

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Programa de Pós-Graduação em Química

Ana Paula Mota Ferreira

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE ELETRODO DE
GRAFITE PIROLÍTICO MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE
COBALTO**

São Luís
2012

Ana Paula Mota Ferreira

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE ELETRODO DE
GRAFITE PIROLÍTICO MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE
COBALTO**

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

Orientador: Prof. Dr. Auro A. Tanaka

São Luís

2012

Ana Paula Mota Ferreira

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO SOBRE ELETRODO DE GRAFITE
PIROLÍTICO MODIFICADO COM FTALOCIANINA DE COBALTO**

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

Aprovada em 03/07/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Auro A. Tanaka (Orientador) UFMA

Prof. Dr. Edmar Pereira Marques UFMA

Prof. Dr. Gilberto Maia UFMS

São Luís

2012

Dedico este trabalho ao nosso Senhor Jesus Cristo e sua mãezinha Maria, a meus pais, Maria Lélia e Carlos, a meu esposo Jocyfran, a minha irmã Aline e ao meu sobrinho Arthur e toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as coisas boas que eu vivo e sei que o bem apenas dele é que vem.

A meu esposo Jocyfran Pontes, sem dúvida, foi um dos maiores colaboradores em todos os sentidos.

A meus pais, Maria Lélia e Carlos Humberto, por todo amor, apoio, educação e a minha irmã Aline e ao meu sobrinho Arthur que eu amo tanto.

Ao meu orientador Prof. Auro A. Tanaka, por todos seus ensinamentos que serviram para ampliar meu horizonte e por sua disponibilidade sempre que precisava.

Aos meus amigos do LELQ, em especial a Fernanda Nunes, Geasi Soares, Leandro Lima, Newton Ribeiro e Ubiranilson por sua atenção e seu carinho.

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

Agradeço a Capes pela bolsa concedida.

E a todos que contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

Sim, a Sabedoria é um espírito que ama os homens, mas não deixará sem castigo o blasfemador pelo crime de seus lábios, porque Deus lhe sonda os rins, penetra até o fundo de seu coração, e ouve as suas palavras. Com efeito, o Espírito do Senhor enche o universo, e Ele, que tem unidas todas as coisas, ouve toda voz.
Sabedoria 1, 6-7

RESUMO

O ácido lipóico, também conhecido como ácido tióctico, é um composto organosulfurado derivado do ácido octanóico, que é um ácido graxo saturado. É um antioxidante que apresenta a propriedade de reprimir radicais livres tanto em meio lipídico quanto aquoso, o que o diferencia dos demais antioxidantes. Atualmente, diferentes técnicas são empregadas para a determinação do ácido lipóico tais como eletroforese capilar, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência. Contudo a detecção eletroquímica é um método promissor, pois uma vez que é menos trabalhosa e pode distinguir entre o oxidado e a forma reduzida de ácido lipóico. Um número crescente de estudos vem mostrando a necessidade de um procedimento rápido para a avaliação do teor de ácido lipóico e técnicas eletroquímicas foram empregadas com sucesso. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um eletrodo de grafite pirolítico modificado com metaloftalocianinas de cobalto para a determinação de ácido lipóico. A oxidação do ácido lipóico apresenta um pico localizado em torno de 0,8V vs ECS, estando próximo dos potenciais de pico apresentados na literatura. Os voltamogramas cíclicos registrados na presença de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido lipóico em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), para uma velocidade de varredura do potencial de 25 mV s^{-1} , mostraram que o eletrodo modificado com $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ CoPc, apresentou perfis voltamétricos melhores em relação ao eletrodo não modificado ou modificado com outras metaloftalocianinas. Aperfeiçoou-se então os parâmetros para as técnicas de voltametria cíclica, pulso diferencial e cronoamperometria. Construíram-se então as curvas analíticas para as técnicas citadas. Para a técnica de voltametria cíclica os limites de detecção e de quantificação são $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para a técnica de cronoamperometria $9,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e para voltametria pulso diferencial são $3,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

Palavras Chave: Ftalocianina de cobalto, ácido lipóico, sensor eletroquímico.

ABSTRACT

Lipoic acid, also known as thiocetic acid is a compound organosulfur derived from octanoic acid, which is a saturated fatty acid. It is an antioxidant that has the property of suppressing free radicals in both aqueous and lipid environment, which differs from other antioxidants. Nowadays, various techniques are employed for determining the lipoic acid such as capillary electrophoresis, chromatography, high performance liquid chromatography efficiency. However, the electrochemical detection is a promising method, because since it is less labor intensive and can distinguish between the oxidized and reduced form of lipoic acid. A growing number of studies has shown the need for a rapid procedure for evaluating the content of lipoic acid and electrochemical techniques were employed successfully. This study aimed to develop a pyrolytic graphite electrode modified with cobalt metallophthalocyanines for the determination of lipoic acid. The oxidation of lipoic acid has a peak located at approximately 0.8 V vs SCE, being close to the peak potential presented in the literature. The cyclic voltammograms reported in the presence of $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ of lipoic acid in phosphate buffer 0.1 mol L^{-1} (pH 7.0) to a potential scan rate 25 mV s^{-1} showed that the electrode modified with $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ CoPc, showed better profiles in relation to the voltammetric electrode unmodified or modified with other metallophthalocyanine. Is then optimized the parameters for the cyclic voltammetry, chronoamperometry and differential pulse. Was then constructed curves for analytical techniques mentioned. For the cyclic voltammetry technique limits of detection and quantification are $8.7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and $2.9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ for the technique of chronoamperometry $9.8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and $3.2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and differential pulse voltammetry are $3.4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ and $1.2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ respectively.

Keywords: cobalt phthalocyanine, lipoic acid, electrochemical sensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ácido Alfa-Lipóico	20
Figura 2	Estrutura da ftalocianina na forma ácida (H ₂ Pc)	24
Figura 3	Estrutura de uma metaloftalocianina (MPc), onde M representa um metal	24
Figura 4	Potenciostato utilizado para as medidas eletroquímicas	30
Figura 5	Célula Eletroquímica com entrada para três eletrodos	31
Figura 6	Eletrodo de grafite pirolítico (GP)	32
Figura 7	Voltamogramas Cíclicos do eletrodo GP saturado em N ₂ em 0,1 molL ⁻¹ de Tampão Fosfato (-) sem CoPc e (-) com CoPc, v = 0,50 V s ⁻¹	39
Figura 8	Voltamogramas Cíclicos do eletrodo GP modificado com CoPc, saturado com N ₂ em 0,1 mol L ⁻¹ de Tampão fosfato pH (7,0) em diferentes velocidades de : 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6 V s ⁻¹	40
Figura 9	Voltamogramas Cíclicos do eletrodo GP modificado com CoPc, saturado com N ₂ em 0,1 mol L ⁻¹ de Tampão fosfato pH (7,0) em diferentes velocidades de : 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6 V s ⁻¹ . Relação do potencial de pico da corrente e a velocidade de varredura.	41
Figura 10	Voltamogramas cíclicos de ácido lipóico 1 mM em tampão fosfato pH 7,0 para v = 25 mV s ⁻¹ com eletrodo de GP modificado com diferentes ftalocianinas.	42
Figura 11	Voltamogramas cíclicos: (a) branco em tampão fosfato (pH 7,0) (b)1mM de ácido α-lipóico em tampão fosfato (pH 7,0) OPG (c) 1 mM de ácido lipóico em tampão fosfato (pH 7,0) CoPc/GP, v = 25 mVs ⁻¹ .	45
Figura 12	Gráfico da dependência da corrente de pico com a concentração de CoPc em 1mM de ALA em tampão fosfato pH 7,0 para v = 50 mV s ⁻¹ , saturado com N ₂ .	47
Figura 13	Gráfico da dependência da corrente de pico com o tempo de adsorção de CoPc na superfície do eletrodo de GP em 1mM de AL em tampão fosfato pH 7,0 para v = 50 mV s ⁻¹ saturado com N ₂ .	48
Figura 14	Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura de potencial para a oxidação de ácido lipóico 1,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução de tampão fosfato pH (7,0), saturada com N ₂ , empregando-se CoPc/GP a 25 °C.	49
Figura 15	Gráfico da dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura.	51
Figura 16	Gráfico da dependência de potencial de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.	52
Figura 17	Esquema da Reação de oxidação do Ácido Alfa-Lipóico	52
Figura 18	Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes concentrações de ácido lipóico em solução de tampão fosfato pH (7,0), saturada com N ₂ , empregando-se CoPc/GP, v = 50 mVs ⁻¹	53
Figura 19	Gráfico da dependência da corrente de pico com a concentração de ácido lipóico.	54
Figura 20	Voltamogramas cíclicos 3D para a oxidação de ALA sobre eletrodo de GP modificado com CoPc em solução tampão BR	55

	0.1mol L ⁻¹ em diferentes pH's contendo 1mM de ALA, saturada com N ₂ .	
Figura 21	Influência do pH sobre o potencial de pico para 1mM de ALA conduzidas em 0,1 molL ⁻¹ de solução tampão fosfato, pH 7,0.	56
Figura 22	Voltamogramas cíclicos de ALA 1 mM em tampão fosfato pH 7,0 para $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ com eletrodo de GP modificado com diferentes eletrólitos.	57
Figura 23	Voltamogramas cíclicos empregando-se o OPG/CoPC em diferentes concentrações de ácido lipóico($1,99 \times 10^{-6}$ a $9,09 \times 10^{-5}$) em Tampão Fosfato pH, saturado com N ₂ , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.	60
Figura 24	Curva analítica empregando-se o GP/CoPC em diferentes concentrações de ácido lipóico ($1,99 \times 10^{-6}$ a $9,09 \times 10^{-5}$) em Tampão Fosfato pH 7 0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.	61
Figura 25	Cronoamperograma registrado com o eletrodo GP/CoPC para adições sucessivas de alíquotas de 20 μL de uma solução de AL $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução tampão fosfato (pH 7), saturada com N ₂ . Potencial aplicado: 0,9 V vs ECS.	63
Figura 26	Curva analítica construída a partir das correntes extraídas do cronoamperograma da figura 25.	64
Figura 27	Voltamogramas de pulso diferencial para o ácido lipóico em diferentes amplitudes, freqüência = 200 ms, $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$	66
Figura 28	Voltamogramas de pulso diferencial para o ácido lipóico em diferentes velocidades, freqüência = 200 ms, amplitude = 0,8 V.	68
Figura 29	Influência do tempo de duração do pulso sobre a corrente de pico de ALA com uma velocidade de varredura do potencial de $0,025 \text{ V s}^{-1}$ e uma amplitude de pulso de 0,8 V	69
Figura 30	Voltamogramas de Pulso Diferencial empregando-se o OPG/CoPC em diferentes concentrações de ácido lipóico($4,99 \times 10^{-7}$ a $1,96 \times 10^{-5}$) em Tampão Fosfato pH 7,0 saturado com N ₂ , $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 80 mV e freqüência de 200 ms.	70
Figura 31	Curva analítica obtida a partir da Fig. 24 empregando-se o OPG/CoPC em diferentes concentrações de ácido lipóico ($4,99 \times 10^{-7}$ a $1,96 \times 10^{-5}$) em Tampão Fosfato pH 7, saturado com N ₂ , $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 80 mV e freqüência de 200 ms.	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Parâmetros utilizados para a obtenção das medidas voltamétricas pela técnica de voltametria cíclica.	35
TABELA 2	Parâmetros utilizados para a obtenção das medidas amperométricas.	35
TABELA 3	Parâmetros utilizados para a obtenção das medidas voltamétricas pela técnica de voltametria pulso diferencial.	36
TABELA 4	Potências de corrente de pico do H ₂ Pc, FePc, ZnPc, NiPc, CuPc e CoPc adsorvidas sobre eletrodos de GP. Nas condições experimentais: $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.	44
TABELA 5	Densidade de corrente referentes a diferentes pH sobre o sinal analítico do sensor na oxidação de ácido lipóico. Medidas conduzidas em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura: $0,05 \text{ V s}^{-1}$.	56
TABELA 6	Influência do tampão sobre resposta analítica (μA) do sensor para ácido lipóico. Medidas conduzidas em tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7.0). Velocidade de varredura: $0,05 \text{ V s}^{-1}$.	58
TABELA 7	Estudo da repetibilidade do eletrodo GP/CoPc para uma solução de ácido lipóico em solução tampão Fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.	58
TABELA 8	Estudo da reprodutibilidade do eletrodo GP/CoPc para uma solução de $5,66 \times 10^{-5}$ de AL em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH (7,0)	59
TABELA 9	Resultados da repetibilidade e da reprodutibilidade para o ALA sobre o eletrodo de GP/CoPc em solução tampão Fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH (7,0)	59
TABELA 10	Influência da amplitude sobre a resposta analítica (μA) do sensor para ácido lipóico. Medidas conduzidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} .	67
TABELA 11	Resultados de ALA para as técnicas de Voltametria Cíclica, Cronoamperometria e Voltametria de Pulso Diferencial.	75

LISTA DE SIGLAS

ECS	Eletrodo de calomelano saturado
Pt	Platina
GP	Grafite Pirolítico
CV	Carbano Vítreo
ALA	Ácido α -Lipóico
Ep	Potencial de Pico
Ip	Corrente de Pico
BR	Britton Robinson
CoPc	Ftalocianina de Cobalto
ZnPc	Ftalocianina de zinco
CoPc	Ftalocianina de cobalto
CuPc	Ftalocianina de cobre
NiPc	Ftalocianina de níquel
FePc	Ftalocianina de ferro
GP	Grafite pirolítico
EQM's	Eletrodo quimicamente modificados
μ A	Microampére
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
VC	Voltametria Cíclica
CRONO	Cronoamperometria
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial

EQUAÇÃO

EQUAÇÃO 1	50
EQUAÇÃO 2	50
EQUAÇÃO 3	58
EQUAÇÃO 4	72
EQUAÇÃO 5	73
EQUAÇÃO 6	73

SUMÁRIO

1.0	CAPITULO 1	17
	INTRODUÇÃO	
1.1	Radicais Livres.....	18
1.2	Antioxidante.....	18
1.3	Ácido Lipóico.....	19
1.4	Eletrodos Quimicamente Modificados.....	21
1.5	Sensores Eletroquímicos.....	23
1.6	Desenvolvimento de Sensores a Base de Metaloftalocianina.....	23
1.7	Técnicas Eletroanalíticas.....	25
1.7.1	Voltametria Cíclica.....	26
1.7.2	Cronoamperometria.....	27
1.7.3	Voltametria de Pulso Diferencial.....	27
1.8	Objetivos.....	28
2.0	CAPITULO 2	29
	PARTE EXPERIMENTAL	
2.1	Instrumentação.....	30
2.2	Célula eletroquímica e eletrodos.....	31
2.3	Pré - Tratamento e modificação das superfícies dos eletrodos de GP.....	32
2.4	Reagentes e Soluções.....	34
2.4.1	Preparo de Soluções.....	33
2.5	Metodologia do Trabalho.....	34
2.5.1	Teste de eletroatividade.....	34
2.5.2	Variação da concentração hidrogeniônica.....	34
2.5.3	Escolha da melhor técnica para a oxidação de ácido alfa lipóico.....	35
2.6	Medidas Voltamétricas.....	35

3.0	CAPITULO 3	37
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1	Propriedades redox e adsorptivas do grafite pirolítico.....	38
3.2	Estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite pirolítico modificado com FePc, NiPc, CuPc, ZnPc, H ₂ Pc e CoPc.....	41
3.3	Eletroatividades dos eletrodos GP e GP/CoPc para a oxidação de AL em solução aquosa meio neutro.....	44
3.3.1	Estudo da concentração e do tempo de adsorção de CoPc sobre o eletrodo de grafite pirolítico.....	46
3.3.2	Efeito da velocidade de varredura de potencial sobre a resposta voltamétrica do CoPc/GP para uma solução de ácido lipóico.....	48
3.4	Variação da Concentração de Ácido α -Lipóico.....	53
3.5	Variação da concentração hidrogênica do meio.....	54
3.6	Variação do eletrólito suporte.....	57
3.7	Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	58
3.8	Construção da curva analítica por VC.....	59
3.9	Cronoamperometria.....	62
3.10	Voltametria de Pulso Diferencial.....	65
3.11	Variações da amplitude de pulso.....	65
3.12	Variações da velocidade de varredura do potencial.....	67
3.13	Variações do tempo de duração do pulso.	69
3.14	Construção da curva analítica por VPD.....	70
3.15	Tratamentos estatísticos dos dados analíticos.....	72
3.16	Comparações das condições analíticas do método proposto com valores reportados na literatura para a detecção eletroanalítica de ALA em soluções aquosas.....	75
3.17	Escolha da melhor técnica eletroquímica	76
4	CAPITULO 4	77
	CONCLUSÕES	

4	Conclusões.....	78
4.1	Sugestão para trabalhos futuros.....	79
5	CAPITULO 5	80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1



INTRODUÇÃO

1.1 RADICAIS LIVRES

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres [1]. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais [2].

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares [3]. Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese [4].

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação [5,6].

1.2 ANTIOXIDANTE

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos [7]. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” [8].

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos [7]. Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos [9]. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidas [10].

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais [11].

1.3 ÁCIDO α -LIPÓICO

O ácido α -lipóico (Fig. 1), fórmula $C_8H_{14}O_2S_2$ - 206,04 g.mol⁻¹, é uma substância sólida de cor amarela nas condições ambientes. Também conhecido como ácido tióico, é um composto organosulfurado derivado do ácido octanóico, que é um ácido graxo saturado. Sua estrutura é constituída de uma cadeia de 8 carbonos que possui em uma das extremidades uma carboxila como grupo funcional e na outra, um anel ditiolano, com início no carbono 6. O anel ditiolano consiste de um anel heterociclo de cinco membros que contém dois átomos de enxofre vizinhos. [12, 13,14].

É um antioxidante que apresenta a propriedade de reprimir radicais livres tanto em meio lipídico quanto aquoso, o que o diferencia dos demais antioxidantes [14]. Em sua forma lipoamídico, ele funciona como um cofator para o complexo multienzimático que catalisa a descarboxilação oxidativa de α -cetoglutarato e α -cetoácidos de cadeia ramificada na mitocôndria [15]. A capacidade antioxidante está localizada no grupamento tiol, que reage diretamente com os radicais oxidantes que podem ser de valor terapêutico em patologias relacionadas à superprodução de radicais livres [16].

Nutricionalmente, o ácido α -lipóico é encontrado no germe de trigo, no levedo de cerveja e na carne vermelha. Contudo, a dieta dos mamíferos não provê quantidades suficientes de ácido lipóico para uma significativa ação antioxidante [17,18]. Este ácido aumenta o fluxo sanguíneo para os nervos e melhora a condução dos impulsos nervosos, sendo indicado no tratamento de problemas neurológicos como dormências e formigamentos de qualquer origem, não apenas os decorrentes do diabetes [19].

O ácido α -lipóico é utilizado como antioxidante em misturas racêmicas de suplementação alimentar de atletas, em dermatologia para prevenir os efeitos do envelhecimento, no tratamento das doenças associadas ao estresse oxidativo, como a polineuropatia diabético, a esclerose múltipla, Alzheimer e demências relacionadas [16]. Pode atuar como um tampão na terapia do câncer, onde as drogas utilizadas são conhecidas promotoras do estresse oxidativo, quer diretamente, como um limpador do radical livre ou indiretamente, devido a sua ação sinérgica com outros antioxidantes [19].

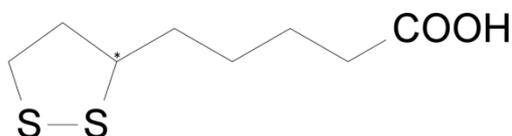


Figura 1 - Ácido α -lipóico

O ácido α -lipóico livre tem a habilidade de capturar radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e peroxinitro. Ele também protege as membranas interagindo com vitamina C e glutathione, que por sua vez recicla a vitamina E. Uma das indicações básicas do ácido α -lipóico é no tratamento de lesões neurológicas, inclusive a neuropatia diabética, uma complicação tardia do diabetes que provoca dor e perda da sensibilidade nos membros [20, 21,22].

Atualmente, técnicas são empregadas para a determinação do ácido α -lipóico como eletroforese capilar [21], cromatografia gasosa [23], cromatografia líquida de alta eficiência [24], contudo a detecção eletroquímica [12] é um método promissor, pois uma vez que é menos trabalhosa e pode distinguir entre o oxidado a

forma reduzida de ácido lipóico [13]. Um número crescente de estudos vem mostrando a necessidade de um procedimento rápido para a avaliação do teor de ácido lipóico e técnicas eletroquímicas foram empregadas com sucesso.

O uso de um mediador para modificar a superfície do eletrodo como a ftalocianina é de grande importância. A ftalocianina é um complexo de coloração azulada e foi inicialmente estudada por Linstead em 1933 [25,26]. As ftalocianinas constituem uma importante classe de catalisadores e são compostos que apresentam uma variedade de aplicação. As metaloftalocianinas são utilizadas principalmente como agente modificador de eletrodo por terem atividade eletrocatalítica a diferentes reações importantes e na determinação eletrocatalítica de muitos herbicidas, carboidratos, amins alifáticas entre outros [27]. Na área de eletrocatalise, as metaloftalocianinas possuem uma larga aplicação na modificação de superfícies de eletrodos [28].

1.4 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

O termo “Eletrodos Quimicamente Modificados” (EQM's) foi primeiramente utilizado na eletroquímica por Murray e colaboradores, na década de 70, com o intuito de designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente mobilizadas na superfície desses dispositivos, com o objetivo de pré-estabelecer e monitorar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, a fim de controlar sua reatividade e/ou seletividade, sendo desta forma usada para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até a transferência de elétrons em moléculas de interesse [29].

A utilização de EQM's é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e de métodos de modificação de superfície de eletrodos, como: na utilização de cerâmicas, filmes de metal-hexacianoferrato e macromoléculas [30,31], o que visa ampliar e potencializar as aplicações destes dispositivos que, em muitos casos, já estão disponíveis no mercado, como os sensores eletroquímicos, conhecidos como “relógios” para

monitoramento de glicose, muito utilizados por diabéticos e atletas [32], da mesma forma que os existentes para uréia.

Desta forma, avanços tecnológicos na área de EQM's encontram aplicações nas mais variadas áreas de atuação, como exemplo, na saúde pública (hospitais), indústrias de alimentos e bioprocessos e área ambiental onde sensores com rápida detecção, alta sensibilidade e especificidade são requisitos importantes [33].

Um EQM consiste de um eletrodo base (substrato) e uma camada do modificador químico. Este substrato deve apresentar características que dependem tanto do tipo de modificador (mediador redox) quanto do método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podem ser citados a platina, ouro, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono, grafite pirolítico e pasta de carbono. Os substratos menos usuais são o carbono vítreo reticulado, material plástico condutor e vidros condutores. A variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um grande campo de atuação destes dispositivos [34].

O uso de camadas de agentes modificadores sobre a superfície do eletrodo tem sido a forma mais comum de modificar a superfície de um eletrodo. De forma geral, os métodos mais importantes utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base consistem em adsorção irreversível direta, que é uma incorporação simples e rápida de compostos sobre eletrodos base, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos, dentre outros [35].

Em processos eletrocatalíticos como na oxidação ou redução de uma molécula reagente que possui uma cinética de transferência de elétrons lenta na superfície do eletrodo, a modificação química de um eletrodo pode acelerar a troca de elétrons entre o eletrodo e a espécie envolvida ou, até mesmo, antecipar o início da reação, reduzindo o sobrepotencial de ativação [36,37].

Além disso, o ato de imobilizar uma determinada substância na superfície de um eletrodo representa um artifício simples e eficaz para o desenvolvimento de procedimentos e técnicas eletroanalíticas mais eficientes, permitindo obter maior

sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, e maior estabilidade ao sistema quando comparado aos eletrodos base [37].

Dentre as espécies químicas utilizadas como agentes modificadores de superfícies eletródicas, os macrociclos de metais de transição particularmente, as metaloftalocianinas e metaloporfirinas têm se destacado devido às suas potencialidades de aplicação em eletroanálise e eletrocatalise [38].

1.5 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Os sensores eletroquímicos representam a classe que mais se destaca dentre os sensores químicos. Esses sensores onde o transdutor é eletroquímico podem ser de íon-seletivo, metálico, de carbono, de vidro, entre outros. Idealmente, um sensor promove certo tipo de resposta diretamente relacionada com a quantidade de uma espécie química específica. São indicados para detectar e responder ao analito em estado sólido, líquido ou gasoso. [37].

Os sensores possuem um papel já bem estabelecido na determinação de vários analitos de interesse industrial, clínico, ambiental e farmacológico. Neste aspecto, eletrodos quimicamente modificados são particularmente adequados não apenas para determinações analíticas, mas também para a investigação de processos e mecanismos físico-químicos tanto de espécies orgânicas como inorgânicas [35].

Todavia, um desafio para a área Eletroanalíticas é o desenvolvimento de sensores eletroquímicos estáveis e com alto grau de seletividade, possibilitando a construção de dispositivos portáteis e de fácil manipulação, como por exemplo, os sensores para glicose e ureia [39].

1.6 DESENVOLVIMENTOS DE SENSORES A BASE DE METALOPTALOCIANINA

O termo “ftalocianina” é originado da composição dos termos gregos “nafta” (óleo de pedra) e “cyanine” (azul escuro), sendo primeiramente usado em 1933 por Linstead para se referir a uma classe de compostos orgânicos com coloração azul intenso [40]. Todd e

seus colaboradores [41] propuseram um estudo com as estruturas das ftalocianinas (Pc), onde identificaram a ftalocianina como um sistema de anel com quatro unidades isoladas unidas por átomos de nitrogênio e com dois átomos centrais de hidrogênio, a ftalocianina na sua forma ácida (H_2Pc), (Fig.2). Os dois átomos de hidrogênio centrais da estrutura podem ser substituídos por uma variedade de metais e metalóides para a formação das metaloftalocianinas (Fig. 3). Tais complexos são altamente coloridos e usualmente insolúveis em solventes comuns, porém possuem uma leve solubilidade em solventes aromáticos com elevado ponto de ebulição.

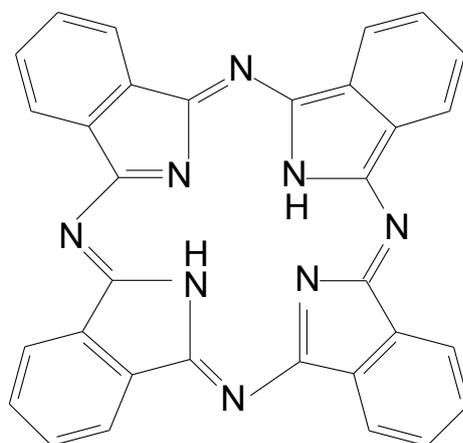


Figura 2: Estrutura da ftalocianina na forma ácida (H_2Pc)

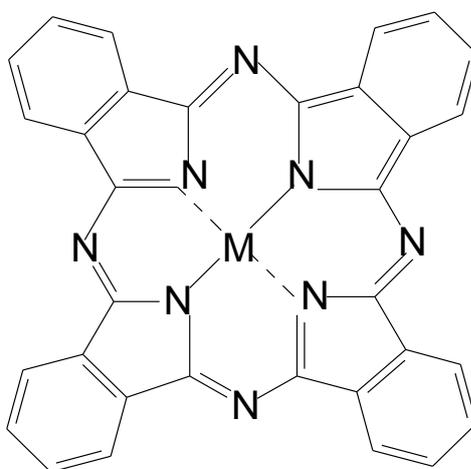


Figura 3: Estrutura de uma metaloftalocianina (MPc), onde M representa um metal

Metalofalocianinas são compostos versáteis que se adsorvem muito fortemente sobre as superfícies de carbono e grafite em níveis de monocamadas [42,43]. Esses eletrodos modificados exibem atividade eletrocatalítica para uma grande variedade de reações eletroquímicas de interesse prático, como as reações de redução de oxigênio e peróxido de hidrogênio [44,45], dióxido de carbono [46,47] e oxidações de mercaptanas, hidrazina, cisteína, íons nitrito e óxido nítrico [48,49].

Zagal [36] e Moser e Thomas [50] afirmam que a atividade catalítica está relacionada com a natureza do metal central na ftalocianina onde os orbitais moleculares externos da molécula reagente interagem com os orbitais externos localizados no metal central, facilitando a transferência de elétrons entre as moléculas. A atividade catalítica da ftalocianina adsorvida pode, então, ser correlacionada com a densidade de elétrons localizados no metal central e com o potencial formal dos pares redoxes correspondentes [51,52].

Estudos envolvendo metalofalocianinas também despertam grande interesse dos pesquisadores e indústrias devido à diversidade de suas aplicações, especialmente como corantes em tecidos, plásticos, superfícies metálicas e em tintas de escrever [42,44]. Além disso, o emprego das metalofalocianinas tem se expandido para várias áreas comerciais como o desenvolvimento de sensores e biossensores químicos, discos de computadores óticos, polímeros condutores e metais moleculares [53, 54].

1.7 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas (técnicas eletroquímicas) vêm sendo cada vez mais utilizadas em diferentes conhecimentos, tais como Medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química [41, 54, 55], com o objetivo de proporcionar informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas de substâncias. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização para a modificação de eletrodos, exemplificam algumas das aplicações das técnicas eletroanalíticas [56].

Uma das mais importantes características é que tais técnicas possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma grandeza elétrica como: corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroanalíticas são adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesse nas diferentes de áreas de estudo [57].

Desta maneira, as técnicas eletroanalíticas surgem como uma ferramenta importante para análise de compostos orgânicos e inorgânicos. Estas técnicas podem ser resumidas como a resposta da variação de corrente que circula pelo circuito elétrico em função de uma dada variação de potencial aplicada ao eletrodo de trabalho². A principal vantagem destas técnicas é a possibilidade da medida ser feita diretamente na amostra sem separações prévias [58].

Esta vantagem, aliada ao curto tempo na realização das análises, ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados em comparação aos Métodos Cromatográficos e principalmente, à sensibilidade que as técnicas eletroanalíticas apresentam em relação à presença de interferentes, fez com que a esta metodologia começasse a ser utilizada na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e alimentos [59].

1.7.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica é uma técnica vantajosa para fins qualitativos que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície [56]. Essa técnica é classificada como dinâmica e é muito versátil, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial, e também é capaz de avaliar processos de oxidação e redução, reversibilidade, mecanismo de reações redox, formação de intermediários, adsorção sobre eletrodos etc. Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no

eletrodo de trabalho, ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar.

1.7.2 CRONOAMPEROMETRIA

Outra técnica voltamétrica bastante utilizada para estudar reações de eletrodo e suas velocidades é a cronoamperometria. Neste sentido, esta técnica é normalmente empregada para complementar a voltametria cíclica na análise de mecanismos eletroquímicos.

A cronoamperometria consiste no monitoramento da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado potencial ao sistema investigado. Para as medidas amperométricas o potencial aplicado tem uma importante influência sobre a resposta do sensor, devido o mesmo contribuir para a sensibilidade do sistema [60].

A cronoamperometria também é muito utilizada em eletroanálise, principalmente em aplicações envolvendo titulações amperométricas, sensores amperométricos e medições em fluxo. Uma grande vantagem da cronoamperometria é que, sendo uma técnica conduzida o potencial constante, a corrente residual obtida apresenta valores muito baixos. Uma vez que o potencial do eletrodo é mantido em um único valor fixo, a corrente capacitiva (resultante do carregamento da dupla camada elétrica do eletrodo) torna-se constante, virtualmente igual a zero [61].

1.7.3 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, onde a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso. Estas correntes são subtraídas, já que a

primeira apresenta a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é, fundamentalmente, a contribuição da corrente faradaica e, então, plotadas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana. Esta técnica é mais sensível que a de pulso normal, isto porque ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido.

Na voltametria de pulso diferencial o efeito da velocidade de varredura e amplitude de pulso são parâmetros muito importantes, pois eles podem influenciar diretamente na sensibilidade do sistema [62].

1.8 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi determinar o ácido lipóico com eletrodos de grafite pirolítico (GP) modificados com ftalocianina de cobalto (CoPc), assim como desenvolver um método de trabalho para a detecção. Para isto seguiu-se as etapas abaixo:

Estudo das propriedades redox e verificação das respostas eletroquímicas dos eletrodos de grafite pirolítico não modificado e modificado com ftalocianinas na ausência e na presença de ácido lipóico.

Estudo dos melhores parâmetros voltamétricos envolvidos na voltametria cíclica: pH, potencial de associação, eletrólito suporte e tempo de vida da fase receptora para a detecção de ácido α -lipóico com eletrodos CoPc/GP.

Estabelecimento da melhor técnica voltamétrica para a determinação de ácido lipóico.

Determinação dos limites de detecção e quantificação e repetibilidade da metodologia proposta.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo, são apresentados a instrumentação, os materiais e os reagentes utilizados nos testes de eletroatividade e no desenvolvimento de metodologia de análise para o alfa ácido lipóico. Serão também apresentadas as metodologias de trabalho empregadas.

2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos voltamétricos foram realizados no potenciostato modelo μ autolab-2 da Ecochemie acoplado a um computador dotado de uma interface GPES (Fig. 4) e utilizando as técnicas de voltametria cíclica, cronoamperometria e voltametria de pulso diferencial.

As pesagens foram feitas em uma balança analítica Kern de modelo 410, com precisão de 0,0001g.

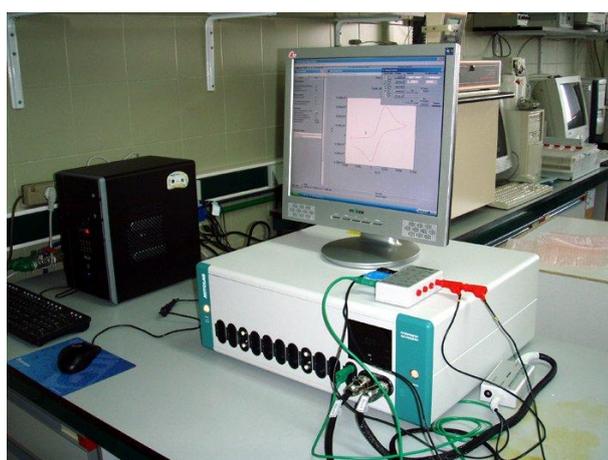


Figura 4: Potenciostato utilizado para as medidas eletroquímicas

Para ajustes da concentração hidrogeniônica foi utilizado um pH metro modelo Analyser de modelo pH 300 contendo um eletrodo acoplado de vidro, diariamente calibrado com com tampões comerciais de pH 4, 7 e 10 (Merck). Um sistema de banho ultrasom foi utilizado para possíveis partículas de carbeto de silício provenientes do processo de polimento que ficam impregnadas na superfície do eletrodo.

2.2 CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica (Fig. 5) confeccionada em vidro Pyrex com capacidade de 10 mL, contendo os eletrodos: o eletrodo de referência ECS (eletrodo de calomelano saturado) contendo KCl 3,0 mol L⁻¹, eletrodo auxiliar de platina (Pt) e o eletrodo de trabalho de grafite pirolítico (GP- Fig. 6), com área geométrica de 0,2 cm².

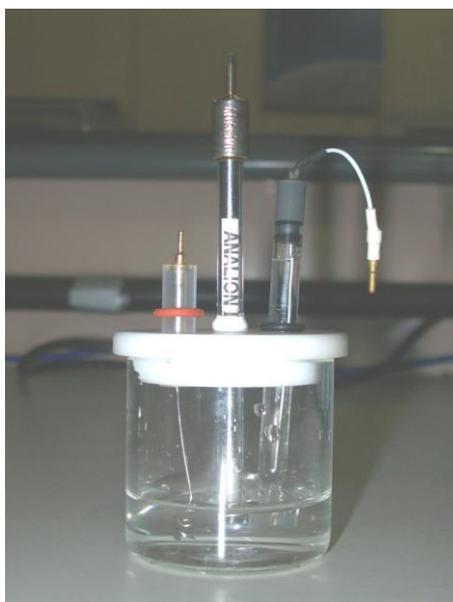


Figura 5: Célula Eletroquímica com entrada para três eletrodos



Figura 6: Eletrodo de grafite pirolítico (GP)

2.3 PRÉ-TRATAMENTO E MODIFICAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DOS ELETRODOS DE GP

Para a obtenção de uma superfície ativa e reprodutível, o eletrodo GP foi submetido a um polimento manual, em lixa 2000 e em suspensão de alumina com granulação 0,3 μm . Em seguida, o eletrodo foi lavado com água purificada, e, posteriormente, levado para um sistema de banho ultra-som por três minutos, para a remoção de impurezas da superfície do eletrodo.

Após a remoção das partículas no banho de ultra-som o método para a modificação do eletrodo GP com as metalofalocianinas (CoPc, NiPc, FePc, CuPc e ZnPc) ou H_2Pc foi o da adsorção irreversível. Primeiramente o eletrodo foi imerso em solução contendo $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de metalofalocianina ou H_2Pc em dimetilsulfoxi por durante 20 minutos sob agitação. Em seguida, o eletrodo modificado foi removido da solução, lavada com água purificada e imerso, imediatamente, na solução eletrolítica.

2.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e preparados com água purificada num sistema Milli-Q da Millipore.

Durante os experimentos, toda vidraria utilizada passou por um procedimento de limpeza para assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos ou metálicos que pudessem interferir nas análises. Para isto, antes de cada experimento a vidraria foi submetida a uma limpeza com permanganato de potássio por cerca de trinta minutos, e, depois com solução piranha (H_2SO_4 : H_2O_2 , v: v) por cerca de dez minutos e posteriormente lavado com água destilada, antes de cada experimento.

Antes de cada análise, as soluções eletrolíticas foram desaeradas por borbulhamento com N_2 do tipo 5.0 – Gases especiais da White Martins S. A. (São Luís-MA) por aproximadamente 10 minutos, para a eliminação da interferência causada pelo oxigênio nas curvas corrente-potencial. As soluções de ácido lipóico foram preparadas diariamente antes de cada experimento.

2.4.1 PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução de CoPc: a solução foi preparada pela dissolução de 0,0005 g em 10 mL de dimetilsulfoxi.

Solução de Ácido α -lipóico: a solução foi prepara pela dissolução de 0,0412 g em 200 mL de tampão fosfato.

Solução Tampão Fosfato: a solução foi preparada pela mistura 250 mL de uma solução KH_2PO_4 0,1 mol L^{-1} , preparada pela dissolução de 3,4022 g de KH_2PO_4 em água, com 250 mL de uma solução K_2HPO_4 0,1 mol L^{-1} , preparada pela dissolução de 4,3545 g de K_2HPO_4 (Merck) em água.

Solução Alcalina de Permanganato de Potássio: foram dissolvidos 3,0 g de KOH (Merck) em 1 (um) litro de água e adicionou-se 1,5 g de KMnO_4 (Merck).

Solução “Piranha” (H_2SO_4 : H_2O_2 3:1 v/v): num balão volumétrico de 1.000 mL de capacidade, 200,0 mL de H_2SO_4 (Merck) concentrado foram adicionados cuidadosamente a 150,0 mL de H_2O_2 (Merck) num banho de gelo e em seguida, o volume foi completado para 1000 mL com água.

Solução Tampão Britton Robinson: a partir de uma mistura de solução $0,1\text{mol L}^{-1}$ formada pelos ácido acético, fosfórico e bórico, seguido pela adição de NaOH 2 mol L^{-1} de modo a obter o valor do pH desejado (medido no pH metro).

Solução tampão de fosfato de potássio- hidróxido de sódio: a solução foi preparada pela mistura de 50 mL de H_2PO_4 $0,1\text{ mol L}^{-1}$ com 29,63 mL de NaOH $0,1\text{ mol L}^{-1}$.

Solução tampão de McIlvaine: a solução foi preparada pela mistura de 16,47 de Na_2HPO_4 $0,1\text{ mol L}^{-1}$, com 3,53 g de ácido cítrico $0,1\text{ mol L}^{-1}$.

Solução tampão de Sörensen: a solução foi preparada pela mistura de 30,0 mL de uma solução Na_2HPO_4 $0,066\text{ mol L}^{-1}$, com 20,0 mL de uma solução de KH_2PO_4 $0,066\text{ mol L}^{-1}$.

2.5 METODOLOGIA DO TRABALHO

Durante o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação Eletroanalíticas de qualquer espécie, devem-se avaliar as condições experimentais (eletroatividade, concentração hidrogeniônica do meio e voltamétricas) em que é possível obter a melhor resposta, tanto em termos de intensidade de corrente quanto em perfil voltamétrico. Assim, inicialmente algumas etapas são seguidas para o desenvolvimento do trabalho.

2.5.1 TESTE DE ELETROATIVIDADE

A eletroatividade do antioxidante ácido α -lipóico foi testada utilizando eletrodos de GP não modificado e modificado com CoPc em solução de tampão fosfato $0,1\text{mol L}^{-1}$, com a técnica de voltametria cíclica.

2.5.2 VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO HIDROGENIÔNICA

A concentração hidrogeniônica do eletrólito foi variada a partir de uma mistura de solução $0,1\text{mol L}^{-1}$ formada pelos ácidos acético, fosfórico e bórico, seguido pela adição de $\text{NaOH } 2\text{ mol L}^{-1}$ de modo a obter o valor do pH desejado (medido no pH metro).

2.5.3 ESCOLHA DA MELHOR TÉCNICA PARA A OXIDAÇÃO DE ÁCIDO ALFA LIPÓICO

Visando ampliar a sensibilidade do método, a oxidação do ácido alfa lipóico sobre eletrodo de GP/CoPc foi investigada pela técnica de voltametria cíclica, cronoamperometria e voltametria de pulso diferencial.

2.6 MEDIDAS VOLTAMÉTRICAS

Os voltamogramas foram registrados de acordo com os parâmetros da Tabela 1, utilizando-se como eletrólito suporte, solução tampão fosfato (pH 7,0).

TABELA 1: Parâmetros utilizados para a obtenção das medidas voltamétricas por voltametria cíclica.

PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO DE VALOR
Potencial Inicial	0,45 V
Potencial Final	1,0V
Velocidade de Varredura	0,05 V/s

TABELA 2: Parâmetros utilizados para a obtenção das medidas voltamétricas por amperometria.

PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO DE VALOR
Potencial Aplicado	0,9 V

TABELA 3: Parâmetros utilizados para a obtenção das medidas voltamétricas por voltametria pulso diferencial.

PARÂMETROS	ESPECIFICAÇÃO DE VALOR
Amplitude	0,8 V
Frequência	200 mV s ⁻¹
Velocidade de Varredura	25 mV s ⁻¹

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos com o teste de eletroatividade do alfa ácido α -lipóico (ALA) utilizando eletrodo de grafite pirolítico (GP) sem modificação e modificado com ftalocianina de cobalto, e também os resultados da otimização dos parâmetros experimentais e voltamétricos. Os resultados obtidos foram otimizados para análises de parâmetros relacionados ao comportamento eletroquímico do ALA sob diferentes condições experimentais.

Desenvolveu-se uma metodologia eletroanalítica para a análise de ALA e construiu-se uma curva de trabalho em eletrólito suporte preparado com água purificada, onde os limites de detecção e quantificação foram calculados.

Os resultados serão apresentados e discutidos posteriormente.

3.1 PROPRIEDADES REDOXES E ADSORTIVAS DO GRAFITE PIROLÍTICO

As propriedades adsortivas do GP através do método de adsorção irreversível com o uso da técnica de voltametria cíclica (VC).

O comportamento voltamétrico típico do eletrodo de GP liso e modificado com ftalocianina de cobalto em uma solução aquosa de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, saturado com nitrogênio (N_2) está ilustrado na figura 7 para uma velocidade de varredura de $0,50 \text{ V s}^{-1}$.

O voltamograma cíclico de coloração preta corresponde ao eletrodo de GP não modificado com ftalocianina de cobalto que se encontra em uma ampla faixa de potencial sem a presença de picos voltamétricos, indicando que as correntes observadas são de naturezas puramente capacitivas, ou seja, não envolvem transferência de carga.

O voltamograma cíclico (—) em solução aquosa de Tampão Fosfato pH 7,0, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ saturado em N_2 , para o eletrodo de GP pré-tratado com lixa 2000 e modificado por adsorção em uma solução de dimetilsulfoxi contendo $\text{CoPc } 1 \times 10^{-4}$

mol L^{-1} . Esta figura mostra que após a adsorção de CoPc, o eletrodo apresentou um par de picos voltamétricos bem definidos em $-0,60 \text{ V}$. De acordo com estudos anteriores, esses picos podem ser atribuídos à presença do centro metálico e estão associados com o processo redox envolvendo Co Pc (II) Pc / Co (I) [36,45]. Estes picos são bem intensos e visíveis durante o segundo e subseqüentes varreduras, provavelmente devido à otimização do filme da ftalocianina de cobalto que pode ser observado na figura 7.

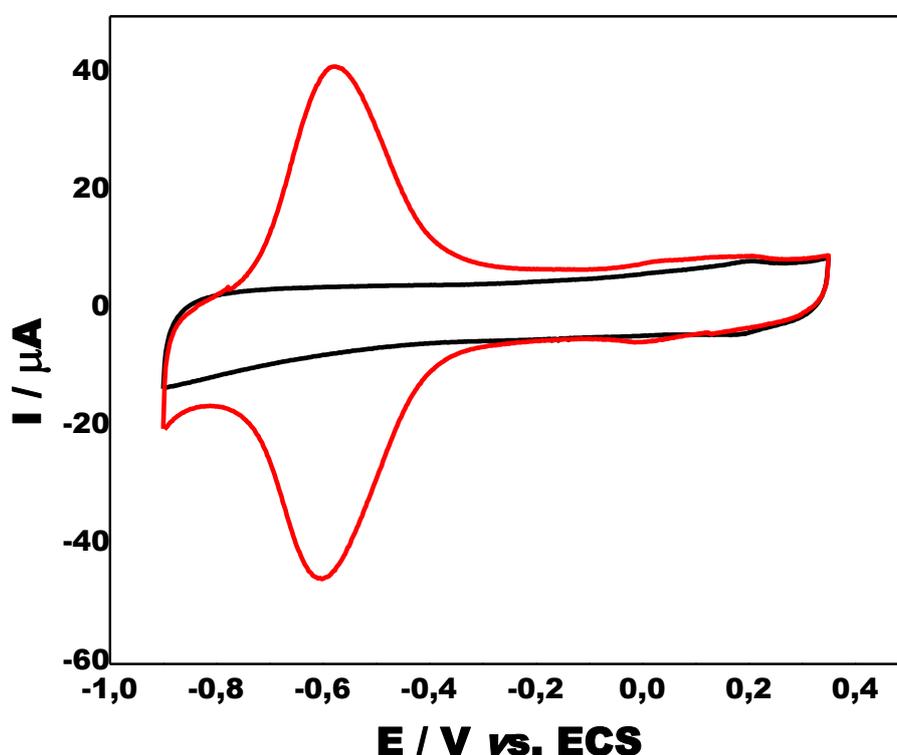


Figura 7: Voltamogramas Cíclicos do eletrodo GP saturado em N_2 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Tampão Fosfato (—) sem CoPc e (—) com CoPc pH (7,0), $v = 0,50 \text{ V s}^{-1}$

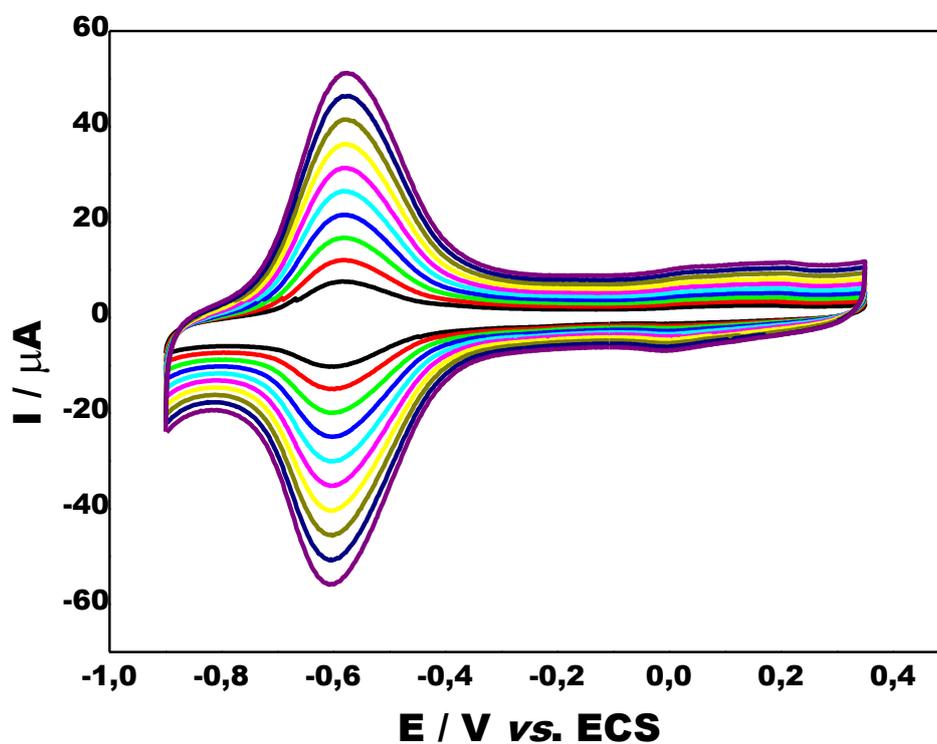


Figura 8: Voltamogramas Cíclicos do eletrodo GP modificado com CoPc, saturado com N_2 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Tampão fosfato pH (7,0) em diferentes velocidades de : 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6 V s^{-1}

Estudos envolvendo diferentes taxas de varredura demonstrou um excelente comportamento da ftalocianina. Trata-se de um processo redox reversível envolvendo apenas a espécie adsorvida (Fig.8). A relação linear entre a taxa de varredura e o potencial de corrente de pico foi observada entre 150 e 600 mVs^{-1} (Fig.9).

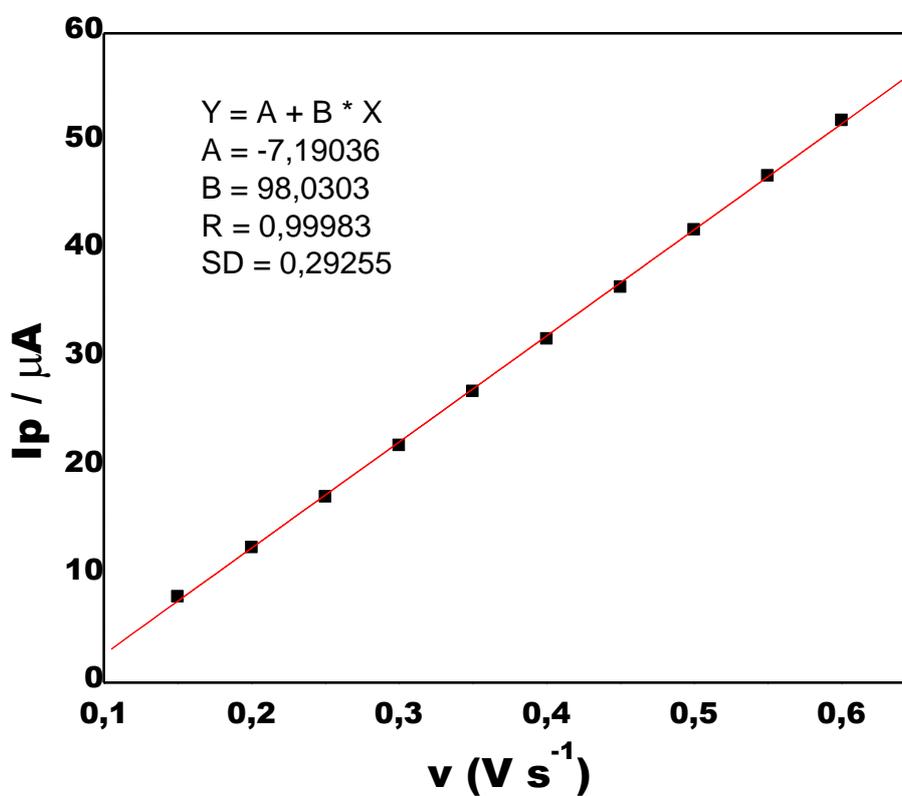


Figura 9: Gráfico do eletrodo GP modificado com CoPc, saturado com N₂ em 0,1 mol L⁻¹ de Tampão fosfato pH 7,0 em diferentes velocidades de : 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6 V s⁻¹. Relação do potencial de pico da corrente e a velocidade de varredura.

3.2 ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO ELETRODO DE GRAFITE PIROLÍTICO MODIFICADO COM FePc, NiPc, CuPc, ZnPc, H₂Pc e CoPc.

Com a finalidade de escolher o melhor eletrodo para a determinação de ALA (C₈H₁₄O₂S₂), experimentos voltamétricos foram realizados utilizando eletrodo modificado FePc/GP, NiPc/GP, CuPc/GP, ZnPc/GP, H₂Pc/GP e CoPc/GP (Fig. 10) em solução tampão fosfato (pH 7,0) 1 mM de ácido α-lipóico, saturada com N₂, no intervalo de potencial de 0,45 a 1,0 V, com uma velocidade de varredura de potencial (v) de 25 mV s⁻¹ vs ECS.

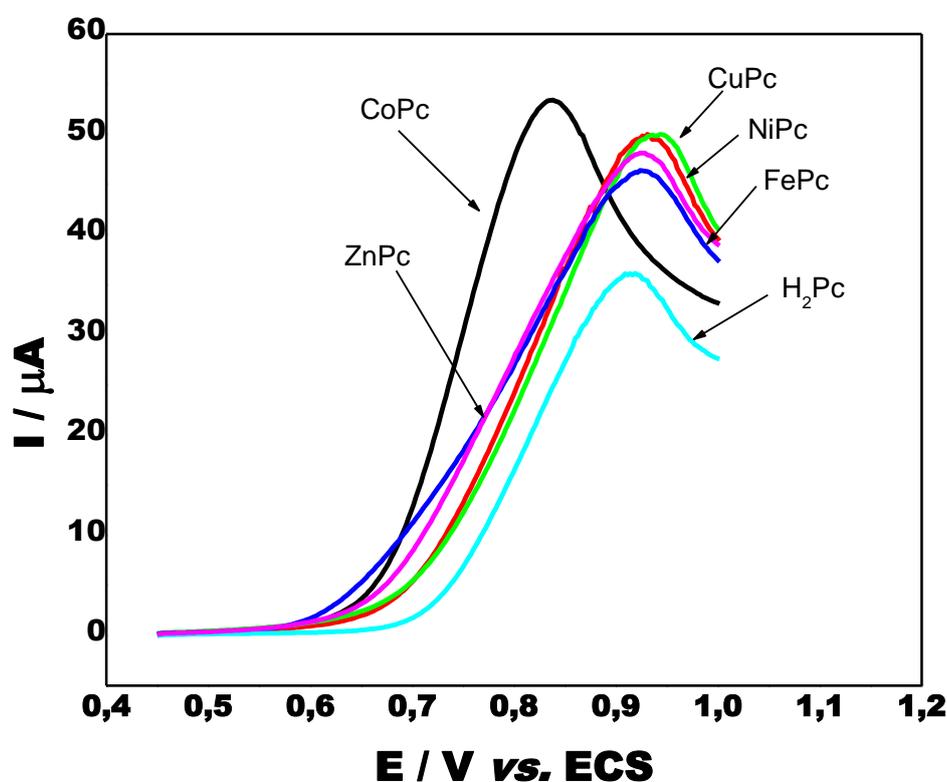


Figura 10: Voltamogramas de varredura linear de ácido α -lipóico 1 mM em tampão fosfato pH 7,0 para $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ com eletrodo de GP modificado com diferentes ftalocianinas.

Pelo voltamograma obtido na figura 10 foi observado que o eletrodo GP modificado com H_2Pc , varrido em um intervalo de potencial de 0,45 a 1,0 V vs ECS apresentou um pico voltamétrico não bem definido, provavelmente associado ao processo redox envolvendo o anel macrocíclico desta estrutura da ftalocianina [49] e o pico se deslocou para potenciais mais positivos em torno de 0,91 V e uma magnitude de corrente de $35,71 \mu\text{A}$ provavelmente pelo pH utilizado .

O voltamograma cíclico do eletrodo de GP modificado com FePc , varrido em um intervalo de potencial de 0,45 a 1,0 V vs ECS, mostrou que o antioxidante ALA se oxida em potenciais próximos a 0,92 V e uma densidade de corrente de $46,27 \mu\text{A}$ na presença de 1mM de ALA, ou seja se oxida em potenciais mais positivos assim como a ftalocianina ácida.

Para a determinação de ALA utilizando GP modificado com NiPc varrido no mesmo intervalo de potencial que as demais ftalocianinas foi observado um pico de oxidação do analito em torno de 0,92 V e densidade de corrente de 49,82 μA . Utilizando-se o eletrodo de GP modificado com ZnPc nas mesmas condições anteriormente citada constatou-se um pico na varredura anódica próximo a 0,92 e uma densidade de corrente de 48,14 μA , assim como as outras ftalocianinas não apresentou um pico voltamétrico bem definido. Pelo voltamograma registrado utilizando-se GP modificado com CuPc, apresentou comportamento similar ao demais eletrodos, porém em potencial mais positivo em torno de 0,94 V e uma densidade de corrente de 50,31 μA .

Após a modificação dos eletrodos GP com CoPc (Fig. 10) este apresentou potencial de oxidação menos positivo. Este resultado mostra claramente que o eletrodo de GP/CoPc apresentou melhor perfil voltamétrico e corrente com magnitude mais acentuada, indicando uma maior sensibilidade, isto é uma maior atividade eletrocatalítica para a detecção de ALA em soluções aquosas. Essa atividade eletrocatalítica pode ser atribuída à presença de Co(I)/Pc/Co(II)Pc [36,45]. Com base nos resultados, o eletrodo GP/CoPc foi escolhido como eletrodo de trabalho, por conciliar um bom perfil voltamétrico.

A partir dos voltamogramas registrados foi construída a Tabela 4 que apresenta os valores dos potenciais e das correntes de pico das ftalocianinas estudadas sobre eletrodos de grafite pirolítico.

TABELA 4: Potencias de corrente de pico do H₂Pc, FePc, ZnPc, NiPc, CuPc e CoPc adsorvidas sobre eletrodos de GP. Nas condições experimentais: $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

Eletrodo	Oxidação	
	Pico	
	Ep (V) vs ECS	Ip (μA)
GP/H ₂ Pc	0,91	35,71
GP/FePc	0,92	46,27
GP/ZnPc	0.92	48,14
GP/NiPc	0.92	49,82
GP/CuPc	0,94	50,31
GP/CoPc	0,8	53,45

3.3 ELETROATIVIDADES DOS ELETRODOS GP E GP/CoPc PARA A OXIDAÇÃO DE ALA EM SOLUÇÃO AQUOSA MEIO NEUTRO.

A VC é a técnica inicial mais comumente utilizada para os estudos de eletroatividade. Assim, experimentos preliminares de VC foram realizados a fim de se observar os processos de oxidação de ALA (C₈H₁₄O₂S₂) sobre a superfície do eletrodo GP não modificado ou modificado com CoPc.

Com o propósito de verificar a influência do comportamento voltamétrico do eletrodo de grafite pirolítico (GP) sobre a resposta analítica do sistema para a determinação do antioxidante ácido α -lipóico, foi realizado um estudo por voltametria cíclica em uma faixa de potencial de 0,45 a 1,0 V vs ECS em tampão fosfato pH (7,0).

Verificou-se a oxidação de ALA sobre o eletrodo de GP modificado com CoPc na presença de ALA (voltamograma C), o voltamograma (B) não modificado

na presença de ALA e o voltamograma (A) na ausência de ALA. O voltamograma (A) não apresenta picos voltamétricos, indicando que não ocorre transferência de elétrons através da interface eletrodo-eletrólito, ou seja, as correntes observadas são de natureza puramente capacitiva, trata-se de processos não faradáicos.

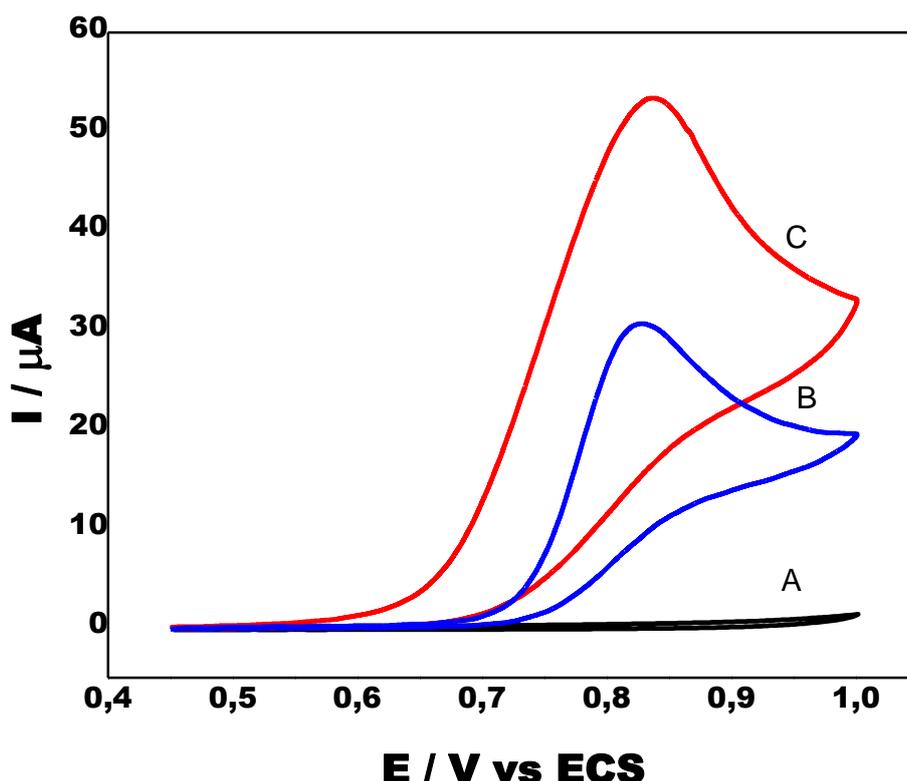


Figura 11: Voltamogramas cíclicos: (A) branco em tampão fosfato (pH 7,0) (B) 1mM de ácido α -lipóico em tampão fosfato (pH 7,0) GP (C) 1 mM de ácido α - lipóico em tampão fosfato (pH 7,0) CoPc/GP, $v = 25 \text{ mVs}^{-1}$.

As medidas foram registradas mantendo-se um fluxo constante de N_2 sobre a superfície da solução. A resposta voltamétrica de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido α -lipóico em uma janela de potencial de 0,45 a 1,0 V mostrou um pico anódico irreversível, estes valores de potencias de pico estão em concordância com os obtidos na literatura [12,13,14].

Os voltamogramas (B) e (C) na presença de 1mM de ALA apresentaram potencias de pico em torno de 0,8 V e corrente de picos na varredura anódica respectivamente em $30,50 \mu\text{A}$ e $53,34 \mu\text{A}$ e a oxidação no voltamograma (C) iniciou-

se em potencias menos positivos cerca de 100 mV (B). A partir desse resultado obtido justifica-se a modificação do eletrodo GP com CoPc. Os eletrodos GP modificados mostraram correntes mais acentuadas do que o eletrodo não modificado, isso pode ser justificado, pelo comportamento eletrocatalítico dos eletrodos modificados, os quais reduzem a energia de ativação da reação necessária para que o ALA sofra a oxidação. No eletrodo não modificado a oxidação de ALA apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta, em comparação com o eletrodo modificado. Quando o eletrodo é modificado, a reação é mediada por um sistema redox que pode trocar elétrons mais rapidamente com o eletrodo e o ácido α -lipóico, aumentando assim a magnitude da corrente.

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

3.3.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO E DO TEMPO DE ADSORÇÃO DE CoPc SOBRE O ELETRODO DE GRAFITE PIROLÍTICO.

Foi realizado um estudo sistemático das dependências de corrente de pico de oxidação do ácido α -lipóico com a concentração de CoPc e com o tempo de imersão do eletrodo GP na solução de CoPc. As concentrações das ftalocianinas estudadas foram 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} e 1×10^{-5} mol L⁻¹ e tempo de adsorção de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min.

As melhores respostas voltamétricas foram observadas em solução de 1×10^{-4} mol L⁻¹ de CoPc em um tempo de 20 min em meio tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 . Assim os experimentos posteriores foram realizados utilizando-se esses dados.

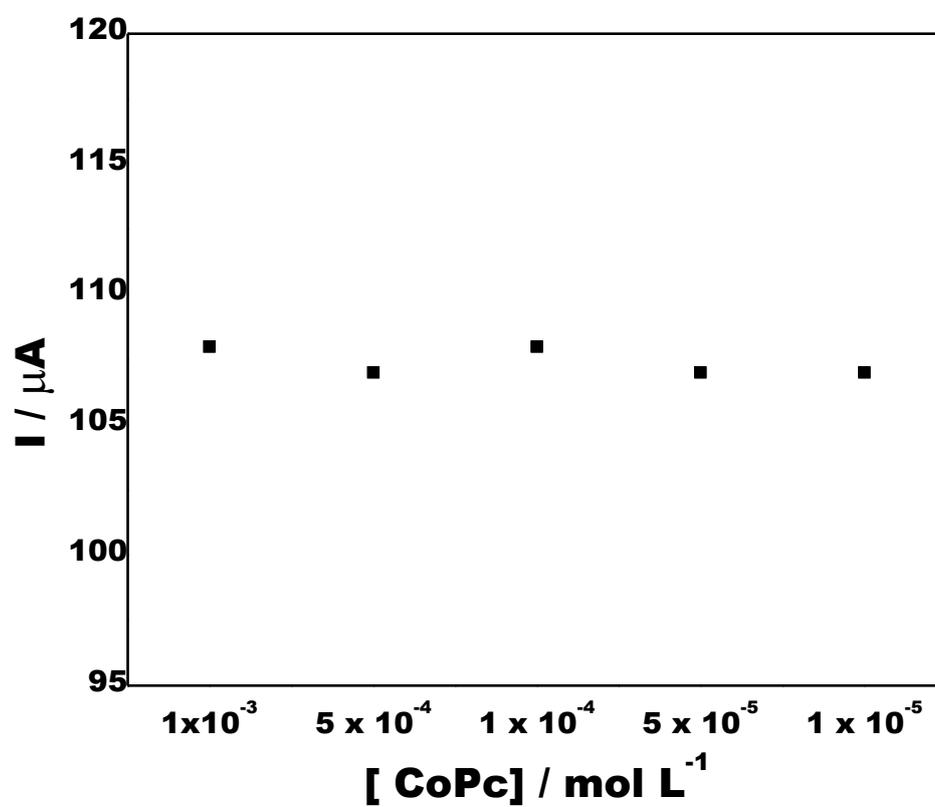


Figura 12: Gráfico da dependência da corrente de pico com a concentração de CoPc durante 20 minutos em 1mM de ALA em tampão fosfato pH 7,0 para $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, saturado com N_2 .

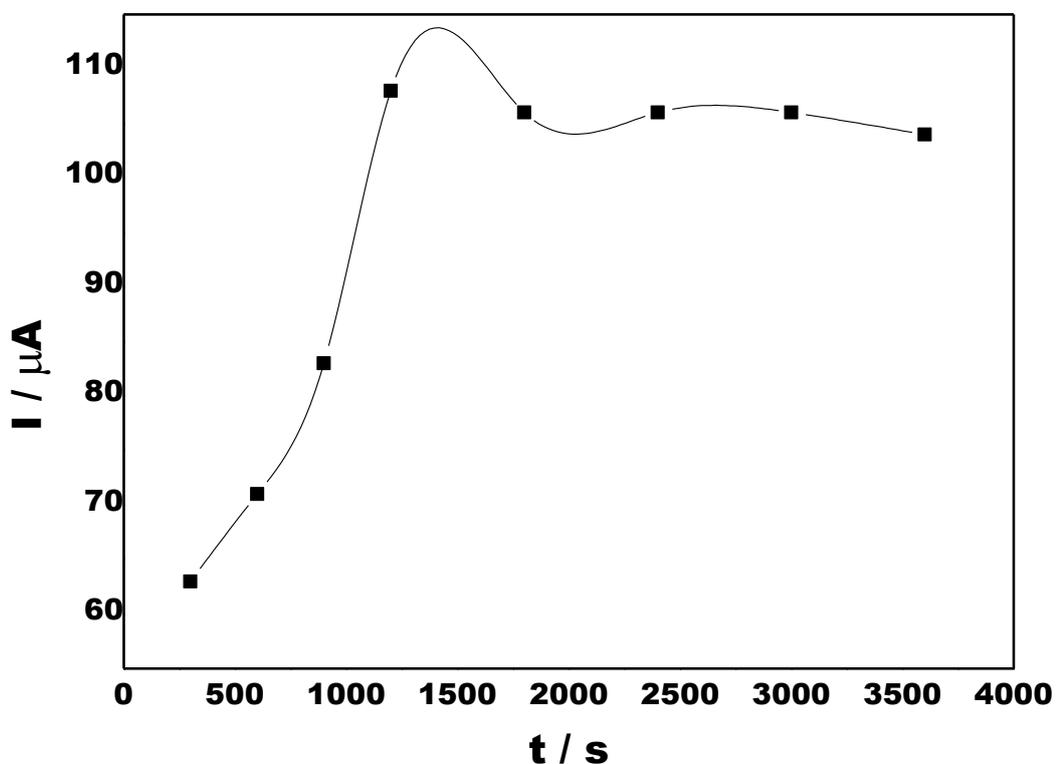


Figura 13: Gráfico da dependência da corrente de pico com o tempo de adsorção de CoPc na superfície do eletrodo de GP em 1mM de ALA em tampão fosfato pH 7,0 para $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ saturado com N_2 .

3.3.2 EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA DE POTENCIAL SOBRE A RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DO GP/CoPc PARA UMA SOLUÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO.

Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varreduras para a reação de oxidação de 1 mM de ALA sobre CoPc/GP em uma solução de tampão fosfato pH (7,0) são apresentados na figura 14. Uma análise dos voltamogramas apresentadas nessa figura mostra que há um aumento do sinal analítico (correntes anódicas) com o aumento da velocidade de varredura. Quando se aumenta a velocidade, sob as mesmas condições experimentais, uma relação

linear foi observada entre a intensidade da corrente de pico i_p e taxa de varredura v (Fig. 14), sugerindo a adsorção do ácido α -lipóico na superfície do eletrodo.

Os voltamogramas cíclicos foram registrados em diferentes velocidades de varredura no intervalo de 10 a 200 mV s^{-1} seguindo a equação linear $E_p = 0,85 + 0,027 \log v$ ($R = 0,997$) (Fig. 15) e há uma dependência linear de corrente de pico anódica (I_{pa}) com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) (Fig.15), o que confirma que a oxidação eletroquímica do ácido α -lipóico nessas condições experimentais é totalmente irreversível.

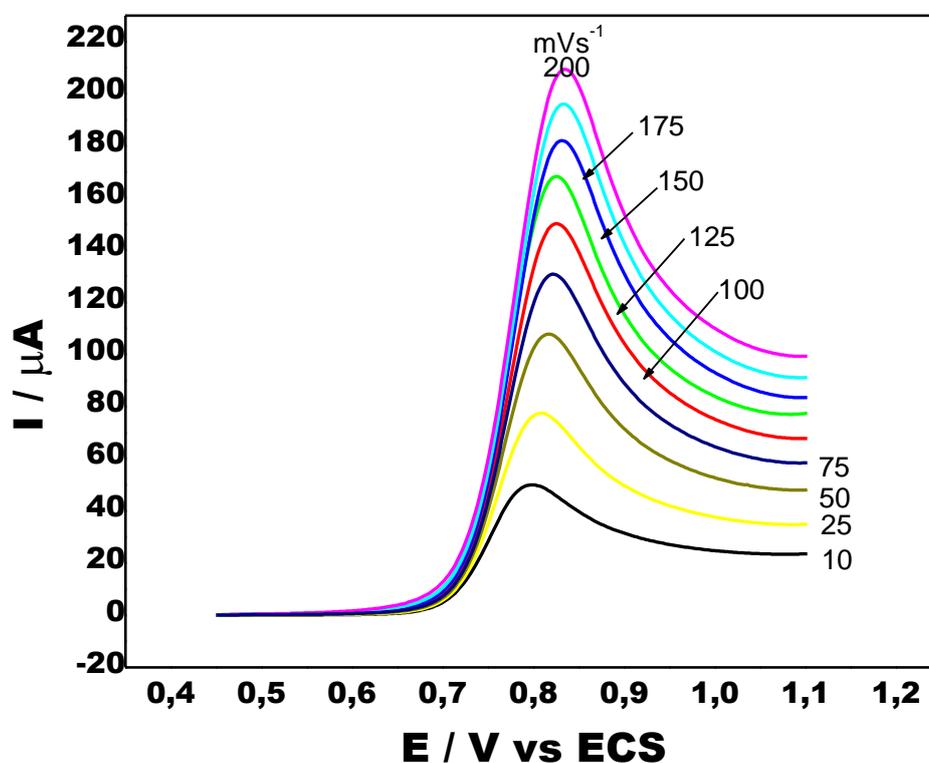


Figura 14: Voltamogramas de varredura linear registrados em diferentes velocidades de varredura de potencial para a oxidação de ácido lipóico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato pH (7,0), saturada com N_2 , empregando-se CoPc/GP.

Segundo a teoria Laviron [63] para uma reação irreversível anódica, a relação entre o E_p e v é descrita na seguinte equação:

$$E_p = E_0 - \frac{RT}{\alpha n F} \log \frac{RTK_s}{\alpha n F} + \frac{RT}{\alpha n F} \log v \quad \text{Eq.1}$$

onde E_0 é o potencial padrão formal, α a transferência de carga coeficiente, n o número de elétrons transferidos envolvidos na oxidação de ácido lipóico, a constante de Faraday F (96.485 C / mol) e k_s é uma constante referente a taxa da reação heterogêneo padrão, R e T têm o seu significado usual. Segundo a inclinação da reta de E_p contra $\log v$, o produto αn pode ser avaliada como 0,59. Enquanto isso, o valor de k_s de $5,8 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ foi calculada a partir da interceptação da reta de E_p vs $\log V$. O valor de E_0 (0,787 V) foi determinado a partir da interceptação de E_p versus v parcela na ordenada, extrapolando a reta para $v = 0$. O valor de K_s encontrado quando comparado ao da literatura $1,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [13] indica que a oxidação do ácido α -lipóico em GP/CoPc em tampão fosfato pH (7,0) ocorre através de uma cinética de transferência de elétrons bem mais rápida.

Para um pico de adsorção irreversível, de acordo com a teoria Laviron [63], uma relação linear entre a corrente de pico i_p e a taxa de varrimento v é descrito da seguinte forma:

$$i_p = \frac{NFQ}{4RT} \quad \text{Eq.2}$$

Aqui i_p é expressa na unidade de ampères e Q é a área do pico no voltamograma (coulomb). A equação acima mostra que n pode ser calculado, enquanto Q é obtida sob uma determinada velocidade de varredura. Com base nisso, foi calculado o número de transferência de elétrons como sendo $n = 2$. Estimou-se então o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação de ácido lipóico catalisada pela ftalocianina de cobalto como sendo de aproximadamente igual a 2 elétrons, ou seja, é provavelmente uma reação de transferência de dois elétrons.

Análise dos voltamogramas cíclicos registrados a diferentes velocidades de varredura do potencial (v) no intervalo de 10 a 200 mV s^{-1} mostrou uma relação diretamente proporcional entre i_p e $(v)^{1/2}$ (Fig.15), indicando que o comportamento

eletroquímico apresentado é característico de um processo irreversível controlado por difusão.

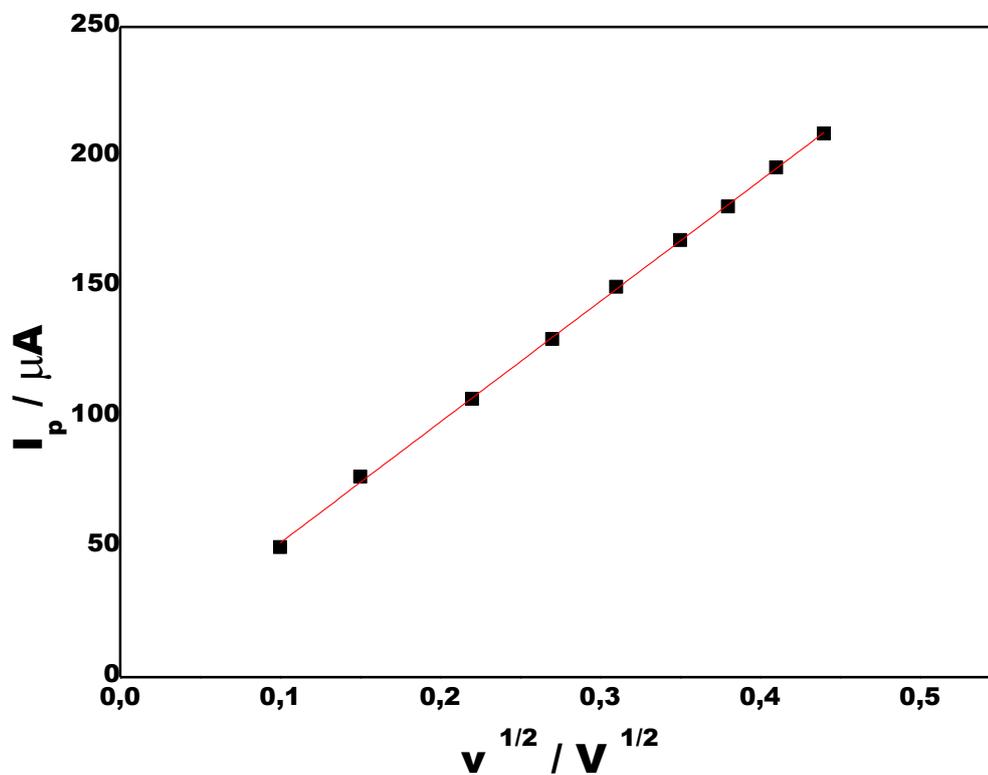


Figura 15: Gráfico da dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Dados extraídos da figura 14.

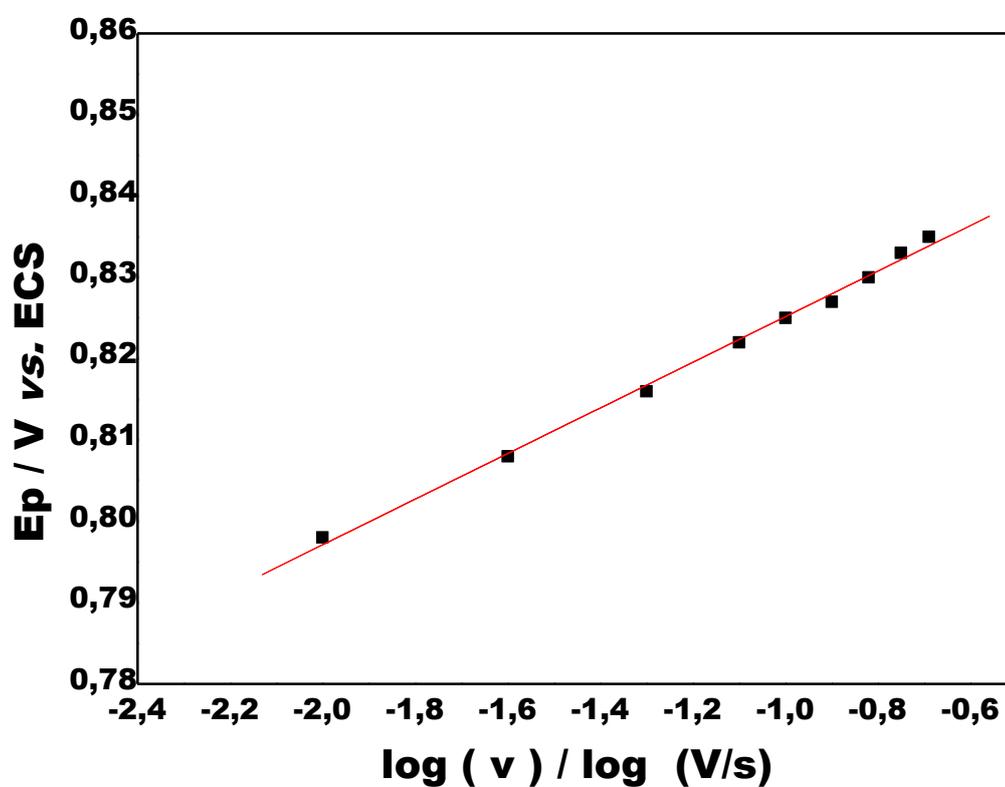


Figura 16: Gráfico da dependência de potencial de pico com o logaritmo da velocidade de varredura. Dados extraídos da Fig.14.

A reação de oxidação do ácido α -lipóico muito provavelmente resulta na formação de um tiosulfonato, o ácido β -lipóico, como principal produto [14]:

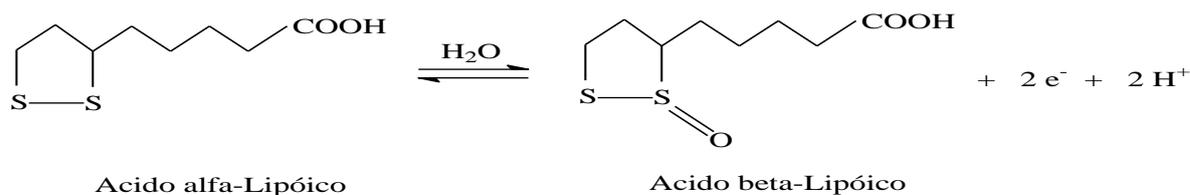


Figura 17: Esquema da Reação de Oxidação do ALA

3.4 VARIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO α -LIPÓICO

Usando as condições experimentais de 50 mVs^{-1} , no intervalo de potencial de 0,45 a 1,0 V variou-se a concentração de ácido α -lipóico. A figura. 18 mostram os voltamogramas cíclicos obtidos variando a concentração de ácido α -lipóico de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Observando-se a figura 18, constatou-se que a corrente de pico aumentou proporcionalmente com a concentração de ácido α -lipóico e o potencial de pico teve uma variação de 0,80V a 0,82V com o aumento da concentração.

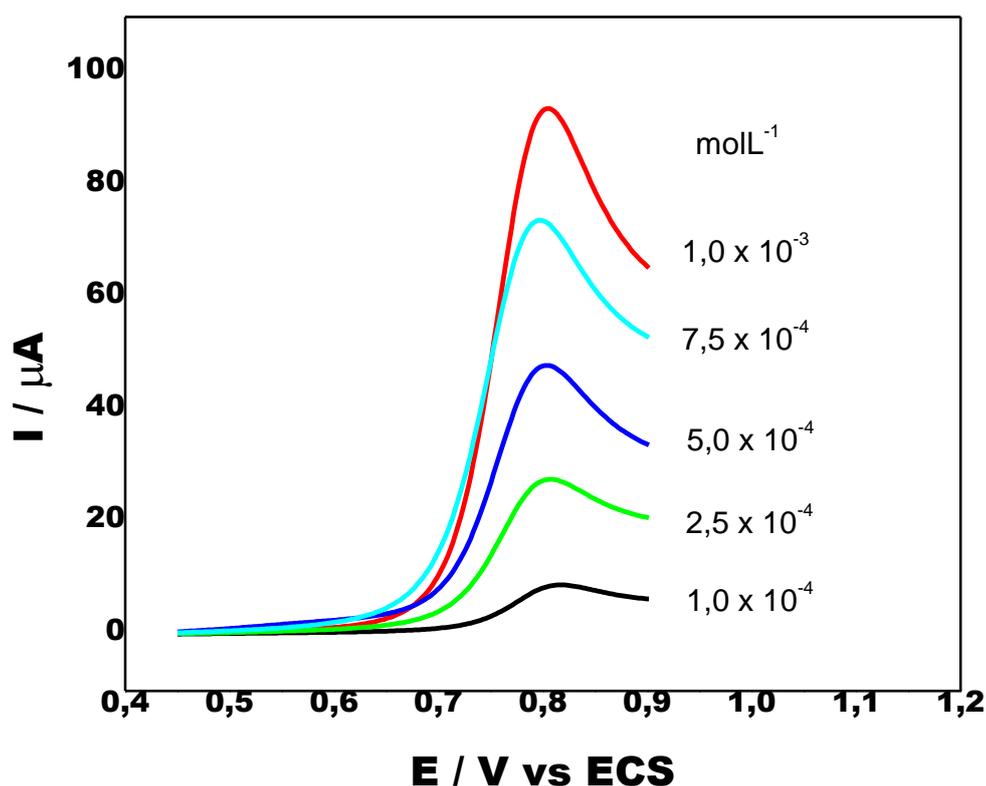


Figura 18: Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes concentrações de ácido lipóico em solução de tampão fosfato pH (7,0), saturada com N_2 , empregando-se CoPc/GP, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

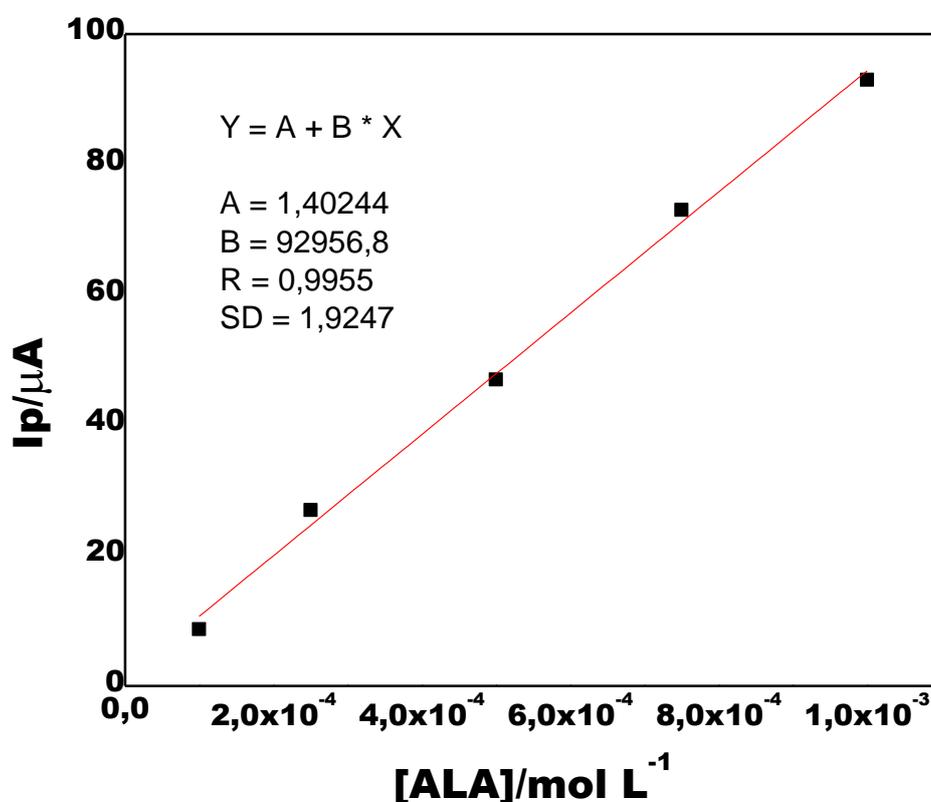


Figura 19: Gráfico da dependência da corrente de pico com a concentração de ALA. Dados extraídos da figura 18.

3.5 VARIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO HIDROGÊNIONICA DO MEIO

A variação da concentração hidrogênionica do meio pode deslocar os valores de potencial de pico e também alterar as intensidades da corrente de pico, dependendo do tipo de sistema redox avaliado, por isso, outro parâmetro a ser otimizado nas condições experimentais de análise é a influência da concentração hidrogênionica do meio e das correntes de pico e potenciais de pico para a otimização do sensor.

A influência do pH sobre a resposta voltamétrica para a oxidação de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA sobre o eletrodo de GP/CoPc foi investigado nos pH's 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, foi conduzido usando o tampão Britton Robinson (BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pela

técnica de VC. A variação do pH permitiu constatar em que meio ocorre maior resposta de corrente de pico para fins analíticos.

O sinal voltamétrico é observado em todo o intervalo de pH investigado, influenciando a intensidade da corrente de pico. Observa-se que a corrente máxima é obtida em pH 7,0 como exposto na Figura 20 e na Tabela 5.

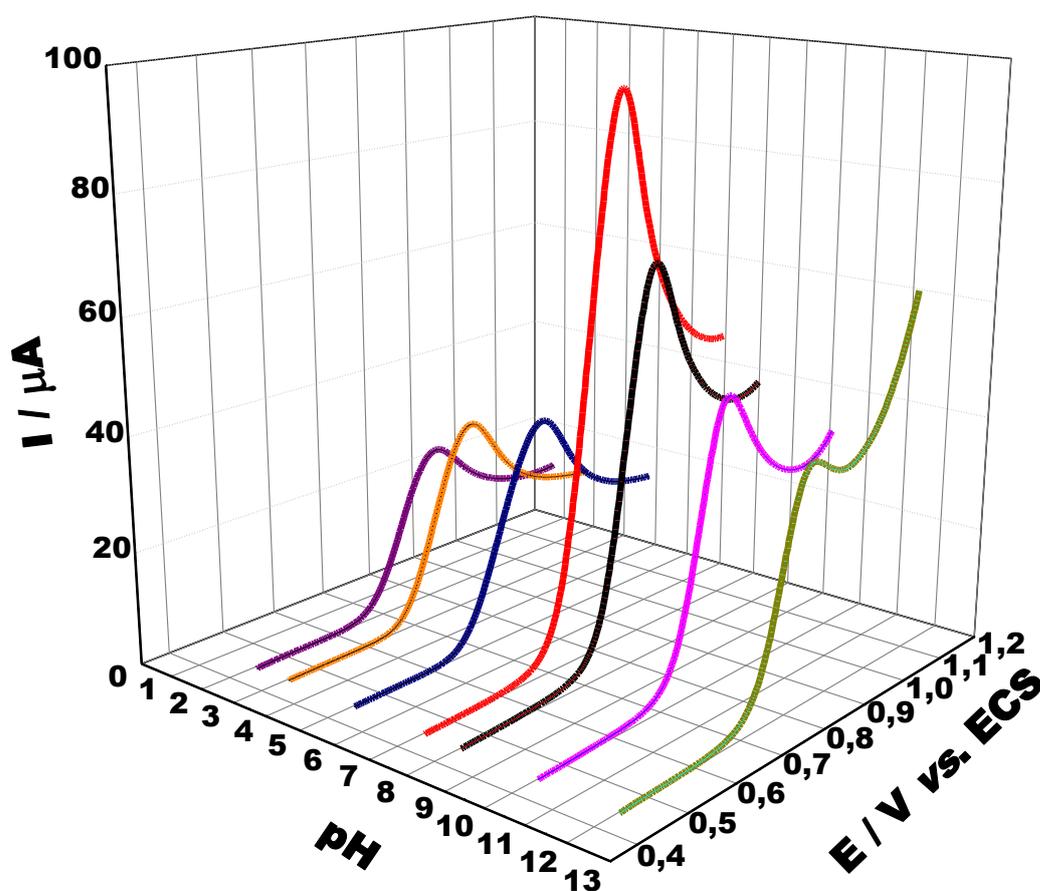


Figura 20: Voltamogramas cíclicos 3D para a oxidação de ALA sobre eletrodo de GP modificado com CoPc em solução tampão BR 0.1 mol L^{-1} em diferentes pH's contendo 1 mM de ALA, saturada com N_2 .

Os resultados deixaram evidente que a densidade de corrente de pico diminui com o aumento do pH básico na faixa de 7,0 a 12 e aumenta em valores de pH maiores de 2,0.

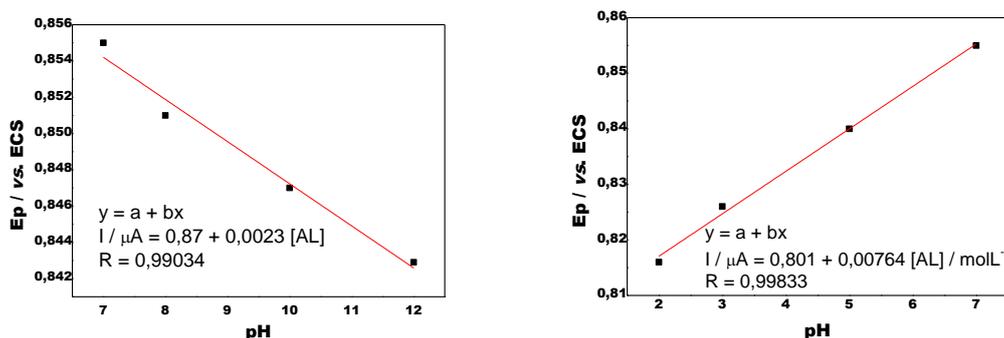


Figura 21: Influência do pH sobre o potencial de pico para 1mM de ácido α -lipóico conduzidas em 0,1 molL⁻¹ de solução tampão fosfato, pH 7,0.

A pouca influência do pH nos potenciais de picos da resposta voltamétrica, parece indicar, que nas condições de trabalho, não existe a influência de prótons H⁺ sobre a oxidação do ALA, apresentando uma inclinação da ordem de 29 mV/pH

Assim, a melhor resposta catalítica para o ácido α -lipóico com o eletrodo GP modificado com CoPc se observa claramente que foi em pH 7,0 e com base no resultado, este pH foi escolhido para os estudos posteriores.

TABELA 5: Densidade de corrente referentes a diferentes pH sobre o sinal analítico do sensor na oxidação de ácido lipóico. Medidas conduzidas em tampão BR 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura: 0,05 V s⁻¹.

pH	2,0	3,0	5,0	7,0	8,0	9,0	10	12
Ip / μA	27,6	33,4	37,5	95,0	67,7	59,1	48,9	40,7

3.6 VARIAÇÕES DO ELETRÓLITO SUPORTE

A investigação da influência da natureza do tampão sobre o sinal analítico foi testada em cinco diferentes soluções tampões: BR, MacIlvaine, Sörensen, Ftalato ácido de potássio e Fosfato.

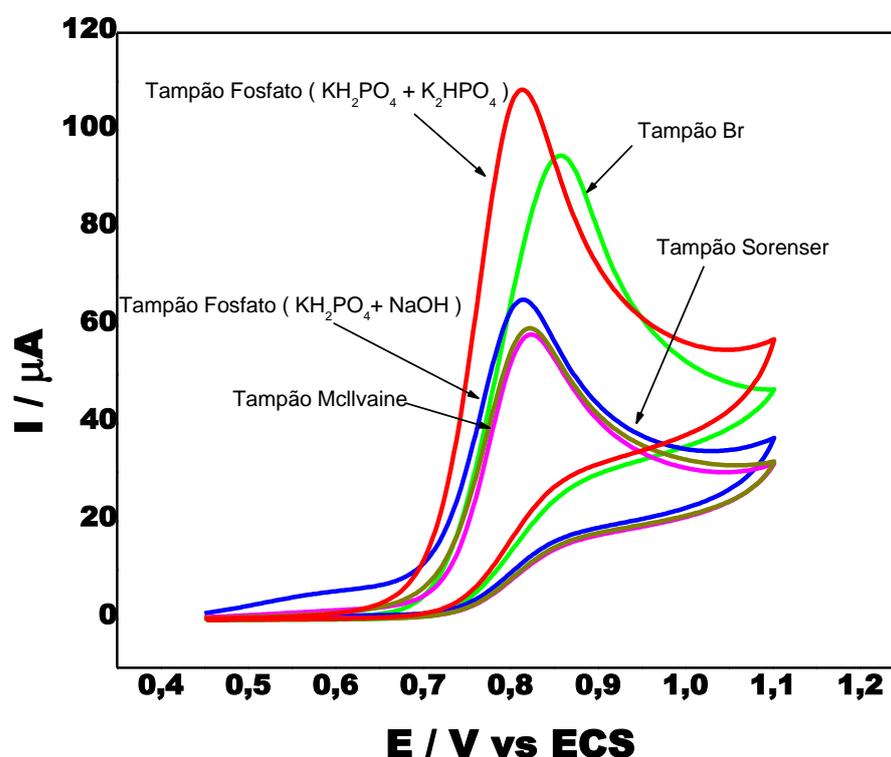


Figura 22: Voltamogramas cíclicos de ácido α -lipóico 1 mM em tampão fosfato pH 7,0 para $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ com eletrodo de GP/CoPc em diferentes eletrólitos.

As correntes de pico referentes à oxidação de ácido α -lipóico em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) para diferentes tipos de soluções tampão, estão expostos na Tabela 6, sendo verificado melhor sinal analítico para a oxidação de ALA quando a solução tampão Fosfato foi utilizada. Esse comportamento pode estar associado à maior facilidade dos íons fosfato se difundirem através da superfície do filme de CoPc em comparação com os íons dos outros tampões investigados.

TABELA 6: Influência do tampão sobre resposta analítica (μA) do sensor para ácido lipóico. Medidas conduzidas em tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7.0). Velocidade de varredura: $0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Tampões	Mcllvaine	Sorensen	Br	Ftalato	Fosfato
$I_p / \mu\text{A}$	58,23	59,27	95,2	65,3	107,7

3.7 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Também foram avaliadas a repetibilidade (máxima diferença aceitável em repetições, na mesma amostra) e a reprodutibilidade (máxima diferença aceitável de resultados obtidos em amostras diferentes). A repetibilidade foi avaliada considerando-se 10 medidas sucessivas realizadas em uma solução contendo $3,84 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA. A tabela 7 apresenta as correntes de pico obtidas do ALA para a repetibilidade do eletrodo. As correntes de pico foram avaliadas e o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{CV\%} = S \times 100 / X \text{ Eq.3}$$

onde S é o desvio padrão das medidas e X é a média das medidas.

TABELA 7: Estudo da repetibilidade do eletrodo GP/CoPc para uma solução de ácido lipóico em solução tampão Fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

Repli	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$I_p / \mu\text{A}$	3,70	3,66	3,7	3,69	3,67	3,7	3,66	4,05	3,80	3,67

A reprodutibilidade foi estudada considerando-se 5 medidas diferentes em soluções diferentes e em 5 sensores diferentes, realizadas em dias diferentes em solução contendo $5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA, nas condições consideradas otimizadas. A tabela 8 mostra os valores das correntes de pico do ALA para a reprodutibilidade do eletrodo proposto. De maneira semelhante à repetibilidade as I_p foram avaliadas e o desvio padrão relativo foi então calculado de acordo com a Equação 3.

TABELA 8: Estudo da reprodutibilidade do eletrodo GP/CoPc para uma solução de $5,66 \times 10^{-5}$ de ALA em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH (7,0) .

Replicatas	1	2	3	4	5
$I_p / \mu\text{A}$	5,05	5,04	5,07	4,7	5,09

De acordo com os resultados obtidos na tabela 9 foi observado que o sensor proposto apresenta boa repetibilidade e reprodutibilidade, uma vez que os desvios padrões relativos encontrados para os mesmos foram inferior a 5%.

TABELA 9: Resultados da repetibilidade e da reprodutibilidade para o ALA sobre o eletrodo de GP/CoPc em solução tampão Fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH (7,0) .

Parâmetros	CV (%)	Quantidade de ALA utilizada	N
Repetibilidade	3,13	$3,84 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	10
Reprodutibilidade	3,27	$5,66 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	5

3.8 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA POR VC.

Usando as condições experimentais definidas previamente, construiu-se uma curva analítica no intervalo de concentração de ALA entre, $1,99 \times 10^{-6}$ a $9,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, cujos voltamogramas são apresentados na Figura 23. O gráfico de I_p vs

concentração de ALA exibe uma relação linear no intervalo de concentração estudado figura 24.

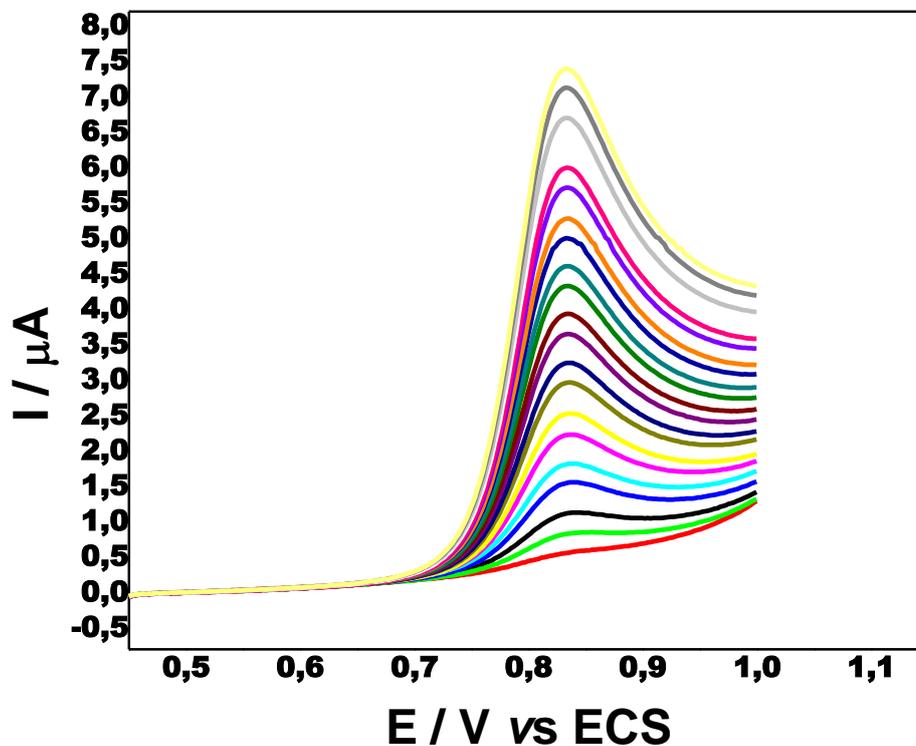


Figura 23: Voltamogramas de varredura linear empregando-se o GP/CoPc em diferentes concentrações de ácido lipóico (2×10^{-6} a 1×10^{-4}) em Tampão Fosfato pH 7,0, saturado com N_2 , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

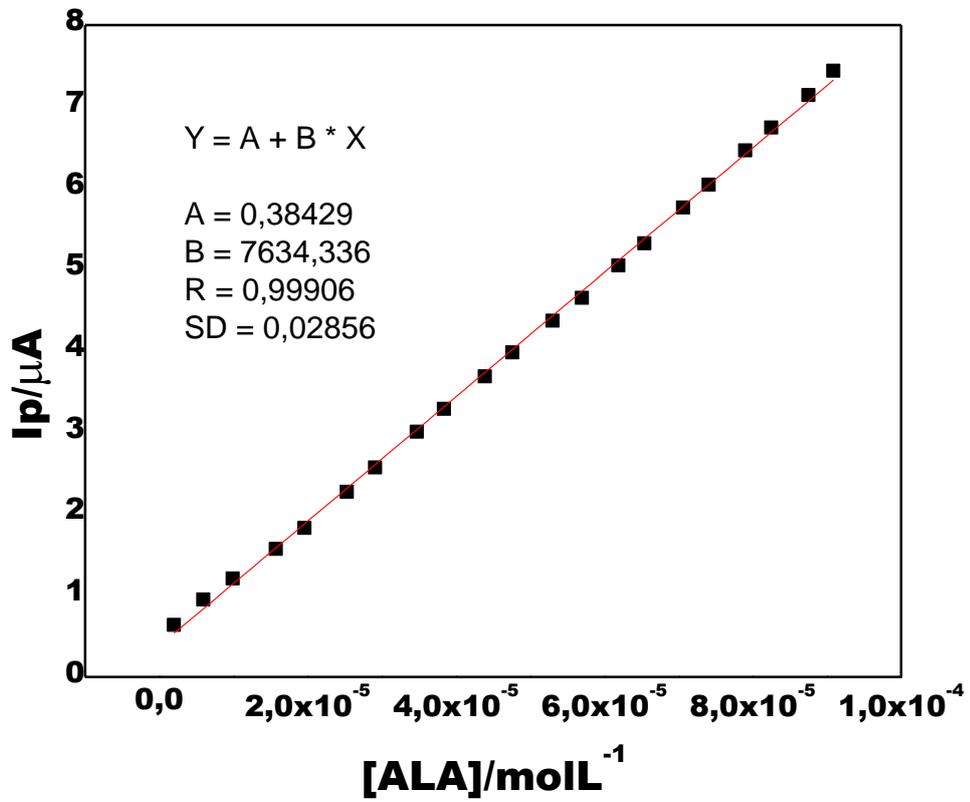


Figura 24: Curva analítica empregando-se o GP/CoPC em diferentes concentrações de ácido lipóico (2×10^{-6} a 1×10^{-4}) em Tampão Fosfato pH 7,0, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Dados extraídos da Figura 23.

3.9 CRONOAMPEROMETRIA

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica que consiste no registro da corrente gerada (i) pela oxidação ou redução de espécies, devido a um potencial externo aplicado, em função do tempo t , onde a carga Q , envolvida no processo pode ser calculada através da área sob a curva

A determinação de ALA utilizando o eletrodo GP/CoPc também foi avaliada com a técnica de cronoamperometria. Sob um potencial aplicado de 0,9 V vs. ECS, as correntes também foram registradas após adições consecutivas de 20 μL de uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ALA na solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

O cronoamperograma resultante é mostrado na figura 25. A partir de dados extraídos desta figura, a curva analítica foi construída e apresentou uma boa linearidade, e valores LD e LQ de $9,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são próximos dos obtidos com a técnica de voltametria e apresentados acima. Além disso, os valores apresentados são bons quando comparados aos da literatura [12, 13,14]

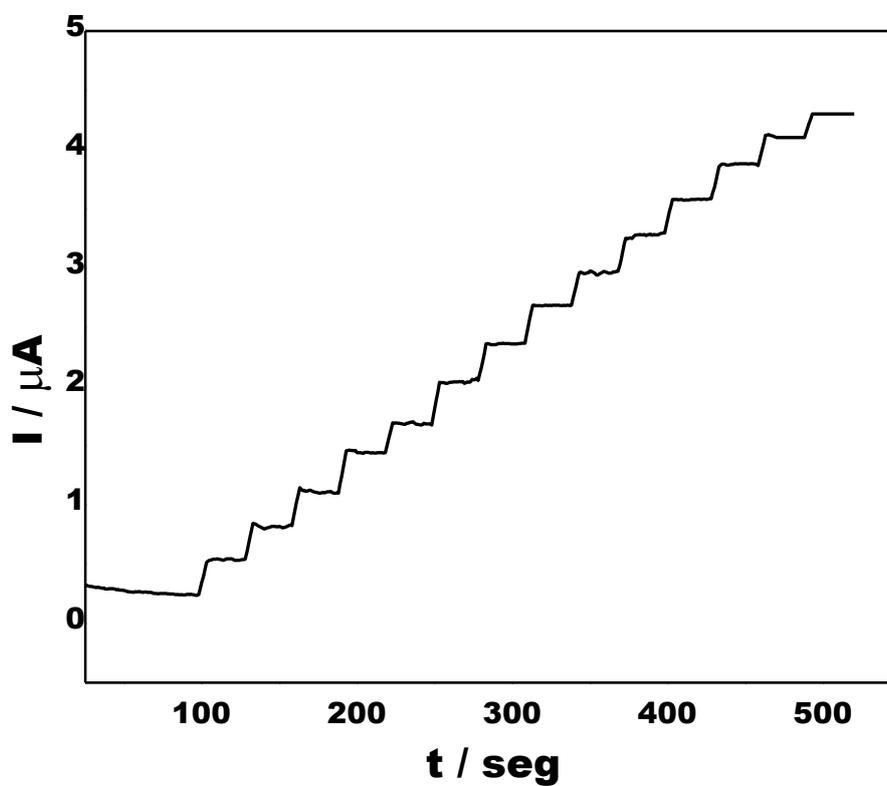


Figura 25: Cronoamperograma registrado com o eletrodo GP/CoPC para adições sucessivas de alíquotas de 20 μL de uma solução de ALA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução tampão fosfato (pH 7), saturada com N_2 . Potencial aplicado: 0,9 V vs ECS.

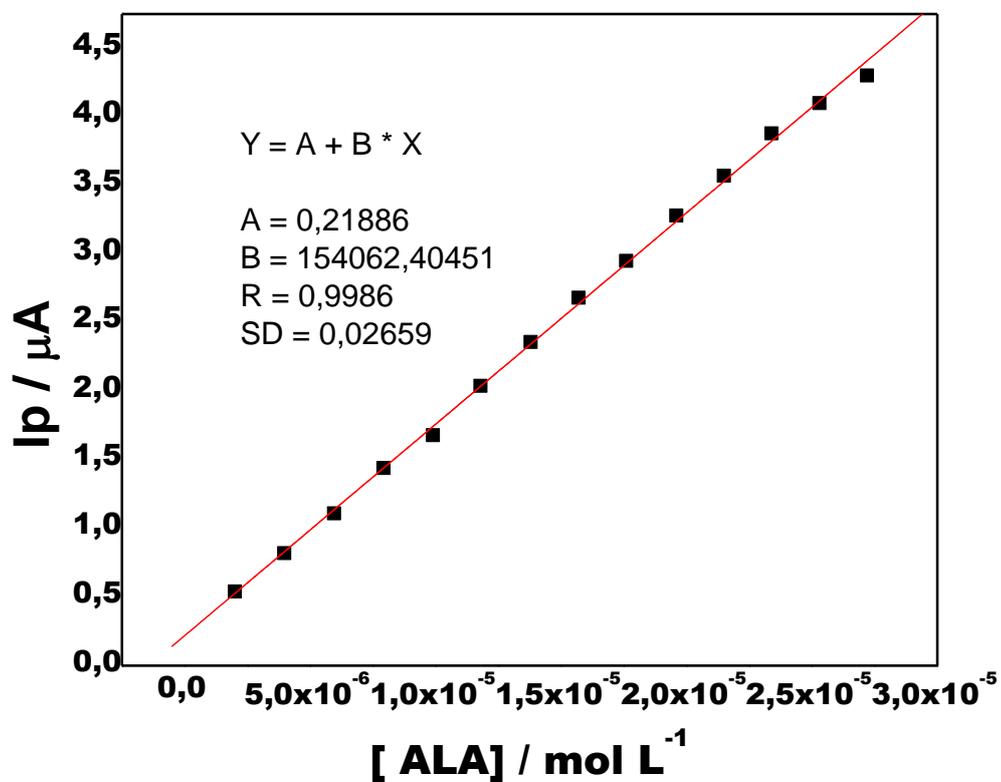


Figura 26: Curva analítica construída a partir das correntes extraídas do Cronoamperograma da figura 25.

3.10 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação da corrente faradaica da capacitiva foi conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. Neste caso a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizados em intervalos de tempo muito pequenos.

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, onde a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira apresenta a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é fundamentalmente, a contribuição da corrente faradaica e, então, plotadas contra o potencial da rampa linear, geram um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana. Esta técnica é mais sensível que a de pulso normal, isto porque ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido.

Na voltametria de pulso diferencial o efeito da velocidade de varredura, amplitude de pulso e frequência são parâmetros muito importantes, pois eles podem influenciar diretamente na sensibilidade do sistema. Sendo assim, antes de realizar-se uma análise a escolha de determinados parâmetros precisa ser feita.

3.11 VARIAÇÕES DA AMPLITUDE DE PULSO

Geralmente escolhe-se um valor entre 10 e 100 mV para a amplitude. Valores típicos são de 25 mV para sistemas com um elétron e a partir de 50 mV para sistemas com dois elétrons.

Inicialmente variou-se a amplitude de 0,02 a 0,13 V utilizando uma amplitude de 0,08 V para uma solução de $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido α -lipóico em solução tampão fosfato, pH 7,0 (Tabela 10).

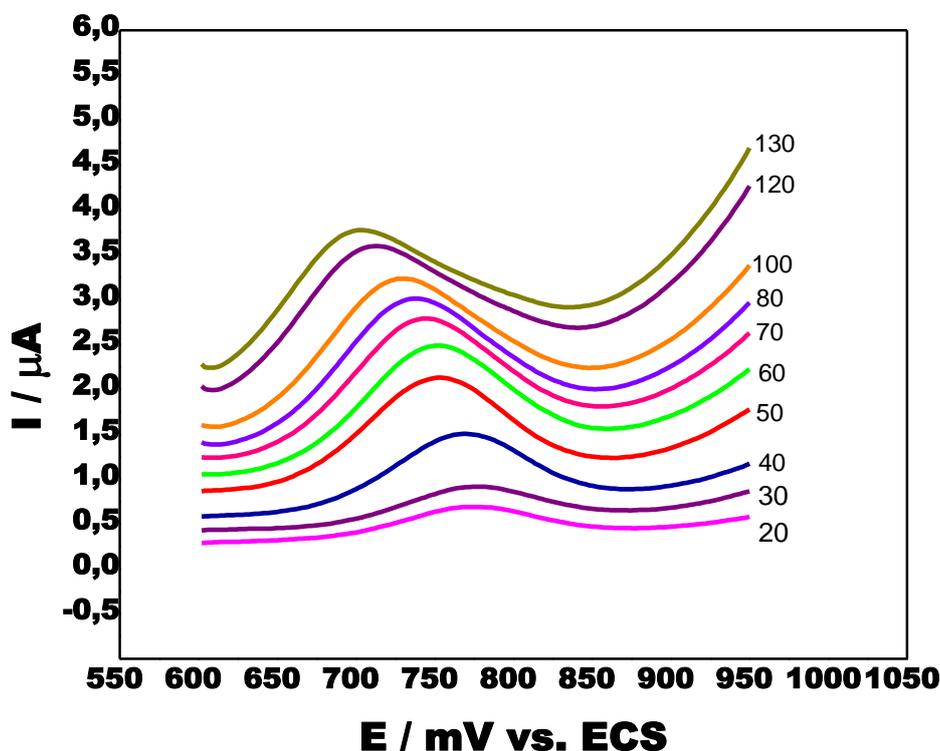


Figura 27: Voltamogramas de pulso diferencial para ALA em diferentes amplitudes, tempo de pulso = 200 ms, $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$

A escolha da amplitude deve ser um compromisso entre o aumento da sensibilidade e a perda de resolução. Para cada valor de amplitude de pulso foi registrado um voltamograma. O que apresentou um pico melhor definido e com maior valor de I_p , indicará a amplitude a ser escolhida. Quando a determinação de mais de uma espécie estiver envolvida, será considerada a amplitude que fornecer um compromisso entre a maior corrente de pico obtida (que permite maior sensibilidade) e a melhor separação entre eles (o que permite uma resolução maior).

Conforme pode ser observado na figura 27 à densidade de corrente de pico do ALA alcançou um patamar máximo entre 0,1 a 0,13 V. Adicionalmente observou-se que após a amplitude de 0,1 V os voltamogramas foram acompanhados por distorção e alargamento dos picos, portanto a amplitude de 0,8V foi escolhida para os demais estudos.

TABELA 10: Influência da amplitude sobre a resposta analítica (μA) do sensor para ácido α -lipóico. Medidas conduzidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7.0). Velocidade de varredura: 10 mV s^{-1} .

Amplitude/ V s^{-1}	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
(-) $I_p/\mu\text{A}$	0,69	0,90	1,53	2,14	2,50	2,81	3,04

3.12 VARIAÇÕES DA VELOCIDADE DE VARREDURA DO POTENCIAL.

Os experimentos de voltametria de pulso diferencial realizados com uma amplitude de pulso de $0,8 \text{ V}$, um tempo de duração do pulso de 200 ms e a velocidade de varredura do potencial (v), onde variou-se a velocidade de $5, 10, 25, 30, 40, 50, 60, 70$ e 100 mVs^{-1} . Mostraram que a corrente de pico da oxidação do ALA sobre o eletrodo GP/CoPc na presença de $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido α -lipóico em solução tampão fosfato, pH 7,0 que atingiu um valor máximo para $v = 70 \text{ mV s}^{-1}$.

Conforme pode ser observado à densidade de corrente de pico anódica de ácido α -lipóico alcançou um patamar máximo em 70 mV s^{-1} . Velocidades acima de 70 mVs^{-1} apresentaram distorções no perfil voltamétrico, por isso a velocidade que apresentou o melhor perfil voltamétrico foi 25 mV s^{-1} .

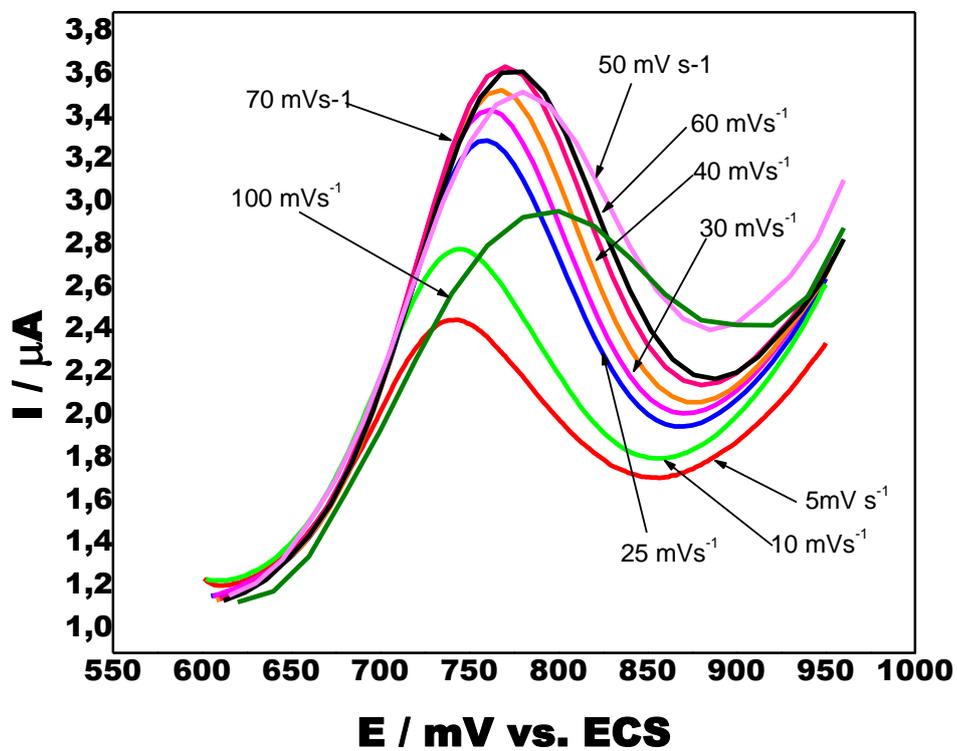


Figura 28: Voltamogramas de pulso diferencial para o ALA em diferentes velocidades, tempo de pulso= 200 ms, amplitude = 0,8 V.

3.13 VARIAÇÕES DO TEMPO DE DURAÇÃO DO PULSO.

Seqüencialmente com a amplitude e a velocidade definida outro parâmetro a ser analisado é a duração de pulso, pois determina a intensidade dos sinais, e conseqüentemente a sensibilidade obtida nas análises. Assim sendo, o efeito no aumento na intensidade de corrente de pico e o potencial de pico para o ALA sobre o eletrodo de GP/CoPc foi avaliado.

Após fixar a velocidade de varredura do potencial em $0,025 \text{ V s}^{-1}$ e a amplitude de pulso em $0,8 \text{ V}$, variou-se o tempo de duração do pulso entre 100 a 200 ms. Os resultados apresentados na Figura 29 mostram que o tempo de pulso que apresentou melhor perfil voltamétrico foi em 200 ms.

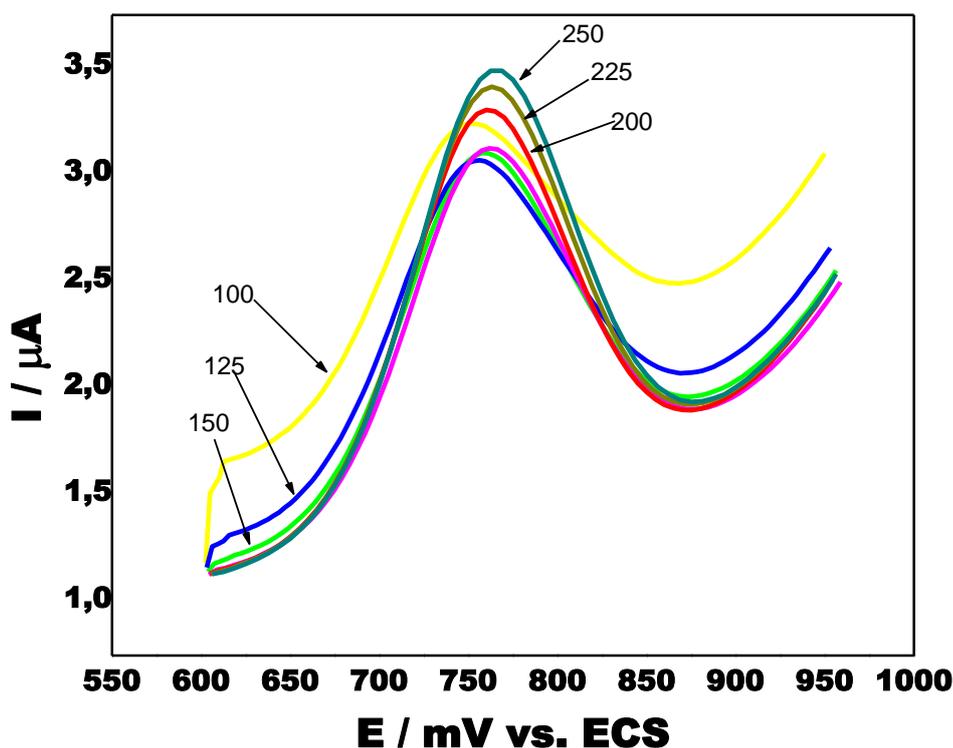


Figura 29: Influência do tempo de duração do pulso sobre a corrente de pico de ALA com uma velocidade de varredura do potencial de $0,025 \text{ V s}^{-1}$ e uma amplitude de pulso de $0,8 \text{ V}$.

3.14 CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA POR VPD.

Os picos dos voltamogramas nesta técnica fornecem uma informação qualitativa, que é o valor do potencial de pico, E_p , e uma informação quantitativa, que é a corrente de pico, I_p . Para construir-se uma curva de calibração normalmente colocam-se os valores das correntes de pico contra as concentrações da espécie eletroativa correspondentes a eles.

Usando as condições experimentais definidas previamente, construiu-se uma curva de calibração no intervalo de concentração de ALA entre, $5,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, cujos voltamogramas são apresentados na figura 30. O gráfico de I_p vs concentração de ALA exibe uma relação linear no intervalo de concentração estudado (Fig. 30).

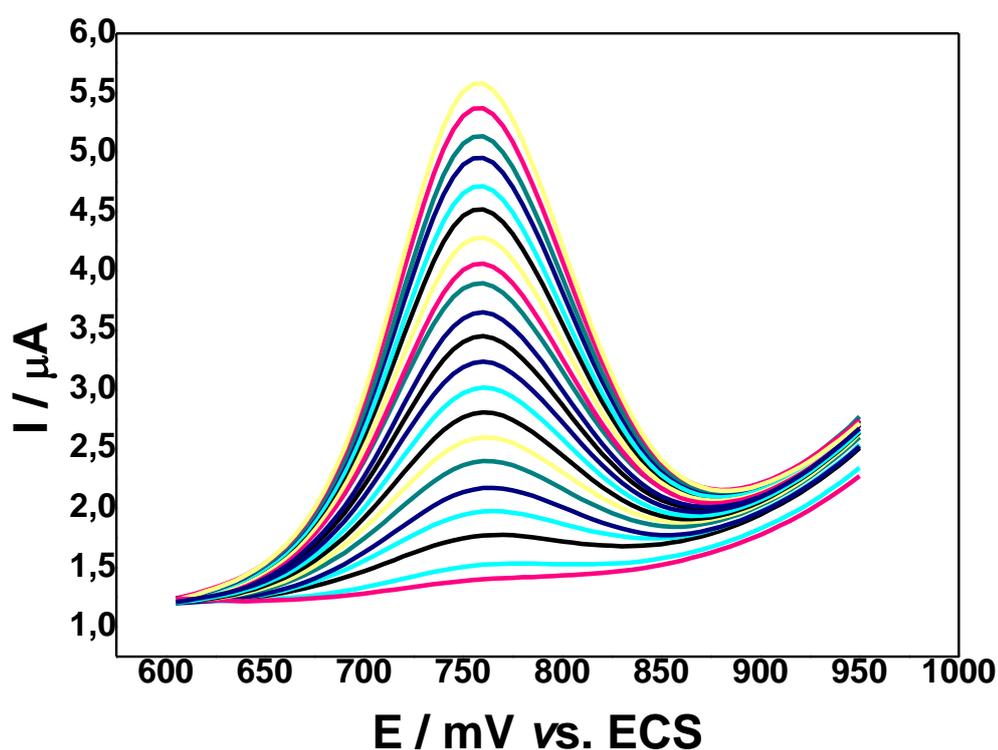


Figura 30: Voltamogramas de Pulso Diferencial empregando-se o GP/CoPC em diferentes concentrações de ácido lipóico ($4,99 \times 10^{-7}$ a $1,96 \times 10^{-5}$) em Tampão Fosfato pH 7, saturado com N_2 , $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso de 80 mV e tempo de pulso de 200 ms.

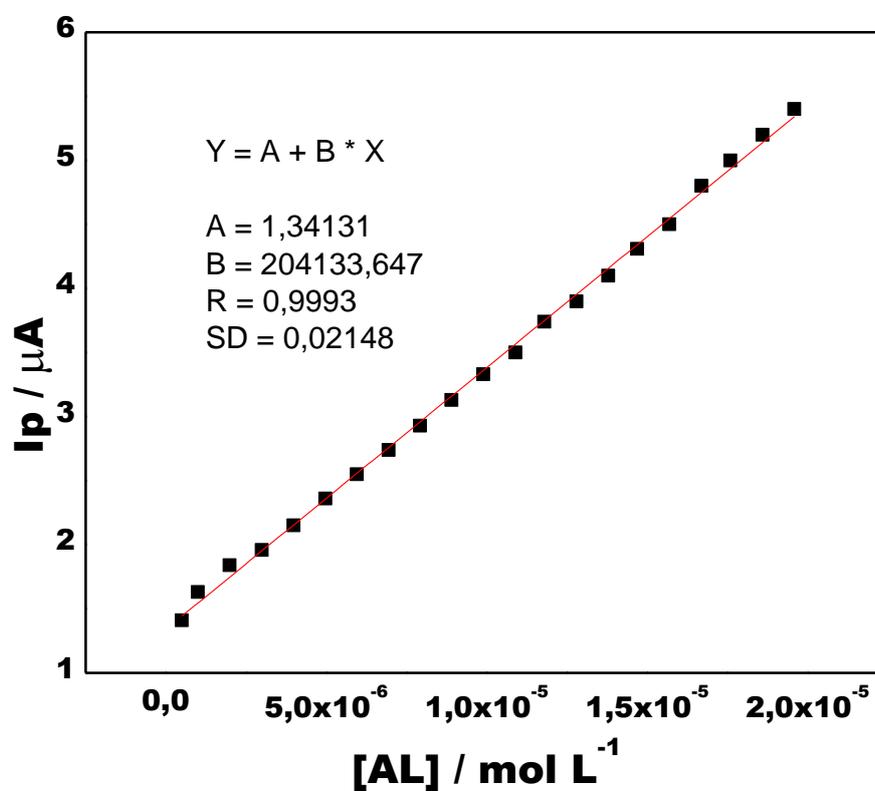


Figura 31: Curva analítica obtida a partir da figura. 30 empregando-se o GP/CoPC em diferentes concentrações de ALA ($4,99 \times 10^{-7}$ a $1,96 \times 10^{-5}$) em Tampão Fosfato pH 7, saturado com N_2 , $v = 25$ $mV s^{-1}$, amplitude de pulso de 80 mV e tempo de pulso de 200 ms.

3.15 TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS DOS DADOS ANALÍTICOS

Os parâmetros geralmente envolvidos no método de validação de métodos analíticos são curvas analíticas, limite de detecção e limite de quantificação, intervalo de confiança. Procedimentos estes que serão utilizados para um estudo estatístico do desempenho analítico de técnicas eletroquímicas para a oxidação do antioxidante alfa ácido lipóico

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos não instrumentais (titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc). No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base, calculada através da equação abaixo:

$$LD = \frac{3xSd}{b} \text{ Eq. 4}$$

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/v, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da

análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação 5:

$$LQ = \frac{10xSD}{b} \text{ Eq. 5}$$

Com os dados obtidos das curvas de calibração de I_p vs [ALA] foi possível estimar os limites de detecção e quantificação para o ácido α -lipóico, a fim de verificar a possibilidade de uma posterior aplicação em amostras reais.

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as curvas analíticas de voltametria de cíclica, cronoamperometria e de pulso diferencial foi calculado a partir do desvio padrão para 20 medidas de corrente do branco obtidas no potencial de oxidação do ácido α -lipóico.

Na maioria das situações encontradas em análises químicas, o valor verdadeiro da média μ não pode ser determinado, porque um número imenso de medidas (aproximadamente infinito) seria necessário. Com a estatística, entretanto, podemos estabelecer um intervalo ao redor da média \bar{x} determinada experimentalmente, no qual se espera que a média da população μ esteja contida com certo grau de probabilidade. Esse intervalo é conhecido como o intervalo de confiança e os limites são chamados de limite de confiança. O nível de confiança é a probabilidade de que a média verdadeira esteja localizada em certo intervalo. Muitas vezes é expresso em termos percentuais. [56].

$$IC \text{ para } \mu = \bar{x} \pm \frac{zS}{\sqrt{n}} \text{ Eq. 6}$$

Intervalo de Confiança para Voltametria Cíclica: Níveis de Confiança para Valores de 95%, $z = 1,96$.

Para 95%:

$$\mu = 8,7 \times 10^{-8} \pm \frac{1,96 \times 5,74 \times 10^{-9}}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 8,7 \times 10^{-8} \pm 6,49 \times 10^{-9}$$

Intervalo de Confiança para Cronoamperometria Níveis de Confiança para Valores de 95% $z = 1,96$.

Para 95%:

$$\mu = 9,8 \times 10^{-8} \pm \frac{1,96 \times 7,2 \times 10^{-9}}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 9,8 \times 10^{-8} \pm 8,23 \times 10^{-9}$$

Intervalo de Confiança para Voltametria de Pulso Diferencial: Níveis de Confiança para Valores de 95% $z = 1,96$.

Para 95%:

$$\mu = 3,33 \times 10^{-9} \pm \frac{1,96 \times 1,08 \times 10^{-10}}{\sqrt{3}}$$

$$\mu = 3,33 \times 10^{-9} \pm 1,22 \times 10^{-10}$$

Para esse calculo, concluímos que é 95% provável que μ , a média da população e, na ausência de erros determinados, o valor verdadeiro, está inserida no intervalo de $\mu = 8,67 \times 10^{-8} \pm 6,49 \times 10^{-9}$ para voltametria cíclica , $\mu = 9,8 \times 10^{-8} \pm 8,23 \times 10^{-9}$ para cronoamperometria e para voltametria de pulso diferencial $3,33 \times 10^{-9} \pm 1,22 \times 10^{-10}$.

3.16 COMPARAÇÕES DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS DO MÉTODO PROPOSTO COM VALORES REPORTADOS NA LITERATURA PARA A DETECÇÃO ELETROANALÍTICA DE ALA EM SOLUÇÕES AQUOSAS.

Fazendo-se uma comparação com trabalhos reportados na literatura se pode notar que os valores de LQ, LD e faixa linear, para o eletrodo GP modificado com CoPc para detecção de ALA merecem destaque pois se sobressaem em relação a alguns dos trabalhos citados que determinam ALA com a mesma técnica. É interessante inferir que, o CoPc utilizado para a modificação do eletrodo foi um simples e eficiente catalisador para o desenvolvimento do sensor, embora assim, o sistema proposto apresentou uma ampla faixa de resposta linear, alta sensibilidade e um baixo limite de detecção, os quais, também, podem ser obtidos para a determinação de ALA empregando outros sistemas como os citados na Tabela 11.

TABELA 11: Resultados de ALA para as técnicas de Voltametria Cíclica, Cronoamperometria e Voltametria de Pulso Diferencial.

Eletrodo	Eletrólito	Técnica	Faixa Linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	Ref.
GP/CoPc	Fosfato (pH 7,0)	VC	1,99 10 ⁻⁶ a 9,09x10 ⁻⁵	8,7 x 10 ⁻⁸	2,9x10 ⁻⁷	Este trabalho
GP/CoPc	Fosfato (pH 7,0)	CRONO	1,99 x 10 ⁻⁶ a 2,53 x 10 ⁻⁵	9,8 x 10 ⁻⁸	3,2x10 ⁻⁷	Este trabalho
GP/CoPc	Fosfato (pH 7,0)	VPD	4,99 x 10 ⁻⁷ a 1,96 x 10 ⁻⁵	3,4 x 10 ⁻⁹	1,1x10 ⁻⁸	Este trabalho
CV	Fosfato (pH 7,0)	VPD	1x 10 ⁻⁶ a 75 x 10 ⁻⁶	1,8 x 10 ⁻⁶	6,1 x 10 ⁻⁶	13
FTO	H ₂ SO ₄ (pH 2,0)	VOQ	5 a 500 x 10 ⁻⁶	3,68 x 10 ⁻⁶	12,27x10 ⁻⁶	14
CV	H ₂ SO ₄ (pH 2,5)	VC	1,15 x 10 ⁻⁵ a 1,73 x 10 ⁻⁴	5,75 x 10 ⁻⁶	—	64
CV	H ₂ SO ₄	VC	2,6 x 10 ⁻⁵ a 1,8 x 10 ⁻⁴	1,9 x 10 ⁻⁵	—	65

3.17 ESCOLHA DA MELHOR TÉCNICA ELETROQUÍMICA

O LD encontrado para voltametria cíclica foi $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, para cronoamperometria $9,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e para voltametria de pulso diferencial $3,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos indicaram a possibilidade da utilização de eletrodo de grafite pirolítico modificado com CoPc como alternativa para a determinação do antioxidante ácido α -lipóico com técnicas eletroanalíticas, pois os LD encontrados estão próximos da literatura de LD $1,8 \times 10^{-5}$ [13] e LD $5,75 \times 10^{-6}$ [64].

O limite de detecção encontrado na técnica de voltametria de pulso diferencial demonstrou que o eletrodo de trabalho GP/CoPc pode ser utilizado para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a determinação de ALA em amostras reais.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

4.0 CONCLUSÃO

Tendo em vista os estudos realizados através da técnica de voltametria cíclica (VC), foi observado que a resposta do eletrodo de grafite pirolítico (GP) modificado com a metaloftalocianina de cobalto (CoPc), quando comparada ao eletrodo de não modificado, para a oxidação de ácido α -lipóico (ALA), apresentou um aumento significativo nas correntes de pico indicando maior sensibilidade, ou seja, uma melhor atividade eletrocatalítica deste sensor na determinação de ALA.

Pelo estudo realizado na escolha do melhor eletrodo de trabalho com a técnica de VC, foi observado que a resposta do eletrodo GP modificado com CoPc quando comparada com a do eletrodo não modificado e com as dos eletrodos modificados com CuPc, NiPc, FePc, ZnPc e H₂Pc para a oxidação de ALA, apresentou um aumento significativo nas correntes de pico do mesmo, além de apresentar melhores perfis voltamétricos e correntes com magnitudes mais acentuadas, indicando uma maior sensibilidade, isto é, uma melhor atividade eletrocatalítica deste sensor na determinação do antioxidante.

A investigação do efeito do pH's sobre o sinal analítico do sensor mostrou que a obtenção da máxima sensibilidade na determinação do ALA foi no pH 7,0. Os testes de detecção do ácido α -lipóico sobre o eletrodo GP/CoPc mostraram que a resposta de corrente foi mais intensa em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

A repetibilidade e a reprodutibilidade do sensor proposto, avaliadas em termos de desvio padrão relativo, apresentaram valores inferiores a 5%, o que significa que o sensor estudado apresentou valores bastante satisfatórios.

Para a técnica de voltametria de pulso diferencial foram realizadas variações de velocidade de varredura do potencial, amplitude de pulso e tempo de duração do pulso, onde a velocidade de varredura de 0,025 V s⁻¹, amplitude de pulso

0,8 V e tempo de duração do pulso de 200 ms foram as que apresentaram melhor resposta em termos de corrente de pico e perfis voltamétricos.

O LD encontrado para voltametria cíclica foi $8,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, para cronoamperometria foi $9,8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e para voltametria de pulso diferencial $3,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Esses limites encontrados estão próximos da literatura de LD $1,8 \times 10^{-5}$ [14] e LD $5,75 \times 10^{-6}$ [15] e são muito apropriados para a determinação de ácido α -lipóico em amostras reais.

Os testes de detecção para ALA mostraram utilizando eletrodo GP/CoPc, para as técnicas de VC, Crono e VPD, mostraram que a VPD é mais sensível que as demais, apresentando também melhor LD.

Por fim, pode-se afirmar que a vantagem de uso de eletrodos de GP modificados pela adsorção de CoPc, para a determinação de ALA, consiste na possibilidade de trabalhar com eletrodos modificados a baixo custo, com precisão, exatidão, sensibilidade e estabilidade.

4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES

Aplicar a metodologia com melhor resposta analítica em amostras de suplementos alimentares ou formulações de produtos comerciais;

Comparar a metodologia proposta com outro método para determinação do ALA

CAPÍTULO 5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BARA, M.T.F., SERRANO, S. H.P, ASQUIERI Eduardo R.,LÚCIO .T. C. Medida del Potencial Anódico en Estado Sólido: Una Herramienta para La Determinación del Potencial Antioxidante de Fitoterápicos. **Latin American Journal of Pharmacy**, 27 , 89-92, 2008.

[2]HAMID, A. A. *et al.* Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, p. 465-469, 2002.

[3]AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

[4]POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

[5]RAYMUNDO, M. S. **Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro em Extratos de Algas Marinhas**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

[6]SOARES, M. WELTER L., KUSKOSKI E. M.,GONZAGA L., FETT R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de Uvas Niágara e Isabel, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 01, p. 059-064, 2008.

[7]SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

[8] SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

[9]JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, New York, v.15, n.5, p.755-766, 1995.

[10]HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

[11] DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research, Baltimore**, v.43, n.2, p.460-472, 1983.

[12] ALARFAJ. N. A. Adsorptive Stripping Anodic Voltammetric Determination of Thiocetic Acid in Bulk and Pharmaceutical Formulations. **International Journal of Biomedical Science**. v.5, 2009.

[13] BRETT, O. M. A.; Anodic Oxidation of α -Lipoic Acid at a Glassy Carbon. Electrode and Its Determination in Dietary Supplements. **Analytical Letters**, v.40, p.1763 – 1778, 2007.

[14] MIRANDA, M.P, FAUNDEZ, M., ARMIJO, F. Use of fluorine-doped tin oxide electrodes for lipoic acid determination in dietary supplements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.668, p.1-6, 2012.

[15] SATOH, S., TOYO'OKA T., FUKUSHIMA, T., INAGAKI S. Simultaneous determination of lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v.854, p.109–115, 2007.

[16] ZHANG S. Jie, GE Q. Fu, GUO D. Wu, HU W. Xiao, LIU H. Zhang, Synthesis and anticancer evaluation of α -lipoic acid derivatives, **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**.v.20, p.3078–3083, 2010.

[17] BRANDÃO, M. D. V. **Efeito do ácido lipóico sobre parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos traço falciformes ou pacientes falciformes**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2008.

[18] PEREZ, O.G.;CASTANEDA, R.E.G. Therapeutic of α -lipoic acid and vitamin E. **Nutrition Research**. v.26, p.1-5, 2006.

[19] MORIKAWA, T.; YASUNO, R.; WADA, H. DO mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding α -lipoic acid synthase located in mitochondria. **Febs Letter**, v.498, p.16-21, 2001.

[20] DELLA CROCE, C., BRONZETTI, G., CINI, M., CALTAVUTURO, L. Protective effect of lipoic acid against hydrogen peroxide in yeast cells. **Toxicol in Vitro**, v.17, p.753–759, 2003.

[21] HOLMQUIST, L.; STUCHBURY, G.; BERBAUM, K.; MUSCAT, S.; YOUNG, S.; HAGER, K.; ENGEL, J.; MÜNCH, G.; **Pharmacol. Ther.** v. 113, p.154, 2007.

[22] SITTON, A., SCHMID, M.G., Gu "bitz, G., ABOUL-ENEIN, H.Y. Determination of lipoic acid in dietary supplement preparations by capillary electrophoresis. **J. Biochem. Bioph. Methods**, v.61, p.119–124, 2004.

[23] KATAOKA, H., HIRABAYASHI, N., MAKITA, M. Analysis of lipoic acid in biological samples by gas chromatography with flame photometric detection. **J. Chromatog: Biomed. Appl.**, v.615, p.197–202, 1993.

[24] PRAHALATHAN, C., SELVAKUMAR, E., VARALAKSHMI, P. Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. **Clin. Chimica Acta.**, v.360, p. 160–166, 2005.

[25] SILVA, R. A. C. A. **Eletrodos de grafite pirolítico modificados com ftalocianna de cobalto e nafion para a oxidação de dopamina na presença de**

ácido ascórbico. 2004 18 f Monografia (Curso de química Industrial) Universidade Federal do Maranhão, 2004.

[26] LOPES, C. I. **Determinação do herbicida paraquat sobre eletrodos de grafite pirolítico modificados com ftalocianina de cobalto utilizando voltametria de onda quadrada**. 2006 14 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão, 2006.

[27] CONCEIÇÃO, C. D. D.C. **Construção e aplicação analítica de eletrodos de pasta de carbono** 2004, 18 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) Universidade Federal de São Carlos, 2004.

[28] MACIAS, J. M. P., et al. Determination of paraquat by cathodic stripping voltammetry after accumulation through the formation of an ion pair on a hanging mercury drop electrode. **Electroanalysis**, v. 5, p. 79-83, 1993.

[29] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalítica. **Química Nova**, v. 25, p. 1012-1021, 2002.

[30] SERRA, A.; DOMINGOS F.; PRATA, M. M. Intoxicação por paraquat. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 25-32, 2003.

[31] MATTOS, I. L.; GORTON, L. Filmes de metal-hexacianoferrato: **Uma ferramenta em Química Analítica**. **Química Nova**, v. 24, p. 200-205, 2001.

[32] HONORÉ, P., et al. Paraquat poisoning: State of the Art. **Acta Clinica Bélgica**, v. 49, p. 220-228, 1994.

[33] SOUZA, D., MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, p. 644-647, 2003.

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

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

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

[37] STRADIOTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal Brazilian of Chemistry Society**, v. 14, p. 159-173, 2003.

[38] ALEXIOU, C.; LEVER, A. P. L. Tuning metalloporphyrin and metallophthalocyanine redox potentials using ligand electrochemical (E_L) and Hammett (δ_p). **Coordination Chemistry Reviews**, v. 216-217, p. 45-54, 2001

[39] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalítica. **Química Nova**, v. 25, p. 1012-1021, 2002.

[40] MOSER, H. F.; THOMAS, A. L. The phthalocyanines: properties. **Cell and Molecular Biology**, v. 1, p. 45-57, 1983.

[41] TODD, W. J., et al. Electrochemically induced metalation of polymeric phthalocyanines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 4887. 1998.

[42] CHAVES, J. A. P. Propriedades eletrocatalíticas da ftalocianina de manganês e da ftalocianina tetracarboxilada de ferro para redução oxigênio e oxidação da hidrazina. 123f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1997.

[43] LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. Phtalocyanines: properties and applications. New York: **VCH Publishers**, v.53, 1993.

[44] CONCEIÇÃO, C. D. C. Eletrocatalise das reações de redução de oxigênio e oxidação de hidrazina por tetrapiridilporfirina de ferro. 2000. 103f. **Dissertação**

(Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2000.

[45] ZAGAL, J. H., et al. Linear versus volcano correlations between electrocatalytic activity and redox and electronic properties of metalophthalocyanines. **Electrochimica Acta**, v. 44, p. 1349-1357, 1998.

[46] ZHANG, J.; PIETRO, W. J.; LEVER, A. B. P. Rotating ring disk electrode analysis of CO₂ reduction electrocatalyzed by a cobalt tetramethyl pyridoporphyrzine on the disk and detected as CO on platinumium ring. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 403, p. 93-100, 1996.

[47] ABE, T., et al. Factors affecting selective electrocatalytic CO₂ reduction with cobalt phtalocyanines incorporated in polyvinylpyridine membrane coated on a graphite electrode. **Electroanalytical Chemistry**, v. 412, p. 125-132, 1996.

[48] CÁRDENAS-JIRÓN, G. I., et al. Theoretical study of the interaction energy profile of cobalt phtalocyanine and 2-mercaptoethanol: effect of the graphite on the global reactivity. **Journal of Molecular Structure**, v. 580, p. 193-200, 2002.

[49] CARO, C. A.; ZAGAL, J. H. BEDIUI, F. Electrocatalytic activity of substituted metalophthalocyanines adsorbed on a vitreous carbon electrode for nitric oxide oxidation. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 150, p. 95-103, 2003.

[50] MOSER, H. F.; THOMAS, A. L. The phthalocyanines: properties. Flórida: Boca Raton, v. 1, p. 45-57, 1983.

[51] ARDILES, P., et al. Electrocatalytic behavior oxidation of hidrazyne at polymeric iron-tetraaminophthalocyanine modified electrodes. **Journal of Molecular Catalysts A: Chemical**, v. 165, p. 169-175, 2001.

[52] SOTOMAYOR, M. D. P. T., et al. Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds. **Analytical Chimica Acta**, v. 455, p. 215-223, 2002.

[53] ONI. J.; NYOKONGO, T. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and serotonin on a carbon paste electrodes modified with iron (II) phthalocyanine complexes. **Analytical Chimica Acta**, v. 434, p.9-21, 2001.

[54] ALEXIOU, C.; LEVER, A. P. L. Tuning metalloporphyrin and metallophthalocyanine redox potentials using ligand electrochemical (E_L) and Hammett (δ_p). **Coordination Chemistry Reviews**, v. 216-217, p. 45-54, 2001.

[55] BRAININA, K. Z. Advances in voltammetry. **Talanta**, v 34, p. 41-50, 1987.

[56] SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. **Principles of Instrumental Analysis**. 5 ed. Philadeldhia, Sauders, 917p, 1998.

[57] RUPP, E.B, ZUMAN, P. Polarographic determinacion of somes pesticides.

Application to a study of their adsorption on lignin, **J. Agric. Food. Chem**, v.40, p. 2016-2021, 1992.

[58] OSTERYOUNG, J; OSTERYOUNG, K. Square wave Voltammetry. **Analytical Chemistry**, v.57, p. 101-110, 1985.

[59] GIROTTI E. M; DE PAOLI M. A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: Importância, técnicas e modelos teóricos. *Química Nova*,v.22, 1999.

[60] QUINTINO M. S. **DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS ASSOCIADOS A BATCH INJECTION ANALYSIS (BIA) PARA APLICAÇÕES ANALÍTICAS**. Tese de Doutorado, São Paulo, 2003.

[61] SOUZA D. D.; MACHADO. S. A.S. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA. PRIMEIRA PARTE: ASPECTOS TEÓRICOS. **Química. Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.

[62] WANG, J. **Analytical Electrochemical**. 2^a ed. Ed. John Wiley e Sons, Canada, 2000.

[63] LAVIRON, E. **J. Electroanal. Chem.**, v.101, p.19, 1979.

[64] ZIYATDINOVA, G. K.; BUDNIKOV, G. K. Electrochemical Determination of Lipoic Acid. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, p. 288–290, 2004.

[65] ZIYATDINOVA, G. K.; GRIGOR'EVA, L.V. Electrochemical Determination of Unithiol and Lipoic Acid at Electrodes Modified with Carbon Nanotubes. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, p. 185–188, 20