

Universidade do Minho
Escola de Ciências

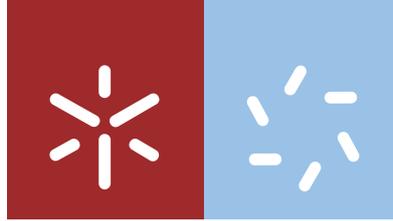
José Pedro Pereira Rebelo da Rocha

**Determinação de polifenóis em vinhos:
Validação do método**

José Pedro Pereira Rebelo da Rocha **Determinação de polifenóis em vinhos: Validação do método**

UMinho | 2018

outubro de 2018



Universidade do Minho
Escola de Ciências

José Pedro Pereira Rebelo da Rocha

**Determinação de polifenóis em vinhos:
Validação do método**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob orientação da
Professora Doutora Dulce Geraldo
e da
Professora Doutora Fátima Bento

outubro de 2018

Declaração

Nome: José Pedro Pereira Rebelo da Rocha

Título da dissertação:

Determinação de polifenóis em vinhos: Validação do método

Orientadora:

Professora Doutora Dulce Geraldo

Professora Doutora Fátima Bento

Ano de conclusão: 2018

Designação do mestrado: Mestrado em técnicas de caracterização e análise química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 03 de outubro de 2018

Assinatura: _____

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer às minhas orientadoras Professora Doutora Dulce Geraldo e Professora Doutora Fátima Bento. Os conhecimentos transmitidos por estas docentes, que me acompanham já desde o meu tempo de licenciatura, contribuíram bastante no meu processo de aprendizagem. Foram orientadoras que se mostraram, ao longo de todo o trabalho desenvolvido, muito atenciosas e profissionais, estando completamente grato por isso.

Quero agradecer também aos meus amigos, principalmente à Kateryna Kasyanenko e Rita Barros que sempre partilharam bons momentos comigo ao longo dos últimos anos da minha vida académica. Aproveito ainda para agradecer aos meus colegas de laboratório por toda a ajuda, simpatia e amizade prestada.

Finalmente, um agradecimento muito, mas muito especial à minha querida família que me proporcionará para sempre um verdadeiro amor incondicional.

Um muito obrigado a todos que me acompanharam nesta etapa tão importante da minha vida.

Resumo

A modificação de elétrodos serigrafados de carbono (SPCE) com nanotubos de carbono (CNT) permitiu aumentar a sensibilidade de detecção de compostos fenólicos (CF). Este aumento de sensibilidade está relacionado com a interação dos CF com os grupos funcionais que são introduzidos nos CNT quando estes são tratados, num banho de ultrassons, em metanol/água.

O sensor desenvolvido foi testado a partir de um conjunto de dez CF com diferentes estruturas químicas, nomeadamente polifenóis com grupos OH em posição orto, para e meta, e monofenóis. As misturas preparadas com alguns destes CF foram caracterizadas com o sensor desenvolvido e os resultados obtidos foram analisados tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo.

A qualidade dos resultados obtidos com o sensor e método desenvolvidos foi avaliada a partir dos parâmetros de desempenho e da comparação com os resultados obtidos por outros métodos, nomeadamente pelo método espectroscópico (medição da absorvância a 280 nm) e pelo método de *Folin-Ciocalteu (F-C)*. A baixa incerteza de medição obtida (11 %) e a elevada seletividade (nomeadamente no que diz respeito à interferência por parte do ácido ascórbico e do dióxido de enxofre) refletem a fiabilidade dos resultados obtidos com o sensor desenvolvido. Na comparação com os outros métodos, foi caracterizada a dispersão dos dados de sensibilidade relativamente ao universo de CF selecionado. Este parâmetro é relevante, no sentido em que uma maior dispersão da sensibilidade traduz-se num aumento do peso relativo com que alguns dos CF contribuem para a medição da concentração total. Estes pesos podem introduzir desvios importantes, particularmente porque os componentes com maior peso não são os que reagem mais extensamente com as espécies reativas de oxigénio.

Abstract

The modification of screen printed carbon electrodes (SPCE) with carbon nanotubes (CNT) allowed the detection sensibility of phenolic compounds to increase. This sensibility increase is related with the interaction of phenolic compounds with functional groups that are introduced in the CNT when these are treated, in an ultrasound bath, of methanol/water.

The developed sensor was tested from a set of ten phenolic compounds with different chemical structures, namely polyphenols with OH groups in *orto*, *para* and *meta* positions, and monophenols. The prepared mixtures with some of these phenolic compounds were characterized with the developed sensor and the results obtained were analyzed both qualitatively and quantitatively.

The quality of the results obtained with the developed sensor and method was evaluated from the performance parameters and from the comparison with the results obtained by other methods, namely by the spectroscopy method (absorbance measurement at 280 nm) and by the *Folin-Ciocalteu* method. The low measurement uncertainty obtained (11 %) and the high selectivity (namely in regarding to the interference by the ascorbic acid and sulfur dioxide) reflect the reliability of the results obtained with the developed sensor. In comparison with other methods, the sensibility data dispersion was characterized in connection with the selected universe of phenolic compounds. This parameter is relevant, in a sense that a greater dispersion of the sensibility reflects on an increase of the relative weight with which some of the phenolic compounds contribute for the total concentration measurement. These weights can introduce important deviations, particularly because the components with a higher weight are not the ones which react more extensively with the oxygen reactive species.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Capítulo 1- Introdução	1
1. Introdução Teórica	3
1.1 Objetivo	3
1.2 Breve introdução ao vinho	3
1.3 Produção do vinho	4
1.4 Compostos fenólicos das uvas e dos vinhos	7
1.4.1 Compostos fenólicos não flavonóides.....	9
1.4.1.1 Ácidos hidroxibenzoicos.....	9
1.4.1.2 Ácidos hidroxicinâmicos.....	9
1.4.2 Compostos fenólicos flavonóides.....	9
1.4.2.1 Flavonóis.....	10
1.4.2.2 Flavanóis.....	10
1.4.2.3 Antocianinas.....	11
1.4.2.4 Taninos	12
1.5 Importância dos compostos fenólicos na saúde	12
1.6 Métodos de quantificação de compostos fenólicos	13
1.6.1 Métodos óticos.....	13
1.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	15
1.6.3 Métodos eletroquímicos	16
Capítulo 2- Parte Experimental	19
2. Materiais e Métodos	21
2.1 Reagentes e soluções	21
2.2 Equipamentos e métodos	23
2.2.1 Ensaio eletroquímico.....	23
2.2.2 Método espectroscópico	28
2.2.3 Método de Folin-Ciocalteu.....	29
2.2.4 Espectroscopia de infravermelho	30
2.2.5 Termogravimetria.....	31
2.3 Tratamento dos resultados	31
Capítulo 3- Apresentação e discussão dos resultados	33

3. Utilização de nanotubos de carbono na determinação eletroquímica de polifenóis	35
3.1 Eléctrodo de carbono vítreo modificado com CNT funcionalizados.....	35
3.2 SPCE modificado com CNT funcionalizados	38
3.3 Otimização da resposta do sensor CNT@SPCE	41
3.3.1 Parâmetros de adsorção	42
3.3.2 Solvente usado na suspensão dos CNT e massa de CNT.....	44
3.4 Grupos funcionais envolvidos na etapa do reconhecimento de polifenóis.....	45
4. Caracterização da resposta do sensor de polifenóis baseado em CNT relativamente a polifenóis com diferentes estruturas.....	51
4.1 Caracterização de compostos fenólicos por CV e DPV.....	51
4.2 Análise de misturas de polifenóis	58
5. Validação do sensor e método de análise de compostos fenólicos.....	65
5.1 Análise com o sensor CNT@SPCE.....	65
5.2 Parâmetros de desempenho do sensor CNT@SPCE	68
5.2.1 Gama de trabalho, linearidade, sensibilidade e limite de quantificação	68
5.2.2 Incerteza de medição	70
5.2.2.1 Precisão	70
5.2.2.2 Justeza	71
5.2.2.3 Incertezas combinada e expandida.....	72
5.2.3 Seletividade	72
5.2.3.1 Etanol	72
5.2.3.2 Ácido ascórbico	73
5.2.3.3 Dióxido de enxofre	74
5.3 Comparação com outros métodos.....	75
5.3.1 Método espectroscópico	75
5.3.1.1 Compostos fenólicos modelo.....	76
5.3.1.2 Amostra de vinho tinto	79
5.3.2 Método de <i>Folin-Ciocalteu</i>	79
5.3.2.1 Compostos fenólicos modelo.....	79
5.3.2.2 Amostra de vinho tinto	81
Capítulo 4- Conclusão.....	83
6. Considerações finais.....	85
Capítulo 5- Bibliografia	89
7. Referências bibliográficas	91
Anexos.....	99

Lista de abreviaturas e Siglas

- τ_o – Grau de cobertura da superfície do eletrodo
- 2,4AHB – Ácido 2,4-dihidroxibenzoico
- 2,5AHB – Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
- 3,4AHB – Ácido 3,4-dihidroxibenzoico
- 3AHB – Ácido 3-hidroxibenzoico
- A – Absorvância
- A – Área do eletrodo
- AC – Ácido cafeico
- Acum – Ácido *p*-cumárico
- AF – Ácido ferúlico
- AG – Ácido gálico
- AT – Ácido tânico
- CAT – Catequina
- CF – Compostos fenólicos
- CNT – Nanotubos de carbono
- CNT@GCE – Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono
- CNT@SPCE – Eletrodo serigrafado de carbono modificado com nanotubos de carbono
- CPE – Eletrodo de pasta de carbono
- CV – Voltametria cíclica
- DPV – Voltametria diferencial por impulsos
- E – Potencial
- E_p – Potencial do pico
- F-C – Folin-Ciocalteu*
- FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- GCE – Eletrodo de carbono vítreo
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- HQ – Hidroquinona
- I – Intensidade de corrente
- I_p – Intensidade de corrente do pico
- ITO – Óxido de estanho e índio
- IV – Infravermelho
- LQ – Limite de quantificação
- m-CAT – *meta*-catequina
- OH – Hidroxilo

PEDOT – Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
r – Coeficiente de correlação
R – Constante de gases
rpm – rotações por minuto
s – Desvio padrão
SPCE – Eléetrodo serigrafado de carbono
SPE – Eléetrodo impresso na tela
TGA – Termogravimetria
UV/Vis – Ultravioleta e visível
V – Velocidade de varrimento
 ΔE_p – Amplitude do impulso de potencial
 ΔE_s – Incremento de potencial
 ΔI – Variação da intensidade de corrente

Capítulo 1- Introdução

1. Introdução Teórica

1.1 Objetivo

O principal objetivo do trabalho apresentado foi desenvolver e validar um método e um sensor, de CF, baseado em elétrodos SPCE modificados CNT tratados com uma mistura de metanol/água.

A otimização dos métodos de modificação da superfície do eletrodo e de medição, recorrendo à voltametria diferencial por impulsos (DPV), foi realizada com o objetivo de maximizar a sensibilidade de detecção dos CF e minimizar a resposta por parte de compostos eletroativos como o ácido ascórbico e dióxido de enxofre que são interferentes comuns na análise de vinhos.

A validação do método recorreu à análise de um conjunto de CF, isolados e em misturas, e a uma amostra de vinho de modo a demonstrar o significado das respostas obtidas relativamente ao teor total de CF, que é um parâmetro importante para a caracterização de uvas e de vinho.

1.2 Breve introdução ao vinho

O vinho é uma bebida alcoólica altamente apreciada, versátil e produzida na Europa há vários milhares de anos [1]. Os dados apresentados pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) revelam que em Portugal o consumo médio é de 51,4 litros de vinho por ano por pessoa [2].

Este produto é obtido a partir da fermentação alcoólica do mosto das uvas [1]. A constituição química das uvas é suficientemente variada para que a fermentação ocorra sem ser necessário adicionar açúcares, ácidos, enzimas ou outros tipos de nutrientes que auxiliam na fermentação alcoólica [3]. A fermentação do mosto das uvas é auxiliada por vários tipos de leveduras. Estas encontram-se nas películas das uvas e têm como principal função transformar os açúcares, presentes nas uvas, em etanol, dióxido de carbono e energia (libertada sob a forma de calor) [1, 3].

Existem cinco tipos diferentes de vinhos, nomeadamente: os vinhos tintos, os brancos, os rosés, os espumantes e os fortificados também denominados de licorosos. Os vinhos tintos podem ser obtidos a partir de uvas tintas ou brancas e tintas. Os vinhos brancos são obtidos a partir das uvas brancas ou tintas desde

que as películas destas uvas não fiquem em contacto com o mosto. Os vinhos rosé podem ser produzidos misturando o vinho tinto com o vinho branco ou diminuindo o tempo de maceração (tempo de contacto entre o mosto e as películas). Os espumantes são vinhos que passam por uma segunda fermentação alcoólica. Esta segunda fermentação ocorre num recipiente fechado, de forma a que dióxido de carbono fique solubilizado no vinho. Nesta classe de vinhos destaca-se muito o champanhe. Finalmente, os vinhos fortificados correspondem aos vinhos cuja fermentação alcoólica é interrompida pela adição de aguardente. Podem ser mais ou menos doces, dependendo do momento em que é feita a interrupção da fermentação e do tipo de uva que é utilizada. Nesta última classe de vinhos destacam-se os seguintes vinhos: vinho do Porto, vinho da Madeira, Moscatel de Setúbal, Xerez e Marsala. A figura 1.1 mostra o aspeto de alguns dos tipos de vinhos referidos anteriormente [4].



Figura 1.1- Tipos de vinhos.

1.3 Produção do vinho

O processo utilizado na produção do vinho é um processo natural e designa-se por vinificação. A vinificação, apesar de requerer pouca intervenção humana, exige alguns cuidados por parte dos produtores de vinhos. A seguir são apresentadas as etapas que constituem o processo de vinificação.

A **colheita** é o processo em que a uva é retirada da videira. O momento em que é realizada esta etapa depende da variedade da uva, das condições climáticas e do estado de maturação da uva. A maturação da uva pode ser dividida em maturação tecnológica, onde se acompanham os níveis de açúcares e acidez, e

em maturação fenólica, onde se medem os níveis de polifenóis: antocianinas e taninos principalmente [5]. O estado de maturação da uva é um parâmetro muito importante, não só na etapa da colheita como também em toda a vinificação, visto que uvas colhidas antecipadamente, ou seja, com baixa maturação originam vinhos ácidos, menos alcoólicos e mais vulneráveis a oxidações indesejáveis. Para evitar a oxidação das uvas, a colheita geralmente é realizada em horários com temperaturas amenas e pode ser feita manualmente ou mecanicamente [6].

A produção do mosto é feita a partir do **esmagamento** das uvas. Estas são colocadas numa máquina que remove os engaços dos bagos e rompe, de forma delicada, as películas das uvas. Como consequência, o sumo das uvas escorre sem que as películas e grainhas sejam esmagadas [7]. O primeiro sumo obtido designa-se por mosto-flor e este é utilizado para fazer os vinhos brancos e espumantes, pois é mais rico em açúcares, mas apresenta uma menor acidez e um menor teor em polifenóis. A produção de vinhos brancos envolve uma etapa adicional antes da fermentação, em que o mosto é **prensado** de modo a separar o sumo das películas e grainhas [8].

Como já foi referido, na etapa da **fermentação alcoólica**, as leveduras consomem o açúcar natural, produzindo etanol, dióxido de carbono e energia sob a forma de calor. Os fatores mais importantes nesta etapa são o tipo de leveduras, o local e a temperatura de fermentação. A atividade das leveduras depende da temperatura do mosto, sendo necessário uma temperatura superior a 12 °C para que a fermentação alcoólica ocorra. A temperatura utilizada na fermentação depende do tipo de vinho que se pretende produzir e não deve ser muito alta, pois a temperaturas elevadas as leveduras podem entrar em colapso, ocorrendo o aparecimento da indesejável acidez volátil. A temperatura de fermentação no vinho tinto deve situar-se entre 25 e 30 °C. Esta temperatura permite uma elevada extração dos CF, fazendo com que os vinhos tintos adquiram mais cor, aroma e estabilidade oxidativa. Já nos vinhos brancos a temperatura de fermentação ocorre entre os 16 e 20 °C, havendo uma menor extração dos CF, mas, ao mesmo tempo, uma maior conservação dos aromas [9,10].

Após a fermentação alcoólica, os resíduos sólidos, a matéria orgânica, as bactérias e as leveduras que ficam depositados no fundo do tanque são eliminados por **filtração**.

O vinho filtrado é, posteriormente, submetido a diversos processos com o objetivo de o **estabilizar** do ponto de vista térmico e microbiológico. O primeiro processo consiste em diminuir a temperatura do vinho de modo a precipitar os cristais de sais tartáricos de potássio e de cálcio que são posteriormente eliminados por filtração. Este processo aumenta a transparência e a estabilidade da cor do vinho. Os vinhos tintos não são submetidos a este tratamento, porque eles geralmente são consumidos à temperatura ambiente e a esta temperatura não ocorre a precipitação de sais. O processo de eliminação dos microrganismos envolve um aquecimento /pasteurização do vinho. Neste processo, também se faz a adição de dióxido de enxofre na forma de metabissulfito de sódio ou potássio. Ao aquecer o vinho na presença de dióxido de enxofre, o excesso de cobre presente no vinho sofre redução e passa para uma forma coloidal, sendo, posteriormente, eliminado por filtração. Para além disso, o dióxido de enxofre estabiliza as enzimas e leveduras, evitando uma segunda fermentação do vinho [9, 11].

A **maturação** e a fermentação do vinho são geralmente realizadas nos tanques de aço inoxidável ou em barris de madeira de carvalho. Quando a fermentação dos vinhos é feita em barris, o vinho torna-se mais macio, claro, menos frutado e com aromas amadeirados. Os produtores de vinho preferem barris construídos com o género *Quercus*. De todas as madeiras de carvalho, as mais utilizadas são o carvalho da América do Norte e o da Europa [12]. A primeira é mais rica em compostos voláteis como, por exemplo, vanilina e lactonas, enquanto o carvalho da Europa possui maior teor de CF [13]. Os barris de madeira de carvalho possibilitam maior exposição do vinho ao oxigénio, enquanto que os tanques de aço, cada vez mais utilizados, limitam a exposição do vinho ao oxigénio. A maturação dos vinhos brancos é feita, na maioria dos casos, em tanque de aço para manter os aromas e frescura que lhes são característicos. Nos vinhos tintos, os barris de carvalho são os mais usados, acrescentando aos vinhos novos aromas, sabores e tornando-os mais macios. Atualmente, é muito comum os produtores realizarem a maturação do vinho em tanques de aço, para

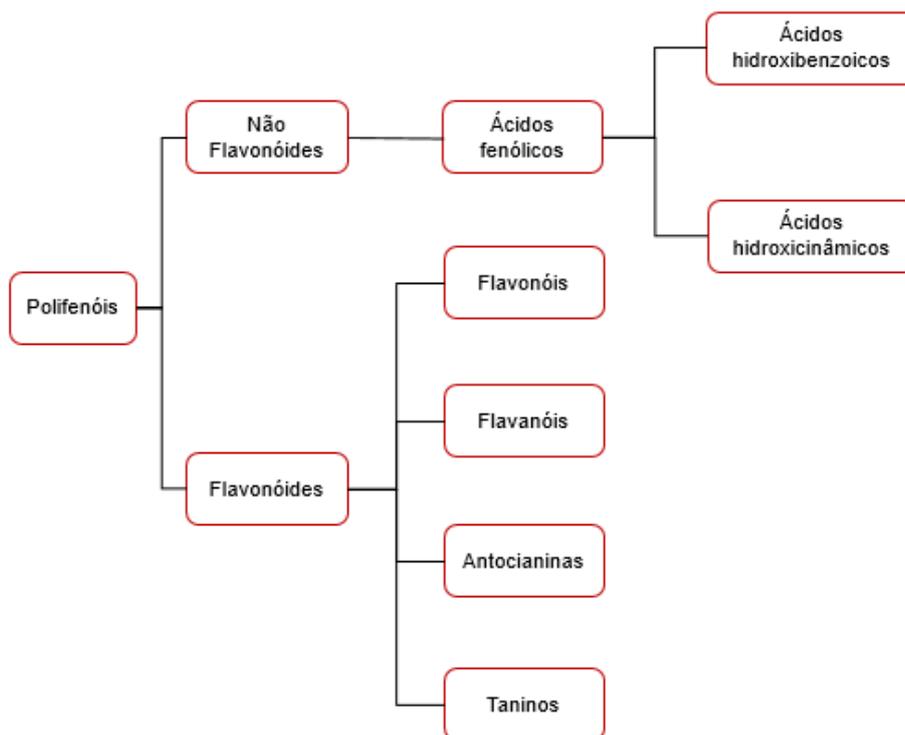
limitar a exposição ao oxigénio, mas na presença de blocos de madeira de carvalho para que o vinho adquira novos aromas e CF [14].

O **engarrafamento** é a última etapa do processo de vinificação. O vinho é engarrafado e colocado em repouso até ser comercializado. Este repouso é muito importante e imprescindível para todos os vinhos. Os vinhos podem ficar em repouso durante dias, semanas, meses ou até mesmo durante muitos anos, mas o tempo de repouso depende da estabilidade oxidativa dos vinhos e esta, por sua vez, está relacionada com o tipo e a concentração de CF.

1.4 Compostos fenólicos das uvas e dos vinhos

Os CF são metabolitos secundários produzidos por plantas. Estes compostos apresentam um ou mais grupos hidroxilos ligados a um anel aromático [15]. A presença de CF está diretamente relacionada com a qualidade dos vinhos, sendo responsáveis pela cor, corpo, adstringência e estabilidade oxidativa dos vinhos. A síntese enzimática destas substâncias ocorre nas células das uvas, estando dependente das condições ambientais em que ocorre o desenvolvimento dos bagos (uvas) [16].

Os CF estão divididos em dois grandes grupos: compostos flavonóides e não flavonóides. O esquema 1.1 apresenta a classificação dos vários CF.



Esquema 1.1- Classificação dos vários compostos polifenólicos.

O grupo dos compostos não flavonóides é constituído por um único subgrupo: os ácidos fenólicos. Este subgrupo é constituído pelos CF que são derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico. A figura 1.2 apresenta as estruturas químicas do ácido benzoico e do ácido cinâmico.

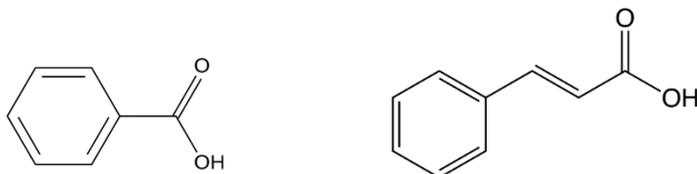
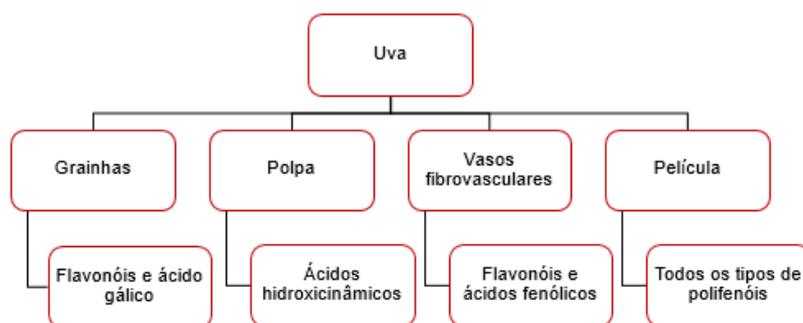


Figura 1.2- Estrutura química do ácido benzoico (esquerda) e do ácido cinâmico (direita).

Os ácidos cafeico (AC), ferúlico (AF) e *p*-cumárico (ACUM) são exemplos de ácidos hidroxicinâmicos (derivados do ácido cinâmico). Como exemplos de ácidos hidroxibenzoicos (derivados do ácido benzoico) podem referir-se os ácidos gálico (AG), 3,4-dihidroxibenzoico (3,4AHB), 2,5-dihidroxibenzoico (2,5AHB), 2,4-dihidroxibenzoico (2,4AHB) e o ácido 3-hidroxibenzoico (3AHB).

O grupo dos compostos flavonóides é o grupo mais complexo de polifenóis, pois é constituído por quatro subgrupos, nomeadamente, os flavonóis, flavanóis, antocianinas e taninos. A catequina (CAT) e o ácido tânico (AT) são exemplos de flavonóides que pertencem aos subgrupos flavanóis e taninos, respetivamente [17].

Os CF distribuem-se de modo desigual pelas diversas partes da uva. O esquema 1.2 apresenta a distribuição dos vários tipos de CF na uva [16].



Esquema 1.2- Distribuição dos vários tipos de compostos fenólicos na uva.

1.4.1 Compostos fenólicos não flavonóides

Os CF da família dos não flavonóides estão amplamente presentes no reino vegetal. Estes compostos raramente estão presentes nas plantas na forma livre, pois encontram-se ligados, por ligações do tipo éster, éter ou acetal, a componentes estruturais das plantas (celulose ou proteínas), a outros CF (flavonóides, por exemplo) ou a outros tipos de moléculas (açúcares ou ácidos orgânicos).

1.4.1.1 Ácidos hidroxibenzoicos

Os ácidos hidroxibenzoicos mais importantes nos vinhos são o ácido vanílico, siríngico, salicílico e o AG. Os primeiros ácidos encontram-se ligados às paredes celulares das células vegetais e o AG está presente na forma de ésteres de flavanóis. Os ácidos hidroxibenzoicos presentes nos vinhos em menores quantidades são os ácidos 3,4AHB, 2,5AHB e o 3AHB. Estes ácidos, que se encontram nas uvas na forma de ésteres, sofrem uma hidrólise lenta durante a produção e conservação do vinho e, apesar de estarem presentes nos vinhos em menores quantidades, são também muito importantes, uma vez que são considerados excelentes antioxidantes [18, 19].

1.4.1.2 Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos são os principais CF dos vinhos brancos, pois encontram-se principalmente nos vacúolos das células das películas e das polpas das uvas. Estes compostos encontram-se combinados com o ácido tartárico na forma de monoésteres e desempenham um papel muito importante no aroma e no sabor dos vinhos brancos [16]. Os mais importantes são o AF, AC e ACUM. Na polpa da uva predomina o ácido cafeico, enquanto na película da uva predomina o ácido *p*-cumárico [20]. A oxidação enzimática destes compostos é responsável pelo acastanhamento do mosto e do vinho [20].

1.4.2 Compostos fenólicos flavonóides

Os CF da família dos flavonóides são compostos cuja estrutura básica consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel de pirano. Estes compostos estão

divididos de acordo com o grau de oxidação do anel de pirano e são os principais responsáveis pela estrutura (corpo) e cor dos vinhos. Encontram-se presentes nas grainhas, polpas e nas películas das uvas e os mais importantes são as antocianinas, os flavano-3-ol e as proantocianidinas. Os flavonóides podem encontrar-se no estado livre ou polymerizados com outros flavonóides, açúcares ou não flavonóides [21, 22]

1.4.2.1 Flavonóis

Os flavonóis são CF caracterizados por apresentarem uma insaturação no anel de pirano e um grupo hidroxilo na posição 3 desse anel. A figura 1.3 mostra a estrutura básica dos flavonóis.

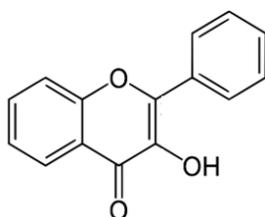


Figura 1.3- Estrutura básica dos flavonóis.

Os compostos quempferol, quercetina e miricetina são exemplos de flavonóis. Estes polifenóis encontram-se apenas nas películas das uvas. Para além de desempenharem um papel muito importante na evolução da cor dos vinhos tintos (juntamente com as antocianinas) protegem as uvas contra a radiação ultravioleta [22 - 24]

1.4.2.2 Flavanóis

No grupo dos flavanóis é possível destacar os compostos 3-flavanóis e as proantocianidinas. Os 3-flavanóis são caracterizados por apresentarem um anel de pirano saturado e os principais compostos desta classe são a CAT e a epicatequina. A figura 1.4 mostra a estrutura química da catequina.

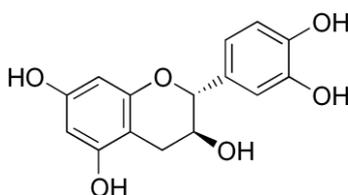


Figura 1.4- Estrutura química da catequina.

Estes compostos, ao contrário dos restantes polifenóis, encontram-se nas uvas no estado livre, sendo que a CAT está presente em maiores quantidades relativamente à epicatequina [25].

Relativamente às proantocianidinas, as suas unidades fundamentais são as moléculas de 3-flavanóis: CAT e epicatequina. As proantocianidinas podem surgir na forma de dímeros, trímeros, oligómeros ou de polímeros e as mais importantes são as procianidinas, ou seja, oligómeros ou polímeros de CAT e epicatequinas. As procianidinas localizam-se principalmente nas partes sólidas das uvas, como nas películas [20, 22].

Os vinhos tintos têm teores mais elevados de procianidinas em relação aos vinhos brancos, pois na produção do vinho tinto o tempo de maceração é maior e, como consequência, ocorre uma extração mais extensa destes compostos [26].

1.4.2.3 Antocianinas

As antocianinas são polifenóis que estão presentes apenas nas uvas tintas. Estas representam uma parte muito importante dos flavonóides, pois estão relacionadas com a cor dos vinhos tintos e encontram-se nas três ou quatro primeiras camadas da hipoderme da uva (película) [27, 28].

Em termos estruturais, as antocianinas são glicósidos, ou seja, compostos que apresentam um açúcar (geralmente o monossacarídeo glicose) ligado a uma CAT, por exemplo [1]. As antocianinas mais abundantes nas uvas da *Vitis Vinifera* são a 3-G-cianidina, 3-G-delfinidina, 3-G-peonidina, 3-G-petunidina e 3-G-malvidina, sendo esta última a mais abundante nas uvas [16]. A figura 1.5 mostra a estrutura da 3-G-cianidina. A cor das antocianinas varia de acordo com a estrutura química e as condições físico-químicas do meio. Por exemplo, as antocianinas apresentam cor rosa quando têm grupos hidroxilo e cor azul quando estes grupos são substituídos por grupos metoxilo [29, 30].

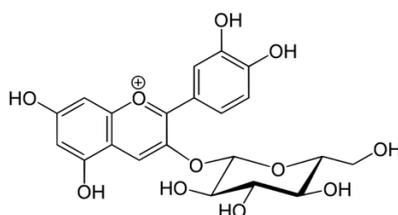


Figura 1.5- Estrutura química da 3-G-cianidina.

1.4.2.4 Taninos

Os taninos são CF que têm capacidade para se combinarem com as proteínas e outros tipos de polímeros como, por exemplo, os polissacarídeos. Estes compostos, assim como as proantocianidinas, são responsáveis pela sensação de adstringência dos vinhos, que é a perda da lubrificação da saliva devido à precipitação das proteínas [20]. Os taninos também influenciam a cor e outras características organolépticas dos vinhos. Estes compostos podem ser hidrolisáveis ou condensados. Os taninos hidrolisáveis são originados pela ligação entre um açúcar (glicose, por exemplo) e várias moléculas de um CF não flavonóide como, por exemplo, o AG. Estes tipos de taninos não estão presentes nas uvas e surgem nos vinhos durante o seu armazenamento, pois estão presentes na madeira de carvalho que constitui os barris de madeira. Por outro lado, os taninos condensados estão presentes naturalmente nas uvas e nos vinhos e são formados por moléculas flavonóides. Esta última classe de taninos está presente principalmente nas grainhas das uvas [1].

1.5 Importância dos compostos fenólicos na saúde

Os CF desempenham funções muito importantes nos seres vivos, particularmente nos seres humanos. Estes compostos, como apresentam excelentes capacidades antioxidantes, inibem a proliferação de radicais livres no corpo humano e apresentam uma ação benéfica em doenças como a diabetes, vários tipos de cânceres e nas doenças cardiovasculares. Relativamente a estas últimas, estudos revelam que os consumidores regulares e moderados de vinho tinto estão em 20 – 30 % menos predispostos a doenças cardiovasculares [31]. Por estes motivos, os CF têm vindo a despertar elevado interesse em várias áreas da ciência (por exemplo, na medicina e na química), cujos objetivos passam pelo desenvolvimento de métodos e sensores que sejam capazes de quantificar estes compostos numa grande variedade de alimentos.

Os polifenóis com maior atividade antioxidante são a CAT, epicatequina, ácidos AC, protocatequico, siringico e AF, resveratrol, quempferol, quercetina e miricetina. O conceito de capacidade antioxidante associado à presença de CF

depende não só da sua natureza, como também da concentração em que estes compostos se encontram. Esta concentração, no caso dos vinhos, é influenciada por vários fatores, nomeadamente: variedade, maturação e saúde da uva, tipo de solo, condições atmosféricas, técnicas agronómicas e técnicas utilizadas na vinificação [32].

1.6 Métodos de quantificação de compostos fenólicos

O desenvolvimento de métodos para quantificar CF é um grande desafio para a química. A publicação de trabalhos de investigação relacionados com o desenvolvimento, otimização e validação de metodologias analíticas para a determinação destes compostos representa uma constante na área da investigação. Atualmente, os métodos óticos na zona do Ultravioleta e visível (UV/Vis) são os mais utilizados, uma vez que estes são conhecidos pela sua simplicidade, baixo preço e rapidez de análise. No entanto, a utilização de métodos cromatográficos, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e eletroquímicos, como a voltametria cíclica (CV), têm vindo a merecer destaque nos últimos tempos e a assumir uma boa posição neste domínio [22, 33, 34].

1.6.1 Métodos óticos

O método de *Folin-Ciocalteu* (*F-C*) é um método ótico caracterizado por ser um método simples, rápido e barato na quantificação do teor total de CF. Este método é muito utilizado para determinar o teor total destes compostos numa grande variedade de matrizes, incluindo os vinhos [34].

O método baseia-se na oxidação dos CF pelo reagente de *F-C*, que é uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato. A forma reduzida do reagente de *F-C* apresenta uma cor azul. A determinação da concentração de CF é feita a partir da intensidade desta cor, que é uma medida da extensão da reação de oxidação-redução. Esta reação ocorre num meio alcalino de modo a favorecer a desprotonação dos grupos hidroxilo que acompanha a cedência dos eletrões [35, 36]. A principal desvantagem deste método de quantificação de CF é a baixa seletividade, sendo o ácido ascórbico, o dióxido de enxofre e os açúcares

reduzindo os principais interferentes. Estas espécies, naturalmente presentes nos vinhos (e.g. açúcares redutores, ácido ascórbico, aminas aromáticas e proteínas) ou adicionadas pelos produtores (e.g. dióxido de enxofre), reagem de forma idêntica aos CF levando a uma sobrestimação do teor total CF [37 - 40].

A medição da absorvância no comprimento de onda de 280 nm também é muito utilizada para determinar o teor total de CF. Este método é ainda mais simples que o *F-C*, uma vez que a amostra em análise apenas necessita de ser diluída sem qualquer outro tipo de preparação.

A absorção de radiação resulta no facto de os CF apresentarem ligações duplas conjugadas e átomos de oxigénio que absorvem na região do ultravioleta. Esta característica não está diretamente relacionada com as propriedades redutoras dos CF. Assim, verifica-se a interferência por parte de um elevado número de compostos, destacando-se os ácidos ascórbico e sórbico que são aditivos utilizados como conservantes [30, 41].

Alguns métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos para fazer a determinação de CF específicos. Por exemplo, para a determinação dos flavonóides foi desenvolvido um método que tem como princípio a formação de um complexo alumínio-flavonóide. Neste método, uma solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) é adicionado à amostra, ocorrendo a formação de um complexo que apresenta um máximo de absorvância entre os 405 – 430 nm. Com o objetivo de melhorar os parâmetros de desempenho deste método, foi efetuada uma nitração dos flavonóides, em meio ácido. No entanto, a principal limitação deste método é não permitir determinar todos os tipos de flavonóides [42, 43].

Para quantificar as antocianinas o método mais simples é a medição da absorvância no intervalo de comprimentos de onda de 490 – 550 nm. Apesar deste método ser simples, existem outros compostos, presentes na amostra, que também absorvem nesta gama de comprimentos de onda, originando, assim, determinações incorretas do teor de antocianinas [44].

A quantificação de proantocianidinas pode ser realizada com o método ótico que utiliza o reagente de vanilina. Neste método, as proantocianidinas reagem com este reagente, obtendo-se um complexo de cor vermelha [45]. Outros métodos também podem ser utilizados para fazer a quantificação destes polifenóis como o método de *Herbertson*, que se baseia na precipitação das proantocianidinas na presença de albumina de soro bovino (BSA), e o método butanol-HCl,

baseado na clivagem das ligações interflavanóides presentes nas estruturas das proantocianidinas [46 - 48].

Como já foi referido anteriormente, os métodos óticos de quantificação de polifenóis são métodos simples, rápidos e económicos, mas apresentam várias limitações, sendo a falta de seletividade a principal limitação destes métodos para a determinação do teor total de CF [33, 34]. Observa-se que devido à sua baixa seletividade, estes métodos tendem a sobrestimar o teor de CF [49].

1.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é considerada a principal técnica de separação e quantificação de compostos, incluindo os CF. As condições experimentais utilizadas nesta técnica, para esta quantificação, envolvem a utilização de uma coluna de fase reversa, uma fase móvel constituída por dois solventes (água acidificada e um solvente orgânico) e um detetor de UV/Vis ou de díodos, sendo este último detetor o mais utilizado na análise de CF [50].

Os CF podem ser identificados, após a sua separação, utilizando um espectrómetro de massa acoplado ao sistema de HPLC. Assim é possível separar, quantificar e identificar os CF que estão presentes na amostra analisada, uma vez que a espectrometria de massa é uma técnica de análise estrutural.

As fontes de ionização mais utilizadas na análise de CF são a *ElectroSpray Ionization* (ESI), a *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) e a *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI). Por outro lado, os detetores mais utilizados são os que trabalham em modo negativo como, por exemplo, o quadrupolo simples, o triplo quadrupolo, o *ion trap* e o *time-of-flight* [33].

A análise de polifenóis por HPLC apresenta diversas vantagens face aos outros métodos que são utilizados para o mesmo objetivo e representa a técnica de eleição na análise qualitativa e quantitativa de CF. No entanto, os elevados custos deste equipamento, principalmente quando está acoplado a um espectrómetro de massa, o tempo de análise e a preparação da amostra dificultam a sua utilização em análises de rotina.

1.6.3 Métodos eletroquímicos

O baixo custo e portabilidade do equipamento tornam os métodos eletroquímicos particularmente adequados ao desenvolvimento de metodologias baseadas em sensores. A determinação do teor total de CF em alimentos e bebidas, por métodos eletroquímicos, tem vindo a merecer a atenção por parte dos investigadores ao longo dos últimos anos. As voltametrias cíclica (CV) e diferencial por impulsos (DPV) são técnicas bastantes utilizadas para a determinação do teor total de CF em amostras naturais, como vinhos [51]. A menor disseminação destes métodos está relacionada com os requisitos necessários para a montagem das células eletroquímicas e sua operação, que requerem operadores com alguma especialização na área.

Os primeiros estudos realizados neste âmbito utilizaram o eléctrodo de carbono vítreo (GCE). Os trabalhos reportados com este eléctrodo indicam que este tem capacidade de distinguir parcialmente os CF com elevada atividade antioxidante (que são os polifenóis com grupos OH em posições *orto* e *para*) dos polifenóis com baixa atividade antioxidante (que são os CF com grupos OH em posição *meta* ou com apenas um único grupo OH), através do potencial de oxidação destas famílias de CF [52]. As oxidações do ácido ascórbico e do dióxido de enxofre afetam a seletividade do GCE [53]. Também é muito comum a superfície deste eléctrodo sofrer passivação originada pela formação de um filme resultante da oxidação de alguns CF, presentes nos vinhos, tais como os flavano-3-ol ou antocianinas [54]. Esta passivação traduz-se na diminuição da intensidade de corrente associada à oxidação dos restantes CF. Em alternativa, a utilização de eléctrodos de pasta de carbono (CPE) apresenta vantagens no que diz respeito à renovação da superfície do eléctrodo de trabalho que é facilmente realizável, utilizando uma folha de papel [55].

A possibilidade de desenvolver sistemas de eléctrodos integrados descartáveis permitiu ultrapassar alguns dos inconvenientes usualmente associados a estes métodos, como a necessidade de polir a superfície do eléctrodo de trabalho e o acondicionamento do eléctrodo de referência, indispensáveis para a realização da experiência. Os eléctrodos produzidos em série incorporando o conjunto dos três eléctrodos, como os eléctrodos serigrafados, são um exemplo destes sistemas que já se encontram no mercado [56]. Os eléctrodos serigrafados de carbono

(SPCE) na sua forma original, quando utilizados na análise de vinhos, apresentam problemas relacionados com a falta de reprodutibilidade e seletividade. Enquanto que a baixa reprodutibilidade está associada à formação de uma camada de passivação, a baixa seletividade relaciona-se com a presença de espécies oxidáveis na janela de potencial onde se detetam os CF. A modificação da superfície dos elétrodos de carbono tem sido realizada com o objetivo de contornar os problemas referidos anteriormente.

A incorporação de enzimas na superfície dos elétrodos constitui uma das estratégias utilizadas para aumentar a seletividade da deteção eletroquímica de CF. A enzima utilizada pode ser uma oxidase, cuja função é oxidar os CF com a redução do oxigénio a água, ou uma peroxidase, que reduz o peróxido de hidrogénio a água enquanto os CF sofrem oxidação [54].

Biossensores construídos a partir de um elétrodo de platina modificado com membranas de polietersulfona contendo na sua matriz a enzima oxidase lacase [57] e a partir do elétrodo de GCE modificado com uma camada de nanopartículas de ouro contendo a enzima tirosinase [54] são exemplos que se encontram descritos na literatura para a análise de vinhos.

Através da modificação de um SPE com as duas enzimas, referidas anteriormente e imobilizadas por reticulação química, foi desenvolvido um novo biossensor que possibilita a medição de todos os CF em oposição ao biossensor baseado na lacase acima referido [58, 59].

A utilização do elétrodo vítreo de óxido de estanho dopado com índio (ITO) para fazer a imobilização da enzima tirosinase em CNT também foi testada [60]. A imobilização de enzimas em CNT apresenta como principal vantagem aumentar a quantidade de enzima no biossensor, com o conseqüente aumento da sensibilidade.

A utilização da peroxidase do rábano (HRP) imobilizada tanto em elétrodos de ouro [61] como em CPE [62] também se encontra descrita no desenvolvimento de biossensores. Neste tipo de biossensores os CF são detetados a partir da sua reação na redução de HRP, que por sua vez catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio em água.

Os biossensores, apesar de serem muito seletivos, apresentam algumas limitações relacionadas essencialmente com a reduzida estabilidade do material biológico, que restringe não só as condições de utilização como as de

armazenamento. Para além do reduzido tempo de vida destes dispositivos, os custos de produção são normalmente elevados.

A utilização de elementos de reconhecimento sintéticos em sensores eletroquímicos para fazer a determinação de CF permite ultrapassar algumas das limitações dos biossensores. A modificação do GCE com CNT e do CPE modificado com CNT e membranas de polivinilpirrolidona (PVP) são exemplos de sensores que utilizam elementos de reconhecimento sintéticos [49, 51, 63]. No caso do GCE, os CNT foram imobilizados em polímeros como o nafion e a polietilamina [49]. Neste estudo verificou-se que o GCE modificado com CNT apresentava maior sensibilidade relativamente ao GCE, quando utilizado sem qualquer modificação, e que o valor mais alto de sensibilidade de deteção era obtido para a polietilamina. A modificação do GCE com Fe_2O_3 e óxido de grafeno depositados sobre uma camada de quitosano também permitiu aumentar a sensibilidade do GCE [64]. Foram também utilizados outros tipos de elementos de reconhecimento sintéticos, para além dos apresentados anteriormente, como, por exemplo, um filme formado na superfície do eléctrodo de trabalho através a oxidação do AC [65] e a utilização de um polímero condutor poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) [66, 67]. O PEDOT permitiu aumentar a sensibilidade de deteção devido à adsorção dos CF, como o AC, neste material [68].

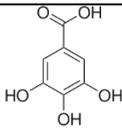
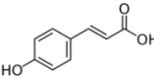
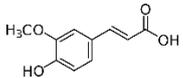
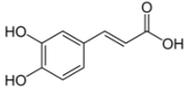
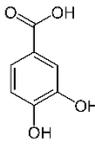
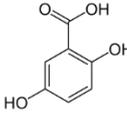
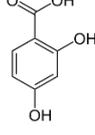
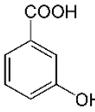
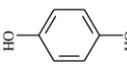
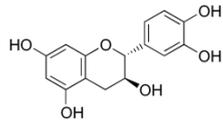
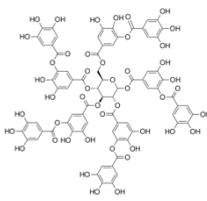
Capítulo 2- Parte Experimental

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. A tabela 2.1 apresenta a marca e estrutura química dos CF que foram analisados.

Tabela 2.1- Compostos fenólicos analisados.

Composto fenólico	Marca	Estrutura
Ácido Gálico (AG)	<i>Sigma</i>	
Ácido <i>p</i> -cumárico (ACUM)	<i>Sigma</i>	
Ácido Ferúlico (AF)	<i>Aldrich</i>	
Ácido Cafeico (AC)	<i>Sigma</i>	
Ácido 3,4- dihidroxibenzóico (3,4AHB)	<i>Acros organics</i>	
Ácido 2,5- dihidroxibenzóico (A2,5HB)	<i>Acros organics</i>	
Ácido 2,4- dihidroxibenzóico (2,4AHB)	<i>Acros organics</i>	
Ácido 3-hidroxibenzóico (3AHB)	<i>Acros organics</i>	
Hidroquinona (HQ)	<i>Riede-de Haen</i>	
Catequina (CAT)	<i>Sigma</i>	
Ácido Tânico (AT)	<i>Riede-de Haen</i>	

As soluções padrão dos CF foram preparadas em uma solução de ácido tartárico 32,0 mM (*Merck*) pH 3,20. O pH desta solução foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 1,0 M preparada a partir do hidróxido de sódio sólido (*Eka chemicals*). No acerto do pH utilizou-se um medidor de pH da *Cyberscan 510* pH, usando um eletrodo de vidro combinado da *Hanna Instruments*.

O carbonato de sódio e o reagente de *F-C* utilizados foram obtidos na *Sigma*.

O metabissulfito de sódio e o ácido ascórbico foram obtidos comercialmente da *Sigma* e da *Aldrich*, respetivamente.

A solução tampão de fosfato 0,15 M (pH 7,40), utilizada para o acondicionamento e a ativação do sensor SPCE modificado com CNT (CNT@SPCE), foi preparada a partir do fosfato de potássio monobásico (*Fisher Scientific*) e do fosfato de potássio dibásico (*Fisher Scientific*).

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura obtida a partir de um sistema *Milli-Q Simplicity 185* (*Millipore*).

No anexo 1 encontram-se apresentados os dados relativos à preparação de todas as soluções.

Soluções da amostra de vinho tinto

Para a validação dos resultados obtidos numa matriz natural de vinho foi usado uma amostra adquirida comercialmente de vinho tinto Pegões 2016.

Nos ensaios eletroquímicos a amostra foi diluída em ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20, nos seguintes fatores de diluição: **1:25** (para estudos com o SPCE) e **1:200** (para estudos com o CNT@SPCE).

Nos ensaios espectroscópicos na zona do UV/Vis a amostra foi diluída em ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20, no fator de diluição **1:100**.

Nos ensaios do método de *F-C* a amostra de vinho tinto foi diluída em água ultrapura no fator de diluição **1:280**.

Suspensões de nanotubos de carbono 1 mg/mL

As suspensões de CNT de parede múltipla (*Nanocyl – NC7000TM*) foram preparadas usando metanol (*Panreac*) ou acetona (*Panreac*), misturando 10 mg

de CNT (previamente funcionalizados) com 10 mL de uma solução de metanol/água (1:1) ou de acetona/água (1:1). Posteriormente, estas misturas foram tratadas com uma sonda ultrassônica UP100H da *Hielscher* (100 W de potência máxima, 60 % de amplitude e 0,9 de ciclo) durante 30 minutos.

2.2 Equipamentos e métodos

2.2.1 Ensaio eletroquímico

A técnica de CV fornece informação que pode ser usada no estudo de mecanismos das reações eletroquímicas. Esta envolve o registo de um sinal de corrente elétrica gerada num elétrodo de trabalho que surge como resposta a uma perturbação na forma de um potencial aplicado a um elétrodo, denominado elétrodo de trabalho. Nesta técnica o potencial aplicado é variado linearmente com o tempo. A corrente registada em função do potencial aplicado ao elétrodo de trabalho é denominada de voltamograma cíclico. Esta corrente resulta de processos faradaicos (associados à transferência de carga que resulta de reações de oxidação-redução) e de uma componente capacitiva (devida à separação de cargas na interface do elétrodo-solução). O voltamograma cíclico traçado no eletrólito suporte (branco), na ausência de processos faradaicos, apresenta uma forma “retangular” resultado dos fluxos de carga, corrente capacitiva, nos varrimentos anódico e catódico que são independentes do potencial aplicado [69, 70].

Todos os voltamogramas de CV apresentados neste trabalho foram obtidos com a velocidade de varrimento 100 mV/s, exceto os traçados no estudo do efeito da velocidade de varrimento para a caracterização do processo limitante associado à transferência eletrónica (difusão ou adsorção). A figura 2.1 apresenta um perfil de potencial aplicado ao elétrodo de trabalho e uma resposta típica da técnica de CV.

A técnica de DPV envolve a aplicação de um perfil de potencial ao elétrodo de trabalho na forma de impulsos. Os voltamogramas obtidos a partir desta técnica correspondem à diferença entre as correntes medidas no final do impulso e antes de aplicar o impulso em função do potencial.

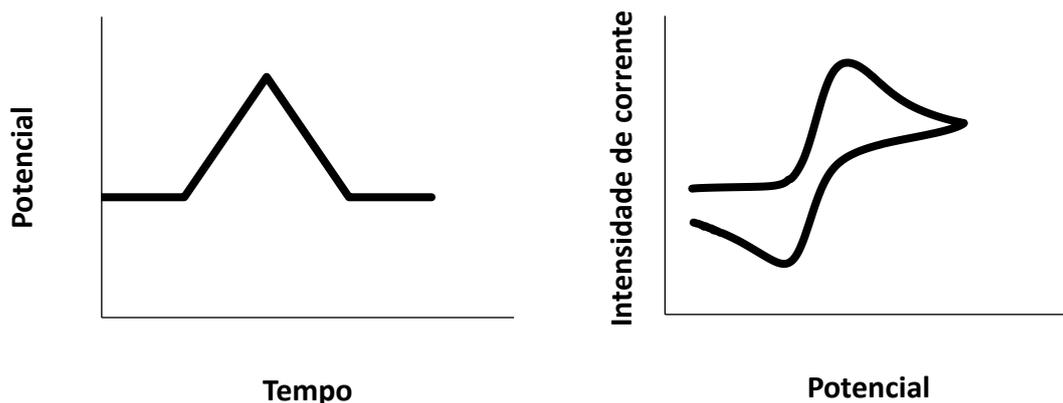


Figura 2.1- Perfil de potencial aplicado ao elétrodo de trabalho (esquerda) e resposta típica da voltametria cíclica (direita).

Como a medição da corrente é feita no final do impulso, situação na qual a corrente capacitiva é muito baixa (pois esta diminui exponencialmente com o tempo após a aplicação do impulso de potencial) o sinal obtido é constituído essencialmente pela componente faradaica. Os sinais obtidos apresentam uma forma próxima a um pico gaussiano, facilitando a sua medição. Por estes motivos, a técnica de DPV apresenta limites de deteção mais baixos que a CV [69, 70]. A figura 2.2 apresenta o perfil de potencial aplicado ao elétrodo de trabalho e a resposta obtida na voltametria de DPV. Na figura 2.2 observa-se que a amplitude do impulso de potencial é dada por $\Delta E_p = E_b - E_a$, o incremento de potencial é $\Delta E_s = E_c - E_a$ e o sinal medido, $\Delta I = I_b - I_a$, corresponde à diferença das intensidades de corrente medidas no final do impulso (b) e no início do impulso (a).

No presente trabalho, a voltametria de DPV foi utilizada no método de quantificação de CF. Todos os voltamogramas de DPV apresentados neste trabalho foram obtidos nas seguintes condições experimentais: 100 mV de amplitude e 5 mV de incremento de potencial.

Todos os ensaios eletroquímicos foram realizados num potencióstato *Autolab PGSTAT 30 (Ecochemie)* controlado pelo software “*General Purpose Electrochemical System*” versão 4.9.

As células eletroquímicas utilizadas estão apresentadas na figura 2.3.

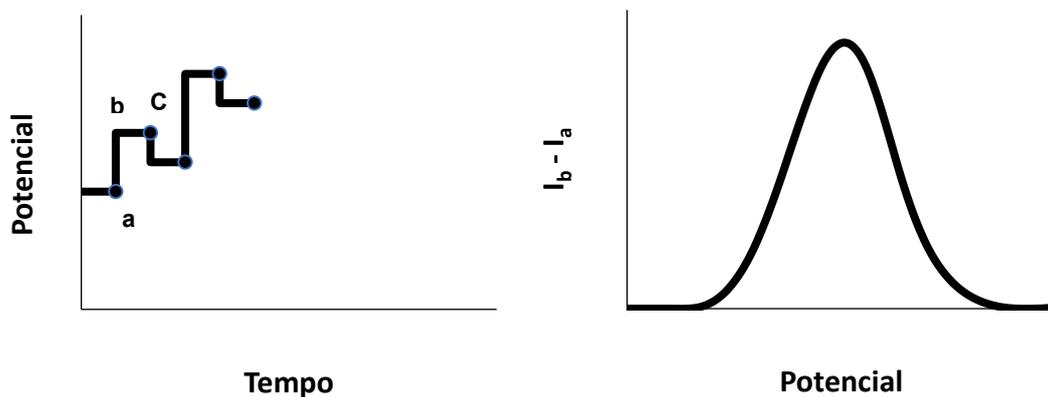


Figura 2.2- Perfil de potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e resposta obtida na voltametria de DPV.



Figura 2.3- Células eletroquímicas: A) Convencional, com eletrodo auxiliar (esquerda, fio de platina), eletrodo de referência (centro, Ag/AgCl, 3 M) e eletrodo de trabalho de carbono vítreo, GCE (direita, 3 mm de diâmetro, *CHI Instruments*); B) Miniaturizada, com eletrodos serigrafados SPCE (*Dropsens*, ref 110) com eletrodos de trabalho (4 mm de diâmetro) e auxiliar de carbono e com pseudo-eletrodo referência de prata.

O GCE (da célula convencional) e o eletrodo de trabalho do SPCE foram utilizados na sua forma original e também após serem modificados por *drop-casting* com a suspensão de CNT 1 mg/mL.

Ensaio eletroquímico com o GCE

Antes de cada utilização, a superfície do eletrodo GCE não modificado foi polida com alumina (*Tonarde 2*; 0,05 μm) numa camurça [71]. De seguida, o eletrodo foi enxaguado com água ultrapura e seco com papel absorvente. Este processo de limpeza foi igualmente utilizado antes da modificação do GCE.

A deposição dos CNT sobre a superfície do GCE fez-se colocando 5,0 μL de suspensão de CNT 1 mg/mL por *drop-casting* (Figura 2.4A). A evaporação do solvente foi efetuada utilizando a radiação proveniente de uma lâmpada de incandescência de luz branca.

Os voltamogramas de CV e DPV foram registados usando um volume de solução de cerca de 10 mL.



Figura 2.4- Modificação dos elétrodos de trabalho por *drop-casting* com a suspensão de CNT 1 mg/mL: (A) GCE; (B) SPCE.

Enquanto com o GCE, os voltamogramas foram registados imediatamente após colocar o elétrodo em contacto com a solução do analito, com o GCE modificado com CNT (CNT@GCE) o registo dos voltamogramas foi efetuado na sequência de um passo de adsorção (**etapa 1**) sujeitando o elétrodo a um potencial de 0 V (*versus* Ag/AgCl, 3 M), durante 90 s, com agitação magnética (450 rpm). Após a adsorção o elétrodo foi retirado da solução a analisar, enxaguado com água ultrapura e a água foi removida com um papel absorvente (**etapa 2**). Os voltamogramas foram registados após mergulhar o elétrodo na solução de eletrólito (ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20). No final do registo do voltamograma, todos os passos referidos anteriormente foram repetidos, incluindo a limpeza e modificação do GCE, para as próximas medições.

Estudos eletroquímicos realizados com o SPCE

Os voltamogramas de CV e DPV obtidos com o SPCE não modificado foram registados colocando 75 μL (gota) de solução de modo a cobrir os 3 elétrodos, como se mostra a figura 2.5.

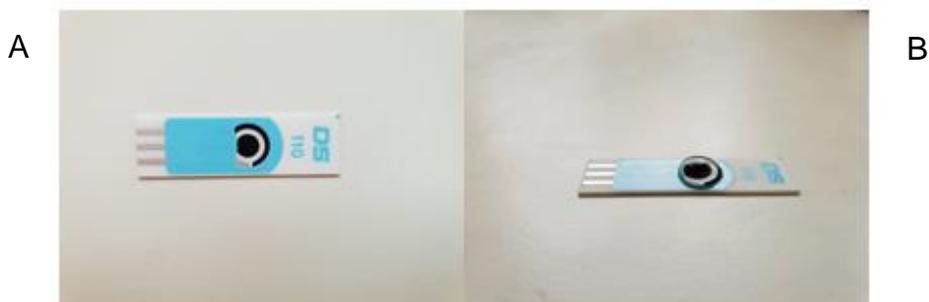


Figura 2.5- Imagem do SPCE: A) sem solução; B) com 75 μL de solução de analito.

Após a medição (na solução do próprio analito), o SPCE foi bem enxaguado com água ultrapura para efetuar as próximas medições.

Por outro lado, com o CNT@SPCE, modificado com 7,5 μL de suspensão de CNT 1 mg/mL por *drop-casting* (figura 2.4B), foi replicado o procedimento composto pelas 3 etapas atrás descritas usando um volume de 75 μL de cada uma das soluções (analito e eletrólito). A adsorção foi realizada sem agitação.

Limpeza da superfície dos sensores CNT@GCE e CNT@SPCE

A possibilidade de reutilização dos sensores preparados por modificação com CNT foi testada. Na figura 2.6A está representada a intensidade de corrente de pico medida em voltamogramas de DPV registados sequencialmente num CNT@SPCE após a adsorção de CAT a partir de 75 μL de solução 3,0 μM , durante 90 s a 0 V. Como se pode verificar a intensidade de corrente de pico medida continua a ser comparável à registada no primeiro voltamograma de DPV, indicando que o polifenol ainda se encontrava adsorvido na superfície do sensor. De modo a remover o polifenol adsorvido foram testados diferentes procedimentos que combinavam a aplicação de perturbações eletroquímicas a soluções de limpeza com diferente composição.

A combinação que mostrou maior eficiência resultou da aplicação de uma perturbação do potencial correspondente a 4 varrimentos de CV (de 0 a 1 V, $v = 100 \text{ mV/s}$) em contacto com uma solução tampão de fosfato 0,15 M, pH 7,40,

mudando a solução entre cada varrimento. Como se pode verificar na figura 2.6B, este tratamento de limpeza é bastante eficiente, permitindo diminuir a resposta da CAT, que é um analito que fica fortemente adsorvido à superfície nos CNT, e, portanto, eliminar aparentemente a CAT da superfície do sensor.

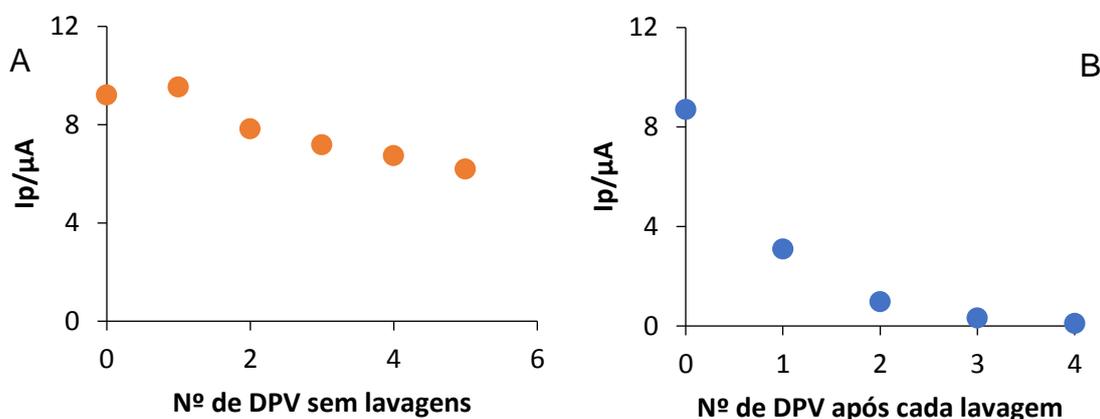


Figura 2.6- Efeito da lavagem do CNT@SPCE nas respostas da CAT em função do nº de varrimentos de DPV. A) sem lavagem; B) com lavagem com a solução tampão de fosfato 0,15 M pH 7,40.

2.2.2 Método espectroscópico

A radiação na região do UV/Vis possui energia suficiente para que os fótons possam interagir com os elétrons da molécula, provocando a excitação dos mesmos para orbitais de energia superiores. Nesta técnica é representada a absorvância medida em função do comprimento de onda da radiação.

Segundo a lei de *Beer – Lambert*, a absorvância medida num dado comprimento de onda, é proporcional à absorvidade molar, à distância percorrida pelo feixe de radiação através da amostra (percurso ótico) e à concentração da espécie que absorve a radiação. Esta técnica, ao contrário das restantes técnicas utilizadas neste trabalho para fazer a determinação de CF em vinhos, é uma técnica de análise não destrutiva [72].

Todos os estudos espectroscópicos no UV/Vis foram realizados num espectrofotómetro da *Shimadzu UV/3101 PC* controlado pelo *software UV probe 2.34 version*. Os espectros de UV/Vis dos CF e da amostra de vinho tinto foram traçados em ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20, no intervalo de comprimentos de onda 235 – 380 nm, com uma célula de quartzo e com um percurso ótico de 1,0

cm. Neste intervalo de comprimentos de onda os CF (anel aromático e átomos de oxigênio) apresentam uma absorvância resultante de transições π - π^* e n - π^* . Todos os espectros traçados apresentam como branco a solução de ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20.

2.2.3 Método de Folin-Ciocalteu

O método de *F-C* envolve uma reação de oxidação-redução entre o reagente de *F-C* e um composto que sofre oxidação, como, por exemplo, um CF.

Neste método a absorvância do reagente de *F-C* reduzido é medida no comprimento de onda 765 nm após a reação com o agente redutor (CF). A figura 2.7 mostra a cor do reagente de *F-C* antes e após a reação com um CF (AG).



Figura 2.7- Cor do reagente de *F-C* antes e após a reação com AG.

Embora a reação que envolve o reagente de *F-C* não seja completamente conhecida, pressupõe-se que ocorre a redução dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e a óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}). Como consequência destas reduções, o reagente de *F-C* muda de cor, passando de amarelo a azul [35, 73].

Os estudos efetuados com o reagente de *F-C* foram realizados seguindo as seguintes etapas.

Etapa 1- A 10 mL de água ultrapura adicionou-se 200 μ L de solução padrão de CF e 200 μ L de reagente de *F-C* (para os ensaios realizados com o AT utilizou-se 50 μ L em vez de 200 μ L). Posteriormente agitou-se, durante 20 segundos, e colocou-se em repouso no escuro durante 5 minutos.

Etapa 2- Após os 5 minutos adicionou-se 4 mL da solução de carbonato de sódio, agitou-se durante mais 20 segundos e colocou-se novamente em repouso no escuro durante 10 minutos.

Etapa 3- No final dos 10 minutos, mediu-se a absorvância da solução, a 765 nm, numa célula de quartzo com 1,0 cm de percurso ótico, no espectrofotómetro da *Spectronic 20 Genesys™*.

Nestes estudos o branco utilizado para medir as absorvâncias, foi feito em água ultrapura, contendo o reagente de *F-C* e carbonato de sódio nas mesmas quantidades em que se fez os ensaios com os CF e amostra de vinho tinto.

2.2.4 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IV), utilizada neste trabalho para analisar os grupos funcionais presentes nos CNT, é uma técnica que envolve a absorção de radiação na região compreendida entre os comprimentos de onda de 2500 a 5000 nm (IV médio). Esta radiação promove as transições entre níveis vibracionais sendo utilizada, principalmente na identificação de grupos funcionais. Nesta técnica é representada a absorvância ou a transmitância (mais comum) em função do número de onda da radiação.

No modo de refletância total atenuada (ATR) o feixe de radiação IV incide no cristal e sofre refração no interior do cristal antes de atingir a amostra. A reflexão do feixe será total quando o ângulo de incidência for maior do que o ângulo crítico. Nessas condições, parte do feixe no limite do cristal penetrará na amostra a uma profundidade de poucos micrómetros sob a forma de “onda evanescente”, como mostra figura 2.8.

A intensidade desta onda evanescente irá diminuir exponencialmente com a distância à superfície do cristal, devido à absorção da radiação IV por parte da amostra. A profundidade de penetração do feixe de radiação IV depende do ângulo de incidência do feixe, do índice de refração e da amostra a analisar [72]. A espectroscopia de IV foi utilizada na caracterização dos CNT provenientes da suspensão metanol/água (1:1) usando um espectrofotómetro *Iraffinity-1S* da *Shimadzu* que se baseia na refletância total atenuada.

Os CNT previamente secos foram diretamente depositados sobre um cristal de diamante. O espectro foi obtido aplicando a transformada de *Fourier* ao interferograma.

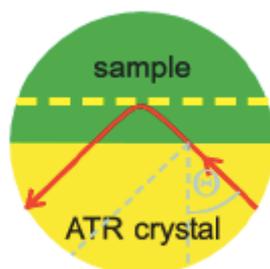


Figura 2.8- Penetração do feixe de radiação IV na amostra sob a forma de “onda evanescente”.

2.2.5 Termogravimetria

A termogravimetria (TGA) é uma técnica de análise térmica que envolve o aquecimento (ou arrefecimento) de um material na presença de uma atmosfera inerte (ou oxidante). Durante o aquecimento o material em estudo pode sofrer uma variação de massa que está relacionada com processos físicos ou químicos como, por exemplo, evaporações, sublimações, decomposições, oxidações (na presença de oxigénio) e adsorções ou dessorções de gás. Esta variação de massa, originada pela rutura ou formação de ligações químicas é, muitas vezes, utilizada para fazer análises quantitativas [74].

Nesta técnica de análise é representada a percentagem de massa do material em estudo em função da temperatura de aquecimento, obtendo-se uma curva de TGA. A curva de TGA dos CNT da suspensão (1 mg/mL) em metanol/água (1:1) foi traçada num analisador termogravimétrico modulado Q5 (TA *instruments*). Estes nanomateriais previamente secos numa pistola de secagem sob vácuo à temperatura de 150 °C e depositados sem qualquer preparação prévia num cadinho de platina, foram aquecidos desde a temperatura ambiente até 800 °C, com a velocidade de varrimento de 10 °C/min e na presença de um fluxo constante (60 mL/min) de nitrogénio.

2.3 Tratamento dos resultados

As incertezas da concentração das soluções padrão dos CF foram determinadas através da abordagem passo a passo. As incertezas dos parâmetros das curvas de calibração dos CF, obtidas por DPV e com o sensor CNT@SPCE, foram

determinadas a partir dos desvios padrão e considerando o valor de *t-student* para 95 % de probabilidade.

O limite de quantificação do método utilizando o sensor CNT@SPCE para os CF analisados neste trabalho foi estimado com base no padrão de concentração mais baixa das curvas de calibração e este valor foi validado para cada CF.

A incerteza de medição do método eletroquímico baseado no sensor CNT@SPCE foi determinada a partir dos resultados obtidos na validação deste método. Na estimativa da incerteza associada à precisão utilizaram-se os resultados obtidos na amostra de vinho tinto. A estimativa da incerteza associada ao *bias* foi efetuada com base nos ensaios de recuperação realizados também com uma amostra de vinho tinto.

Capítulo 3- Apresentação e discussão dos resultados

3. Utilização de nanotubos de carbono na determinação eletroquímica de polifenóis

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos com o GCE e com um SPCE, modificados com nanotubos de carbono (CNT). A presença dos CNT é avaliada considerando a resposta eletroquímica de um polifenol modelo, o AG. Foram estudados os efeitos das variáveis experimentais relacionadas com a constituição do sensor eletroquímico e com o modo de operação.

3.1 Eléctrodo de carbono vítreo modificado com CNT funcionalizados

A resposta voltamétrica do GCE foi caracterizada numa solução de AG por CV e DPV. Na figura 3.1 são comparadas as respostas voltamétricas do GCE usando soluções de AG de duas concentrações, 450 e 900 μM , em ácido tartárico (32,0 mM, pH 3,20) como eletrólito suporte.

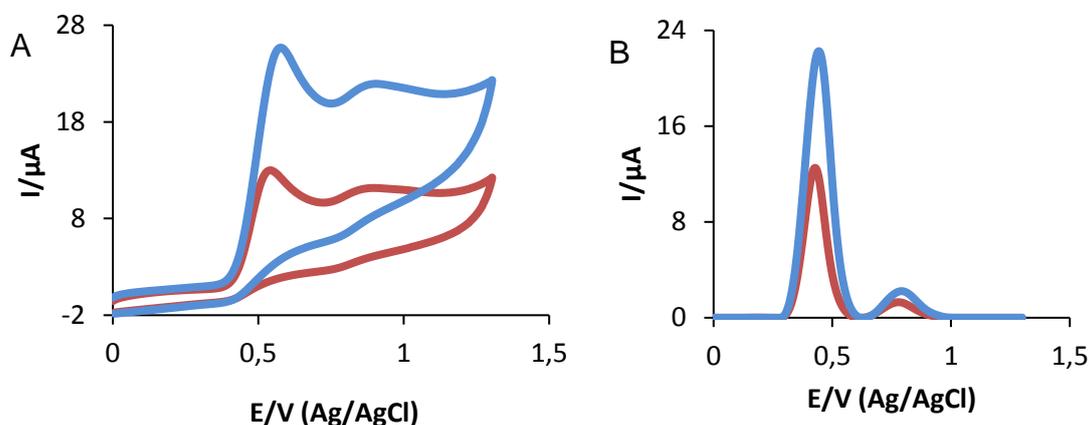


Figura 3.1– Voltamogramas de CV ($v=100$ mV/s) (A) e de DPV ($E_p=100$ mV e $\Delta E_s=5$ mV) (B) obtidos com GCE em soluções **0,450** e **0,900** μM de AG em ácido tartárico (32,0 mM a pH 3,20).

Os voltamogramas obtidos através das duas técnicas apresentam dois picos de oxidação, indicando que a oxidação do AG no GCE ocorre através de um mecanismo que compreende dois processos de transferência de carga. Este resultado está de acordo com os descritos na literatura [71]. A posição dos picos

é semelhante apesar da diferença entre as bases de tempo em que são registados os voltamogramas pelas duas técnicas, 100 mV/s e 10 mV/s por CV e por DPV, respetivamente.

Os voltamogramas de CV apresentam picos largos e não simétricos, característicos de um processo controlado por difusão. Por outro lado, os voltamogramas de DPV apresentam picos bem definidos e simétricos característicos desta técnica [70] que permite definir com facilidade a linha de base mesmo para concentrações muito reduzidas, facilitando a leitura da intensidade de corrente de pico.

A resposta voltamétrica de soluções de AG usando o CNT@GCE encontra-se apresentada na figura 3.2. Estes voltamogramas foram obtidos nas mesmas condições experimentais, mas com concentrações de AG trezentas vezes mais diluídas do que as apresentadas na figura 3.1.

Esta resposta voltamétrica foi registada na solução contendo apenas o eletrólito suporte (ácido tartárico 32,0 mM a pH 3,20) após o passo de adsorção numa solução de AG, controlando o potencial de adsorção, 0 V, durante 90 s com agitação magnética da solução a 450 rpm, de acordo com o descrito no procedimento experimental, secção 2.2.1.

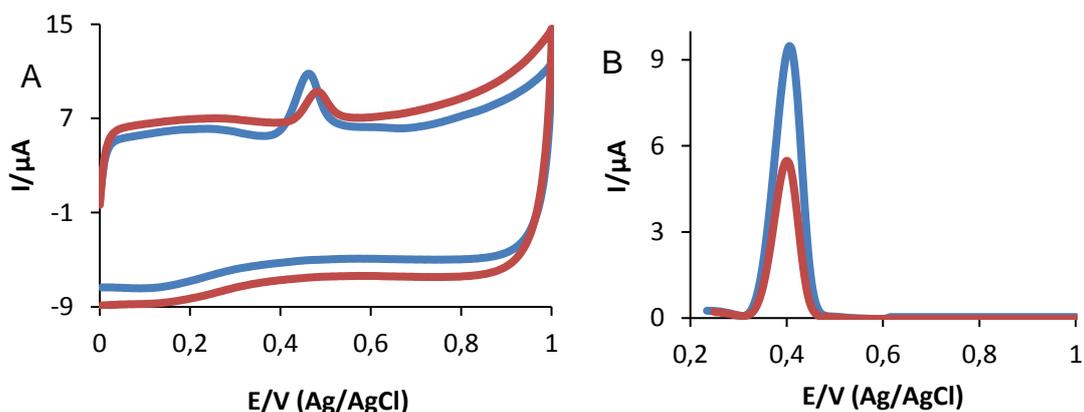


Figura 3.2- Voltamogramas de CV (A) e DPV (B) obtidos com CNT@GCE a partir de soluções de AG (1,5 e 3,0 μM), seguindo o procedimento de medição descrito na secção 2.2.1.

A presença dos CNT na superfície do GCE leva a um aumento significativo da contribuição da corrente capacitiva. Este efeito só é visível nos voltamogramas obtidos por CV e caracteriza-se por uma diferença elevada entre os valores de

intensidade de corrente obtidos nos varrimentos anódico e catódico, nos potenciais em que não ocorrem processos faradaicos. Esta característica decorre do maior afastamento de cargas na interface na presença dos CNT.

No intervalo de potenciais entre 0 e 1 V, os voltamogramas de CV e DPV apresentam um único pico de oxidação do AG. Este facto indica que o mecanismo de oxidação do AG é diferente quando este se encontra adsorvido na superfície dos CNT e pode ser explicado considerando que o AG poderá ceder os dois eletrões num único passo considerando que o produto formado deverá adquirir uma estabilidade adicional pelo facto de se manter ligado à superfície dos CNT. Uma hipótese alternativa pode ser a da oxidação envolver unicamente a perda de um eletrão e um protão ficando o produto formado ligado à superfície dos CNT, estabilizado de tal forma que não sofre um posterior processo de oxidação.

O pico observado no voltamograma de CV é simétrico, característico de um processo controlado por adsorção.

A alteração do mecanismo com que ocorre o processo de oxidação do AG, associado à presença dos CNT, tem influência ao nível da sensibilidade das respostas nas duas técnicas voltamétricas utilizadas. Os valores obtidos para a sensibilidade (correspondente à razão entre o sinal obtido e a concentração da solução) encontram-se apresentados na tabela 3.1 juntamente com os obtidos nos mesmos elétrodos na ausência dos CNT. Esta tabela apresenta também os fatores de amplificação do sinal associados ao efeito da presença de CNT. Este parâmetro corresponde à razão entre as sensibilidades (declives) obtidas com o eletrodo modificado com CNT e não modificado.

A análise da tabela 3.1 permite concluir que a sensibilidade da determinação do AG por DPV é amplificada pela presença dos CNT cerca de 2,4 vezes relativamente à obtida quando é utilizada a técnica de CV.

Tabela 3.1- Comparação entre os valores da sensibilidade e da amplificação das medições efetuadas em soluções de AG usando CNT@GCE relativamente ao GCE não modificado.

Técnica	CV	DPV
Sensibilidade GCE (A/M)	9,01 x 10 ⁻³	1,02 x 10 ⁻²
Sensibilidade CNT@GCE (A/M)	1,46	3,50
Amplificação	146	350

3.2 SPCE modificado com CNT funcionalizados

Na figura 3.3 são comparadas as respostas voltamétricas obtidas por CV e por DPV usando um SPCE em soluções 60,0 e 120,0 μM de AG.

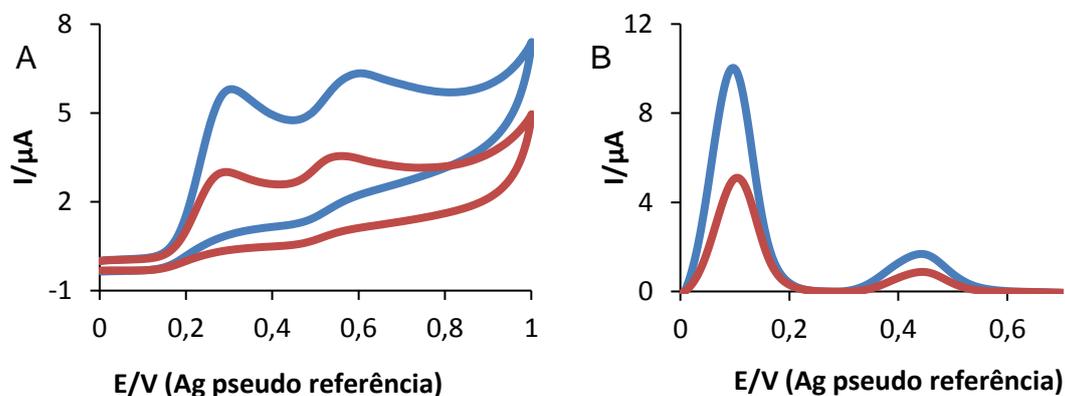


Figura 3.3- Voltamogramas de CV (A) e DPV (B) obtidos em soluções de AG (60,0 e 120,0 μM) com SPCE.

Os voltamogramas do AG obtidos com o SPCE são semelhantes aos obtidos com o GCE, apresentando dois picos de oxidação. Nos voltamogramas obtidos por CV os picos são típicos de um processo de oxidação controlado por difusão, com uma forma larga e assimétrica.

A figura 3.4 mostra a resposta voltamétrica do CNT@SPCE em duas soluções de AG. Estas soluções são dez vezes mais diluídas do que na figura 3.3. A resposta voltamétrica foi obtida seguindo o procedimento descrito na seção 2.2.1, em que o registo do voltamograma é feito na solução de eletrólito, após a adsorção do AG. Foi ainda registado o voltamograma na mesma solução em que foi realizada a etapa da adsorção para comparação. A utilização deste procedimento tem como principal vantagem aumentar o tempo de uso do sensor. Estudos realizados evidenciaram que a durabilidade do CNT@SPCE tende a diminuir com o número de lavagens e com as mudanças de solução para fazer o traçado do voltamograma, após a etapa da adsorção.

Os voltamogramas obtidos com o CNT@SPCE apresentam um perfil semelhante ao dos obtidos com o CNT@GCE. Para ambos os sensores e técnicas voltamétricas, estes são caracterizados por apresentarem um único pico de oxidação do AG no intervalo entre 0 e 1 V. Este pico é originado apenas pelas moléculas de AG adsorvidas ao sensor durante a etapa da adsorção.

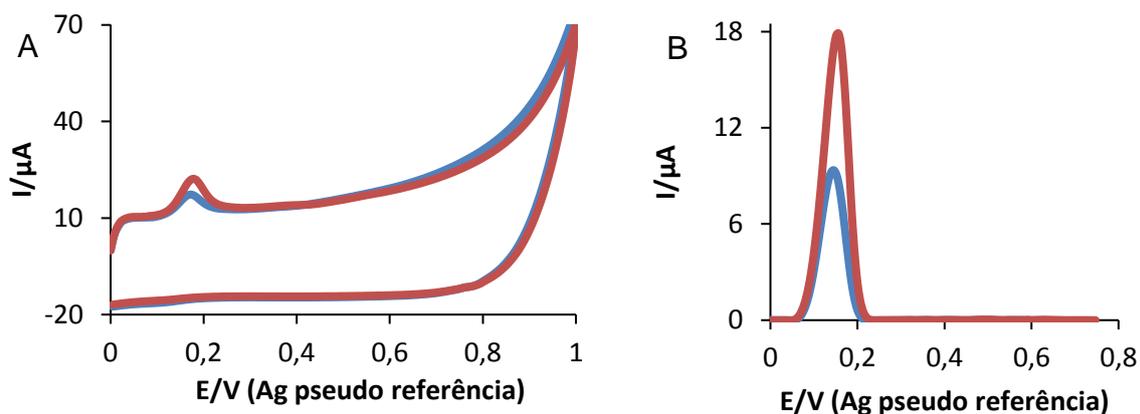


Figura 3.4- Voltamogramas de CV (A) e DPV (B) obtidos após a adsorção de AG em soluções **6,0** e **12,0** μM , seguindo o procedimento de medição descrito na seção 2.2.1.

Esta afirmação decorre de um estudo em que se verificou que a resposta do sensor registada a partir de solução de AG era idêntica à obtida numa solução do eletrólito suporte, quando antes de cada um dos registos era realizada a etapa em que a adsorção do AG era promovida mantendo constantes as condições relativas ao potencial aplicado ao eléctrodo e ao transporte de massa da solução (figura 3.5). Os voltamogramas na figura 3.5 registados na solução de amostra e na solução de eletrólito suporte não apresentam diferenças significativas em termos de intensidade de corrente.

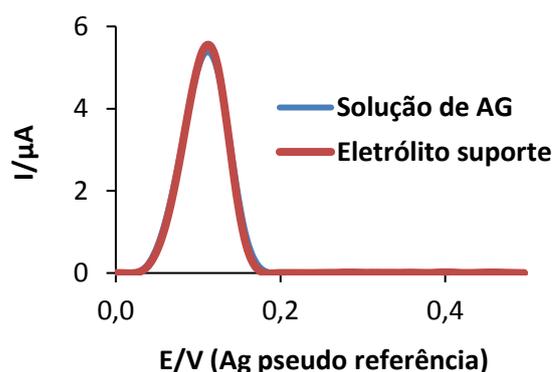


Figura 3.5- Voltamogramas de DPV obtidos com CNT@SPCE numa solução de AG $3,0 \mu\text{M}$ e na solução do eletrólito suporte, após a adsorção na solução de AG. A adsorção foi realizada durante 90 s, aplicando um potencial de 0 V versus o pseudo eléctrodo de referência.

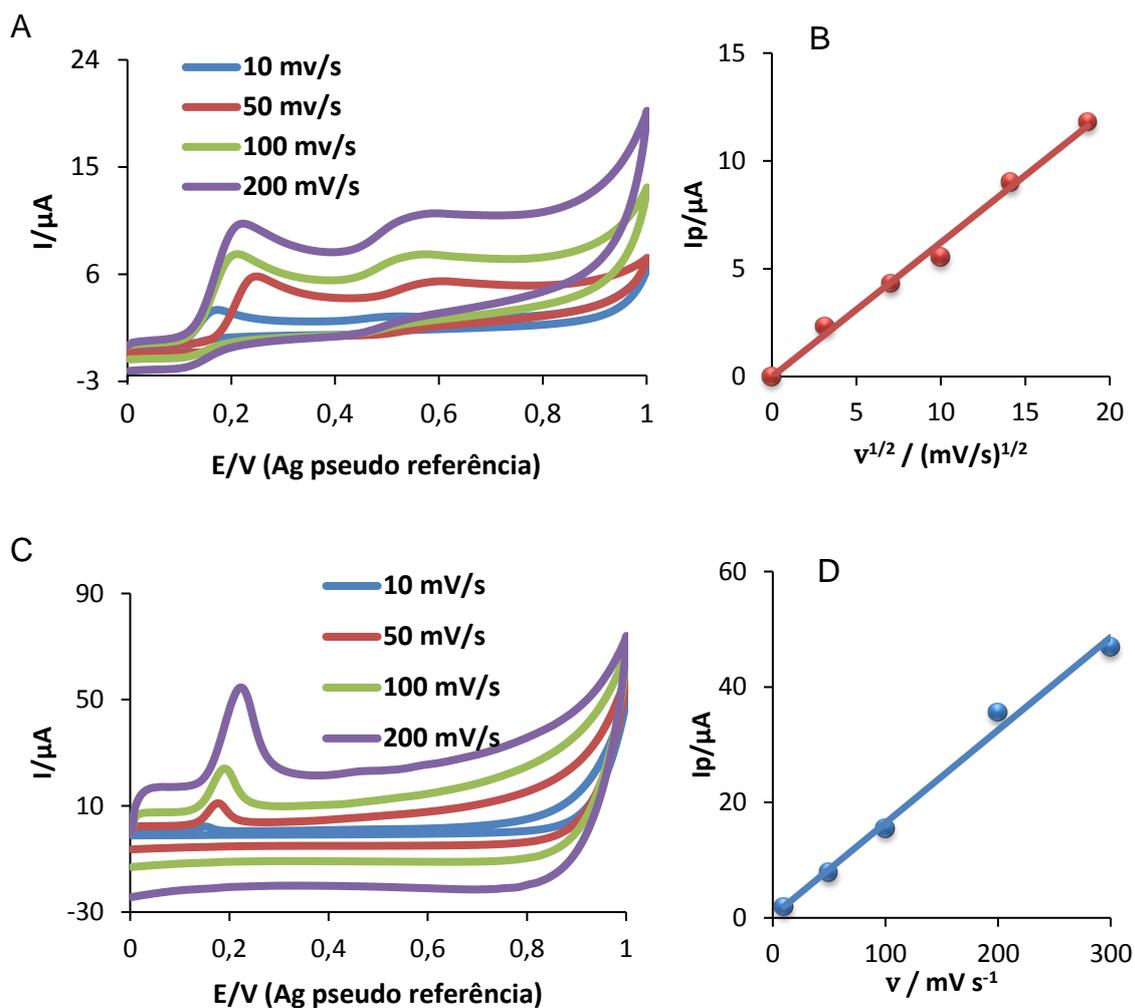


Figura 3.6- Voltamogramas de CV obtidos numa solução de AG, traçados a diferentes velocidades de varrimento, com SPCE (A) e CNT@SPCE (C). Representação da variação da intensidade de corrente com a velocidade de varrimento.

Foi ainda realizado o estudo do efeito da velocidade de varrimento por CV para averiguar a natureza do processo de oxidação. Na figura 3.6 estão apresentados os voltamogramas de CV obtidos com SPCE e CNT@SPCE, produzidos a partir de uma solução de AG a diferentes velocidades de varrimento. Com o SPCE os voltamogramas foram registados diretamente da solução de AG. A realização da etapa de adsorção não produziu alterações apreciáveis na resposta do SPCE, pelo que esta não foi efetuada com este eletrodo.

A intensidade de corrente de pico (I_p) medida a partir dos voltamogramas de CV obtidos com o SPCE (1º pico) varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento ($v^{1/2}$) ($r=0,996$). Este resultado demonstra que no SPCE, o processo de oxidação do AG é controlado por difusão. Relativamente

ao CNT@SPCE obteve-se uma correlação linear ($r=0,996$) da I_p em função da velocidade de varrimento, indicando que o processo é controlado por adsorção. As intensidades de corrente geradas pela oxidação do AG no CNT@SPCE foram significativamente superiores às obtidas no SPCE. Este facto resultou numa superior sensibilidade de medição e em limites de deteção mais baixos. O efeito da presença dos CNT foi quantificado a partir do incremento da sensibilidade, aqui denominado por amplificação.

A tabela 3.2 apresenta a comparação entre os valores da amplificação da sensibilidade das medições efetuadas em soluções de AG usando CNT@SPCE relativamente ao SPCE não modificado.

Tabela 3.2- Comparação entre os valores da sensibilidade e da amplificação das medições efetuadas em soluções de AG usando CNT@SPCE relativamente ao SPCE não modificado.

Técnica	CV	DPV
Sensibilidade SPCE (A/M)	0,0451	0,0522
Sensibilidade CNT@SPCE (A/M)	0,868	1,49
Amplificação	19,2	28,8

Os valores relativos à amplificação de sinal com o SPCE (cerca de 19 e de 29, por CV e DPV, respetivamente) são bastante inferiores aos obtidos com o eletrodo GCE (cerca de 145 e de 350, por CV e DPV, respetivamente). Esta diferença deverá estar relacionada com as condições experimentais em que a etapa da adsorção é realizada. A célula eletroquímica usada com o GCE permite usar um maior volume da solução e condições de transporte de massa mais eficientes, utilizando agitação. Estas condições promovem a acumulação de quantidades superiores de AG na superfície dos CNT imobilizados no GCE relativamente ao SPCE.

3.3 Otimização da resposta do sensor CNT@SPCE

Ainda que menos sensível, o CNT@SPCE apresenta uma enorme potencialidade para ser utilizado em análises de rotina por utilizadores não

especializados. Assim, foi feito um esforço no sentido de melhorar a resposta do sensor construído a partir do SPCE.

As variáveis experimentais analisadas na otimização foram as que condicionam a resposta do CNT@SPCE, nomeadamente: tempo de adsorção, potencial de adsorção, massa de CNT (utilizada na modificação do sensor SPCE) e o solvente utilizado na suspensão de CNT.

O processo de otimização foi realizado com o padrão de referência AG através da resposta por DPV, mantendo constantes as condições experimentais em que foram realizados os anteriores estudos voltamétricos.

3.3.1 Parâmetros de adsorção

A figura 3.7 apresenta a I_p obtida a partir de uma solução 6,0 μM de AG por DPV com o sensor CNT@SPCE, em função do tempo de adsorção, mantendo o potencial de adsorção a 0 V. Esta figura revela que o sinal tende a aumentar com o tempo de adsorção. O tempo de 90 s, apesar de não corresponder ao maior valor de I_p do AG, foi escolhido como o tempo de adsorção, pois não sendo excessivamente elevado não compromete significativamente a eficiência do método.

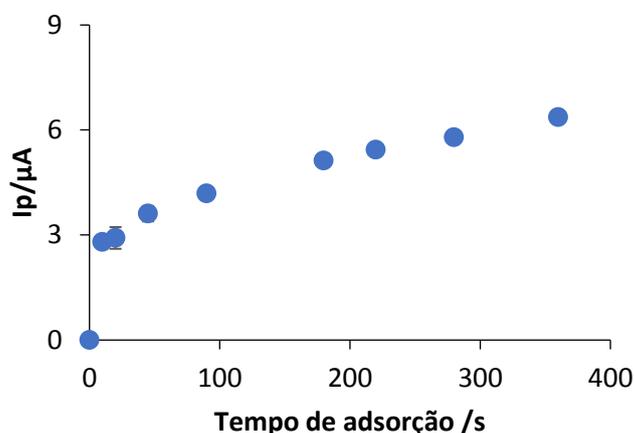


Figura 3.7– Efeito do tempo de adsorção na intensidade do sinal obtido por DPV, $E_{\text{ads}} = 0 \text{ V}$, $[\text{AG}] = 6,0 \mu\text{M}$.

A tabela 3.3 apresenta o efeito da utilização de potencial de adsorção durante o contacto com uma solução contendo AG, numa etapa que antecede o registo do

sinal eletroquímico por DPV numa solução de eletrólito suporte, com o sensor CNT@SPCE.

Tabela 3.3- Efeito do potencial de adsorção na intensidade do sinal obtido por DPV, [AG] = 9,0 μ M, tempo de adsorção de 90 s com o CNT@SPCE.

Potencial de adsorção	I_p / μ A
Circuito aberto	6,1
0 V	15,6

De acordo com a tabela 3.3, observa-se que o controlo do potencial na etapa de adsorção influencia determinantemente a resposta obtida com o CNT@SPCE. Considerando a mesma solução de AG, a resposta obtida é muito mais elevada (15,6 μ A) quando a adsorção do AG é realizada com um potencial constante de 0 V do que a obtida quando a adsorção é feita em circuito aberto. A diferença observada poderá estar relacionada com a redução dos grupos funcionais que são introduzidos nos CNT durante a produção da suspensão destes nanomateriais com a mistura de solventes água/metanol (1:1). Quando a adsorção do AG nos CNT depositados na superfície do SPCE, é efetuada com o potencial constante de 0 V, os grupos OH, provenientes das moléculas de metanol e introduzidos nos defeitos intrínsecos dos CNT, sofrem oxidação a um potencial muito inferior a 0 V (pois encontram-se numa estrutura eletrónica altamente deslocalizada) interagindo com os grupos funcionais do AG através do estabelecimento de ligações de hidrogénio. Por outro lado, na ausência de potencial de adsorção, os grupos OH presentes nos CNT, encontram-se na sua forma reduzida não interagindo com o AG. Nesta situação, a interação é associada apenas à pouca funcionalização que os CNT apresentam na sua forma original. Esta diferença poderá estar também relacionada com o facto das moléculas de AG serem atraídas, por interações electrostáticas, para a superfície do eléctrodo de trabalho quando este se encontra (polarizado) com um potencial constante (0 V). Nesta situação, a distância entre o analito e os grupos funcionais será menor, permitindo o estabelecimento de ligação de hidrogénio e uma maior concentração de analito na superfície do sensor que é traduzida num

sinal mais elevado face ao sinal que se obtém quando não há aplicação de potencial na etapa da adsorção.

3.3.2 Solvente usado na suspensão dos CNT e massa de CNT

O efeito do solvente usado na preparação das suspensões de CNT foi testado usando duas misturas: água/acetona (1:1) e água/metanol (1:1). Os resultados relativos à sensibilidade da determinação do AG com o CNT@SPCE encontram-se apresentados na figura 3.8.

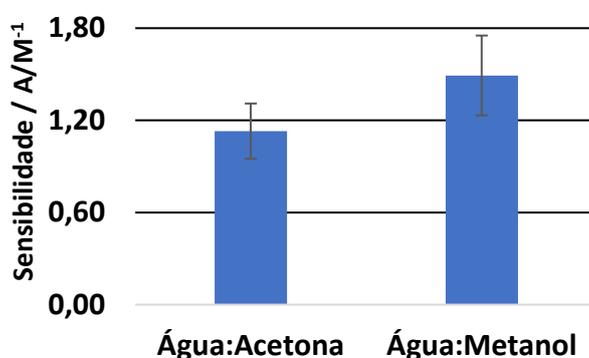


Figura 3.8– Efeito do solvente das suspensões de CNT na resposta do CNT@SPCE em soluções de AG.

Apesar de a sensibilidade obtida para a suspensão de CNT preparada em água/metanol ser maior, verificou-se que as sensibilidades não são significativamente diferentes (avaliado pelo teste de t). O efeito associado a esta variável é complexo pois poderá ser devido a diferentes fatores. A viscosidade e a polaridade dos solventes poderão influenciar a sua capacidade para dispersar os CNT, afetando a eficiência da sua distribuição à superfície do sensor. Por outro lado, da interação com o solvente poderá verificar-se a funcionalização dos CNT por ligação destas moléculas aos defeitos intrínsecos dos CNT. Esta funcionalização por sua vez irá determinar não só a forma como estes se organizam na superfície do eletrodo, mas também como estes interagem com as moléculas dos polifenóis.

O efeito da quantidade de CNT na suspensão foi também avaliado. Esta variável poderá afetar a extensão com que ocorre a interação com os polifenóis. Para o

estudo do efeito da massa de CNT foram modificados vários SPCE com diferentes massas de uma suspensão de CNT de concentração 1 mg/mL em água/metanol. A resposta do CNT@SPCE, correspondente à I_p obtida num ensaio por DPV a partir de uma solução 3,0 μM de AG está apresentada na figura 3.9.

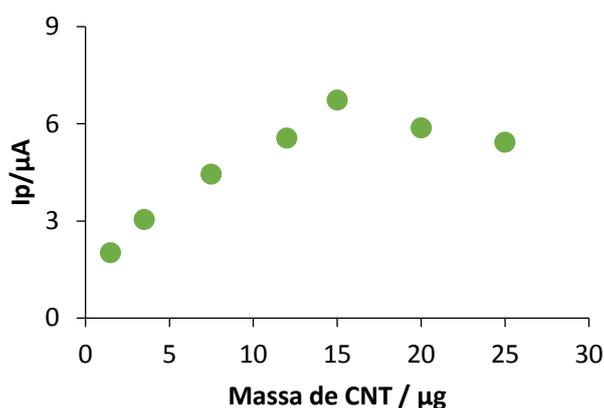


Figura 3.9 – Efeito da massa de CNT depositada no elétrodo de trabalho do SPCE na resposta do CNT@SPCE obtida num ensaio de DPV numa solução 3,0 μM de AG.

A I_p tende a aumentar com a massa de CNT depositada por *drop-casting*, até um valor de cerca de 15 μg . Como foi sempre usado a mesma suspensão de CNT, o aumento da massa de CNT corresponde a um aumento do volume da suspensão depositado. A colocação de volumes de suspensão superiores a 7,5 μL é bastante difícil devido à reduzida área do elétrodo de trabalho e à necessidade de confinar a suspensão a esta zona. Deste modo, optou-se por usar uma massa de 7,5 μg de CNT apesar desta não corresponder à situação ótima para a resposta do sensor.

3.4 Grupos funcionais envolvidos na etapa do reconhecimento de polifenóis

Em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório verificou-se que a presença de grupos funcionais contendo oxigénio pode contribuir para aumentar a sensibilidade da deteção de moléculas contendo fenóis na sua estrutura. Este efeito foi verificado na deteção de dopamina em SPCE tratados a elevada temperatura [75], com elétrodos modificados com CNT funcionalizados por

tratamento com ácido nítrico [76] e com fragmentos carbonáceos obtidos a partir de CNT [77]. Estes grupos funcionais podem estabelecer ligações de hidrogénio com os grupos funcionais dos polifenóis. No sentido de esclarecer acerca da importância dos grupos carboxílico na adsorção dos polifenóis aos CNT, realizou-se uma experiência em que o passo de adsorção do ácido 2,5-dihidroxibenzóico, 2,5AHB, foi efetuado a partir de duas soluções com diferente pH, 7,40 e 3,20, sendo a oxidação das moléculas adsorvidas posteriormente realizada numa solução tampão de ácido tartárico pH 3,20. A figura 3.10 mostra os voltamogramas de CV obtidos com o CNT@SPCE relativos à oxidação do 2,5AHB, comparativamente à oxidação da hidroquinona, HQ, cuja adsorção foi realizada a pH 3,20 e o registo do voltamograma foi efetuado também na solução do eletrólito suporte. A HQ é uma molécula semelhante ao 2,5AHB diferindo pela ausência do grupo carboxílico.

Nas condições experimentais em que o grupo carboxílico do 2,5AHB está protonado, obtidas a pH 3,20, as intensidades de corrente são mais elevadas que as obtidas a pH 7,40 quando o grupo carboxílico se encontra desprotonado. Para além disso, a I_p obtida pela oxidação do 2,5AHB, após a adsorção a pH 7,40, é comparável à obtida para a HQ após a sua adsorção a pH 3,20, como mostra a figura 3.10.

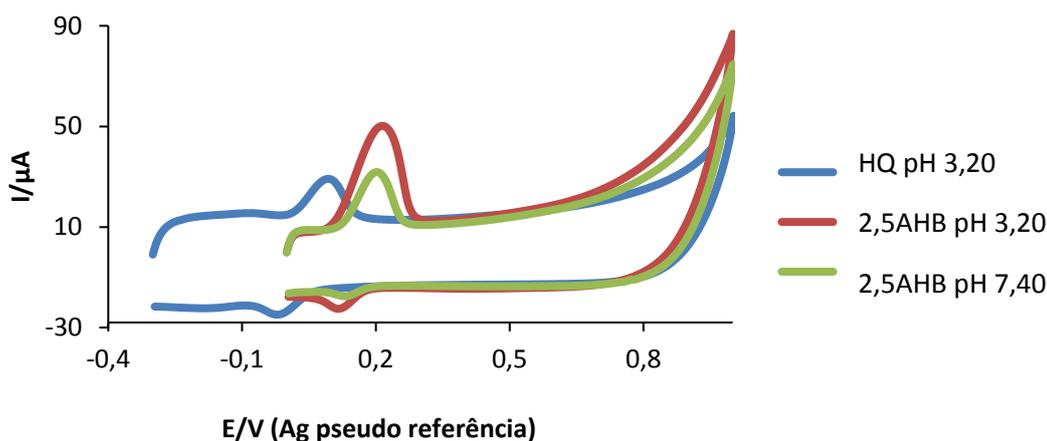


Figura 3.10– Voltamogramas de CV obtidos na solução do eletrólito suporte (ácido tartárico 32,0 mM a pH 3,20) com o CNT@SPCE, após adsorção de HQ e 2,5AHB (120,0 μM) a pH 3,20 (ácido tartárico) e do 2,5AHB a pH 7,40 (tampão fosfato).

A igualdade entre as intensidades de corrente de pico sugere que o grau de cobertura da superfície por estas moléculas é semelhante, considerando que o mecanismo de oxidação de ambas as moléculas envolve o mesmo número de eletrões com a formação de uma *para*-quinona, de acordo com a equação 3.1.

$$I_P = \frac{n^2 F^2 v A \tau_0}{4RT} \quad 3.1$$

Na equação 3.1 n é o número de eletrões envolvido no processo de transferência eletrónica, F é a constante de *Faraday*, v é a velocidade de varrimento, A é a área do elétrodo de trabalho, τ_0 é o grau de cobertura da superfície do elétrodo, R é a constante de gases e T a temperatura.

Estes resultados mostram que o grupo carboxílico do 2,5AHB está envolvido no processo de adsorção quando este se encontra na forma protonada. Nesta situação, o 2,5AHB adsorve em maior extensão que a HQ, obtendo-se valores de I_p superiores. A interligação entre a extensão da adsorção e o grau de protonação do grupo carboxílico poderá indicar que os átomos de oxigénio dos CNT envolvidos no processo de adsorção não estão ligados a um átomo de hidrogénio. Assim, nos CNT, a ligação de hidrogénio só é efetiva com grupos funcionais presentes nos CF que possuam um átomo de hidrogénio ligado a um átomo eletronegativo, tal como nas funções de ácido carboxílico (COOH) e fenol (OH).

Esta observação indica a presença de grupos carbonilo na superfície dos CNT. A existência destes grupos poderá estar relacionada com a oxidação eletroquímica de grupos OH que foram introduzidos nos defeitos intrínsecos dos CNT, através das moléculas de água e metanol no seu tratamento com ultrasons. Como estes grupos se encontram ligados a uma estrutura macromolecular de carbono sp^2 altamente deslocalizada, a sua oxidação poderá ocorrer a potenciais inferiores ao potencial em que é realizada a adsorção dos CF, já referido anteriormente.

A figura 3.11 apresenta o espetro de IV com a transformada de Fourier (FTIR) dos CNT da suspensão água/metanol (1:1) e dos CNT na sua forma original, denominados de prístinos. De acordo com esta figura, os espetros de FTIR dos CNT prístinos e provenientes da suspensão água/metanol são semelhantes. Deste modo não é possível através desta técnica, identificar funcionalização

associada ao tratamento dos CNT com água/metanol. Estes espectros são semelhantes aos apresentados na caracterização de CNT, quer prístinos, quer funcionalizados por oxidação com ácido nítrico [78]. Pode então concluir-se que as bandas que surgem nos espectros de FTIR são características dos CNT.

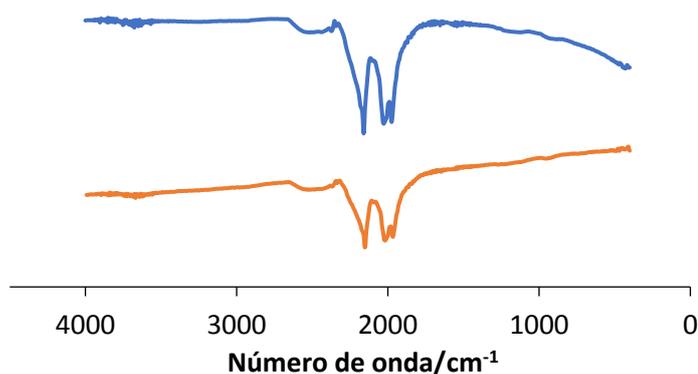


Figura 3.11- Espectros de FTIR dos CNT da suspensão água/metanol (laranja) e dos CNT originais (azul).

A figura 3.12 mostra uma curva de TGA obtida com os CNT provenientes da suspensão em água/metanol (1 mg/mL), após a sua secagem prévia (descrita na seção 2.2.5). Esta curva foi traçada, entre a temperatura ambiente até 800 °C, com uma velocidade de varrimento de 10 °C/min, na presença de um fluxo constante, 60 mL/min, de nitrogénio.

De acordo com a figura 3.12, a perda de massa dos CNT, num total de 5,4 %, começa a ser significativa a partir dos 200 °C e deverá corresponder à libertação de grupos funcionais ligados covalentemente na superfície dos CNT. O facto desta perda de massa ser pequena demonstra que o grau de funcionalização é baixo. Ainda que reduzido, esta perda de massa é superior à obtida com os correspondentes CNT prístinos, cujo valor de perda de massa é de 1,3 % [77]. Dadas as diferenças entre as perdas de massa e as temperaturas a que estas têm lugar, pode concluir-se que os CNT submetidos ao tratamento por ultra-sons na presença de água/metanol são sujeitos a um processo de funcionalização efetiva que condiciona o seu desempenho em termos eletroquímicos.

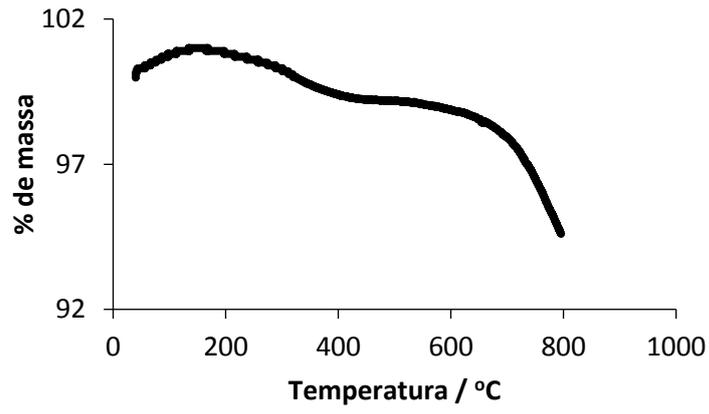


Figura 3.12- Curva de TGA dos CNT da suspensão em água/metanol (1 mg/mL).

4. Caracterização da resposta do sensor de polifenóis baseado em CNT relativamente a polifenóis com diferentes estruturas

Nesta secção são apresentados os resultados relativos à caracterização do sensor de polifenóis, constituído por um SPCE modificado com CNT funcionalizados, CNT@SPCE, com diferentes polifenóis. Como a resposta eletroquímica deste sensor está associada à oxidação dos polifenóis adsorvidos nos CNT, a sensibilidade da deteção depende tanto da extensão da adsorção como do mecanismo de oxidação. Assim, foi selecionado um conjunto de CF com diferentes estruturas, incluindo diferente número de grupos OH ligados ao anel aromático e em diferentes posições relativas (*orto*, *meta* ou *para*). A resposta eletroquímica do sensor de polifenóis é analisada em soluções contendo cada um dos polifenóis isolados e em misturas de polifenóis. A informação contida nos voltamogramas obtidos com o CNT@SPCE é comparada com a obtida no SPCE não modificado.

4.1 Caracterização de compostos fenólicos por CV e DPV

As figuras 4.1 e 4.2 mostram os voltamogramas de um conjunto de polifenóis com características estruturais diferentes obtidos com um SPCE e o sensor de polifenóis CNT@SPCE por CV e DPV, respetivamente. Os voltamogramas obtidos com o SPCE foram registados diretamente a partir de um volume de 75 μL de solução que foram colocados sobre a superfície do conjunto de 3 elétrodos impressos. Com o CNT@SPCE, os voltamogramas foram registados numa sequência de dois passos, como se descreve na secção experimental 2.2.1. No primeiro passo é realizada a adsorção, a potencial controlado ($E_d=0\text{ V}$ vs elétrodo de pseudo referência) durante 90 s.

Os voltamogramas de CV obtidos com o SPCE apresentam picos largos e não simétricos, indicando que neste sensor o processo de oxidação dos CF é controlado por difusão. Por outro lado, os voltamogramas de CV do sensor

CNT@SPCE, apresentando picos simétricos, indicam que os CF se adsorvem na superfície dos CNT depositados no elétrodo de trabalho do SPCE.

O grau de simetria dos picos relativos ao ACUM e ao 2,4AHB é menor devido a estes picos surgirem junto ao limite de oxidação da janela de potenciais disponíveis.

Todos os voltamogramas de CV dos CF obtidos com o SPCE apresentam apenas um pico de oxidação, com a exceção do AG e da catequina (CAT) que apresentam dois picos. No sensor CNT@SPCE verifica-se o mesmo comportamento, com exceção do AG que apresenta um único pico de oxidação. A ocorrência do pico de redução, só se verifica para os polifenóis com grupos hidroxilo em posições *orto* ou *para*, nomeadamente para o AC, 2,5AHB e a CAT. Este pico está relacionado com a redução das quinonas (*orto* ou *para*) que são formadas através da oxidação do polifenol. Os polifenóis com grupos hidroxilo em posição *meta*, tal como os fenóis com um único grupo hidroxilo sofrem oxidação eletroquímica a potenciais mais elevados e não apresentam pico inverso, devido a não haver formação das quinonas pela oxidação destes CF. O AG apresenta grupos hidroxilo em posições adjacentes (*orto*), sendo oxidado a potenciais relativamente baixos, próximos dos obtidos para os polifenóis com grupos hidroxilo em posições *orto* ou *para*. O facto de a transferência de carga ocorrer em dois processos separados, no caso do SPCE, poderá ser justificado com a estabilização do intermediário gerado após a transferência de 1 eletrão, como se encontra ilustrado na figura 4.3 [79].

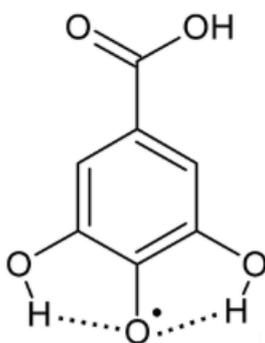


Figura 4.3– Representação hipotética da estrutura do intermediário da reação de oxidação do AG.

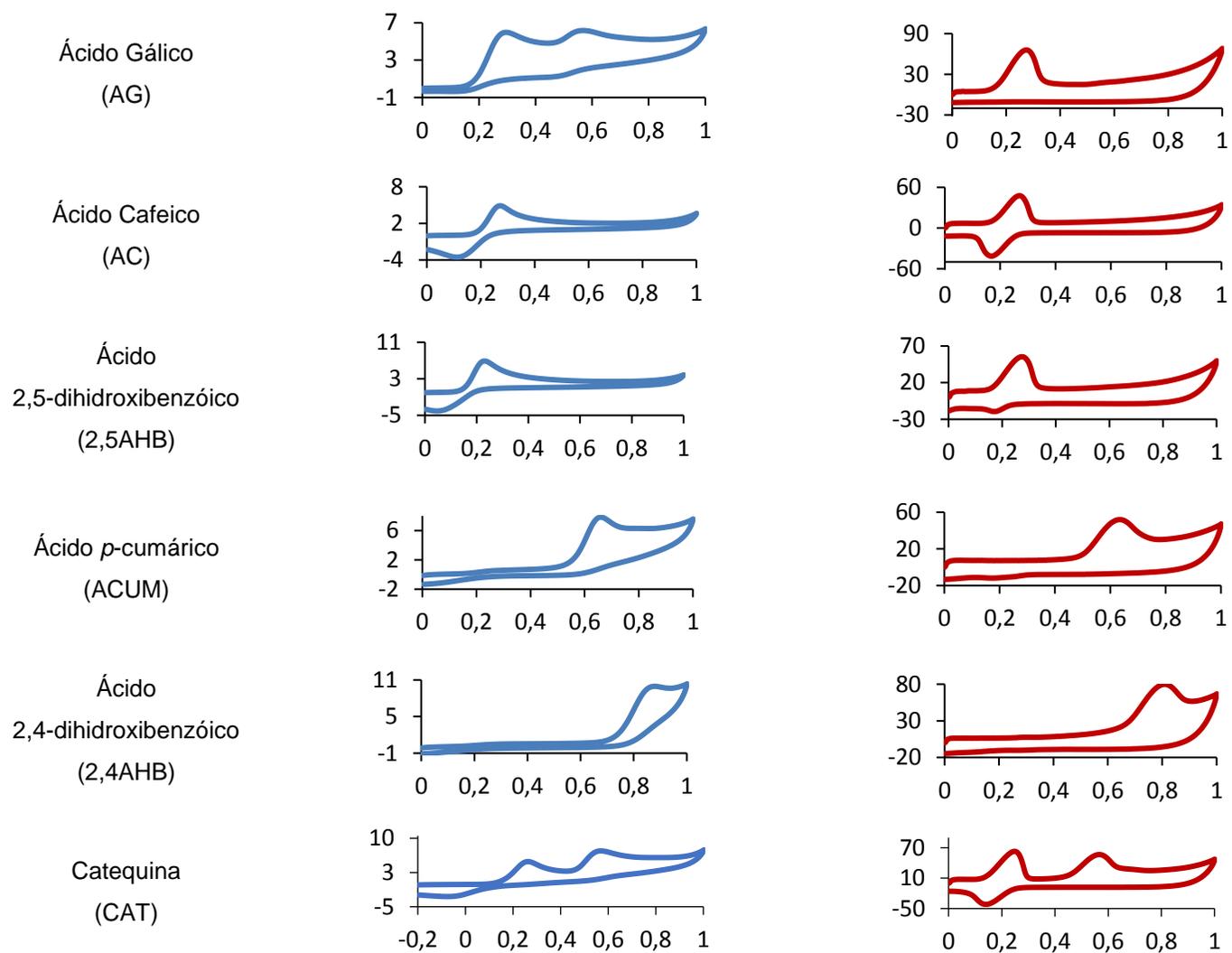


Figura 4.1– Voltamogramas de CV de diferentes polifenóis (120,0 μM) obtidos com SPCE e CNT@SPCE (eixo vertical: I/μA; eixo horizontal: E/V vs pseudo referência).

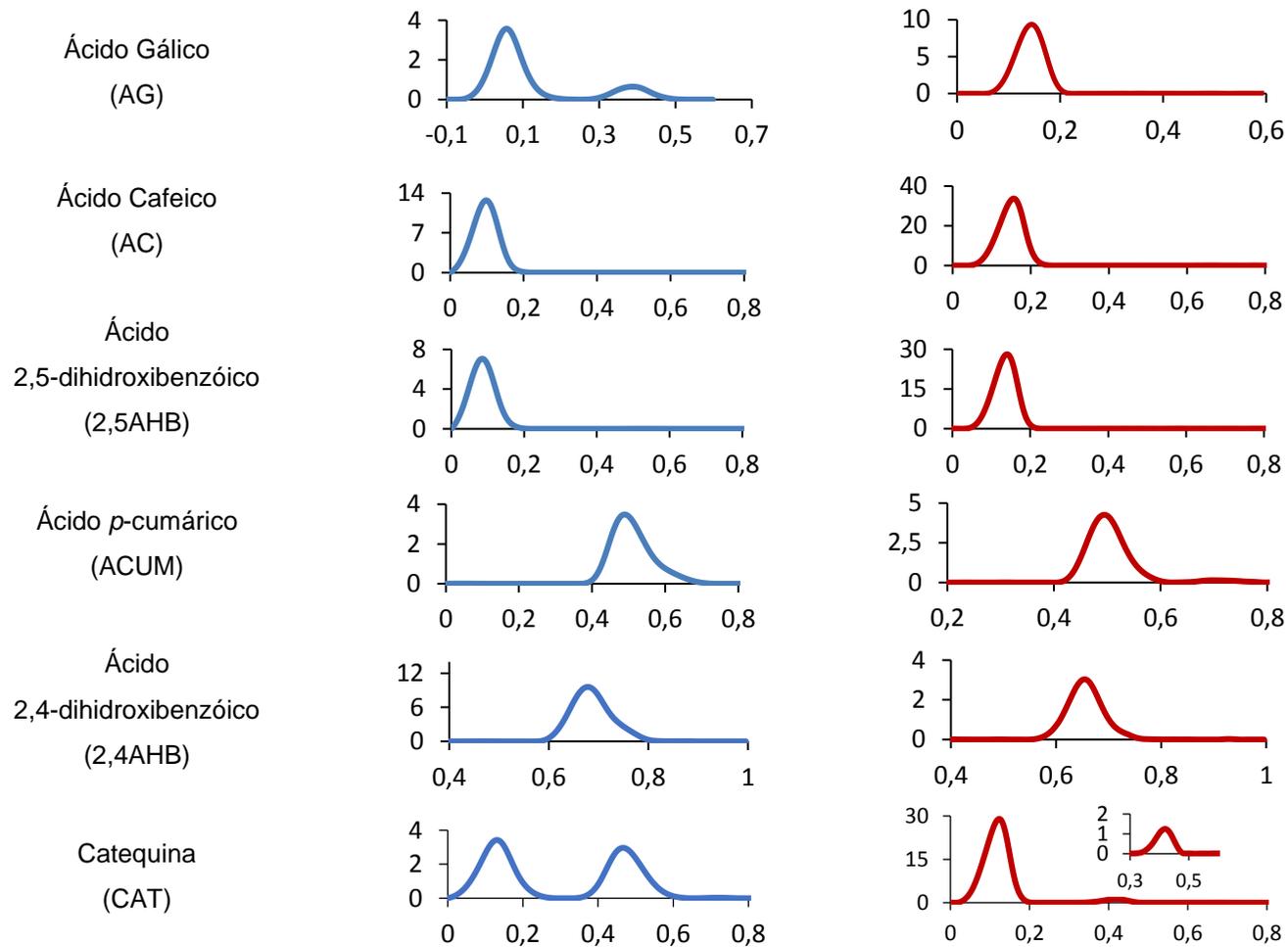


Figura 4.2– Voltamogramas de DPV de diferentes polifenóis obtidos com **SPCE** (60,0 μM) e **CNT@SPCE** (6,0 μM), eixo vertical: **I/μA**; eixo horizontal: **E/V** vs pseudo referência.

O radical formado após a transferência do primeiro eletrão é estabilizado por um efeito eletrónico dador exercido pelos dois grupos hidroxilos fenólicos adjacentes e pela formação de duas ligações de hidrogénio. Estes dois fenómenos opõem-se ao efeito eletrónico retirador exercido pelo grupo carboxílico, estabilizando, desta forma, o radical formado durante a oxidação do AG.

O facto de este não apresentar pico inverso indica que a quinona formada pela oxidação não é reduzida na janela de potenciais experimentalmente acessível ou alternativamente poderá considerar-se que a oxidação do AG não leva à formação de uma quinona estável.

A resposta obtida, por DPV e CV, com o CNT@SPCE é semelhante à do SPCE, no que diz respeito à posição relativa dos picos de oxidação e à existência de um pico inverso, com a exceção do AG. A alteração do perfil voltamétrico do AG sugere que o seu mecanismo de oxidação é influenciado pela presença dos CNT na superfície do SPCE. Com o SPCE a ocorrência de dois picos de oxidação (envolvendo a perda sequencial de 1 eletrão e 1H⁺ em cada processo) relaciona-se com o facto produto formado no primeiro processo (figura 4.3) é mais difícil de oxidar que o próprio AG. Usando o CNT@SPCE, a oxidação do AG origina um único pico voltamétrico. O facto do catião radicalar se encontrar adsorvido na superfície dos CNT pode conferir-lhe uma maior estabilidade e simultaneamente favorecer a formação de dímeros por combinação entre catiões radicalares adsorvidos em posições adjacentes.

As I_p obtidas com o CNT@SPCE são muito superiores às relativas ao SPCE. Este resultado está diretamente relacionado com o facto desta resposta resultar da oxidação de espécies adsorvidas nos CNT imobilizados na superfície do SPCE, de acordo com os resultados apresentados na secção 3. Nestas circunstâncias as I_p são controladas pelo grau de cobertura da superfície do eléctrodo pela espécie ativa, o que resulta em respostas mais sensíveis do que as controladas pelo transporte de massa (difusão).

As tabelas 4.1 e 4.2 apresentam dados relativos à caracterização eletroquímica de polifenóis por DPV com o sensor CNT@SPCE. Os dados de sensibilidade e da gama de trabalho foram obtidos através de curvas de calibração que se encontram apresentadas no anexo 2. Para efeitos de comparação, são também apresentados os dados dos voltamogramas registados no SPCE não modificado. Os dados de sensibilidade reportados para o sensor utilizado na sua forma

original (SPCE) foram calculados através da razão entre a I_p e a concentração de uma solução padrão.

De acordo com os dados das tabelas 4.1 e 4.2 é possível concluir que os polifenóis que sofrem oxidação a potenciais mais baixos, nomeadamente o AG, CAT, 2,5AHB, AC, 3,4AHB e o ácido tânico, AT, são os que apresentam grupos hidroxilos fenólicos em posição *orto* ou *para*.

O menor potencial de oxidação é uma característica das espécies com superior atividade antioxidante. O facto de serem facilmente oxidados do ponto de vista termodinâmico, permite que em sistemas naturais estas espécies reajam mais extensamente com as espécies reativas de oxigénio associadas à degradação oxidativa, prevenindo, assim, a oxidação de outras moléculas presentes no sistema natural como, por exemplo, no vinho [38, 80].

Os CF que apresentam apenas um grupo hidroxilo, ou grupos hidroxilo fenólicos em posição *meta*, como o AF, AC, 3AHB, 2,4AHB e a m-CAT são compostos cuja oxidação ocorre a potenciais mais elevado, estando por isso associados a uma menor atividade antioxidante.

Os potenciais de oxidação obtidos com o CNT@SPCE apresentam algumas diferenças relativamente aos obtidos com o SPCE. Este facto pode ter diversas origens. O elétrodo utilizado como referência é uma pseudo referência, podendo verificar-se a alteração do seu potencial com a composição da solução. Este efeito é particularmente significativo devido às medições com o SPCE serem efetuadas na solução a analisar, enquanto com o CNT@SPCE a medição é efetuada na solução de eletrólito após o passo da adsorção.

Por outro lado, a cinética de transferência eletrónica deverá ser afetada pela presença dos CNT na superfície do elétrodo, alterando eventualmente os potenciais de pico. A modificação da superfície com os CNT poderá ter contribuído para facilitar a transferência eletrónica de todos os processos, eliminando esta contribuição no valor de E_p , aproximando estes valores entre si (tabela 4.1 e 4.2).

A sensibilidade da determinação, dos diferentes CF, por DPV obtida com o CNT@SPCE é significativamente superior à obtida com o SPCE. Para todos os compostos verifica-se um aumento de sensibilidade quando é utilizado o sensor CNT@SPCE, sendo este aumento mais acentuado para os compostos que apresentam grupos OH em posições *orto* e *para* (figura 4.4).

Tabela 4.1- Caracterização eletroquímica dos polifenóis com grupos OH em posições *orto* e *para* por DPV com o sensor CNT@SPCE e SPCE (para referência).

Composto fenólico	CNT@SPE				SPCE		
	E_{p1} E_{p2} (V)	$E_p - E_{p/2}$ (V)	Sensibilidade (A/M)	Gama de trabalho (A/M)	E_{p1} (V)	$E_p - E_{p/2}$ (V)	Sensibilidade (A/M)
AG	0,105	0,068	$1,49 \pm 0,13$	1,5 – 12,0	0,056	0,087	0,0522
	-	-	-	-	0,619	0,112	-
CAT	0,122	0,073	$3,330 \pm 0,017$	0,75 – 4,5	0,132	0,098	0,142
	0,430	0,068	-	-	0,483	0,107	-
2,5AHB	0,141	0,073	$2,15 \pm 0,36$	3,0 – 12,0	0,083	0,082	0,118
	-	-	-	-	-	-	-
ACAF	0,156	0,073	$5,60 \pm 0,44$	0,75 – 6,0	0,098	0,082	0,212
	-	-	-	-	-	-	-
AT	0,190	0,151	$4,83 \pm 0,39$	1,5 – 6,0	0,138	0,181	0,131
	-	-	-	-	-	-	-
3,4AHB	0,220	0,078	$4,13 \pm 0,70$	0,75 – 4,5	0,273	0,103	0,0578
	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 4.2- Caracterização eletroquímica dos compostos fenólicos com grupos OH em posições *meta* ou com apenas um único grupo OH (mono fenóis) com o sensor CNT@SPCE e SPCE.

Composto fenólico	CNT@SPE				SPCE		
	E_{p1} (V)	$E_p - E_{p/2}$ (V)	Sensibilidade (A/M)	Gama de trabalho (A/M)	E_{p1} (V)	$E_p - E_{p/2}$ (V)	Sensibilidade (A/M)
AF	0,320	0,112	$0,433 \pm 0,021$	3,0 – 24,0	0,303	0,146	0,0695
ACUM	0,480	0,063	$0,165 \pm 0,012$	6,0 – 48,0	0,493	0,112	0,0579
3AHB	0,620	0,078	$0,212 \pm 0,013$	6,0 – 48,0	0,664	0,107	0,125
2,4AHB	0,654	0,073	$0,264 \pm 0,028$	3,0 – 24,0	0,679	0,112	0,200

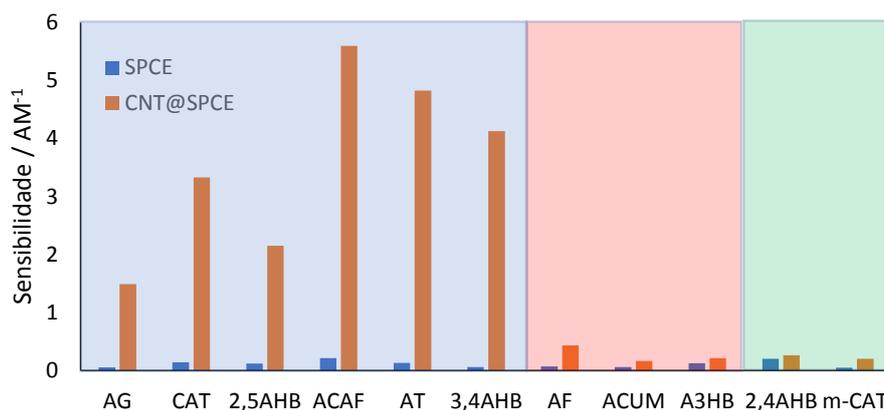


Figura 4.4- Comparação das sensibilidades do SPCE e CNT@SPCE, determinadas por DPV, para os diferentes compostos fenólicos (*orto* e *para*, *monofenóis* e *meta*).

Pode-se, então, concluir que o CNT@SPCE produz Ip mais elevadas na detecção de polifenóis que apresentam uma atividade antioxidante mais elevada (polifenóis que se oxidam a potenciais mais baixos) do que os polifenóis que apresentam menor atividade antioxidante. Por exemplo, a sensibilidade deste sensor em relação ao ACUM (composto que não forma a quinona) é cerca de 0,16 A/M, enquanto a sensibilidade do mesmo sensor em relação ao AC (composto fenólico que forma a quinona) é 5,58 A/M, determinada, também, por DPV.

4.2 Análise de misturas de polifenóis

A análise de misturas de polifenóis pode ser efetuada do ponto de vista qualitativo ou quantitativo. Do ponto de vista qualitativo, é considerada a possibilidade de detetar a presença de diferentes compostos, enquanto que em termos quantitativos é discutida a aditividade dos sinais relativos aos componentes presentes na mistura. Nas figuras 4.5 e 4.6 comparam-se as respostas voltamétricas, por DPV, de duas misturas de polifenóis (A e B) utilizando um SPCE e um CNT@SPCE, respetivamente.

As figuras 4.5A e 4.6A apresentam voltamogramas relativos aos CF com grupos OH em posições *orto* (AG, AC e CAT), *meta* (CAT) e *para* (2,5AHB) nos anéis aromáticos.

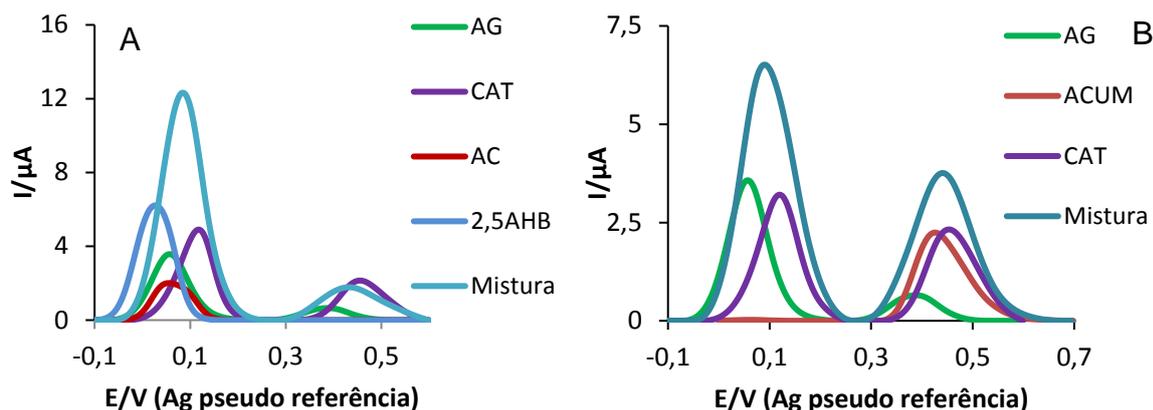


Figura 4.5– Voltamogramas de DPV, obtidos com um SPCE, de misturas de polifenóis: A) contendo grupos OH em posições *orto* ou *para* (30 μM de AG e de 2,5AHB, 15 μM de AC), contendo grupos OH em posição *orto* e *meta* (30 μM de CAT); B) contendo grupos OH em posições *orto* e *meta* (30 μM de AG e CAT) e um monofenol (60 μM de ACUM).

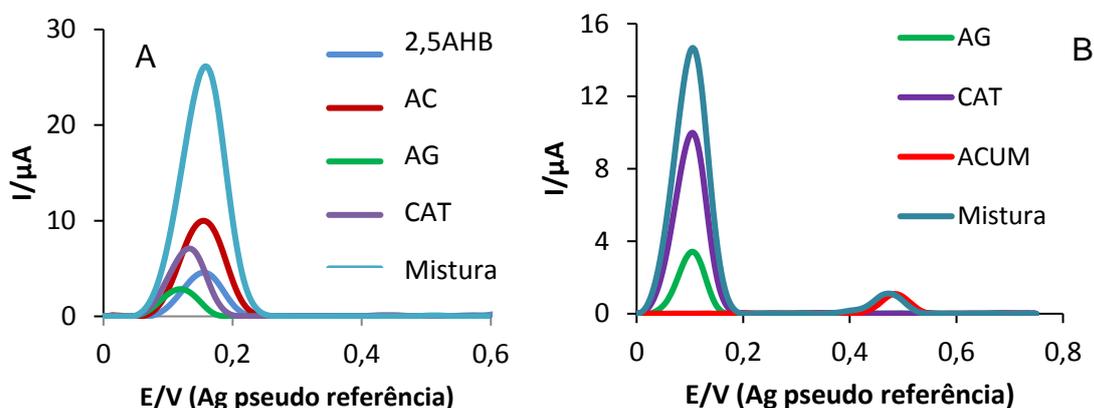


Figura 4.6- Voltamogramas de DPV, obtidos com um CNT@SPCE, de misturas de polifenóis: A) contendo grupos OH em posição *orto* ou *para* (3,0 μM de AG, CAT, A2,5dHB e de AC) e *meta* (3,0 μM de CAT); B) contendo grupos OH em posição *orto* (3,0 μM de AG e CAT) e um monofenol (6,0 μM de ACUM).

Com o SPCE o AG e a CAT apresentam dois picos de oxidação em oposição ao AC e ao 2,5AHB que só apresentam um. O voltamograma da mistura A (contendo AG, AC, CAT e 2,5AHB) apresenta dois picos. O primeiro tem contribuição de todas as espécies presentes que são facilmente oxidáveis. Só algumas das espécies contribuem para o segundo pico, nomeadamente o AG e a CAT. Com o CNT@SPCE só é visível um pico para cada um dos polifenóis analisados isoladamente. Apesar da CAT apresentar um anel aromático com grupos OH em posição *meta*, não é visível um pico a valores de potencial mais elevados que possa ser atribuído à oxidação destes grupos. O voltamograma da

mistura A, com um único pico a 0,161 V, é resultado da contribuição de todos os compostos.

As figuras 4.5B e 4.6B apresentam voltamogramas relativos aos AG, CAT e ACUM. O primeiro composto apresenta grupos OH nas posições *orto*; o segundo apresenta grupos OH em posição *orto* e *meta*; enquanto que o último é um monofenol. Com o SPCE os polifenóis AG e CAT apresentam dois picos de oxidação, o primeiro a cerca de 0,1 V e o segundo a cerca de 0,45 V. O ACUM apresenta um único pico de oxidação que coincide com o segundo pico do AG e da CAT. O voltamograma da mistura B (AG, CAT e ACUM) apresenta dois picos. Enquanto para o primeiro pico contribuem exclusivamente as espécies facilmente oxidáveis, AG e CAT, para o segundo pico observa-se a contribuição de todos os compostos. Com o CNT@SPCE cada um dos CF apresenta um único pico enquanto que a mistura B apresenta dois picos. Os picos do AG e da CAT ocorrem a aproximadamente a 0,1 V enquanto o do ACUM ocorre a cerca de 0,5 V. As espécies AG e CAT (que possuem grupos OH facilmente oxidáveis) contribuem para o primeiro pico da mistura, a cerca de 0,1 V, enquanto que o ACUM (que é mais dificilmente oxidável) contribui unicamente para o segundo pico, a cerca de 0,5 V.

A análise quantitativa das duas misturas (A e B), com ambos os sensores, foi efetuada a partir dos valores de I_p obtidos para os compostos isolados e para as misturas. A tabela 4.3 apresenta os desvios relativos entre os valores medidos de I_p dos voltamogramas das misturas e os valores de I_p calculados a partir da soma dos valores de I_p medidos para cada CF isoladamente. Os valores de I_p dos compostos medidos isoladamente, bem como das misturas, encontram-se no anexo 3.

Tabela 4.3- Diferença relativa entre as I_p medidos dos voltamogramas das misturas e as I_p calculadas a partir da soma dos valores de I_p medidos para cada CF isoladamente.

	Desvio relativo (%)			
	CNT@SPCE		SPCE	
	Pico 1	Pico 2	Pico1	Pico 2
Mistura A	6	-	30	49
Mistura B	9	5	4	33

Relativamente aos resultados obtidos com o SPCE, a I_p do 1º pico obtida na mistura A é 30 % inferior ao correspondente à soma das I_p individuais. No que diz respeito ao 2º pico, a I_p obtida na mesma mistura é 49 % inferior à soma dos I_p individuais. Na mistura B, verifica-se uma diferença de 4 % para a I_p do 1º pico e 33 % para a I_p do 2º pico, sendo que os valores de I_p obtidos nesta mistura são também inferiores aos obtidos pelo somatório das I_p individuais dos compostos. Já com o CNT@SPCE as diferenças calculadas são muito menores. Na mistura A, a I_p do único pico observado é 6 % superior à soma das I_p individuais. Na mistura B, observa-se uma diferença de 9 % para a I_p do 1º pico e 5 % para a I_p do 2º pico, sendo os valores de I_p da mistura também superiores aos obtidos pelo somatório das I_p individuais dos compostos.

A diferença destes resultados, quando se faz a análise das misturas A e B com os sensores SPCE e CNT@SPCE, representa uma consequência direta da maior proximidade entre os valores de E_p , como mostra a figura 4.7, e da menor largura dos picos (tabela 4.1 e 4.2) obtidos com o sensor CNT@SPCE.

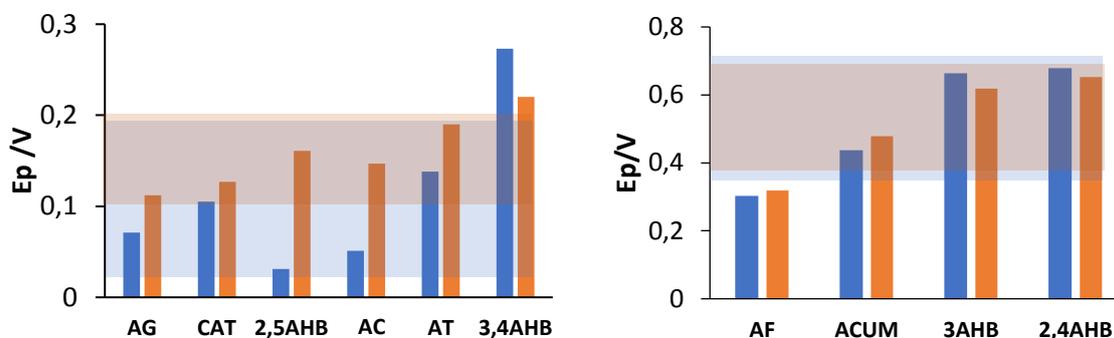


Figura 4.7- Comparação dos valores de E_p dos compostos fenólicos estudados obtidos com SPCE e CNT@SPCE. As regiões sombreadas correspondem aos intervalos de confiança obtidos do E_p , para cada sensor, a partir do valor médio e do desvio padrão.

Para além da aditividade dos sinais ser verificada em maior extensão com o CNT@SPCE, a informação contida em cada um dos picos, nas misturas, é superior. A partir do primeiro pico é possível quantificar os CF com grupos OH em posição *orto* e *para*, enquanto que através do segundo pico quantificam-se os compostos com grupos OH em posição *meta* ou compostos com um único grupo fenólico.

Os grupos OH em posição *meta* relativos à CAT não foram detetados nesta experiência devido à menor sensibilidade com que são detetados os processos de oxidação relativos a compostos com grupos OH nesta posição. Na figura 4.8 estão apresentados voltamogramas de DPV obtidos em diferentes concentrações de CAT com o sensor CNT@SPCE. De acordo com a figura 4.8, a presença do 2º pico só se faz sentir para concentrações iguais ou superiores a 6 µM, enquanto o 1º, correspondente à oxidação dos grupos OH em posição *orto*, é detetado para soluções de 0,75 µM.

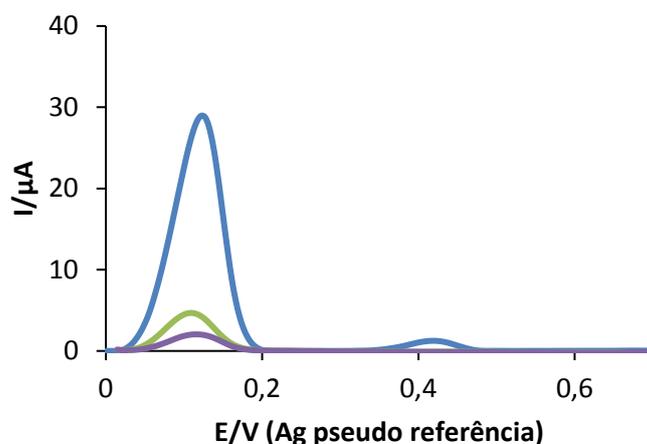


Figura 4.8- Efeito da concentração (0,75, 1,5 e 6,0 µM) no sinal, obtido por DPV com o CNT@SPCE, relativo aos grupos OH em posição *meta* da CAT.

Para além dos compostos com grupos OH em posição *meta*, os monofenóis também apresentam uma sensibilidade mais reduzida relativamente aos compostos com grupos OH em posições *orto* ou *para*.

A sensibilidade relativa à deteção de monofenóis e polifenóis com grupos OH em posição *meta* pode ser melhorada alterando as condições em que é realizada a etapa de adsorção, nomeadamente aumentando o tempo de adsorção.

Na figura 4.9 encontra-se ilustrado o efeito do tempo de adsorção na resposta de DPV obtida numa solução equimolar de ACUM e AG (2,50 µM). A adsorção foi realizada ao potencial de 0,400 V e o voltamograma foi registado entre 0,400 e 0,700 V. Com um aumento do tempo de adsorção entre 45 e 550 s, verificou-se um incremento de 22 vezes na sensibilidade do ACUM que variou entre 0,02 A/M e 0,40 A/M.

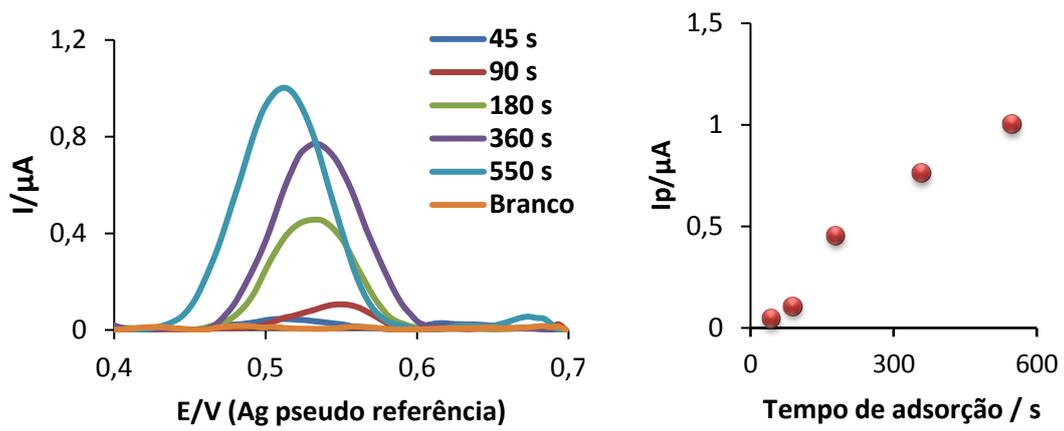


Figura 4.9- Efeito do tempo de adsorção na resposta de DPV numa solução equimolar de AG e ACUM (2,50 μM).

5. Validação do sensor e método de análise de compostos fenólicos

Na presente secção, são apresentados resultados relativos à validação do sensor de polifenóis, cuja constituição e modo de operação foram otimizados (secção 3) e testado com diferentes CF, individualmente e em misturas (secção 4). A validação foi realizada considerando resultados obtidos por DPV em soluções padrão de um CF modelo (AG) e soluções de uma amostra de vinho tinto. O desempenho do sensor e do método foi avaliado a partir da gama de trabalho, sensibilidade, limite de quantificação, precisão, justeza, seletividade e incerteza de medição. Os resultados obtidos com este sensor foram comparados com os dos métodos utilizados na determinação do teor total de CF em amostras naturais, nomeadamente a medição de absorvância a 280 nm e o método de *Folin-Ciocalteu*.

5.1 Análise com o sensor CNT@SPCE

A análise de uma amostra de vinho tinto (Pegões 2016) foi efetuada com o sensor CNT@SPCE na solução de eletrólito suporte após uma etapa de adsorção dos CF, ao potencial de 0 V. Para efeito de comparação a mesma amostra de vinho tinto (diluída 1:25) foi analisada com o SPCE. A figura 5.1 apresenta o voltamograma de DPV obtido com o sensor SPCE. Neste voltamograma, com baixa resolução, é observada a presença de três picos parcialmente sobrepostos. Os dois primeiros picos localizados na região de potenciais inferiores a 0,3 V, deverão corresponder aos polifenóis com grupos OH em posição *orto* e *para* (tabela 4.1) enquanto o último pico que se localiza a potenciais mais elevados (superiores 0,3 V), deverá corresponder aos CF com um único grupo OH ou com grupos OH em posição *meta* (tabela 4.2). A quantificação de cada um dos dois grupos e do teor total de CF com o SPCE é feita por interpolação das I_p ($I_{p1} + I_{p2}$ para o primeiro grupo e I_{p3} para o segundo grupo) numa curva de calibração de AG, obtida por DPV (anexo 4). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.1. A razão entre as concentrações dos CF que se oxidam a potenciais inferiores a 0,3 V e os que se oxidam a potenciais superiores a 0,3 V é de 4:5.

Dada a baixa seletividade do SPCE, estes resultados deverão estar afetados pela presença de interferentes relevantes na matriz do vinho como, por exemplo, o ácido ascórbico e o dióxido de enxofre. Assim, a justeza deste método está diretamente relacionada com a concentração em que estes interferentes se encontram na amostra.

A figura 5.2 mostra os voltamogramas de DPV registados com o sensor CNT@SPCE, numa solução de amostra de vinho tinto (Pegões 2016), obtidos em diferentes condições experimentais.

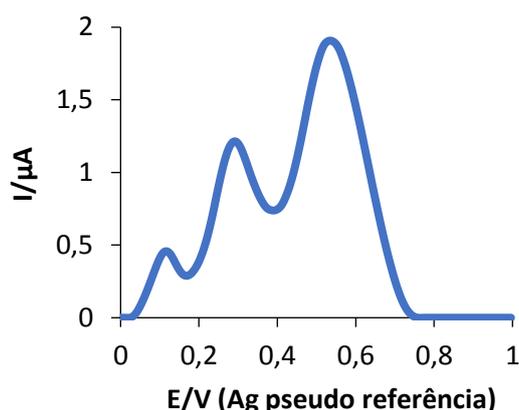


Figura 5.1– Voltamogramas obtidos com SPCE numa amostra de vinho tinto diluída **1:25** na solução de eletrólito suporte (ácido tartárico 32 mM a pH 3,20) por DPV ($E_p=100$ mV e $\Delta E_s= 5$ mV).

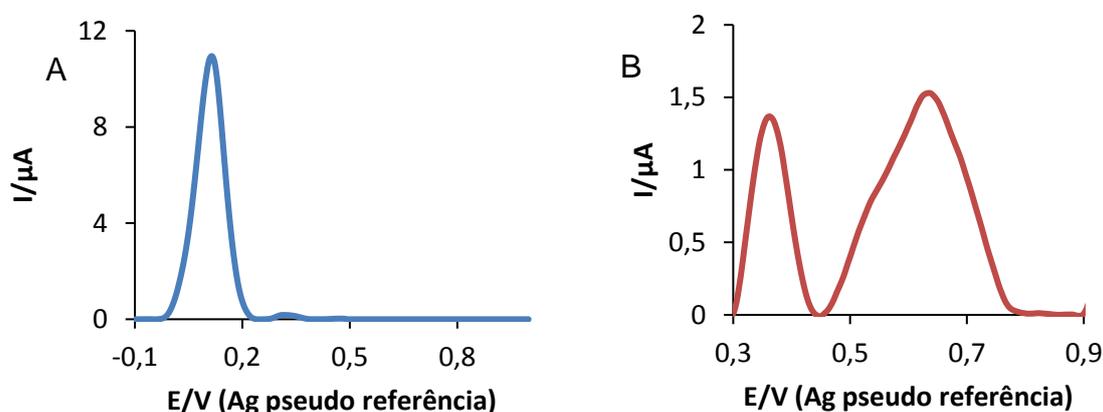


Figura 5.2– Voltamogramas obtidos com CNT@SPCE numa amostra de vinho tinto diluída no eletrólito suporte por DPV nas mesmas condições experimentais da figura 5.1. A) Amostra diluída 1:200; adsorção de 90 s ao potencial de 0 V. B) Amostra diluída 1:50; adsorção de 550 s ao potencial de 0 V.

Os voltamogramas obtidos com o sensor CNT@SPCE nas soluções de amostra de vinho tinto apresentam um pico mais intenso a um potencial próximo de 0,1 V que é atribuído aos polifenóis com grupos OH em posição *orto* e *para*. Os dois picos de menor intensidade aos potenciais 0,4 e 0,6 V estão associados aos CF

com um único grupo OH ou grupos OH na posição *meta*. Os dois picos menos intensos são dificilmente visualizados quando os ensaios são realizados na solução diluída 1:200 e tempo de adsorção de 90 s (figura 5.2A). Assim, a quantificação relativa aos CF cuja resposta ocorre na gama de potenciais superiores a 0,3 V foi efetuada a partir de medições realizadas em soluções diluídas 1:50 e tempos de adsorção de 550 s (figura 5.2B). Relativamente ao primeiro pico utilizou-se o AG como padrão, uma vez que a sensibilidade com que este é detetado é comparável à sensibilidade da deteção dos polifenóis com grupos OH em posições *orto* e *para* (tabela 4.1). Por interpolação do valor de I_{p1} na curva de calibração do AG (figura 5.3) obteve-se um valor de 1,17 mM eq AG para a concentração total de polifenóis com maior atividade antioxidante.

Para a quantificação dos restantes CF foi utilizado como padrão o ACUM que apresenta uma sensibilidade de deteção da mesma ordem de grandeza dos compostos com um único OH ou com grupos OH em posição *meta* (tabela 4.2). Esta quantificação foi efetuada a partir da comparação do valor de $I_{p2} + I_{p3}$ com o medido a partir de uma solução padrão 2,50 μ M (anexo 5) de ACUM, tendo-se estimado 0,47 mM eq de ACUM. Na tabela 5.1 apresenta-se a concentração de compostos fenólicos total (CFT) calculada a partir da soma dos CF com $E_p < 0,3$ V e com $E_p > 0,3$ V.

A estimativa da razão entre as concentrações dos CF que se oxidam a potenciais inferiores a 0,3 V e os que se oxidam a potenciais superiores a 0,3 V é de 5:2.

Tabela 5.1- Concentrações parciais e total de CF obtidos com CNT@SPCE e SPCE. Concentração relativa dos CF facilmente oxidáveis ($E_p < 0,3$ V) face aos restantes CF.

	$[CF]_{E_p < 0,3 \text{ V}}$ (mM)	$[CF]_{E_p > 0,3 \text{ V}}$ v(mM)	$\frac{[CF]_{E_p < 0,3 \text{ V}}}{[CF]_{E_p > 0,3 \text{ V}}}$	[CFT] (mM)
CNT@SPCE	1,17	0,47	2,50	1,59
SPCE	0,87	1,04	0,80	1,96
Desvio (%)	-26	121	-68	23

A discrepância observada entre os valores obtidos com SPCE relativamente aos do CNT@SPCE, tanto em termos da concentração dos CF com $E_p > 0,3$ V e total de CF, como da abundância relativa dos dois grupos de compostos, deverá

estar associada à menor seletividade do SPCE e à possível interferência do SO₂. Esta espécie que é oxidada no SPCE a potenciais superiores a 0,3 V, é correntemente adicionada aos vinhos de modo a aumentar a sua estabilidade. Em oposição, esta espécie não constitui um interferente quando é utilizado o CNT@SPCE, como é demonstrado na secção 5.2.

5.2 Parâmetros de desempenho do sensor CNT@SPCE

Os parâmetros de desempenho do sensor CNT@SPCE foram estimados com o objetivo de caracterizar o método desenvolvido e avaliar a qualidade dos resultados obtidos em soluções de um CF modelo, AG, e em uma amostra natural, nomeadamente vinho tinto. A partir da curva de calibração, figura 5.3, obtida com o sensor CNT@SPCE por DPV, foi realizada a caracterização da gama de trabalho, linearidade, sensibilidade e limite de quantificação. A incerteza de medição foi estimada a partir da combinação das incertezas associadas à precisão e à justeza. A precisão foi quantificada a partir de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia. A justeza foi calculada com base em ensaios de recuperação. No estudo da seletividade foram considerados o ácido ascórbico, o dióxido de enxofre e o etanol que são interferentes relevantes para os vinhos.

5.2.1 Gama de trabalho, linearidade, sensibilidade e limite de quantificação

A partir de soluções com diferentes concentrações de AG foram traçados voltamogramas de DPV nas mesmas condições experimentais em que foi caracterizada a amostra de vinho para a quantificação dos CF com $E_p < 0,3$ V (figura 5.2A). Por representação I_p em função da concentração foi traçada uma curva de calibração, apresentada na figura 5.3. No anexo 6 encontram-se os dados utilizados para fazer o traçado desta curva de calibração.

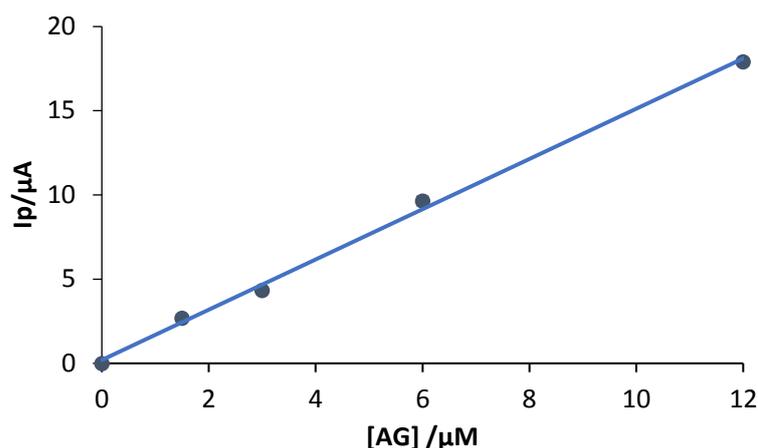


Figura 5.3- Curva de calibração da intensidade de corrente de pico do AG obtida por DPV com o sensor CNT@SPCE.

A tabela 5.2 apresenta os parâmetros da curva de calibração da figura 5.3. As incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem foram determinadas multiplicando os desvios padrões obtidos pelo parâmetro *t* de *Student* ($N=3, P=95\%$). No anexo 7 estão apresentados os desvios padrões e no anexo 8 encontra-se as equações utilizadas.

Tabela 5.2- Parâmetros da curva de calibração do AG, obtida por DPV com o sensor CNT@SPCE.

Declive (A/M)	Ordenada na origem (μA)	$S_{y/x}$ (μA)	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)
$1,49 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,83$	0,40	0,999

A qualidade dos resultados obtidos, avaliada tanto por inspeção visual da reta de calibração como pelos valores reportados na tabela 5.2, é elevada, uma vez que a ordenada na origem engloba o ponto (0, 0) e o declive apresenta um erro relativo baixo (8 %).

Verifica-se que a gama de trabalho é linear no intervalo de concentração de 1,5 – 12,0 μM . Esta conclusão resulta da aplicação do teste de homogeneidade das variâncias para 95 % ($PG=10,3 < F_{\text{tabelado}}=15,44$) e do valor do coeficiente de correlação, que é superior ao valor recomendado de 0,995 [81]. No anexo 9 encontram-se apresentados os dados utilizados para validar a gama de trabalho utilizada.

A partir da curva de calibração define-se a sensibilidade obtida com o sensor CNT@SPCE, relativamente ao AG, como $1,49 \pm 0,13$ A/M.

O erro relativo e o coeficiente de variação obtido para o padrão de AG mais diluído usado para a definição da curva de calibração (9 % e 2 %) são baixos (< 10 %), permitindo definir como limite de quantificação $1,50 \mu\text{M}$.

5.2.2 Incerteza de medição

A incerteza de medição foi estimada a partir dos resultados obtidos no estudo da precisão e justeza do método. Assim, fez-se a determinação das incertezas associadas à precisão intralaboratorial e à justeza [82]. No anexo 10 estão apresentadas as expressões utilizadas.

5.2.2.1 Precisão

A precisão foi caracterizada em condições de repetibilidade (diferentes soluções analisadas no mesmo dia) e em condições de precisão intermédia (sensores e soluções diferentes). A figura 5.4 mostra os resultados obtidos para dois sensores CNT@SPCE diferentes, preparados no mesmo dia. No anexo 11 estão apresentados dados obtidos neste estudo.

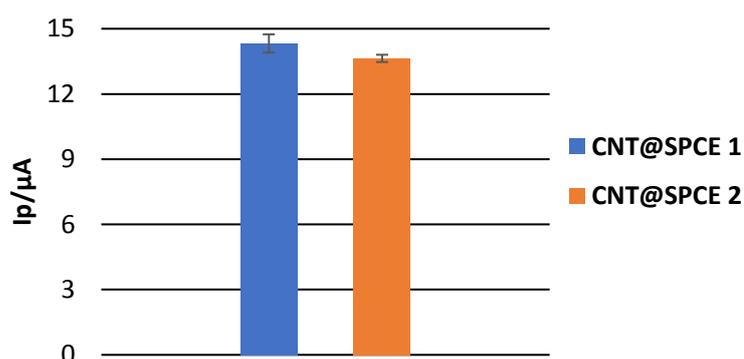


Figura 5.4– Intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de DPV obtidos com dois sensores CNT@SPCE na solução do eletrólito suporte, após a etapa de adsorção numa solução de amostra de vinho tinto (diluída 1:200).

O desvio padrão da repetibilidade e da precisão intermédia, determinados com a ferramenta estatística ANOVA, são de $0,43$ e $0,47 \mu\text{A}$, respetivamente. A partir destes resultados determinaram-se os coeficientes de repetibilidade e precisão

intermédia (ambos de 5 %). Os limites de repetibilidade e precisão intermédia, (calculados a partir do produto de cada um dos desvios padrões por 2,8) são de 1,8 e 2,0 μA , respetivamente. Em termos de concentração o limite de repetibilidade é de 1,2 μM e o limite de precisão intermédia é de 1,3 μM .

Com base nos valores da repetibilidade e da precisão intermédia pode-se concluir que não há variações significativas quando se utilizam sensores diferentes, modificados com a mesma suspensão de CNT no mesmo dia.

Foi obtido um valor de 4 % para a incerteza associada à precisão intralaboratorial, determinada a partir do estudo da precisão com resultados de dois sensores numa amostra de vinho tinto e CNT@SPCE (tabela A7 do anexo 9).

5.2.2.2 Justeza

A justeza foi avaliada através da realização de ensaios de recuperação. Para tal utilizou-se uma amostra de vinho tinto diluída e fortificou-se essa amostra de vinho com uma solução padrão de AG. Na tabela 5.3 estão apresentados os resultados obtidos nos dois ensaios de recuperação.

Tabela 5.3– Intensidade de pico dos voltamogramas de DPV obtidos em soluções de AG (fortificação), amostra de vinho tinto (diluída 1:200 na solução de eletrólito suporte) e amostra de vinho tinto fortificada (diluída 1:200 na solução de eletrólito suporte e fortificada em AG 3,0 μM) com CNT@SPCE, após a etapa de adsorção realizada durante 90 s ao potencial constante de 0 V.

Ip / μA	Ensaio 1	Ensaio 2
Amostra	11,07	10,93
Amostra fortificada	13,76	12,86
Fortificação	2,47	2,47
Taxa de recuperação (%)	98	104

A taxa de recuperação média obtida com a amostra de vinho tinto é 101 ± 4 % e a incerteza associada à justeza é 4 %. Estes valores indicam que os resultados obtidos com o sensor CNT@SPCE são justos [83].

5.2.2.3 Incertezas combinada e expandida

Com base nos resultados obtidos no estudo da precisão e justeza, conclui-se que a incerteza combinada é de 6 % e a incerteza expandida da medição (utilizando um fator de expansão 2) é de 11 %. Este valor mostra que as medições efetuadas podem ser consideradas de elevado grau de confiança.

5.2.3 Seletividade

Os potenciais interferentes da determinação de CF em amostras de vinho são o etanol, ácido ascórbico e dióxido de enxofre. Apesar do etanol não ser eletroativo, pode competir com o analito na etapa de adsorção por possuir um grupo OH. O dióxido de enxofre e o ácido ascórbico são adicionados aos vinhos com o objetivo de aumentar a sua estabilidade oxidativa, uma vez que estes compostos, assim como os CF, apresentam atividade antioxidante e conservante.

5.2.3.1 Etanol

A figura 5.5 mostra a I_p dos voltamogramas de DPV obtidos em soluções $7,5 \mu\text{M}$ de AG, na presença de diferentes concentrações de etanol. Na escolha do intervalo de concentração do etanol (de 0 a 3 %) considerou-se o teor de etanol médio dos vinhos (12 %) e diluições da amostra compreendidos entre 1:200 e 1:4.

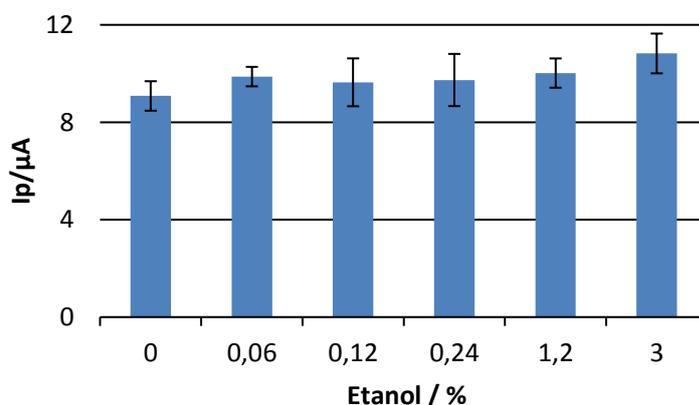


Figura 5.5– Efeito do etanol na intensidade de pico dos voltamogramas de DPV obtidos em soluções de AG de concentração $7,5 \mu\text{M}$, com diferentes percentagens de etanol, com o CNT@SPCE.

Como as diferenças entre as I_p obtidas nas soluções de AG são inferiores ao limite de repetibilidade ($1,8 \mu\text{A}$) pode concluir-se que o sinal deste polifenol não vem afetado pela presença do etanol neste intervalo concentração.

Este resultado pode significar que a molécula de etanol poderá não adsorver nos locais ativos dos CNT ou, caso adsorva, a sua adsorção deverá ser mais fraca do que a dos CF, não diminuindo a extensão com que estes se adsorvem.

5.2.3.2 Ácido ascórbico

A figura 5.6 compara os voltamogramas de DPV registados com o CNT@SPCE diretamente a partir de uma solução $0,80 \text{ mM}$ (este valor de concentração tem em conta a concentração máxima de ácido ascórbico permitida nos vinhos) de ácido ascórbico e na solução do eletrólito suporte, após uma etapa de adsorção na solução $0,80 \text{ mM}$ de ácido ascórbico, seguindo um procedimento idêntico ao utilizado na análise da amostra de vinho. Para efeitos de comparação, está também apresentado o voltamograma obtido com SPCE na mesma solução de ácido ascórbico.

Apesar do ácido ascórbico ser eletroativo e por isso apresentar resposta quando o voltamograma é registado com o sensor diretamente em contacto com a solução, esta espécie não é adsorvida nos CNT. Como o sinal do ácido ascórbico não é observado quando a medição é realizada recorrendo à etapa de adsorção e registando o sinal na solução de eletrólito, pode-se afirmar que esta espécie não constitui um interferente no método de análise de CF com este sensor.

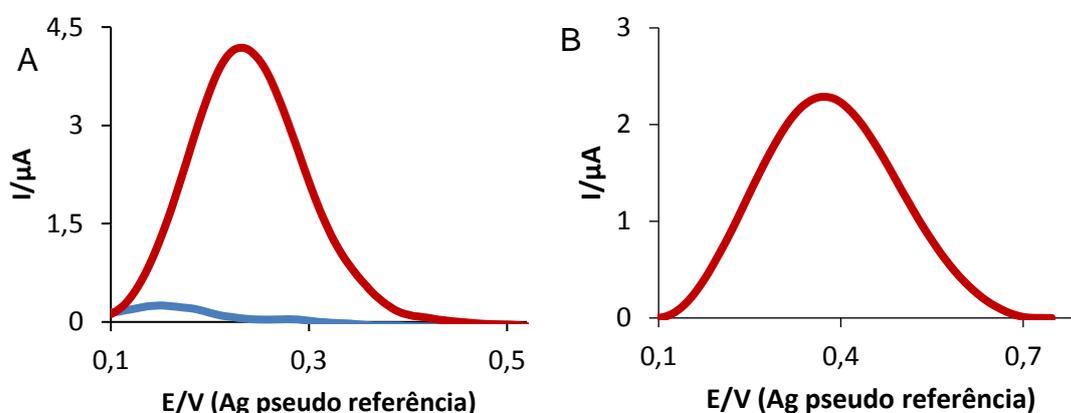


Figura 5.6- Voltamogramas de DPV de uma solução $0,80 \text{ mM}$ de ácido ascórbico obtidos com: A) CNT@SPCE (medição na solução de ácido ascórbico e medição da solução de eletrólito suporte, após etapa de adsorção na solução de ácido ascórbico) e B) SPCE.

5.2.3.3 Dióxido de enxofre

A figura 5.7 ilustra os voltamogramas de DPV obtidos com CNT@SPCE diretamente na solução 0,80 mM de dióxido de enxofre e na solução do eletrólito suporte, após uma etapa de adsorção na solução de dióxido de enxofre 0,80 mM, seguindo um procedimento idêntico ao utilizado na análise da amostra de vinho. O voltamograma de DPV obtido com o SPCE na mesma solução está apresentado na figura 5.7B, para efeitos de comparação.

Com ambos os sensores é possível registrar um sinal relativo à oxidação do SO_2 , apesar das características do sinal, em termos de posição e intensidade, serem bastantes diferentes. De acordo com estes resultados, é previsível que o SO_2 interfira diretamente no sinal registado do SPCE, afetando a quantificação dos polifenóis cujo E_p é superior a 0,3 V.

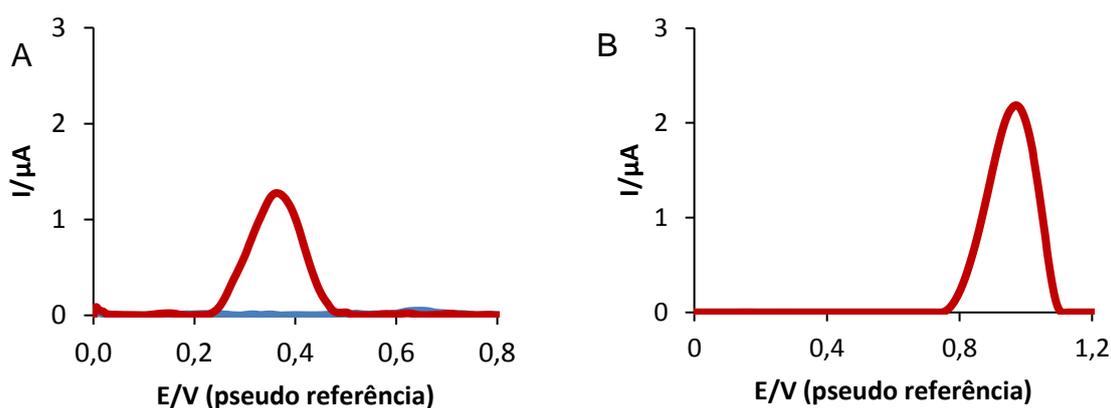


Figura 5.7– Voltamogramas de DPV de uma solução 0,80 mM de SO_2 obtidos com: A) CNT@SPCE (medição na solução de SO_2 e medição da solução de eletrólito suporte, após etapa de adsorção na solução de SO_2) e B) SPCE.

No caso do sensor CNT@SPCE, este sinal é apenas visível quando o voltamograma é registado diretamente na solução de SO_2 . No entanto, quando a medição é realizada através do procedimento semelhante ao utilizado na análise da amostra de vinho, efetuando uma etapa de adsorção previamente ao registo do voltamograma na solução de eletrólito, o sinal desta espécie não é observado. Este resultado mostra que o SO_2 não tem capacidade de se adsorver na superfície do sensor.

Foi analisada a interferência do SO₂ no sinal de uma amostra de vinho (figura 5.8) a partir da variação da I_p dos voltamogramas de DPV obtidos com o sensor CNT@SPCE em soluções de uma amostra de vinho tinto (diluída 1:200), contendo diferentes concentrações de SO₂ (a escolha do intervalo de concentração do SO₂, de 0 a 90 μM, considerou a concentração máxima permitida de SO₂ nos vinhos).

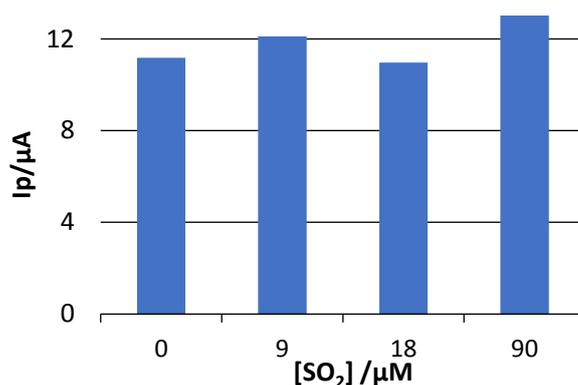


Figura 5.8– Efeito do SO₂ na intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de DPV obtidos em soluções de uma amostra de vinho tinto diluída 1:200 (na solução de eletrólito suporte), com o sensor CNT@SPCE.

As diferenças entre as I_p obtidas nas soluções contendo concentrações variáveis de dióxido de enxofre estão contidas no intervalo determinado para o limite de repetibilidade (1,8 μA).

5.3 Comparação com outros métodos

Os métodos óticos são os mais utilizados para determinar o teor total de CF em amostras naturais, dada a elevada simplicidade e rapidez que os caracterizam. Para efeitos de validação, os resultados do CNT@SPCE foram comparados com os obtidos a partir dos métodos espectroscópico UV/Vis (absorvância a 280 nm) e *Folin-Ciocalteu*.

5.3.1 Método espectroscópico

A determinação de CF em vinhos é muitas vezes realizada recorrendo ao método espectroscópico (UV/Vis), avaliando a absorvância da amostra no comprimento de onda de 280 nm. A seguir são apresentados os resultados obtidos na

caracterização espectroscópica de um conjunto de CF e de uma amostra de vinho tinto.

5.3.1.1 Compostos fenólicos modelo

Todos os CF absorvem radiação na região do espectro do ultra-violeta devido à presença de ligações duplas conjugadas e de oxigênio. Apesar dos diferentes CF apresentarem máximos de absorção em comprimentos de onda distintos, a medição de absorvância a 280 nm está indicada para a quantificação total destes compostos.

Na figura 5.9 apresentam-se os espectros de UV/Vis dos CF utilizados neste estudo.

A partir da figura 5.9 é possível observar que as características dos espectros do conjunto dos CF analisados são muito díspares. Estes compostos podem apresentar um ou dois máximos de absorvância e coeficientes de absorvidade molar muito diferentes no comprimento de onda de 280 nm (variando entre $4,3 \times 10^2$ e $819 \times 10^2 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Verifica-se também que a posição e número de grupos hidroxilos fenólicos influenciam fortemente as propriedades espectroscópicas UV/Vis dos CF.

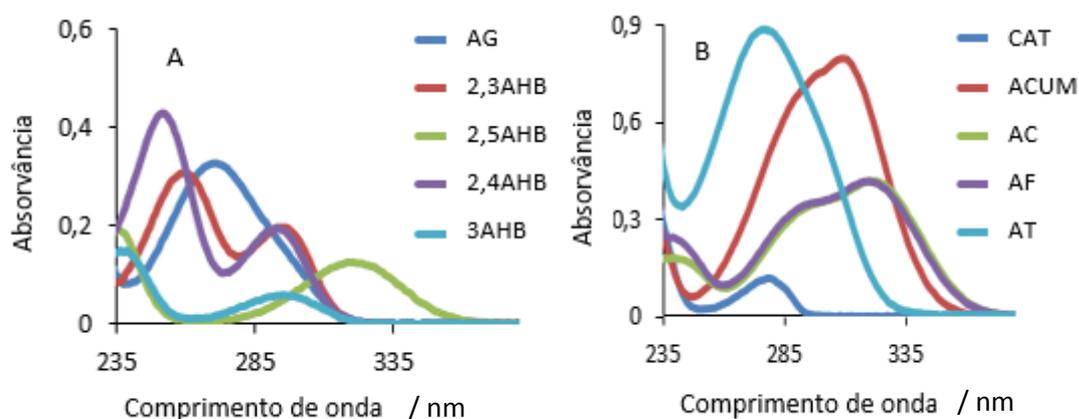


Figura 5.9- Espectros UV/Vis dos vários CF estudados: A) derivados do ácido benzoico e B) três ácidos hidroxicinâmicos, um tanino (AT) e um flavonoide (CAT). A concentração de CF utilizada para traçar o espectro de UV/Vis foi de 30,0 μM , à exceção do AT que foi de 10,0 μM .

As características dos espectros, nomeadamente o comprimento de onda e a absorvidade molar relacionam-se com a estabilidade da espécie no estado excitado relativamente ao seu estado fundamental e com a probabilidade de ocorrência da transição eletrónica. A informação contida no espectro não é relevante no que diz respeito ao seu desempenho em reações de oxidação-

redução. O ACUM, que é oxidado a potencias moderadamente elevados e cuja a extensão com que se oxida é relativamente baixa por não formar a quinona, é um dos compostos que apresenta uma maior absortividade molar a 280 nm. Em contrapartida o AC, 2,5AHB, 2,3AHB e a CAT, que se oxidam extensamente a potenciais baixos (formando quinonas), apresentam baixas absortividades molares a 280 nm.

Na tabela 5.4 apresentam-se os resultados obtidos da análise dos diversos CF selecionados neste estudo. As concentrações das soluções de cada um dos CF foi ajustada de modo a que a absorvância medida fosse inferior a 1. Os valores de sensibilidade foram estimados a partir da razão entre a absorvância (280 nm) e a concentração considerando uma solução padrão para cada um dos CF e 2 soluções no caso do AG. A incerteza associada à sensibilidade de detecção do AG corresponde à razão entre o desvio padrão e o valor do declive da curva de calibração de AG, traçada a partir de duas soluções padrão de AG (anexo 12). Em termos percentuais a incerteza relativa é cerca de 8 %. Este valor pode ser considerado como um valor de referência para a incerteza associada as sensibilidades de detecção dos restantes CF.

Tabela 5.4- Caracterização espectroscópica dos diferentes polifenóis no comprimento de onda de 280 nm,

Polifenol	Concentração (μM)	Absorvância	Sensibilidade ($10^2 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)
ACUM	30,0	0,526	175
3AHB	30,0	0,035	12
2,4AHB	30,0	0,127	42,3
AF	30,0	0,254	84,7
2,5AHB	30,0	0,013	4,3
AT	10,0	0,819	819
CAT	30,0	0,115	38,3
2,3AHB	30,0	0,138	46,0
AC	30,0	0,234	78,0
AG	20,0	0,209	95,2 \pm 8%
	30,0	0,281	

A figura 5.10 apresenta a comparação entre os resultados obtidos com o CNT@SPCE e os obtidos com o método espectroscópico (UV/Vis) relativamente aos vários CF estudados.

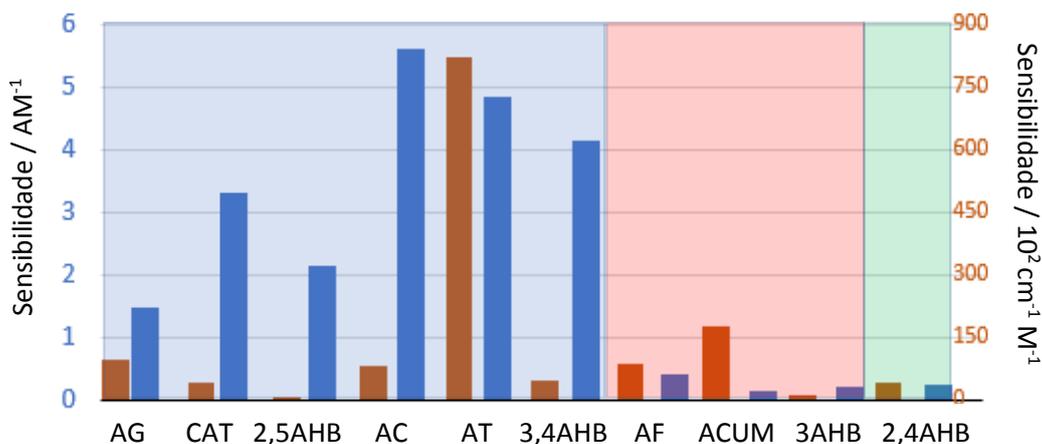


Figura 5.10- Comparação entre as sensibilidades obtidas com o CNT@SPCE e as obtidas com o método espectroscópico relativamente aos vários CF estudados (*orto* e *para*, *monofenóis* e *meta*).

As barras representadas a azul no gráfico da figura 5.10 correspondem às sensibilidades de deteção dos diferentes CF com o sensor CNT@SPCE, enquanto as barras a laranja representam as sensibilidades por espectroscopia de UV/Vis.

A sensibilidade relativa (razão entre a sensibilidade de um CF e a sensibilidade do padrão utilizado como referência) corresponde ao peso com que cada um dos CF numa mistura contribui para o sinal resultante.

Quando se verifica uma grande dispersão entre os valores das sensibilidades dos diferentes componentes da mistura, a concentração total estimada vem afetada de um desvio significativo face à soma algébrica das concentrações e a natureza do padrão utilizado na análise determina significativamente os resultados obtidos.

A sensibilidade da deteção eletroquímica dos compostos com grupos OH em posições *orto* e *para* é comparável. A maior discrepância observada verifica-se entre AG e o AC, cuja sensibilidade é 3,8 vezes superior ao primeiro. O valor médio da sensibilidade é de 3,59 A/M, com um coeficiente de variação de 44 % considerando o universo constituído pelos seis polifenóis analisados (AG, CAT, 2,5AHB, AC, AT, 3,4AHB).

Relativamente ao conjunto de CF com grupos OH em posição *meta* ou com um único grupo OH, verifica-se uma dispersão semelhante em que o AF tem uma sensibilidade 2,6 vezes superior ao ACUM (que é detetado com menor sensibilidade). O valor médio da sensibilidade é de 0,269 A/M, com um coeficiente de variação de 44 % (idêntico ao observado para os polifenóis *orto* e *para*) considerando o universo constituído pelos quatro CF analisados (AF, ACUM, 3AHB e 2,4AHB).

O método espectroscópico (UV/Vis) apresenta uma maior assimetria entre os valores de sensibilidade dos diferentes CF. O valor médio da sensibilidade é de $139 \times 10^2 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, com um coeficiente de variação de 175 % considerando o universo constituído pelos dez CF analisados. Este coeficiente é cerca de 4 vezes superior ao calculado para o CNT@SPCE.

5.3.1.2 Amostra de vinho tinto

A amostra de vinho tinto analisada com o sensor CNT@SPCE (secção 5.1) foi também analisada pelo método espectroscópico (UV/Vis) para comparar os resultados obtidos por estes métodos relativamente a uma amostra natural. A concentração total de CF determinada pelo método espectroscópico UV/Vis foi de 3,80 mM eq AG, enquanto a determinada pelo sensor de polifenóis foi de 1,59 mM CFT. Esta diferença deverá estar relacionada com o facto de os dois métodos apresentarem pesos diferentes para os distintos componentes da amostra. No caso do UV/Vis este efeito é particularmente importante (como foi verificado para o conjunto dos dez CF analisados).

5.3.2 Método de *Folin-Ciocalteu*

Tal como foi referido na introdução, o método mais utilizado para avaliar o teor total de CF, em vinhos e noutros tipos de amostras naturais, é o método de *F-C*. A seguir são apresentados os resultados obtidos na caracterização de um conjunto de CF e de uma amostra de vinho tinto, pelo método de *F-C*.

5.3.2.1 Compostos fenólicos modelo

Na tabela 5.5 estão apresentados os resultados obtidos na análise de um conjunto de CF.

Tabela 5.5– Absorvância, a 765 nm, das soluções de CF pelo ensaio de *Folin-Ciocalteu*. Os valores de sensibilidade foram obtidos a partir de uma solução padrão.

Polifenol	Concentração (μM)	Absorvância	Sensibilidade ($10^2 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)
ACUM	21,0	0,202	96,2
3AHB	43,0	0,316	73,5
2,4AHB	43,0	0,374	87,0
AF	21,0	0,213	101
2,5AHB	43,0	0,496	115
AT	11,0	0,408	370
CAT	43,0	0,801	186
2,3AHB	43,0	0,623	145
AC	21,0	0,296	141
	11,0	0,150	
AG	21,0	0,300	125 \pm %
	43,0	0,538	

As concentrações das soluções de cada um dos CF foi ajustada de forma a que a absorvância medida após a reação com o reagente de *F-C* fosse inferior a 1. Os valores de sensibilidade foram estimados a partir da razão entre a absorvância (765 nm) e a concentração considerando uma solução padrão para cada um dos CF e 3 soluções no caso do AG. A incerteza associada à sensibilidade relativa ao AG corresponde à razão entre o desvio padrão e o declive da curva de calibração de AG, traçada a partir de três soluções padrão de AG (anexo 13). Em termos percentuais a incerteza relativa é cerca de 5 %. Este valor pode ser considerado como um valor de referência para a incerteza associada as sensibilidades dos restantes CF. A figura 5.11 apresenta a comparação entre os resultados obtidos com o CNT@SPCE e os obtidos com o método de *F-C* relativamente aos vários CF estudados. As barras representadas a azul no gráfico da figura 5.11 correspondem às sensibilidades de deteção dos diferentes CF com o sensor CNT@SPCE, enquanto as barras a vermelho representam as sensibilidades de deteção determinadas pelo método de *F-C*.

Relativamente ao método de *Folin-Ciocalteu*, observa-se que o valor médio da sensibilidade é de $143 \times 10^2 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, com um coeficiente de variação de 60 % considerando o universo constituído pelos 10 CF analisados.

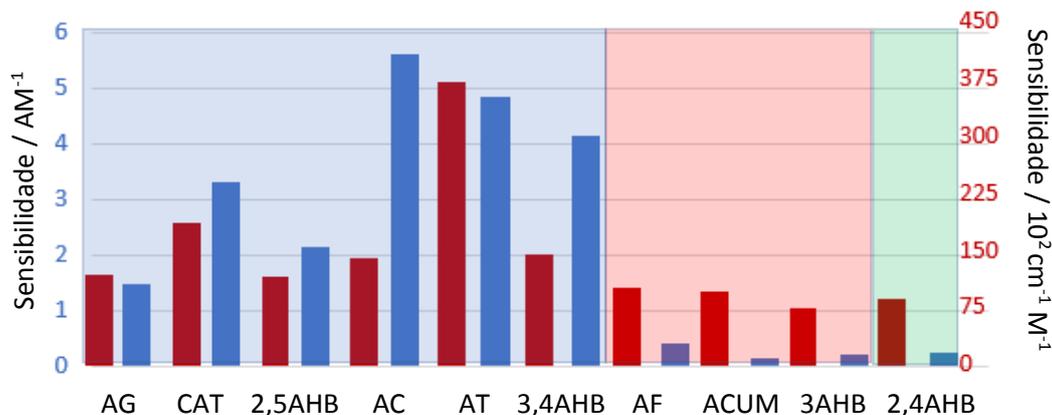


Figura 5.11- Comparação entre as sensibilidades obtidas com o CNT@SPCE e as obtidas com o método de *Folin-Ciocalteu* relativamente aos vários CF estudados (orto e para, monofenóis e meta).

5.3.2.2 Amostra de vinho tinto

Para efeitos de comparação, a amostra de vinho tinto utilizada neste trabalho foi também analisada pelo método de *F-C*, uma vez que este método é muito utilizado na análise do teor total de CF em vinhos. A concentração total de CF determinada pelo método de *F-C* foi de 7,40 mM eq AG, enquanto a determinada pelo sensor CNT@SPCE foi de 1,59 mM CFT. A diferença observada pode ser justificada com os diferentes pesos que os dois métodos atribuem a cada um dos componentes da amostra. Para além deste efeito há ainda que considerar a baixa seletividade do método de *F-C*. A presença de interferentes, tais como açúcares redutores, ácido ascórbico, proteínas e SO_2 podem também justificar esta diferença.

Capítulo 4- Conclusão

6. Considerações finais

A utilização de CNT na determinação eletroquímica de CF revelou-se muito eficiente, uma vez que os elétrodos modificados com este tipo de nanomateriais (CNT@GCE e CNT@SPCE) apresentam, para o CF modelo ácido gálico (AG) sensibilidades que são muito superiores às obtidas quando os elétrodos GCE e SPCE são usados na sua forma original (1,5 e 3,5 A/M para o CNT@GCE, e 0,9 e 1,5 A/M para o CNT@SPCE, em CV e DPV, respetivamente). A caracterização da resposta dos elétrodos modificados com CNT por voltametria de CV e DPV indica que nestes sensores o processo de oxidação do AG é controlado por adsorção.

Apesar do sensor CNT@GCE ter-se relevado o sistema eletroquímico mais sensível, optou-se por otimizar a construção e operação do sensor CNT@SPCE, pois este, por ser um sistema compacto, tem uma utilização mais simplificada, sendo adequado para operadores não especializados. As variáveis experimentais otimizadas foram os parâmetros de adsorção (potencial e tempo), o solvente e a massa da suspensão (utilizada na modificação do SPCE).

Os CNT tratados com a mistura metanol/água apresentaram um grau de funcionalização na ordem dos 5 % (estimativa obtida através da perda de massa por TGA). Por FTIR-ATR não foi possível identificar a natureza dos grupos funcionais introduzidos. Os resultados obtidos indicam que a adsorção dos CF deverá resultar de interações do tipo pontes de hidrogénio. Para além dos grupos hidroxilos fenólicos, os grupos hidroxilos dos ácidos carboxílicos poderão contribuir para a adsorção quando estes se encontram na sua forma protonada. O sensor CNT@SPCE também foi utilizado para caracterizar outros CF, para além do AG. Este sensor apresenta capacidade para detetar os diferentes tipos de CF, nomeadamente polifenóis com grupos OH em posições *orto*, *para*, *meta* e monofenóis. Os polifenóis que formam quinonas através da oxidação eletroquímica (que são os compostos que apresentam grupos OH em posição *orto* e *para*) são detetados com maior sensibilidade. Estas famílias de compostos, que são oxidadas a potenciais relativamente baixos, são as que apresentam maior atividade antioxidante. A sensibilidade deste sensor é cerca de uma ordem de grandeza superior relativamente às restantes classes de compostos. Alargando o tempo de adsorção é possível aumentar a sensibilidade

da deteção. No estudo realizado com o ACUM obteve-se um incremento de 22 vezes na sensibilidade de deteção do ACUM quando se aumentou do tempo de adsorção de 45 para 550 s.

O sensor de polifenóis CNT@SPCE apresenta melhores resultados no que diz respeito à análise de misturas de CF, relativamente ao SPCE não modificado. Em termos qualitativos, o aparecimento de dois picos é sempre indicativo da presença de CF pertencentes a mais do que uma família. Do ponto de vista da análise quantitativa de misturas, verificou-se que o sinal obtido numa mistura de polifenóis apresentou um erro relativo médio inferior a 7 %, enquanto no SPCE este erro apresenta um valor médio de 30 %. Este resultado decorre diretamente de os picos voltamétricos serem mais estreitos e situados em posições mais próximas (no caso dos polifenóis *orto* e *para*) quando se utiliza o sensor de polifenóis. Outro fator que contribui para este resultado relaciona-se com a menor reprodutibilidade do SPCE associada à passivação parcial do eletrodo de trabalho.

Com o objetivo de validar o método desenvolvido e o sensor de polifenóis foi feita a análise de uma amostra de vinho tinto e a comparação com outros métodos usados correntemente na determinação do teor total de CF.

A elevada sensibilidade do sensor CNT@SPCE permite analisar soluções de amostra de vinho tinto muito diluídas (> 50 vezes), minimizando o efeito de matriz. O ácido ascórbico e o dióxido de enxofre, dois interferentes relevantes nos vinhos, não foram detetados com o método desenvolvido. Este resultado diferencia o método desenvolvido relativamente aos restantes métodos eletroquímicos que medem estes interferentes com sensibilidades próximas das obtidas para os CF.

Os resultados obtidos com o sensor CNT@SPCE foram caracterizados a partir dos parâmetros de desempenho do método. Com base na estimativa da precisão intralaboratorial (coeficiente de variação de 5 %) e da justeza avaliada através de ensaios de recuperação (taxa de recuperação média 101 %) foi estimada uma incerteza de medição de 11 %. Estes resultados demonstram a elevada fiabilidade do método.

Os resultados do sensor CNT@SPCE foram comparados com os obtidos através de métodos comuns, como o método espectroscópico UV/Vis e o método de *F-C*, recorrendo ao CF modelo AG e a uma amostra de vinho tinto.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a sensibilidade com que são detetados os vários CF é diferente. A concentração total de CF, estimada com base num sinal que resulta da contribuição de vários compostos, depende das concentrações e das sensibilidades de deteção de cada um dos componentes. Como as sensibilidades são diferentes, a contribuição de cada composto é associada a um fator de ponderação diferente. A diferença entre os vários fatores de ponderação pode originar afastamentos significativos entre a concentração estimada e real. Este efeito é tanto mais significativo quanto maior a dispersão dos valores de sensibilidade.

No universo de dez CF analisados a dispersão obtida foi de 60 % e 175 % para o ensaio de F-C e para o método espectroscópico baseado na medição a 280 nm, respetivamente. O método desenvolvido apresenta um valor de dispersão de 44 %, quer para os compostos com maior atividade antioxidante ($E_p < 0,3V$), quer para os de menor atividade antioxidante ($E_p > 0,3V$). Este efeito, em conjunto com os interferentes, pode estar na origem dos desvios observados entre os resultados obtidos para uma amostra de vinho tinto com o sensor CNT@SPCE (1,59 mM CFT) relativamente ao obtido para o F-C (7,40 mM eq AG) e para o espectroscópico (3,80 mM eq AG).

Capítulo 5- Bibliografía

7. Referências bibliográficas

- [1] R. Clarke and J. Bakker, *Wine flavour chemistry*, 2nd ed. Wiley-Blackwell. 2012.
- [2] www.oiv.int, acessado em maio de 2018.
- [3] H. Johnson, *the story of wine*, 1st ed. Simon & Schuster. 1989.
- [4] www.winefolly.com, acessado em maio de 2018.
- [5] www.drapc.min-agricultura.pt, acessado em maio de 2018.
- [6] O. Pato, *Vinho: sua preparação e conservação*, 10th ed. Clássica editora. 1998.
- [7] www.sograpevinhos.com, acessado em maio de 2018.
- [8] L. Rizzon and M. Zanus, *Como elaborar vinho de qualidade na pequena propriedade*, 3rd ed. Embrapa. 1996.
- [9] www.clubevinhosportugueses.pt, acessado em maio de 2018.
- [10] M. J. Torija, G. Beltran, M. Novo, M. Poblet, J. M. Guillamón, A. Mas, N. Roséz, "Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 85, no. 1–2, pp. 127–136, 2003.
- [11] A. G. Salgueido, *ENOLOGIA PRACTICA Conocimiento y elaboración del vino*, 3rd ed. Mundi-Prensa. 1989.
- [12] A. M. Martínez-Gil, M. del Alamo-Sanza, G. Gutiérrez-Gamboa, Y. Moreno-Simunovic, and I. Nevares, "Volatile composition and sensory characteristics of Carménère wines macerating with Colombian (*Quercus humboldtii*) oak chips compared to wines macerated with American (*Q. alba*) and European (*Q. petraea*) oak chips," *Food Chem.*, vol. 266, pp. 90–100, 2018.
- [13] B. Fernández De Simón, E. Cadahía, T. Hernández, and I. Estrella, "Evolution of oak-related volatile compounds in a Spanish red wine during 2 years bottled, after aging in barrels made of Spanish, French and American oak wood," *Anal. Chim. Acta*, vol. 563, no. 1–2 SPEC. ISS., pp. 198–203, 2006.
- [14] M. Gay, C. Apetrei, I. Navares, M. Del Almo, J. Zurro, N. Prieto, J. Saja, M. Rodríguez-Méndez, "Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine," *Electrochim. Acta*, vol. 55, no. 22, pp. 6782–6788, 2010.
- [15] V. Cheynier, P. Sarni-Manchado, and S. Quideau, *Recent Advances in Polyphenol*

- Research*, 1st ed. Wiley-Blackwell. 2012.
- [16] M. J. Cabrita, J. Ricardo-da-Silva, and O. Laureano, "Os Compostos Polifenólicos Das Uvas E Dos Vinhos," *I Semin. Int. Vitivinic.*, pp. 61–102, 1999.
- [17] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, and L. Jimenez, "Polyphenols - Food Sources and Bioavailability," *Am J Clin Nutr*, vol. 79, no. 5, pp. 727–47, 2004.
- [18] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
- [19] J. G. Ribéreau, É. Peynaud, and P. G. Ribéreau, *Traite d'oenologie: transformations et traitements des vins*, 1st ed. 1972.
- [20] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, and D. Dubourdieu, *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second Edition*, vol. 2. Wiley-Blackwell. 2006.
- [21] B. Zoecklein, K. Fugelsang, B. Gump, and F. Nury, *Wine analysis and production*, 1st ed. Springer Publishing. 1999.
- [22] J. Valls, S. Millán, M. P. Martí, E. Borràs, and L. Arola, "Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 43, pp. 7143–7172, 2009.
- [23] J. Pérez-Jiménez, S. Arranz, M. Taberner, M. E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Goñi, F. Saura-Claixto, "Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results," *Food Res. Int.*, vol. 41, no. 3, pp. 274–285, 2008.
- [24] A. Ramakrishna and G. A. Ravishankar, "Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants," *Plant Signal. Behav.*, vol. 6, no. 11, pp. 1720–1731, 2011.
- [25] E. Haslam, "In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines," *Phytochemistry*, vol. 19, no. 12, pp. 2577–2582, 1980.
- [26] C. Dallas, J. M. Ricardo-Da-Silva, and O. Laureano, "Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. ," *Vitis*, vol. 34, no. 1, pp. 51–56, 1995.
- [27] S. Baoshan, I. Spranger, J. Yang, C. Leandro, L. Guo, S. Canário, Y. Zhao, W. Chunfo, "Red wine phenolic complexes and their in vitro antioxidant activity," *J.*

- Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 18, pp. 8623–8627, 2009.
- [28] A. Faria, D. Pestana, D. Teixeira, V. De Freitas, N. Mateus, and C. Calhau, “Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: Anticancer properties in breast cancer cell lines,” *Phyther. Res.*, vol. 24, no. 12, pp. 1862–1869, 2010.
- [29] A. Castañeda-Ovando, M. de L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez, and C. A. Galán-Vidal, “Chemical studies of anthocyanins: A review,” *Food Chem.*, vol. 113, no. 4, pp. 859–871, 2009.
- [30] G. Mazza and R. Brouillard, “Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products,” *Food Chem.*, vol. 25, no. 3, 1987.
- [31] J. M. Guilford and J. M. Pezzuto, “Wine and health: A review,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 62, no. 4, pp. 471–486, 2011.
- [32] I. Kekelidze, N. Ebelashvili, M. Japaridze, B. Chankvetadze, and L. Chankvetadze, “Phenolic antioxidants in red dessert wine produced with innovative technology,” *Ann. Agrar. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 34–38, 2018.
- [33] I. Ignat, I. Volf, and V. Popa, “A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables,” *Food Chem.*, vol. 126, no. 4, pp. 1821–1835, 2011.
- [34] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, “Techniques for analysis of plant phenolic compounds,” *Molecules*, vol. 18, no. 2, pp. 2328–2375, 2013.
- [35] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, 2005.
- [36] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent,” *Methods Enzymol.*, vol. 299, no. 1974, pp. 152–178, 1998.
- [37] J. D. Everette, Q. M. Bryant, A. M. Green, Y. A. Abbey, G. W. Wangila, and R. B. Walker, “Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 14, pp. 8139–8144, 2010.
- [38] A. J. Blasco, M. C. Rogerio, M. C. González, and A. Escarpa, “‘Electrochemical index’ as a screening method to determine ‘total polyphenolics’ in foods: A proposal,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 539, no. 1–2, pp. 237–244, 2005.
- [39] A. Escarpa and M. . González, “Approach to the content of total extractable

- phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods," *Anal. Chim. Acta*, vol. 427, no. 1, pp. 119–127, 2001.
- [40] A. L. Waterhouse, "Determination of Total Phenolics," in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003, p. 1.1.1.-1.1.8.
- [41] M. D. L. De Castro, J. González-RODRÍGUEZ, and P. Pérez-Juan, *Analytical methods in wineries: Is it time to change?*, vol. 21, no. 2. 2005.
- [42] D. W. Barnum, "Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols," *Anal. Chim. Acta*, vol. 89, no. 1, pp. 157–166, 1977.
- [43] A. Pełkal and K. Pyrzynska, "Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay," *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, pp. 1776–1782, 2014.
- [44] R. E. Wrolstad, R. W. Durst, and J. Lee, "Tracking color and pigment changes in anthocyanin products," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 16, no. 9, pp. 423–428, 2005.
- [45] E. C. Bate-Smith, "Phytochemistry of proanthocyanidins," *Phytochemistry*, vol. 14, no. 4, pp. 1107–1113, 1975.
- [46] D. O. Adams, J. F. Harbertson, and E. a Picciotto, "Fractionation of red wine polymeric pigments by protein precipitation and bisulfite bleaching.," *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, vol. 225, pp. U71–U71, 2003.
- [47] C. J. Sarneckis, R. G. Damberg, P. Jones, M. Mercurio, M. J. Herderich, and P. A. Smith, "Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 39–49, 2006.
- [48] A. N. Schofield, P., Mbugua, D. M., A. N. Pell, "Analysis of condensed tannins: a review. Animal Feed Science and Technology, 91(1), 21-40.," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 91, pp. 21–40, 2001.
- [49] A. Sánchez Arribas, M. Martínez-Fernández, M. Moreno, E. Bermejo, A. Zapardiel, and M. Chicharro, "Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified

- electrodes," *Food Chem.*, vol. 136, no. 3–4, pp. 1183–1192, 2013.
- [50] R. R. Watson, *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*, 1st ed. 2014.
- [51] J. Hoyos-Arbeláez, M. Vázquez, and J. Contreras-Calderón, "Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1371–1381, 2017.
- [52] P. a Kilmartin, H. Zou, and A. L. Waterhouse, "A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 1957–1965, 2001.
- [53] O. Makhotkina and P. A. Kilmartin, "Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 633, no. 1, pp. 165–174, 2009.
- [54] A. S. Arribas, M. Martínez-Fernández, and M. Chicharro, "The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 34, pp. 78–95, 2012.
- [55] M. Abou Samra, V. S. Chedea, A. Economou, A. Calokerinos, and P. Kefalas, "Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry," *Food Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 622–629, 2011.
- [56] A. Dhroso, S. Laschi, G. Marrazza, and M. Mascini, "A fast electrochemical technique for characterization of phenolic content in wine," *Anal. Lett.*, vol. 43, no. 7, pp. 1190–1198, 2010.
- [57] C. I. S. Fernandes and M. J. F. Rebelo, "Polyphenolic Biosensors. Application in Red Wines," *Port. Electrochim. Acta*, vol. 27, no. 4, pp. 457–462, 2009.
- [58] M. Rita Montereali, W. Vastarella, L. Della Seta, and R. Pilloton, "Tyrosinase biosensor based on modified screen printed electrodes: Measurements of total phenol content," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 85, no. 9–11, pp. 795–806, 2005.
- [59] M. R. Montereali, L. Della Seta, W. Vastarella, and R. Pilloton, "A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic

- compounds in must and wine," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 64, no. 3–4, pp. 189–194, 2010.
- [60] K. L. Kim, J. C. Lee, K. Robards, and S. H. Choi, "Immobilization of tyrosinase in carboxylic and carbonyl group-modified MWNT electrode and its application for sensing phenolics in red wines," *Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 10, pp. 3790–3798, 2010.
- [61] S. I. Imabayashi, Y. T. Kong, and M. Watanabe, "Amperometric biosensor for polyphenol based on horseradish peroxidase immobilized on gold electrodes," *Electroanalysis*, vol. 13, no. 5, pp. 408–412, 2001.
- [62] A. M. Granero, H. Fernández, E. Agostini, and M. A. Zón, "An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples," *Talanta*, vol. 83, no. 1, pp. 249–255, 2010.
- [63] L. P. Souza, F. Calegari, A. J. G. Zarbin, L. H. Marcolino-Júnior, and M. F. Bergamini, "Voltammetric Determination of the Antioxidant Capacity in Wine Samples Using a Carbon Nanotube Modified Electrode," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 14, pp. 7620–7625, 2011.
- [64] F. Gao, D. Zheng, H. Tanaka, F. Zhan, X. Yuan, F. Gao, Q. Wang, "An electrochemical sensor for gallic acid based on Fe₂O₃/electro-reduced graphene oxide composite: Estimation for the antioxidant capacity index of wines," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 279–287, 2015.
- [65] P. A. Kilmartin, "Electrochemistry applied to the analysis of wine: A mini-review," *Electrochem. commun.*, vol. 67, pp. 39–42, 2016.
- [66] L. Pigani, G. Foca, K. Ionescu, V. Martina, A. Ulrici, F. Terzi, M. Vignali, C. Zanardi, R. Seeber, "Amperometric sensors based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes: Discrimination of white wines," *Anal. Chim. Acta*, vol. 614, no. 2, pp. 213–222, 2008.
- [67] L. Pigani, G. Foca, K. Ionescu, V. Martina, A. Ulrici, F. Terzi, M. Vignali, C. Zanardi, R. Seeber, "Classification of red wines by chemometric analysis of voltammetric signals from PEDOT-modified electrodes," *Anal. Chim. Acta*, vol. 643, no. 1–2, pp. 67–73, 2009.
- [68] Z. Liu, J. Xu, R. Yue, T. Yang, and L. Gao, "Facile one-pot synthesis of Au-

- PEDOT/rGO nanocomposite for highly sensitive detection of caffeic acid in red wine sample," *Electrochim. Acta*, vol. 196, pp. 1–12, 2016.
- [69] P. Monk, *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*, 1st ed. John Wiley and Sons. 2001.
- [70] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed. John Wiley and Sons. 2001.
- [71] M. J. Rebelo, R. Rego, M. Ferreira, and M. C. Oliveira, "Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods," *Food Chem.*, vol. 141, no. 1, pp. 566–573, 2013.
- [72] D. Skoog, J. Holler, and T. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed. Brooks Cole. 1997.
- [73] L. M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. F. C. Lima, "Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties," *Anal. Chim. Acta*, vol. 613, no. 1, pp. 1–19, 2008.
- [74] M. E. Brown, *Introduction to Thermal Analysis, Techniques and Applications*, 2nd ed. Springer Publishing. 2001.
- [75] R. Gusmão, V. López-Puente, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, M. F. Proença, F. Bento, D. Geraldo, M. C. Paiva, E. González-Romero, "Enhanced electrochemical sensing of polyphenols by an oxygen-mediated surface," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 7, pp. 5024–5031, 2015.
- [76] R. Gusmão, M. Melle-Franco, D. Geraldo, F. Bento, M. C. Paiva, and F. Proença, "Probing the surface of oxidized carbon nanotubes by selective interaction with target molecules," *Electrochem. commun.*, vol. 57, pp. 22–26, 2015.
- [77] R. Gusmão, E. Cunha, C. Paiva, D. Geraldo, F. Proença, and F. Bento, "Role of Carbonaceous Fragments on the Functionalization and Electrochemistry of Carbon Materials," *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 12, pp. 2138–2145, 2016.
- [78] H. S. Mansur, M. M. Pereira, H. S. Costa, and A. A. P. Mansur, "Mechanical behavior of nanostructured hybrids based on poly(vinyl alcohol)/bioactive glass reinforced with functionalized carbon nanotubes," *J. Nanomater.*, vol. 2012, 2012.
- [79] B. Badhani, N. Sharma, and R. Kakkar, "Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 35, pp. 27540–27557, 2015.

- [80] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 933–956, 1996.
- [81] Guia Relacre 13, Validação de métodos internos de ensaio em análise química, 2000.
- [82] "INTERNATIONAL STANDARD measurement uncertainty based on," vol. 2012, 2012.
- [83] M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch, "Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question," *J. Chromatogr. A*, vol. 1232, pp. 101–109, 2012.

Anexos

Anexo 1

Preparação de soluções

A preparação das soluções padrão de CF utilizadas neste trabalho, foi efetuada por pesagem dos sólidos. A tabela A1 apresenta os dados utilizados na preparação destas soluções. A incerteza de cada concentração apresentada foi determinada pela abordagem passo a passo.

Tabela A1- Massas dos compostos fenólicos e volumes dos balões volumétricos usados na preparação das soluções padrão de compostos fenólicos.

Composto fenólico	Massa (g)	Volume (mL)	Concentração (mM)
AG	0,0126	25,00	2,963 ± 0,024
ACUM	0,0123	25,00	2,999 ± 0,026
AF	0,0148	50,00	1,524 ± 0,011
AC	0,0135	50,00	1,499 ± 0,012
3,4AHB	0,0119	25,00	3,089 ± 0,027
2,5AHB	0,0121	25,00	3,140 ± 0,027
2,4AHB	0,0120	25,00	3,114 ± 0,027
3AHB	0,0103	25,00	2,983 ± 0,030
HQ	0,0167	50,00	3,034 ± 0,019
CAT	0,0217	25,00	2,990 ± 0,016
AT	0,1275	25,00	2,9979 ± 0,0083

Solução de ácido tartárico 32,0 mM pH 3,20

A solução de ácido tartárico 32,0 mM com pH 3,20 foi usada como eletrólito suporte nos estudos eletroquímicos. Para a sua preparação diluiu-se cerca de 4,952 g de ácido tartárico em 1 L de água ultrapura (balão volumétrico). O pH desta solução foi ajustado com uma solução de NaOH 1,0 M (2,00 g de NaOH em 50 mL de água ultrapura).

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

Pesou-se cerca de 10,30 g de fosfato de potássio dibásico e 10,72 g de fosfato de potássio monobásico e diluiu-se em 1 L de água ultra-pura (balão volumétrico). Posteriormente o pH desta solução foi ajustado com a solução de NaOH 1,0 M.

Solução de ácido ascórbico 0,90 mM

Diluiu-se 0,0156 g de ácido ascórbico em 100 mL de solução de ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20 (balão volumétrico).

Solução de metabissulfito de sódio 0,80 mM

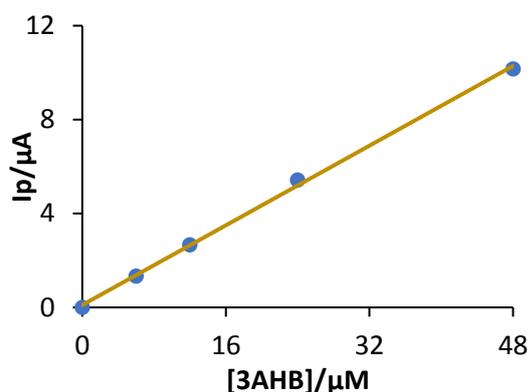
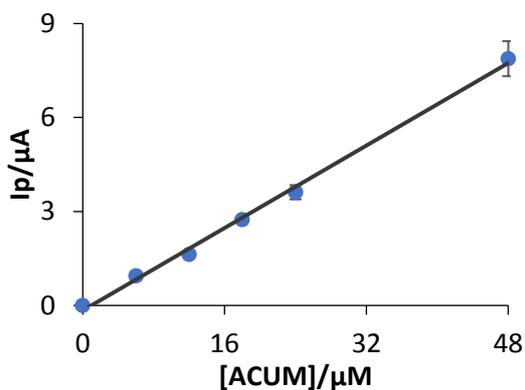
Uma massa de 0,077 g de metabissulfito de sódio foi diluída em 500 mL de solução de ácido tartárico 32,0 mM, pH 3,20 (balão volumétrico).

Solução de carbonato de sódio 7 % (w/v)

Diluiu-se cerca de 7,00 g de carbonato de sódio e em 100 mL de água ultrapura (balão volumétrico).

Anexo 2

Curvas de calibração dos compostos fenólicos determinadas por DPV com CNT@SPCE



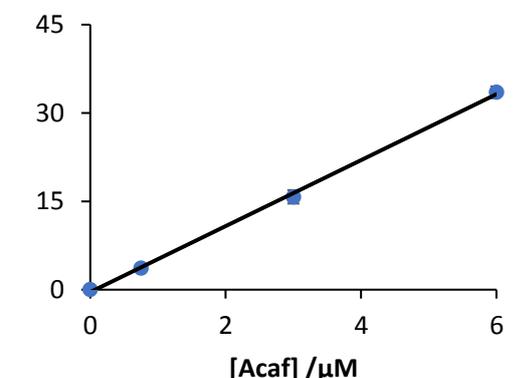
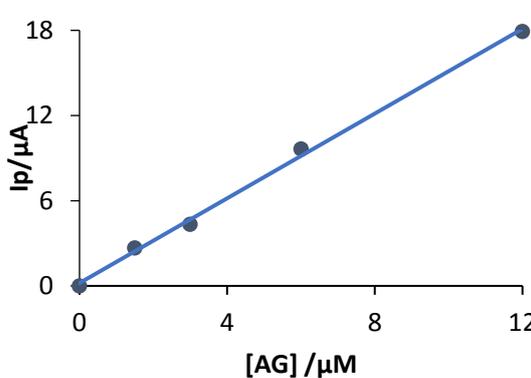
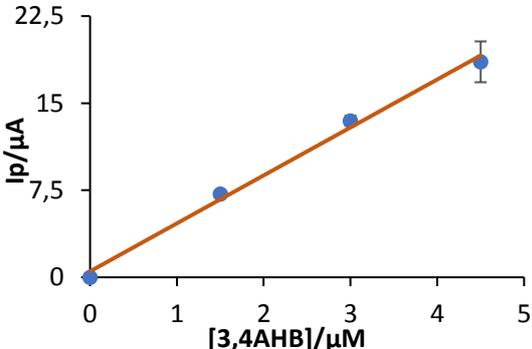
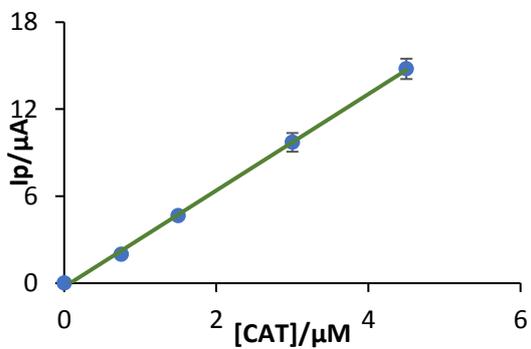
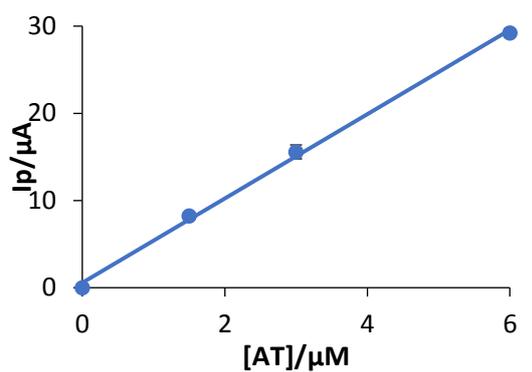
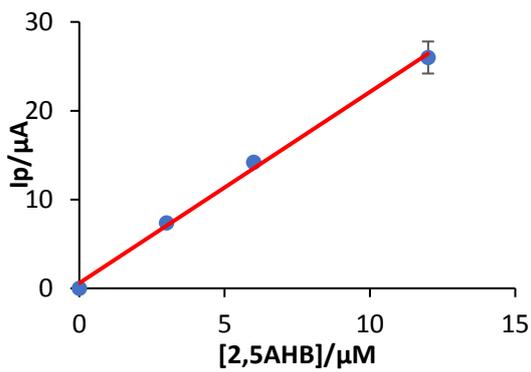
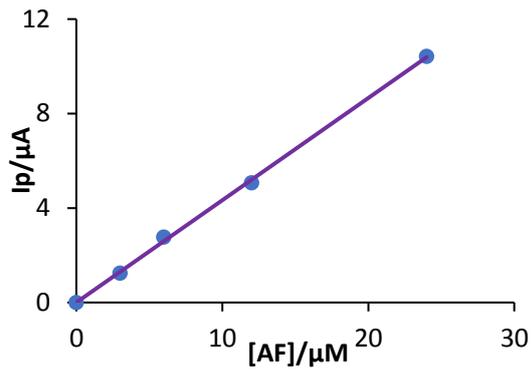
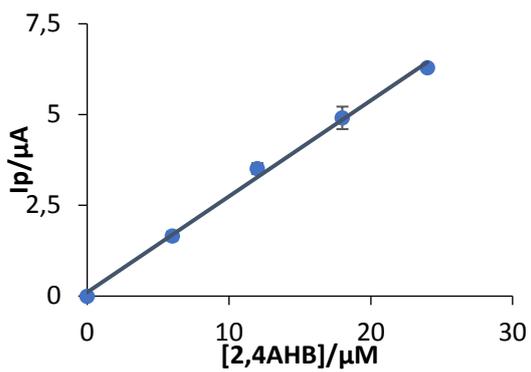


Figura A1- Curvas de calibração dos compostos fenólicos determinadas por DPV com CNT@SPCE.

Tabela A2- Parâmetros das retas de calibração apresentadas na figura A1.

Polifenol	Declive (A/M)	Ordenada na origem (μA)	r	LQ (μM)	Gama de trabalho (μM)
ACUM	0,165 \pm 0,012	-0,16 \pm 0,29	0,998	6,0	6,0 – 48,0
3AHB	0,212 \pm 0,013	0,10 \pm 0,32	0,9993	6,0	6,0 – 48,0
2,4AHB	0,264 \pm 0,028	0,11 \pm 0,41	0,998	6,0	6,0 – 24,0
AF	0,433 \pm 0,021	0,00 \pm 0,25	0,9997	3,0	3,0 – 24,0
2,5AHB	2,15 \pm 0,36	0,6 \pm 2,5	0,998	3,0	3,0 – 12,0
AT	4,83 \pm 0,39	0,6 \pm 1,2	0,9990	1,5	1,5 – 12,0
CAT	3,330 \pm 0,017	-0,27 \pm 0,37	0,9994	0,75	0,75 – 4,5
3,4AHB	4,13 \pm 0,70	0,5 \pm 2,0	0,997	1,5	1,5 – 4,5
AC	5,60 \pm 0,44	-0,4 \pm 1,5	0,9995	0,75	0,75 – 6,0
AG	1,49 \pm 0,13	0,19 \pm 0,83	0,999	1,5	1,5 – 12,0

Anexo 3

Análise de misturas de compostos fenólicos

Tabela A3.1- Dados obtidos na análise da mistura **A** com SPCE e CNT@SPCE.

	[CF]/ μM SPCE/CNT@SPCE	SPCE (μA)		CNT@SPCE (μA)	
		Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
AG	30,0/3,0	3,6	0,65	2,8	-
AC	15,0/3,0	2,0	-	10	-
CAT	30,0/3,0	4,9	2,1	7,1	-
2,5AHB	30,0/3,0	6,2	-	4,6	-
Mistura A	-	12	1,7	26	-

Tabela A3.2- Dados obtidos na análise da mistura **B** com SPCE e CNT@SPCE.

	[CF]/ μM SPCE/CNT@SPCE	SPCE (μA)		CNT@SPCE (μA)	
		Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
AG	30,0/3,0	3,6	0,65	3,4	-
CAT	30,0/3,0	3,2	2,3	10,0	-
ACUM	60,0/6,0	-	2,2	-	1,1
Mistura B	-	6,5	3,8	15	1,1

Anexo 4

Curva de calibração do AG obtida por DPV com SPCE

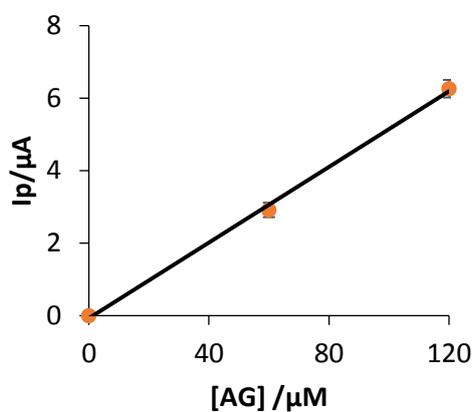


Figura A2- Curva de calibração do AG obtida por DPV com SPCE: $I_p (\mu A) = 0,0456 [AG] (\mu M) - 0,0849$; $r = 0,999$.

Anexo 5

Curva de calibração do ACUM obtida por DPV com CNT@SPCE com adsorção realizada a 0 V durante 550 s

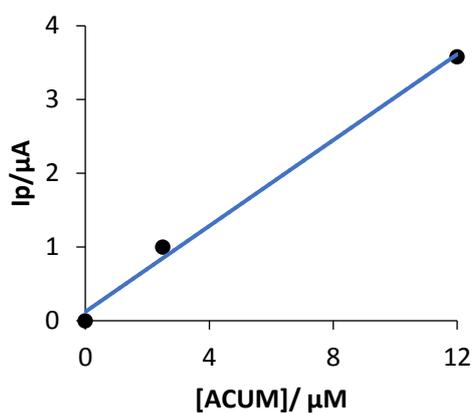


Figura A3- Curva de calibração do ACUM obtida por DPV com CNT@SPCE: $I_p (\mu A) = 0,291 [ACUM] (\mu M) + 0,121$; $r = 0,997$.

Anexo 6

Dados utilizados para traçar a curva de calibração do AG obtida por DPV com CNT@SPCE

Tabela A4- Dados utilizados para fazer o traçado da curva de calibração do AG obtida por DPV com o sensor CNT@SPCE.

[AG] / μM	Ip/ μA		Média / μA	Desvio padrão / μA	% Erro relativo
	Réplica 1	Réplica 2			
1,5	2,629	2,633	2,631	0,003	0
3,0	4,235	4,445	4,34	0,15	3
6,0	9,688	9,621	9,788	0,047	1
12,0	17,91	17,92	17,915	0,007	0

Anexo 7

Desvios padrões dos parâmetros da curva de calibração do AG obtida por DPV com CNT@SPCE

Tabela A5- Desvios padrões dos parâmetros da curva de calibração do AG e incerteza associada considerando o valor de t de *student* 3,18 (N=3; P= 95 %).

	s	ts
Declive / A/M	0,042	0,13
Ordenada na origem / μA	0,26	0,83

Anexo 8

Expressões utilizadas nos cálculos dos desvios padrão dos parâmetros da curva de calibração

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{desvio padrão dos resíduos}) \quad \text{A1}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{desvio padrão do declive}) \quad \text{A2}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{desvio padrão da ordenada na origem}) \quad \text{A3}$$

Anexo 9

Validação da gama de trabalho da curva de calibração do AG obtida por DPV com CNT@SPCE

Tabela A6- Análise da homogeneidade das variâncias do padrão de AG mais diluído e mais concentrado para validar a gama de trabalho.

	Ip/μA					
[AG] / μM	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Média	Desvio padrão
1,5	2,629	2,633	<u>2,720</u>	<u>2,929</u>	2,73	0,14
12,0	17,91	17,92	<u>20,31</u>	<u>20,51</u>	19,2	1,4

O valor de F_{tabelado} para uma distribuição *two tailed* correspondente a 3 graus de liberdade para o numerador e denominador e para 95 % de probabilidade é 15,44.

As réplicas sublinhadas foram obtidas num dia diferente relativamente às réplicas que não estão destacadas. A suspensão de CNT, em água/metanol (1:1 e 1 mg/mL), o sensor CNT@SPCE e a solução stock de AG foram diferentes, com o objetivo de fazer um estudo mais complexo da precisão intermédia. Observou-se que as variações obtidas são inferiores ao limite da precisão intermédia obtido (2,0 μM), indicando que este método é muito preciso.

Anexo 10

Expressões utilizadas nos cálculos da incerteza de medição do método

Incerteza da precisão intermédia (u_{RW})

$$u_{RW} = S_{RW} \text{ (desvio padrão obtido experimentalmente com a amostra)} \quad A4$$

Incerteza da justeza (u_b)

$$b_{rms} = \sqrt{\frac{\sum bi^2}{n}} \text{ (raiz quadrada média dos desvios dos ensaios de recuperação)} \quad A5$$

$$u_{add} = \sqrt{u_V^2 + u_{conc}^2} \text{ (Incerteza da concentração de analito adicionada)} \quad A6$$

$$u_b = \sqrt{b_{rms}^2 + u_{add}^2} \quad A7$$

Anexo 11

Estudo da precisão

Tabela A7- Dados obtidos no estudo da precisão caracterizada em condições de repetibilidade (mesmo sensor, mas diferentes soluções) e em condições de precisão intermédia (diferentes sensores CNT@SPCE e soluções).

	Ip (μA) / [PF] (mM eq AG)		
CNT@SPCE 1	13,45 / 9,014	13,77 / 9,228	13,69 / 9,174
CNT@SPCE 2	13,86 / 9,288	14,68 / 9,838	14,43 / 9,670

Anexo 12

Curva de calibração do AG obtida por UV/Vis (280 nm)

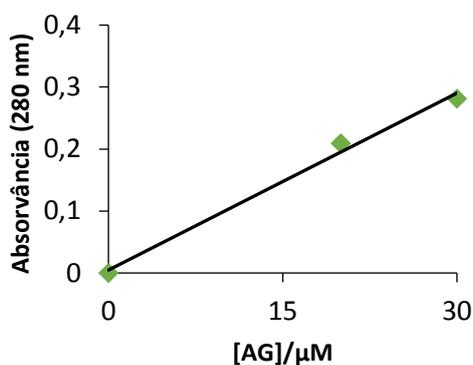


Figura A4- Curva de calibração do AG obtida por UV/Vis: $A_{280} = 0,0095 [AG] (\mu\text{M}) + 0,0046$; $r = 0,996$.

Anexo 13

Curva de calibração do AG obtida pelo método de *Folin-Ciocalteu*

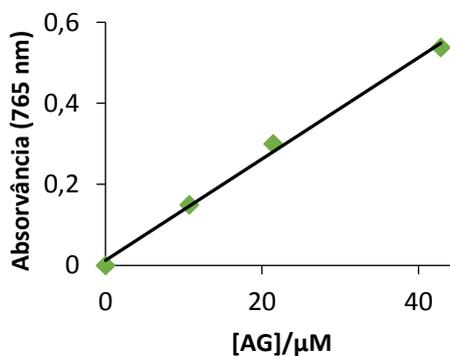


Figura A5- Curva de calibração do AG obtida pelo método de *Folin-Ciocalteu*: $A_{765} = 0,0125 [AG] (\mu\text{M}) + 0,0124$; $r = 0,998$.