos obtidos é idêntico ao anteriormente reportado para o ácido gálico. Em vez de 3 picos, surge apenas um único pico simétrico e de intensidade muito baixa que aparece no mesmo valor de potencial que AG $E_p = 0,200$ V. Simultaneamente, observa-se um aumento substancial da corrente capacitiva, associada à presença dos CNT na superfície do sensor. A interação entre a catequina e a superfície do eletrodo parece ser por adsorção e a presença de CNT na superfície do eletrodo contribui para o aumento da corrente capacitiva.

No caso de ácido tânico, o perfil dos voltamogramas é diferente. No SPCE, a corrente capacitiva é ligeiramente inferior e surge um único pico resultante de ocorrência de vários processos de oxidação em simultâneo, apresentando uma banda larga com um máximo ao de potencial a $E_p = 0,250$ V e sem pico inverso.

No CNT@SPCE, a tendência é semelhante ao AG, também surge um pico a $E_p = 0,200$ V, mas ligeiramente alargado do lado direito. Este comportamento poderá ser devido à presença de cinco moléculas de ácido gálico terminais na estrutura molecular do ácido tânico. A interação entre o ácido tânico e a superfície do eletrodo parece ser por adsorção e a presença de CNT na superfície do eletrodo contribui para o aumento da corrente capacitiva.