

ACELINO CARDOSO DE SÁ

Determinação de açúcares em bagaço e palha de cana-de-açúcar por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica utilizando eletrodos de nanotubos de carbono modificados com óxidos metálicos

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara
2015

DADOS CURRICULARES

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Acelino Cardoso de Sá
Nacionalidade: Brasileira
Nascimento: 23/02/1983 – Bebedouro/SP – Brasil
Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara.
Departamento de Química Analítica
Laboratório de Eletroanalítica – NDCOM
Rua Prof. Francisco Degni, 55
Bairro Quitandinha
Araraquara
14800–900, SP – Brasil
Telefone: (16) 3301-9519
Endereço eletrônico: acelino2@hotmail.com

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2011 – 2015 Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
UNESP, Araraquara, Brasil.
Período de doutorado sanduíche durante 6 meses na
Universitat Autònoma de Barcelona - UAB (Orientador: Manuel
Del Valle).
Título: “Determinação de açúcares em bagaço e palha de cana-
de-açúcar por cromatografia líquida de alta eficiência com
detecção eletroquímica utilizando eletrodos de nanotubos de
carbono modificados com óxidos metálicos”.
Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

2007 – 2010 Mestrado em Ciências dos Materiais.
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
UNESP, Ilha Solteira, Brasil.

Titulo: "Potencialidades eletroanalíticas de complexos binucleares de nitroprussiato de metais de transição suportado em 3-aminopropil sílica".

Orientador: Prof. Dr. Devaney Ribeiro do Carmo

2001 - 2005

Graduação (Licenciatura Plena em Química).

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos-UNIFEB, Barretos, Brasil.

Título: "A Percepção pública da química".

Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena Porto Francisco

3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Trabalhos aceitos e publicados

1. SÁ, A. C. de; CIPRI, A.; GONZÁLEZ-CALABUIG, A.; STRADIOTTO, N. R.; VALLE, M. del. Resolution of galactose, glucose, xylose and mannose in sugarcane bagasse employing a voltammetric electronic tongue formed by metals oxyhydroxide/MWCNT modified electrodes. Sensors and Actuators. B, Chemical, v. 222, p. 645-653, 2016.

2. SÁ, A. C. de; PAIM, L. L.; STRADIOTTO, N. R. Sugars Electrooxidation at Glassy Carbon Electrode Decorate with Multi-Walled Carbon Nanotubes with Nickel OxyHydroxide. International Journal of Electrochemical Science (Online), v. 9, p. 7746-7762, 2014.

3. CARMO, D. R.; PAIM, L. L.; SILVESTRINI, D. R.; SÁ, A. C. de; Bicalho, U. O.; STRADIOTTO, N. R. Voltammetric Behavior of a Modified Electrode With Azide Copper Octa(3-Aminopropyl)Octasilsesquioxane Composite in the Oxidation of Ascorbic Acid. International Journal of Electrochemical Science (Online), v. 6, p. 1175-1188, 2011.

4. SÁ, A. C. de; PAIM, L. L.; Bicalho, U. O.; CARMO, D. R. Determination of N-acetylcysteine by Cyclic Voltammetry Using Modified Carbon Paste Electrode with Copper Nitroprusside Adsorbed on the 3-Aminopropylsilica. International Journal of Electrochemical Science (Online), v. 6, p. 3754-3767, 2011.

3.2 Trabalhos submetidos

1. SÁ, A. C. de; SEDENHO, G.; PAIM, L. L.; STRADIOTTO, N. R. Determination of sugars in hydrolyzate of sugarcane bagasse by HPLC-PAD using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes containing nanoparticles of nickel oxy/hydroxide. *Fuel*, 2015.

ACELINO CARDOSO DE SÁ

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 26 de novembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



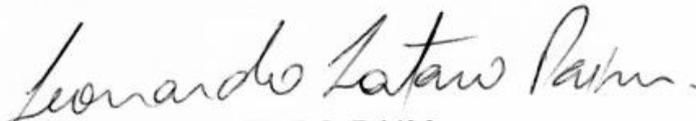
Prof. Dr. CECILIO SADAO FUGIVARA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE MAZO
Instituto de Química / USP / São Carlos – SP



Prof. Dr. MARCELO FIRMINO DE OLIVEIRA
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP



Prof. Dr. LEONARDO LATARO PAIM
Campus Experimental de Rosana / UNESP / Rosana - SP

Dedico este trabalho,

Minha linda e maravilhosa esposa Silvia, obrigado pelo amor, carinho, amizade e por entender com tanto carinho meus momentos de distância, mesmo quando fui para Barcelona, você não hesitou em apoiar essa ideia e ainda me apoiou em todos os momentos. Agradeço todos os dias por ter conhecido você, uma mulher humilde, inteligente, batalhadora e muito linda. Você me fez uma pessoa melhor, e de tudo que aprendi e conquistei, o melhor foi aprender a amar, e isso deve a você minha querida Silvia. Eu simplesmente te amo muito.

Ao meu lindo e esperto filho Olavo, no seu batismo eu ouvi a seguinte frase “os filhos são presentes na forma de empréstimo que ganhamos, porém temos que tratar como jóias, pois um dia teremos que prestar contas com Deus, e devolve-los sem nenhum arranhão” te amo filho.

Minha querida e muito dedicada mãe Adalgisa, que amo muito. Não importa o tempo ou a distância que separa um filho de uma mãe, mas sim o amor e o respeito que são carregados no coração.

Ananias, meu querido pai, um homem sério, honesto e trabalhador, obrigado pelo apoio. Não tem como expressar todo orgulho e sorte que tenho de ter um pai como você. As poucas qualidades que tenho como homem pode ter certeza que aprendi com você, quero apenas agradecer por ser meu querido pai.

A minha querida sogra Teresa (*In memoriam*) e ao meu sogro Antonio, pois me trataram tão bem que acabei ganhando um Pai e uma Mãe, obrigado pelo amor, carinho e por cuidarem tão bem do meu príncipe Olavo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, Quem me permitiu realizar este trabalho e deu forças diante das pedras que encontrei no caminho.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto pela orientação, apoio, compreensão e ensinamentos transmitidos durante este trabalho e durante minha jornada, o meu sincero agradecimento pelo exemplo de ética, dedicação e amor à pesquisa.

Aos meus irmãos Isabel, Deneval, Roberval e Getúlio pelo apoio, amo muito vocês.

À vó Angelina, Suzana e Randolpho pelo apoio.

Ao meu grande amigo Leonardo Paim pelo apoio, discussões e cervejas durante estes 4 anos. À Ana Paula e Maria Luiza Paim pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos Kely, Paulo e Rafael pelo apoio durante essa empreitada.

Aos professores, Sadao, Valnice, Hideko, Fabiola e Pilar, pelo amparo à nossa pesquisa, confiança e pela continua amizade.

Aos grandes amigos Felipe e Daniela Manfroi que me acolheram em Araraquara.

Aos amigos de república Marco Modenes, Thiago Silva e Thiago (nemo) pelas discussões até altas horas.

A todos os amigos do IQ, pelos momentos de alegria, principalmente na hora dos almoços.

A todos os alunos do grupo de eletroanalítica que de alguma forma contribuíram para a pesquisa e conclusão deste trabalho.

Aos amigos especiais do NDCOM Michelle, Maisa (Miss Bagaço), José Luis (Furfural), Marco, Josiel, Lúcio, Bianca, Thiago (Nemo), Thiago (01), Guilherme Zocolo, Graziela, Bruna, Milena, Jefferson e Henrique que sempre estiveram comigo nessa nova estadia em Araraquara.

À minha grande amiga Teresa por me receber tão bem em sua casa com carinho e atenção durante minha estadia em Barcelona.

À minha grande amiga Lara que foi a pessoal que mais ensentivou o começo da graduação.

Agradecimento especial ao pessoal da Universidade Autônoma de Barcelona, Manel del Valle que me ensinou os conceitos e aplicação das Línguas Eletrônicas, aos amigos Andreu, Andrea, Iara, Gina, Cristina e Julio muito obrigado pela oportunidade para eu fazer estágio com vocês e conhecer uma nova cultura.

Agradeço a todos os funcionários e professores do Instituto de Química.

Agradeço a FAPESP (Processo 2011/19289-5) pela bolsa concedida e pela bolsa de estágio no exterior realizado em Barcelona (BEPE- 2014/15557-3).

*“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar
mais uma vez.”
Thomas Edison*

*“Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte pode
bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É
assim que a vitória é conquistada.”
Rocky Balboa*

*“É melhor tentar e falhar, a se preocupar a ver a vida passar
É melhor tentar ainda que em vão, a se sentar-se, não fazendo nada ao final.
Prefiro caminhar na chuva, a esconder-me em casa em dias tristes.
Prefiro ser feliz, embora louco, a viver sempre igual...”
Martin Luther King.*

RESUMO

A biomassa constituída pelo bagaço da cana-de-açúcar é um subproduto do processo de produção do açúcar e do etanol. Novas aplicações para o bagaço têm sido desenvolvidas, dentre elas pode-se destacar a produção de biocombustíveis (etanol) de segunda geração. O processo para a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa da cana-de-açúcar envolve a otimização de forma integrada de diversas etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos hidrolisados, para avaliar a eficiência destes processos é fundamental uma caracterização precisa dos açúcares da biomassa para sua conversão em etanol, diante disso foi desenvolvida a preparação e utilização do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxi-hidróxido de níquel GCE/MWCNT/NiOOH para detecção e quantificação de açúcares em meio alcalino. Foram estudados as constantes de velocidade eletrocatalíticas dos açúcares no GCE/MWCNT/NiOOH, esses estudos são importantes para melhor compreensão dos processos eletródicos envolvidos no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH durante a eletro-oxidação dos açúcares para o desenvolvimento de métodos analíticos acoplados em HPLC. Foram desenvolvidos os métodos analíticos utilizando o HPLC com os eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH e GCE/MWCNT/CoOO para quantificação dos açúcares em amostras de bagaço de cana de açúcar. O GCE/MWCNT/NiOOH apresentou limites de detecção de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para arabinose, $5,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para galactose, $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para glicose e $6,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para xilose. Já o GCE/MWCNT/CoOO apresentou os seguintes limites de detecção: $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para arabinose, $4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para galactose, $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para glicose e a xilose foi de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Foi observado que ambos os eletrodos apresentaram limites de detecção semelhantes, outra característica foi que em ambos os métodos foram adequados na determinação dos açúcares presentes nas amostras de bagaço de cana de açúcar, sendo que no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foi determinado $5,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de arabinose, $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de glicose e $2,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para xilose. A determinação dos açúcares utilizando o GCE/MWCNT/CoOO foi de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para arabinose, $7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para galactose, $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para glicose e $2,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para xilose. Os métodos desenvolvidos mostraram serem seletivos, sensíveis e reprodutíveis. Os resultados mostraram que os métodos propostos podem ser utilizados para a detecção destes açúcares com considerável precisão sem a necessidade de derivatização e os métodos analíticos não sofreram nenhuma interferência, mesmo em amostra complexa como é o bagaço de cana de açúcar apresentando considerável confiabilidade. Como alternativa foi estudado um método que não requereu o uso de HPLC para determinação dos açúcares, foi desenvolvido um língua eletrônica utilizando uma matriz de 5 sensores modificados com nanopartículas de óxi-hidróxido de metais (paládio, ouro, cobre, níquel e cobalto) empregando uma rede neural artificial, esta língua eletrônica tem um enorme potencial para determinar açúcares em amostras de hidrolisados de bagaço de cana de açúcar. O mérito do sistema proposto é conseguir resolução de misturas de carboidratos sem a necessidade de utilizar qualquer componente de biosensores, permitindo assim respostas mais estáveis.

Palavras-chave: Açúcar, Biomassa, Nanopartículas, HPLC, língua eletrônica.

ABSTRACT

Biomass generated from the bagasse from sugarcane is a byproduct of the production process of sugar and ethanol. New applications for the bagasse have been developed among them we can highlight the production of biofuels (ethanol) of second generation. The processes for the production of second generation ethanol from biomass sugarcane involves optimizing an integrated manner in several steps: pre-treatment, hydrolysis and fermentation of the hydrolyzed products, to evaluate the efficiency of these procedures is fundamental a precise characterization of biomass sugars for conversion into ethanol, therefore it was developed the preparation and use of the glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes containing nickel oxide-hydroxide GCE/MWCNT/NiOOH for detection and quantification of sugars in alkaline médium. It was studied electrocatalytic constant rate of sugars in GCE/MWCNT/NiOOH. These studies are important to better understand the electrodic processes involved in the GCE/MWCNT/NiOOH during the electro-oxidation of sugars to the development of analytical methods for HPLC. Analytical methods were developed using HPLC with electrodes GCE/MWCNT/NiOOH and GCE/MWCNT/CoOO for quantification of sugars in sugarcane bagasse samples. The GCE/MWCNT/NiOOH presented a detection limit 2.5×10^{-6} mol L⁻¹ for arabinose, 5.4×10^{-6} mol L⁻¹ for galactose, 3.4×10^{-6} mol L⁻¹ for glucose and 6.6×10^{-6} mol L⁻¹ for xylose. The GCE/MWCNT/CoOO showed the following detection limits: 3.4×10^{-6} mol L⁻¹ for arabinose, 4.4×10^{-6} mol L⁻¹ for galactose, 3.6×10^{-6} mol L⁻¹ for glucose and 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ for xylose. It was observed that both electrodes exhibit similar detection limits, another feature was that in both methods were adequate in determining the sugars present in the sugarcane bagasse samples, on GCE/MWCNT/NiOOH was determined 5.9×10^{-4} mol L⁻¹ arabinose 1.0×10^{-2} mol L⁻¹ glucose and 2.8×10^{-3} mol L⁻¹ for xylose. The determination of sugars using GCE/MWCNT/CoOO was 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ for arabinose, 7.2×10^{-5} mol L⁻¹ for galactose, 3.0×10^{-3} mol L⁻¹ for glucose and 2.4×10^{-3} mol L⁻¹ for xylose. The developed methods were selective, sensitive and reproducible. The results showed that the proposed methods can be used to detect these sugars with considerable precision without need of derivatizing and analytical methods did not suffer any interference, even in complex sample such as sugarcane bagasse presenting considerable reliability. Alternatively a method that does not require the use of HPLC was studied for determination of sugars, an electronic tongue was developed using an array of 5 modified sensors with nanoparticles metals oxy-hydroxide (palladium, gold, copper, nickel and cobalt) using an artificial neural network (ANN), this electronic tongue has enormous potential to determine sugars in samples of hydrolyzed sugarcane bagasse. The merit of the proposed system is to achieve resolution of carbohydrate mixtures without the need for using any component of biosensors, thus allowing more stable responses.

Key Words: Sugar, Biomass, Nanoparticles, HPLC, Electronic Tongue.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

[]	Concentração
ΔE_p	Diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico
A	Área geométrica
A	Amper
Ag/AgCl (KCl 3 mol L ⁻¹) de potássio 3 mol L ⁻¹	Eletrodo de prata/cloreto de prata em solução de cloreto de potássio 3 mol L ⁻¹
E	Potencial
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
FIA	Análise por injeção em fluxo
I	Corrente
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
j	Densidade de corrente (A cm ⁻²)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Voltametria cíclica
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
nm	Nanômetro
n	Número de elétrons
n	Número de amostras
Ni	Níquel
Co	Cobalto
Pd	Eletrodo de referência de paládio
pH	Potencial hidrogeniônico
pka	Medida logarítmica da constante de dissociação do ácido
SA	Sensibilidade amperométrica
SD	Desvio padrão
t	Tempo

vs.	Versus
α	Coeficiente de transferência eletrônica
Γ	Excesso superficial
v	Velocidade de varredura
$v^{1/2}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura
r	Coeficiente de correlação linear
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
CGE	Eletrodo de carbono vítreo
CGE/MWCNT	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono
CGE/NiOOH	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxi-hidróxido de níquel
CGE/MWCNT/NiOOH	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxi-hidróxido de níquel
CGE/MWCNT/CoOO	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxido de cobalto
CGE/MWCNT/AuO	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxido de ouro
CGE/MWCNT/PdOOH	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxi-hidróxido de paládio
CGE/MWCNT/CuOOH	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxi-hidróxido de cobre
CGE/MWCNT/MetaisOOH	Língua eletrônica formada por eletrodos modificados com óxi-hidróxidos de metais.

	CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO		17
1.1. <i>Biomassa para geração de etanol de segunda geração</i>		17
1.2. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>		19
1.3. <i>Detectores Eletroquímicos em HPLC</i>		22
1.4. <i>Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) para determinação de açúcares</i>		24
2. OBJETIVOS		27
	CAPÍTULO II	28
Eletrooxidação de açúcares no eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) contendo óxi-hidróxido de níquel.		28
1. INTRODUÇÃO		28
2. PARTE EXPERIMENTAL		29
2.1. <i>Reagentes</i>		29
2.2. <i>Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxi-hidróxido de níquel (GCE/NiOOH) e modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas contendo óxi-hidróxido de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH)</i>		29
2.3. <i>Instrumentação</i>		30
2.3.1. <i>Medidas Eletroquímicas</i>		30
2.3.2. <i>Caracterização por microscopia eletrônica de varredura do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH</i>		31
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES		31
3.1. <i>Estudos de otimização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas na superfície do carbono vítreo.</i>		31
3.2. <i>Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH</i>		34
3.3. <i>Caracterização microscópica</i>		39
3.4. <i>Eletro-oxidação de açúcares</i>		41
3.5. <i>Estudo da área dos eletrodos GCE/NiOOH GCE/MWCNT/NiOOH</i>		42
3.6. <i>Estudo cinético da oxidação eletrocatalítica dos açúcares</i>		45
3.7. <i>Estudos da concentração de açúcares</i>		49
4. CONCLUSÃO		53
	CAPÍTULO III	55
Determinação dos açúcares em bagaço de cana de açúcar por cromatografia de troca aniônica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel		55
1. INTRODUÇÃO		55
2. PARTE EXPERIMENTAL		56
2.1. <i>Reagentes</i>		56
2.2. <i>Funcionalização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)</i>		56
2.3. <i>Modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel GCE/MWCNT/NiOOH</i>		57
2.4. <i>Determinações dos açúcares (Arabinose, Galactose, Glicose, Xilose e Manose) em cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-DPAD)</i>		58
2.5. <i>Curvas analíticas</i>		59

2.6. <i>Preparo das amostras de hidrolisado de biomassa para determinação cromatográfica</i>	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
3.1. <i>Caracterização microscópica.</i>	60
3.2. <i>Caracterização eletroquímica do eletrodo GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH</i>	62
3.3. <i>Eletro-oxidação dos açúcares</i>	69
3.4. <i>Estudos da concentração de açúcares</i>	71
3.5. <i>Otimização dos parâmetros cromatográficos dos utilizando o eletrodo de ouro</i>	75
3.5.1. <i>Estudo de otimização dos parâmetros para formação das nanopartículas do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH para aplicação no HPLC</i>	83
3.6. <i>Estabilidade do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH como detector no HPLC</i>	93
3.7. <i>Determinação dos açúcares presentes no bagaço de cana-de-açúcar utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH como detector no HPLC</i>	93
4.0. CONCLUSÃO	96
CAPÍTULO 4	
Determinação dos açúcares em bagaço de cana de açúcar por cromatografia de troca aniônica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto	98
1. INTRODUÇÃO	98
2. MATERIAIS E MÉTODOS	98
2.1. <i>Reagentes</i>	99
2.2. <i>Modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto GCE/MWCNT/CoOO</i>	99
2.3. <i>Determinações dos açúcares (Arabinose, Galactose, Glicose, Xilose e Manose) em cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada</i>	101
2.4. <i>Curvas analíticas</i>	102
2.5. <i>Preparo das amostras de hidrolisado de biomassa para determinação cromatográfica</i>	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	103
3.1. <i>Estudos de eletrodeposição do cobalto</i>	103
3.2. <i>Caracterização eletroquímica do GCE/MWCNT/CoOO</i>	106
3.3. <i>Caracterização microscópica</i>	109
3.4. <i>Eletro-oxidação dos açúcares</i>	111
3.5. <i>Estudos da influência da concentração de açúcares</i>	114
3.6. <i>Otimização do método cromatográfico utilizando coluna Carboxpac PA-1</i>	117
3.7. <i>Determinação dos açúcares presentes no bagaço de cana-de-açúcar utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO</i>	124
4.0. CONCLUSÃO	127
CAPÍTULO 5	
Determinação de galactose, glicose, xilose e manose em bagaço de cana empregando uma língua eletrônica voltamétrica formada por eletrodos modificados de MWCNT/óxi-hidróxido de metais.	128
1. INTRODUÇÃO	128
2. PARTE EXPERIMENTAL	129
2.1. <i>Reagentes</i>	129
2.2. <i>Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e varredura</i>	129

2.3. Medidas eletroquímicas	129
2.4. Desenho experimental para o modelo de quantificação	130
2.5. Processamento de dados	131
2.6. Preparação dos eletrodos para língua eletrônica	132
2.6.1. Modificação dos MWCNTs com nanopartículas de Pd, CuO e Au	132
2.6.2. Modificação dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas com paládio (MWCNT/Pd)	132
2.6.3. Modificação de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com ouro (MWCNT/Au)	132
2.6.4. Nanotubos de carbono integrado com nanofolhas de óxido de cobre (MWCNT / CuO)	133
2.6.5. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de paládio (GCE/MWCNT/PdOOH)	133
2.6.6. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de ouro (GCE/MWCNT/AuOOH)	134
2.6.7. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanofolhas de cobre (GCE/MWCNT/CuOOH)	134
2.6.8. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH)	135
2.6.9. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/CoOO)	135
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	136
3.1. Caracterização microscópica dos eletrodos GCE/MWCNT/MetaisOOH	136
3.2. Resposta dos eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH	138
3.3. Construção do modelo da Rede Neural artificial (ANN)	145
4. CONCLUSÃO	147
CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS	151

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biomassa para conversão a etanol de segunda geração

A biomassa da cana-de-açúcar (bagaço) é um subproduto do processo de produção do açúcar e do etanol, sendo reaproveitada principalmente para gerar energia elétrica, por meio de sua queima nas próprias usinas. No Brasil, novas aplicações para o bagaço têm sido desenvolvidas, dentre elas pode-se destacar a produção de biocombustíveis (etanol) de segunda geração (ANDRADE; COLODETTE, 2014; DIAS et al., 2012; MOSIER et al., 2005).

O etanol de segunda geração é aquele produzido a partir dos açúcares que foram liberados da parede celular do bagaço e palha da cana-de-açúcar (ANDRADE; COLODETTE, 2014). O potencial para o uso da biomassa para produzir o etanol de segunda geração é enorme, especialmente por causa da grande disponibilidade desta matéria-prima (ANDRADE; COLODETTE, 2014).

A biomassa é formada por materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, que é uma fonte importante de carbono, ou seja compostos de polímeros de carboidratos de estruturas cristalinas e amorfas, composta de três frações principais: celulose, hemicelulose e lignina (ANDRADE; COLODETTE, 2014; DIAS et al., 2012; MOSIER et al., 2005; SOCCOL et al., 2010).

A mais abundante é a celulose contendo de 32 a 44%, um homopolissacarídeo linear, formado por unidades de glicose fortemente ligadas (ANDRADE; COLODETTE, 2014; SOCCOL et al., 2010). A hemicelulose contendo de 27 a 32% é constituída por diversos açúcares, principalmente por xilose, configurada em uma cadeia facilmente hidrolisável (ANDRADE; COLODETTE, 2014; SOCCOL et al., 2010).

Por último, encontra-se uma série de álcoois aromáticos polimerizados, fração denominada lignina de 19 a 24%, que ligada à hemicelulose, envolve a celulose e a protege de ataques hidrolíticos químicos ou enzimáticos. A biomassa do bagaço também é formada por outros materiais como ceras, cinza e outros compostos que

somados apresentam em torno de 16% em sua composição (ANDRADE; COLODETTE, 2014; SOCCOL et al., 2010).

As hemiceluloses são uma classe heterogênea de polímeros que contém açúcares como, pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos (α -D-glicurônico, ácido 4-O-metilglicurônico e ácido α -D-galacturônico) (GÍRIO et al., 2010).

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular num estágio anterior à lignificação. A fácil interação das ramificações e cadeias laterais com a celulose promove estabilidade e flexibilidade à hemicelulose (MARTINS, 2005).

A celulose e a hemicelulose compõem até dois terços da biomassa do bagaço e são os substratos para produção de etanol de segunda geração. A conversão microbiana da fração de hemicelulose, tanto na forma monomérica quanto na forma oligomérica, é essencial para aumentar o rendimento do etanol combustível desta biomassa (SOCCOL et al., 2010).

O volume desta biomassa representa cerca de um terço da produção de cana-de-açúcar no Brasil, que vem batendo recordes a cada ano. Para manter as primeiras posições de liderança, é preciso investir em pesquisa e produção de fontes alternativas de energia, como a produção de etanol de segunda geração, ou a partir da biomassa vegetal, além do aumento na produção de biocombustíveis, o aumento da utilização de biomassa para energia poderá levar ao desenvolvimento econômico e à diminuição da pobreza pela geração de empregos e melhoria na vida das populações rurais (DAMASCENO et al., 2010).

A implantação da tecnologia de etanol de segunda geração no Brasil é favorecida, pois o processo de produção pode ser anexado ao açúcar/etanol nas unidades já existentes, exigindo investimentos mais baixos, tais como, infraestrutura, logística e fornecimento de energia (SOCCOL et al., 2010).

Além disso, o bagaço é gerado nas unidades industriais, e portanto, livre de custos de transporte. Este é um cenário promissor, pois a partir de 10 milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de etanol poderiam ser produzidos, considerando o uso da sua parte celulósica. Outra vantagem da produção de bioetanol a partir do bagaço de cana é a utilização dos resíduos, quase 10% da produção total, que normalmente é rejeitada é causadora de problemas ambientais (SOCCOL et al., 2010).

A produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica inclui pré-tratamento da biomassa, a hidrólise da celulose, a fermentação de hexoses, separação e tratamento de efluentes. Intensos esforços têm sido feitos nos últimos anos para desenvolver tecnologias adequadas para a fermentação de açúcares C6 e C5, bem como para a hidrólise desta biomassa (ORGANIZAÇÃO BNDES E CGEE, 2008).

Os biocombustíveis são a solução da viabilidade da bioenergia que pode, então, ser considerada uma fonte energética moderna e sustentável na medida em que os mesmos forem competitivos economicamente e apresentarem uma boa relação entre a energia produzida e a demanda em sua produção, causando a redução do impacto ambiental, com um grande potencial para diminuir as mudanças climáticas, diminuindo a competição entre biocombustíveis e alimentos, utilizando integralmente a matéria-prima, reduzindo a área plantada e produzindo mais etanol (ORGANIZAÇÃO BNDES E CGEE, 2008; RAELE et al., 2014).

1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A medida exata do teor de carboidratos presentes nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar é de extrema importância, pois sua quantificação está diretamente ligada à produção do etanol de segunda geração (SLUITER et al., 2010).

Os métodos clássicos para a determinação de açúcares em biomassas são baseados na técnica de cromatografia. Nas últimas décadas, os métodos cromatográficos, principalmente cromatografia líquida de alta eficiência tornaram-se muito populares para a determinação de açúcares. De acordo com a Collins e colaboradores a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contem um grande número de substâncias similares (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, 2009).

A HPLC utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel eluída em altas pressões. Esta técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de

tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, 2009).

Muitos detectores acoplados na cromatografia têm sido desenvolvidos, entre estes se cita os detectores espectrofotométricos que operam em comprimento de onda na região do ultravioleta e do visível, detectores por índice de refração, espalhamento de luz, fluorescência e espectrometria de massa e eletroquímicos. A cromatografia acoplada a esses detectores tornou possível a detecção de uma faixa ampla de compostos em baixas concentrações presentes em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, açúcares, petróleo, etanol (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, 2009).

A análise de açúcares em biomassa tem sido objeto de inúmeros estudos, os quais produziram além do procedimento técnico da ASTM intitulado “Determinação de Carboidratos em Biomassa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência” que utiliza o índice de refração como detector (SLUITER et al., 2010), várias publicações científicas, as quais são descritas sucintamente a seguir.

Gouveia et al. (2009) compararam as determinações de açúcares em biomassa de amostras de bagaço cana-de-açúcar em dois laboratórios distintos utilizando HPLC, em um laboratório foi utilizada uma coluna de Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) com detector de índice de refração, e em outro laboratório, foi utilizado uma coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad). Em ambos os laboratórios foram empregados detectores de índice de refração, sendo encontrados os seguintes intervalos lineares de concentração para cada um dos analitos: 0,0306-0,306 g L⁻¹ (celobiose), 0,1621-1,621 g L⁻¹ (glicose), 0,0622-0,622 g L⁻¹ (xilose) e 0,0316-0,316 g L⁻¹ (arabinose).

Santos e Gouveia (2009) determinaram as concentrações de açúcares de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a HPLC com uma coluna Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%). O método utilizou um detector com índice de refração, sendo quantificada a glicose nas concentrações de 20,8 g L⁻¹, 32,8 g L⁻¹ e 34,2 g L⁻¹.

Santos et al. (2010) analisaram açúcares de bagaço de cana-de-açúcar em dois tipos de processos para a produção de etanol durante as hidrolises enzimáticas, utilizando a HPLC com uma coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%V/V) com detector de índice de refração. A concentração de glicose alcançou um valor máximo de 5 g L⁻¹ e a celobiose teve a concentração de 1,5 g L⁻¹ e para o segundo processo foram encontrados os valores de 0,6 g L⁻¹ para a glicose.

Noronha et al. (2010) analisaram os açúcares hidrolisados por hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar através de HPLC, utilizando um cartucho Sep Pak C18 e uma coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad), com um detector de índice de refração. As concentrações dos açúcares detectados foram de 1,34 g L⁻¹ glicose, 15,76 g L⁻¹ xilose e 2,03 g L⁻¹ arabinose.

Rocha et al. (2011) determinaram as concentrações dos açúcares após a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar através de HPLC, utilizando uma coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad), com um detector de índice de refração. Foram detectadas as concentrações dos açúcares: 3,67 g L⁻¹ glicose, 9,04 g L⁻¹ xilose, 1,03 g L⁻¹ arabinose e 0,20 g L⁻¹ celobiose.

Gottschalk, Oliveira e Bom (2010) analisaram os açúcares durante a hidrólise enzimática da biomassa de cana de açúcar utilizando a HPLC com uma coluna Lichrospher 100 NH₂ de 5 µm acoplado com a um detector de índice de refração, sendo que a hidrólise de 20 e 200 g L⁻¹ do bagaço, produziu 3,9 e 40 g L⁻¹ de glicose, respectivamente.

Prakash et al. (2011) analisaram a fermentação do bagaço de cana-de-açúcar com a HPLC com uma coluna Waters sugar pak 6.5 x 300 mm. Os açúcares foram detectados com o auxílio de um detector de índice de refração, sendo que o hidrolisado contendo 20 g L⁻¹ de xilose foi usado para a produção de xilitol.

Abo-State et al. (2013) isolaram diversos microrganismos e aplicaram na fermentação de bagaço de cana de açúcar. Para análise dos rendimentos dos açúcares utilizaram uma coluna 10A Shimadzu Shim-pack SCR-101N acoplada ao HPLC com detecção de índice de refração. Os açúcares quantificados após a hidrólise foram de 20,89 g L⁻¹ para glicose e 5,08 g L⁻¹ para xilose.

Methrath Liyakathali et al. (2015) realizaram estudos de pré tratamento com o bagaço de cana de açúcar utilizando um banho de ultrassom antes da hidrólise, para análise de glicose foi utilizado um HPLC aoplado a uma coluna HPX-87P (Bio Rad) com um detector de índice de refração, foi quantificado um rendimento máximo de glicose de 24,29 g / 100 g de biomassa seca.

Diversos autores quantificaram com a técnica de HPLC com detector de índice de refração, açúcares para produção de bioetanol contidos em vários tipos de biomassas, tais como, palha de milho (AGBLEVOR et al., 2007; LIU et al., 2010; MATHEW et al., 2011), resíduos de papel (FOYLE; JENNINGS; MULCAHY, 2007), beterraba (DODIĆ et al., 2009), tronco de palmeiras (YAMADA et al., 2010), polpa de

oliveira (CARA et al., 2008; HAAGENSEN et al., 2009), palha de trigo (HONGZHANG; LIYING, 2007), melão de soja (SIQUEIRA et al., 2008), resíduos florestais (FERREIRA et al., 2010), casca de arroz (DA CUNHA-PEREIRA et al., 2011; KARIMI; EMTIAZI; TAHERZADEH, 2006), alfafa (DIEN et al., 2011), farelo de triticalear (GARCÍA-APARICIO et al., 2011) e sorgo doce (WU et al., 2010).

Outros autores também quantificaram açúcares em amostras de outras biomassas utilizando diversos detectores, como detector de espalhamento de luz evaporativo em microalgas (HARUN et al., 2011) e casca de batata (LENIHAN et al., 2010); detector de espectrometria de massa (ESI) em alcachofra de Jerusalém (MATÍAS et al., 2011) e detector de fluorescência em madeira (TANG et al., 2006).

1.3. Detectores Eletroquímicos em HPLC

Os detectores eletroquímicos ganharam popularidade por oferecerem as melhores soluções para problemas em análises para a HPLC, pois estes são sensíveis e detectam uma ampla gama de compostos orgânicos oxidáveis ou reduzíveis, ampla aplicabilidade, alta detectabilidade (10^{-12} g), importantes na análise de traços. Os detectores eletroquímicos quando comparados com o índice de refração são mais robustos pois não sofrem alterações durante a análise quando são submetidos a mudanças de fase móvel ou temperatura (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

A célula de um detector eletroquímico, na qual ocorre à reação redox, possui três eletrodos, sendo um de trabalho podendo ser de carbono vítreo, pasta de carbono, grafite poroso, mercúrio, platina e de carbono modificado com metais de transição, o eletrodo de referencia de cloreto de prata e prata (Ag/AgCl) ou paládio e o eletrodo auxiliar de platina (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Os detectores eletroquímicos medem a variação de corrente na célula do detector quando se aplica um potencial fixo no eletrodo de trabalho. Os detectores eletroquímicos usados na HPLC podem ser classificados em função de sua operação em modulo amperométrico que pode utilizar a detecção com potencial controlado (DC) ou com pulso de potencial (pulsada) e coulométricos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

A detecção eletroquímica pode ser feita tanto no modo de oxidação como de redução essa escolha dependerá do tipo de analito (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Açúcares são espécies difíceis de serem detectadas com sensibilidade significativa pela maioria dos detectores convencionais, tais como detectores na região do UV-visível, mas que podem ser prontamente medidos eletroquimicamente (FLANANGAN; PERRETT; WHELPTON, 2005).

Cataldi et al. (1992) analisaram alguns açúcares por cromatografia líquida e injeção em fluxo utilizando uma coluna de troca aniônica de (250 mm x 4 mm) acoplado ao detector eletroquímico. Os resultados obtidos utilizando um eletrodo carbono vítreo quimicamente modificado com cobalto apresentaram os seguintes limites de detecção: 0,8 ng arabinose, 0,9 ng glicose, 2,7 ng lactose e 4,8 ng sucrose.

Davis (1998) determinou concentrações de açúcares de biomassas de madeira de álamo e pinus utilizando um HPLC com detecção amperométrica pulsada com um eletrodo de ouro. As concentrações de açúcares encontradas foram: arabinose 0,063 g L⁻¹, galactose 0,073 g L⁻¹, rhamnose 0,033 g L⁻¹, glicose 0,78 g L⁻¹, xilose 0,36 g L⁻¹ e manose 0,23 g L⁻¹.

Widmer (2011) analisou amostras de vários açúcares após a hidrólise ácida da biomassa de casca de laranja utilizando cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) com uma coluna Dionex CarboPac PA-1 (4x 250 mm) com detecção amperométrica pulsada com o eletrodo de ouro. O limite de detecção encontrado para os açúcares rarnose, arabinose, galactose, glicose e frutose foi de 6 ng.

Engling et al. (2006) determinaram açúcares produzidos a partir de degradação térmica da celulose e hemicelulose em restos de florestas utilizando (HPAEC-PAD). Os resultados obtidos utilizando uma coluna analítica Dionex Carbo Pac PA 10 (4x 250 mm), acoplado ao detector eletroquímico com um eletrodo de ouro operando no modo amperométrico, apresentaram um limite de detecção de 2 mg mL⁻¹ para glicose, manose e galactose.

linuma et al. (2009) também determinaram açúcares produzidos a partir de degradação térmica da celulose e hemicelulose em restos de florestas utilizando HPAEC-PAD com uma coluna analítica Dionex Carbo Pac PA 10 (4x 250 mm), com um eletrodo de ouro operando no modo amperométrico, os limites de detecção

obtidos foram 0,003 mg L⁻¹ para glicose e galactose, 0,005 mg L⁻¹ para manose e 0,08 mg L⁻¹ para frutose.

Buratti, Brunetti e Mannino (2008) detectaram açúcares e tióis por detecção amperométrica utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com oxido de cobalto em nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Os estudos voltamétricos foram realizados em um sistema de injeção em fluxo em HPLC com um detector amperométrico, sendo obtidos os seguintes limites de detecção, 0,07 mM para glicose, 0,10 mM galactose, 0,08 mM lactose e sucrose.

Sevcik et al. (2011) modificaram uma coluna cromatográfica aniônica com carbonato e tornaram mais rápidas as análises de açúcares hidrolisados de biomassas de palha de milho, gramíneas e madeira de álamo. O método utilizado foi o HPLC acoplado ao detector amperométrico usando um eletrodo de ouro. As concentrações de açúcares encontradas foram: 23,5 mg g⁻¹ arabinose, 6,6 mg g⁻¹ galactose, 334 mg g⁻¹ glicose e 272 mg g⁻¹ xilose.

1.4. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) para determinação de açúcares

Durante as últimas décadas surgiram inúmeras publicações a respeito de detecção eletroquímica não enzimática de açúcares. Eletrodos utilizando ouro, platina, cobre e níquel, foram utilizados para melhorar a seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade. Alguns trabalhos investigando a eletro oxidação direta de glicose também tem sido realizados em eletrodos de platina (BOLZAN, 1987; VASSILYEV; KHAZOVA; NIKOLAEVA, 1985a, 1985b).

Eletrodos de ouro são quimisorventes fracos devido ao orbital d estar completo, no entanto apresentam uma maior eletroatividade para a oxidação da glicose do que a platina, portanto são pesquisados como sensores não-enzimática para glicose. O comportamento eletrocatalítico do ouro é altamente complexo e apesar de inúmeras investigações, o mecanismo para a oxidação de glicose em ouro permanece indeterminado, embora tenha sido proposta uma grande variedade de mecanismos para essa reação (BURKE, 1994, 2004).

Numerosos eletrodos carbono modificados tem aparecido na última década para uso da eletrocatalise da oxidação de glicose e de outros açúcares. Os eletrodos

desenvolvidos têm explorado a possibilidade da utilização do carbono para a oxidação de glicose visando a fabricação de sensores de baixo custo. Geralmente, são usados como substratos o carbono devido sua condutividade eletrônica e outras propriedades peculiares (NEWMAN; TURNER; MARRAZZA, 1992; WRING et al., 1990).

Durante a última década o surgimento de carbono baseado em materiais nanoestruturados, tais como nanotubos de carbono e mais recentemente o grafeno tem melhorado a detecção eletroquímica da glicose. Esses materiais são promissores em biosensoriamento, devido a facilidade de modificação e funcionalização, boa condutividade, biocompatibilidade e grande área superficial (DE SÁ et al., 2014; LI et al., 2009).

Sugawara et al. (1995) estudaram a determinação alguns açúcares utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com porfirina de cobre (II) com a técnica de voltametria de varredura linear, onde analisaram a glicose em uma faixa linear de $2,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o método desenvolvido apresentou um desvio padrão relativo de 7,2 % para a determinação de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de glicose (n = 5) e um limite de quantificação de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Shamsipur, Najafi e Hosseini (2010) analisaram glicose em amostras de soro de sangue humano utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com óxido de níquel em nanotubos de carbono. Os resultados obtidos com a técnica de voltametria cíclica e cronoamperometria mostram que o limite de detecção encontrado para glicose foi de $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Jafarian et al. (2010) utilizaram como sensor um eletrodo modificado de hidróxido de cobre para estudos da oxidação eletrocatalítica da sacarose utilizando a técnica de cronoamperometria no potencial eletrocatalítico de 0,7 mV vs Ag / AgCl, encontrando um limite de detecção de $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Vidotti et al. (2009) utilizaram como sensor um eletrodo modificado de hidróxido de níquel para quantificação de açúcares (glicose, frutose, lactose e sacarose) empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com uma coluna trocadora iônica, tendo encontrado os valores de sensibilidade amperométrica para glicose, frutose, lactose e sacarose de 76,4, 71,8, 43,7 e 40,8 $\mu\text{A cm}^{-2} \text{ppm}^{-1}$ respectivamente e um limite de detecção para glicose de $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Liang et al. (2016) investigaram o comportamento do eletrodo de pasta de carbono modificado com grafeno contendo microesferas de cobalto para

quantificação dos açúcares (manitol, sacarose, lactose, glicose e frutose), empregando um sistema de eletroforese capilar, obtendo os limites de detecção de $0,21 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para manitol, $0,24 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para sacarose, $0,27 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para lactose, $0,20 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para glicose e $0,28 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para frutose.

Santos et al. (2016) desenvolveram um método analítico para determinação de açúcares redutores totais (glicose e frutose) em amostras de águas residuais obtida no processamento de cana para a produção de etanol. Foi utilizada a técnica de amperometria pulsada, sendo obtido o limite de detecção de $6,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Sendo assim, conforme literatura os materiais lignocelulósicos na forma de biomassa de plantas, como o bagaço e palha de cana-de-açúcar, são fontes abundantes de carbono nas formas de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (DIAS et al., 2012; MOSIER et al., 2005; SOCCOL et al., 2010).

A biomassa de cana de açúcar para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados para a bioconversão em etanol de segunda geração, já que estes materiais apresentam alta concentração de carboidratos, baixas concentrações de lignina, baixo custo de transporte e armazenagem. (MOSIER et al., 2005; SOCCOL et al., 2010).

O desenvolvimento de processos para a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa da cana-de-açúcar envolve a otimização, de forma integrada, de diversas etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos hidrolisados, para a avaliação da eficiência destes processos é fundamental uma caracterização exata dos açúcares da biomassa para sua conversão em etanol de segunda geração.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta tese de doutorado foi o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a caracterização da composição de açúcares (arabinose, galactose, glicose, xilose e manose) na transformação de biomassa de cana-de-açúcar em etanol de segunda geração utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com um Detector Eletroquímico. Para isso foram desenvolvidos detectores eletroquímicos baseados em eletrodos quimicamente modificados de nanotubos de carbono contendo óxidos metálicos, como óxido de níquel e óxido de cobalto. Foi desenvolvida também a construção de uma língua eletrônica para a determinação de açúcares provenientes da biomassa de cana-de-açúcar (bagaço + palha) para a geração de etanol de segunda geração.

CAPÍTULO II

Eletrooxidação de açúcares no eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) contendo óxi-hidróxido de níquel.

1. INTRODUÇÃO

Primeiramente foi realizado o estudo do comportamento eletroquímico da eletro-oxidação dos açúcares, a fim de elucidar a cinética das reações eletroquímicas envolvidas. Na literatura são encontrados vários exemplos de trabalhos abordando este tema, tal como relatado por Berchmans, Gomathi e Rao (1995) que estudaram a cinética da eletro-oxidação de açúcares e álcoois utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de níquel, no qual através da relação entre corrente anódica e concentração dos açúcares determinaram as constantes de velocidade de transferência heterogênea eletrônica da oxidação dos compostos orgânicos frente ao eletrodo modificado com óxido de níquel.

Devido o interesse na construção de sensores para açúcares é importante estudar a oxidação eletrocatalítica de açúcares. Foram estudados as oxidações eletroquímicas diretas dos açúcares em meio alcalino usando o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas com óxi-hidróxido de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH) e eletrodo de carbono vítreo modificado com óxi-hidróxido de níquel (GCE/NiOOH) para vários açúcares (glicose, galactose, manose, arabinose e xilose).

Os estudos de morfologia dos materiais foram realizados utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV). As propriedades de oxi-redução da cinética de transferências de elétrons dos eletrodos modificados foram investigadas usando voltametria cíclica (CV). As oxidações eletroquímicas diretas e os valores das taxas das constantes das reações de oxidação dos açúcares em meio alcalino foram investigadas usando voltametria cíclica e cronoamperometria.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

Todos os experimentos foram realizados utilizando reagentes de grau de pureza analítica. Na preparação das soluções foi utilizada água deionizada (Millipore, Billerica, MA, USA). Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas com pureza de 95% foram fornecidos por Dropsens-Spain. Os reagentes nitrato de níquel (II), N, N-dimetilformamida 99,8% (C₃H₇NO), L-arabinose, D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxi-hidróxido de níquel (GCE/NiOOH) e modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas contendo óxi-hidróxido de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH)

Os eletrodos de carbono vítreo (GCE) foram polidos com alumina 0,3 µm, depois lavados com água destilada e etanol.

Foram realizados estudos com diversas concentrações de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), onde os nanotubos foram pesados e dispersados em N,N-dimetilformamida (DMF) com agitação ultrassônica por 30 minutos obtendo-se as concentrações de 0,2; 0,35; 0,5; 0,75; e 1,0 mg mL⁻¹.

Foram realizados estudos de varias concentrações de nitrato de níquel (II)-Ni(NO₃)₂.6H₂O (1,0×10⁻⁴; 5,0×10⁻⁴; 1,0×10⁻³; 2,0×10⁻³; 2,5×10⁻³ mol L⁻¹) para as modificações dos eletrodos com nanotubos de carbono.

Na modificação do eletrodo de carbono vítreo, foi adicionada a suspensão de nanotubos de acordo com as concentrações em estudo e colocados na superfície do eletrodo GCE, secou-se o eletrodo GCE contendo nanotubos de carbono durante 1,0 hora em uma estufa com 50 °C. Logo após foi transferido 10 µL da solução de Ni(NO₃)₂.6H₂O de acordo com a concentração em estudo para a superfície do eletrodo, secou-se a 50° C em uma estufa por 25 min, esse eletrodo foi denominado por CGE/MWCNT/NiOOH.

Para a modificação do eletrodo de carbono vítreo (GCE) somente com nitrato de níquel, foram pipetados 10 μL da solução aquosa de $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na superfície do GCE, secou-se o eletrodo a 50°C durante 25 min, o eletrodo foi denominado por CGE/NiOOH.

Os eletrodos foram condicionados em solução de $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$, até os voltamogramas atingirem o estado estacionário, utilizando a técnica de voltametria cíclica em uma faixa de potencial limitados entre 0,1 e 0,6 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Estes eletrodos foram utilizados nos estudos de oxidação dos açúcares de arabinose, glicose, galactose, xilose e manose.

2.3. Instrumentação

2.3.1. Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas dos eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH e GCE/NiOOH foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30, empregando uma célula convencional contendo três eletrodos, sendo utilizado um eletrodo de referência de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$), um eletrodo auxiliar de platina ($3,0 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm}$) e um eletrodo de carbono vítreo (área geométrica de $0,070 \text{ cm}^2$) como eletrodo de trabalho.

Os eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH foram caracterizados por voltametria cíclica. O estudo da velocidade de varredura nos eletrodos modificados foi realizado entre 10 e 700 mV s^{-1} em uma janela de potencial entre 0,1 a 1,0 V vs. Ag/AgCl em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH . Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de 25°C .

Os comportamentos eletroquímicos dos eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH em presença dos açúcares foram realizados em uma célula eletroquímica contendo uma solução de 10 mL de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH utilizando a técnica de voltametria cíclica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A corrente catalítica foi determinada através da diferença entre a corrente medida na ausência e na presença dos açúcares. Os estudos de cronoamperometria foram realizados em solução de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ de açúcares, sendo aplicado o potencial de oxidação de 0,6 V vs. vs. Ag/AgCl.

2.3.2. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH

Para a caracterização microscópica do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG) da marca Jeol, modelo JSM 7500F, Nas análises dos filmes foram utilizados placas de carbono vítreo com área total de 1 cm² e espessura de 0,2 cm, sendo a área recoberta pelos filmes de 0,070 cm² seguindo o mesmo procedimento descrito no item 2.2.

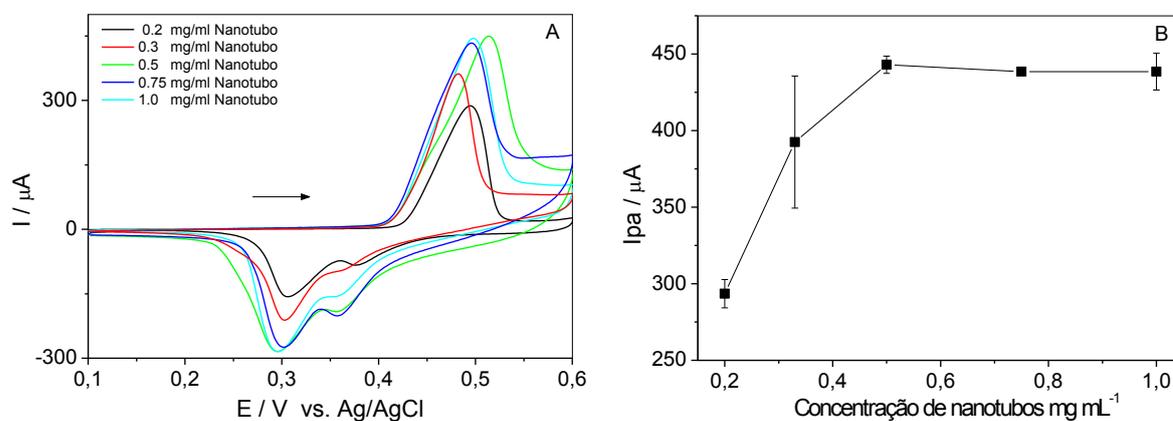
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Estudos de otimização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas na superfície do carbono vítreo.

Inicialmente foram realizados os estudos de concentração de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) na superfície do eletrodo de carbono vítreo utilizando um volume constante de 20 µL de suspensão de nanotubos/DMF e foi adicionado um volume constante de 10 µL de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de Ni(NO₃)₂.6H₂O. Os voltamogramas cíclicos foram realizados em solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

De acordo com a Figura 1 observa-se que a partir de 0,5 mg mL⁻¹ de MWCNT as correntes anódicas praticamente não se alteram, indicativo de que os nanotubos de carbono estão recobrendo toda a superfície do carbono vítreo. Assim sendo, foi escolhido a concentração de 1,0 mg mL⁻¹ de MWCNT para a modificação dos eletrodos.

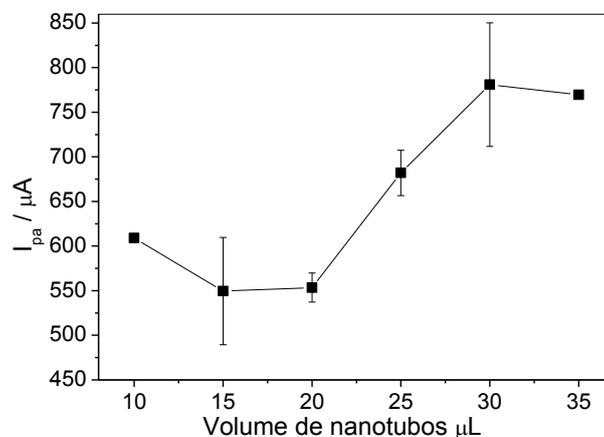
Figura 1- A) Voltamogramas cíclicos dos estudos de concentração de nanotubos de carbono de paredes múltiplas na superfície de carbono vítreo; B) Estudo da concentração de nanotubos de carbono para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com volume de nanotubos de carbono de 35 μL e solução de 10 μL de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



Fonte: Autor (2015).

O estudo dos volumes de suspensão de nanotubos/DMF foi realizado mantendo-se constante a concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT e utilizando um volume de 10 μL de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A Figura 2 mostra que as correntes anódicas aumentam de acordo com o aumento do volume de MWCNT adicionados na superfície do eletrodo de carbono vítreo, sendo que a partir de 30 μL a corrente anódica permanece praticamente constante, indicativo do recobrimento de toda superfície do carbono vítreo por nanotubos de carbono. Assim sendo, foi escolhido o volume de 35 μL de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de MWCNT para a modificação dos eletrodos.

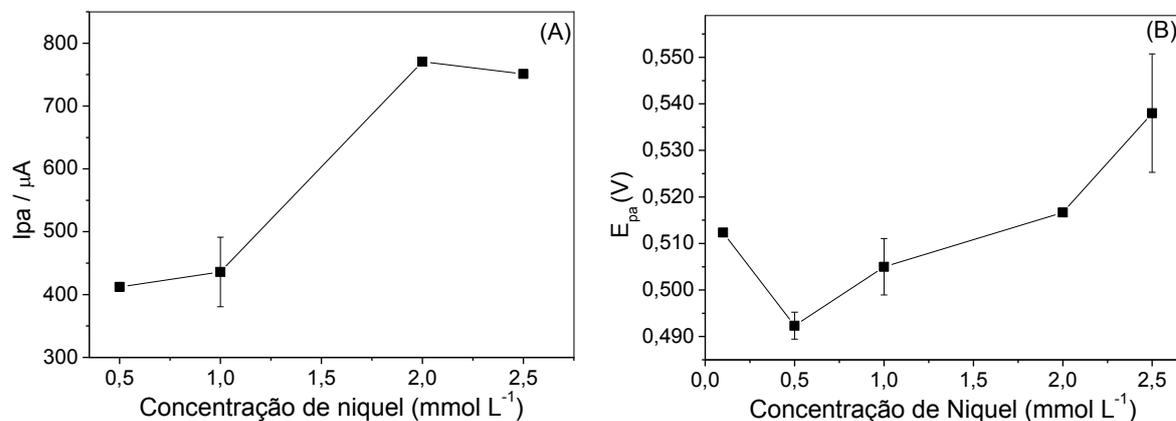
Figura 2 - Estudo de volume de nanotubos de carbono de paredes múltiplas ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) na superfície de carbono vítreo para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com solução de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



Fonte: Autor (2015).

Os estudos da concentração de níquel realizados mostram que conforme a concentração de nitrato de níquel é aumentada, há um ganho significativo de corrente anódica, porém a partir de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ as correntes anódicas praticamente não são alteradas (Figura 3-A). Foi também observado que conforme as concentrações são aumentadas a partir de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ os potenciais começam a se deslocar gradativamente conforme pode ser visto na Figura 3-B, sendo que os potenciais de oxidação e redução são deslocados para valores positivos e negativos, respectivamente. Assim foi selecionada para preparação do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH a concentração de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Figura 3 - (A) Estudos das concentrações de níquel na superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com 35 μL de 1.0 mg ml^{-1} de MWCNT em relação com a corrente de pico anódico; (B) Estudos das concentrações de níquel na superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com 35 μL de 1.0 mg ml^{-1} de MWCNT em relação com a potencial de pico (NaOH 0,1 mol L^{-1} , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



Fonte: Autor (2015).

3.2. Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH

Após a modificação dos eletrodos de carbono vítreo, o comportamento eletroquímico apresentado em 0,1 mol L^{-1} de NaOH mostra dois picos de corrente correspondente ao potencial anódico (E_{pa}) e catódico do par redox $\text{Ni}^{(II)}/\text{Ni}^{(III)}$ (NIE et al., 2011; TOGHILL et al., 2010b)(Figura 4) para efeito de comparação foram colocados na figura os eletrodos GCE, GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH. A Equação 1 representa o processo redox para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH.

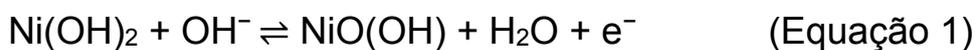
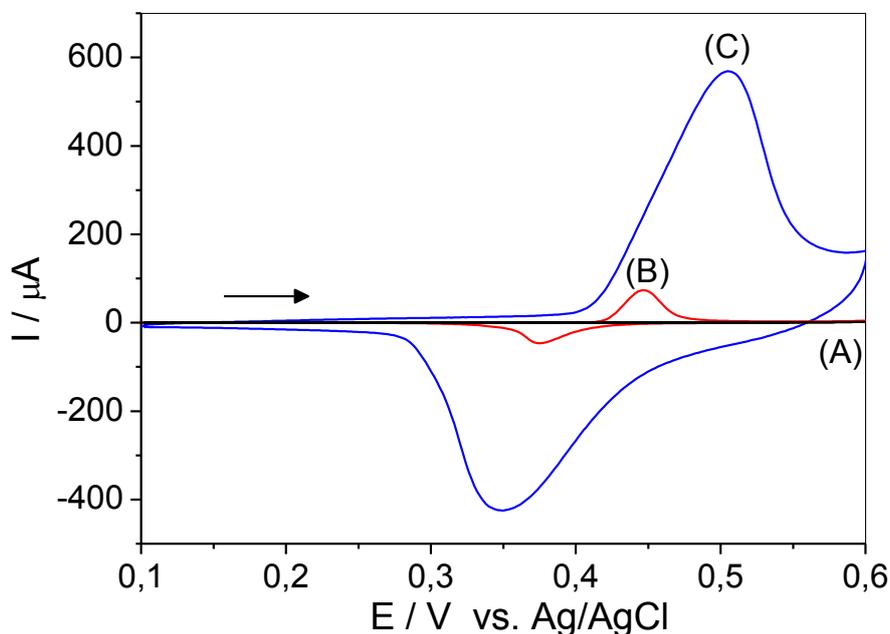


Figura 4 - Voltamogramas cíclico dos eletrodos (A) GCE, (B) GCE/NiOOH e (C) GCE/MWCNT/NiOOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)



Fonte: Autor (2015).

A Figura 4-C mostra o voltamograma cíclico de GCE/MWCNT/NiOOH onde podem ser vistos um par de picos com E^0 ($\frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$) e ΔE_p de 0,43 V e 0,15 V respectivamente, na velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Embora os picos de potenciais anódicos e catódicos exibem valores próximos para ambos os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH, a corrente de pico anódica e catódica de GCE/MWCNT/NiOOH apresentam valores muito mais elevados quando comparadas com o eletrodo GCE/NiOOH conforme mostrado na Figura 4-B. Estes aumentos relativos de correntes de pico são resultante do aumento da área superficial fornecida pelos nanotubos de carbono na superfície de GCE/MWCNT/NiOOH (SALINAS-TORRES et al., 2011; SHAMSIPUR; NAJAFI; HOSSEINI, 2010).

O excesso superficial do eletrodo (Γ) pode ser avaliada a partir da área do pico anódico realizado na técnica de voltametria cíclica através da carga (Q) (BARD; FAULKNER, 2001) para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH, segundo a Equação 2:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday e A é a área da superfície do eletrodo GCE.

O valor de $4,3 \times 10^{-8}$ mol cm^{-2} foi encontrado para GCE/NiOOH e $3,2 \times 10^{-7}$ mol cm^{-2} para GCE/MWCNT/NiOOH, isso pode indicar que na presença de nanotubos de carbono as espécies de níquel estão mais distribuídas na superfície do eletrodo e consequentemente ser a causa de picos de correntes mais elevados no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH.

A Figura 5-A e Figura 6-A são apresentados os voltamogramas cíclicos dos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH em diferentes velocidades de varredura ($2-700$ mV s^{-1}) em NaOH $0,1$ mol L^{-1} na faixa de potencial de $-0,1$ a $1,0$ V. Nesta figura é observado a separação de potenciais de pico, a qual aumenta com o incremento das velocidades de varredura. Em acordo com a literatura (KARIM-NEZHAD et al., 2009; LAVIRON, 1979) estes resultados indicam uma limitação nas cinéticas de transferência de carga, atribuídas a vários fatores, tais como interações químicas entre os íons do eletrólito e do eletrodo modificado, domínio de fatores eletrostáticos, interações adjacentes dos pares redox presentes na superfície do eletrodo e sítios não-equivalentes presentes na superfície do eletrodo.

Foram calculados os parâmetros cinéticos para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH. Através da expressão geral de Laviron, para pequenas concentrações de espécies confinadas na superfície do eletrodo é possível determinar o coeficiente de transferência de carga (α) e a constante de transferência de elétrons heterogênea (k_s) através da variação dos potenciais de pico em função da velocidade de varredura.

O ΔE_p aumenta em um valor muito pequeno, quando a velocidade de varredura é aumentada de 2 a 200 mV s^{-1} . No entanto, para velocidades de varredura mais elevadas (> 200 mV s^{-1}), a separação de pico é muito maior, indicando as limitações resultantes da cinética de transferência de carga (KUMAR; NARAYANAN, 2008).

Na Figura 5 -B e Figura 6-B são apresentadas as relações de corrente de pico em função da velocidade de varredura no intervalo de $2 - 700$ mV s^{-1} , sendo que as correntes de pico anódica e catódica são proporcionais à raiz quadrada da velocidade de varredura indicando um processo controlado por difusão para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/ MWCNT/NiOOH. No entanto, as correntes de picos são proporcionais a velocidade de varredura no intervalo de 2 a 100 mV s^{-1} ,

apontando para um processo eletródico controlado por adsorção (BARD; FAULKNER, 2001; KUMAR; NARAYANAN, 2008).

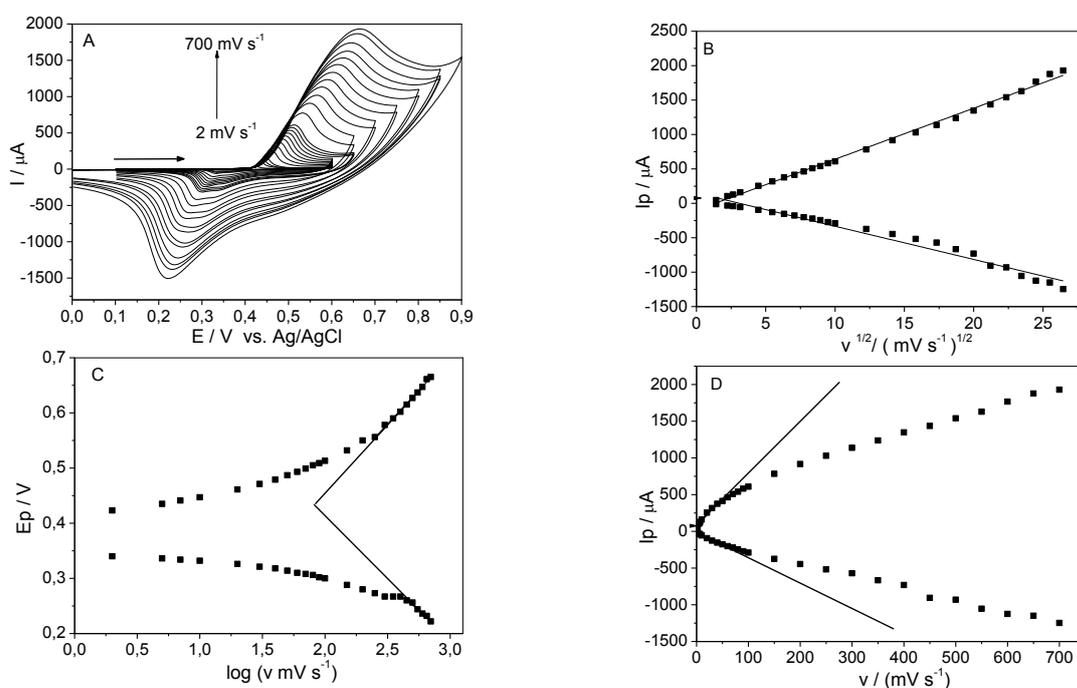
O gráfico de E_p vs $\log v$ fornece retas com inclinações de $-2,3 RT/anF$ para o pico catódica e $2.3 RT/(1-\alpha)nF$ para o pico anódico. Uma vez conhecido o valor de n , a partir destas expressões o α pode ser determinado pela inclinação da variação do potencial de pico em relação à velocidade de varredura de potenciais mostrados nas Figura 5-C e Figura 6-C. Nestas condições, a Equação 3 pode ser usada para determinar a constante de velocidade de transferência de elétrons (k_s) dos eletrodos GCE/NiOOH e/ou GCE/MWCNT/NiOOH:

$$\log k_s = \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log (RT/nFv) - \alpha(1-\alpha) nF \Delta E_p/2.3RT \quad (\text{Equação 3})$$

onde $n=1$, $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$, v é a velocidade de varredura (KARIM-NEZHAD et al., 2009).

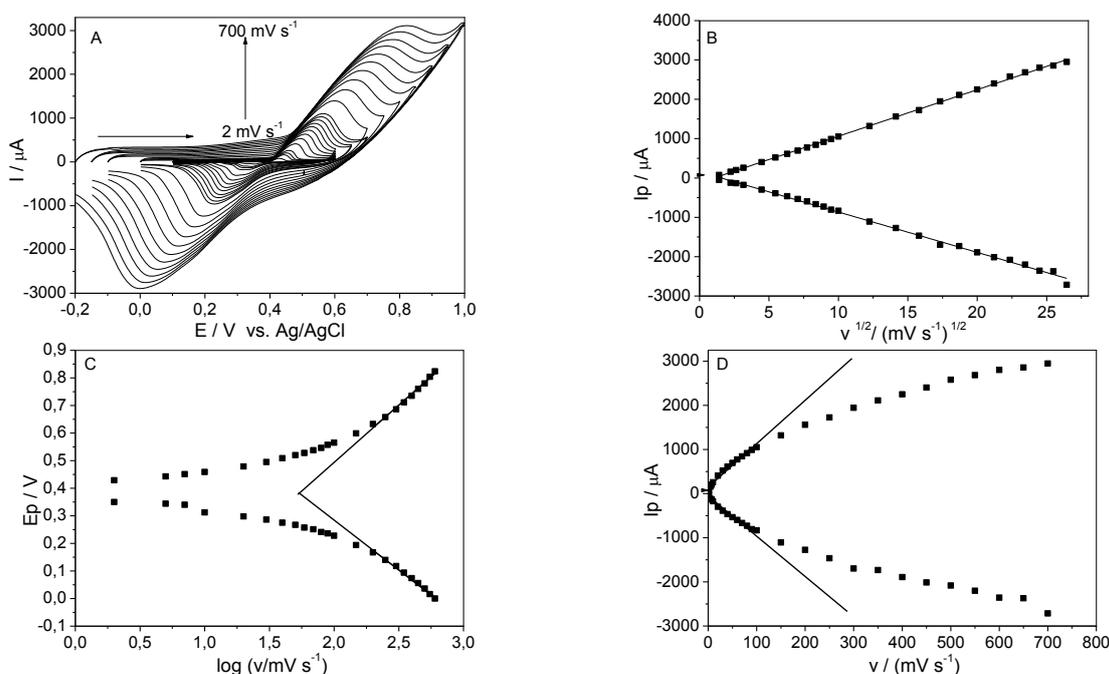
Os valores determinados de k_s para GCE/NiOOH foi de $0,18 \text{ s}^{-1}$ e $0,10 \text{ s}^{-1}$ para GCE/MWCNT/NiOOH, sendo que os valores determinados de α foi de $0,76$ para GCE/NiOOH e $0,85$ para GCE/MWCNT/NiOOH. Ao comparar os valores de k_s entre GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH, nota-se que GCE/NiOOH possui uma velocidade maior de transferência eletrônica do par redox $\text{Ni}^{(II)}/\text{Ni}^{(III)}$, essa diferença de k_s pode ser atribuída a ausência de nanotubos de carbono no eletrodo GCE/NiOOH favorecendo a transferência eletrônica $\text{Ni}^{(II)}/\text{Ni}^{(III)}$ na superfície do eletrodo modificado.

Figura 5 - (A) Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/NiOOH em NaOH 0,1 mol L⁻¹. Velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 e 700 mV s⁻¹. (B) Dependência dos picos de correntes anódicas e catódicas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura entre 2–700 mV s⁻¹. (C) Estudo de E_p versus log v para voltamogramas cíclicos representados em (A) para picos de correntes anódicas e catódicos. (D) Dependência dos picos de correntes anódicas e catódicas em função da velocidade de varredura entre 2-700 mV s⁻¹



Fonte: Autor (2015).

Figura 6 – (A) Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em NaOH 0,1 mol L⁻¹. Velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 e 700 mV s⁻¹. (B) Dependência dos picos de correntes anódicos e catódicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura entre 2 – 700 mV s⁻¹. (C) Estudo de E_p versus $\log v$ para voltamogramas cíclicos representados em (A) para picos de correntes anódicos e catódicos. (D) Dependência dos picos de correntes anódicos e catódicos em função da velocidade de varredura entre 2-700 mV s⁻¹



Fonte: Autor (2015).

3.3. Caracterização microscópica

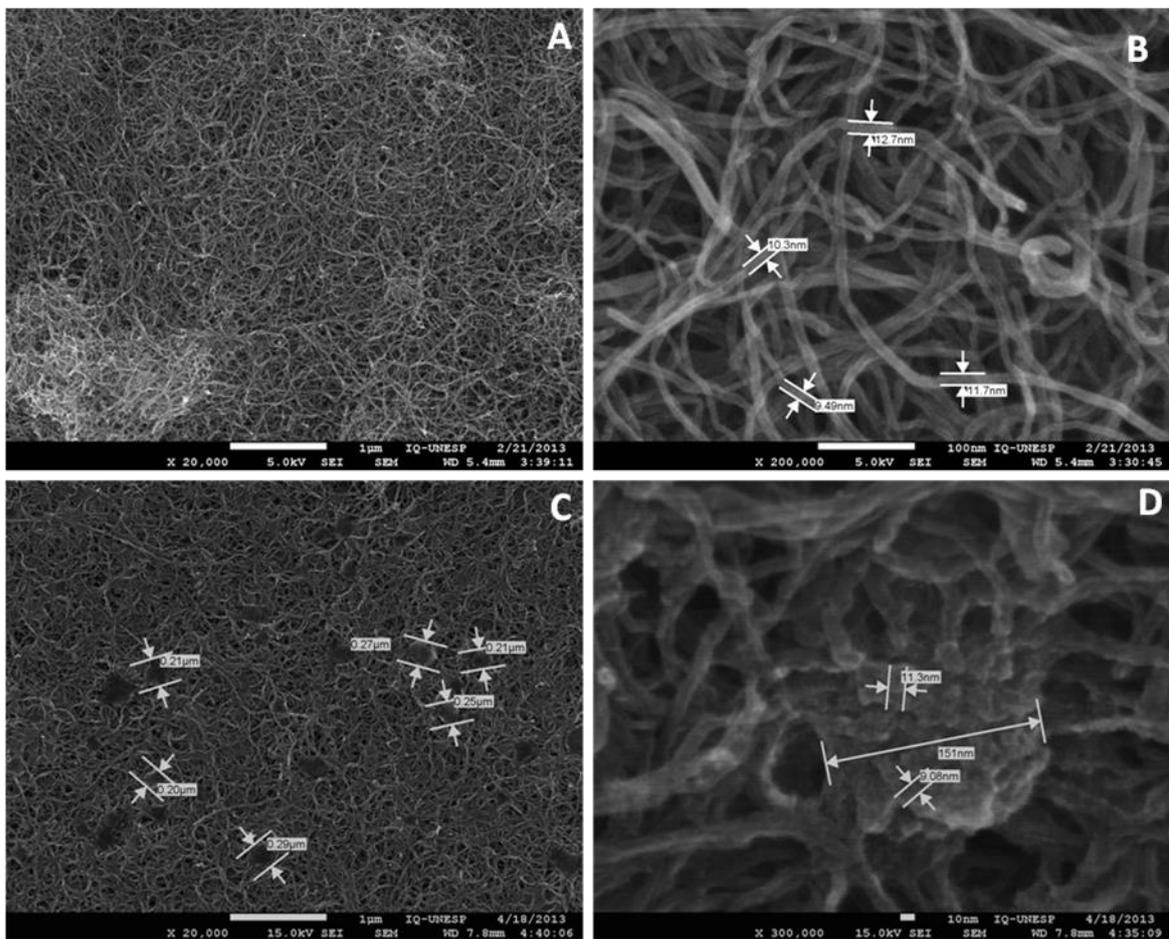
Os eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) e GCE/MWCNT/NiOOH foram estudados comparando a morfologia das superfícies em diferentes ampliações das imagens de micrografias geradas por SEM-FEG. De acordo com a Figura 7 (A e B), observa-se que os nanotubos de carbono estão totalmente dispersos na superfície de GCE e na Figura 7-B são apresentados detalhes dos nanotubos que permitiram estimar o seu tamanho, o qual apresenta um diâmetro de aproximadamente 11 nm, consistente com a especificação emitida pelo fabricante.

A modificação do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH é apresentada na Figura 7 (C e D). A Figura 7-C mostra partículas de tamanhos diferentes em torno de 0,25 μm , as quais estão dispersas sobre a superfície dos nanotubos. No entanto quando

se analisa a Figura 7-D observa-se um tamanho médio de 10 nm dos aglomerados, constituindo uma única partícula.

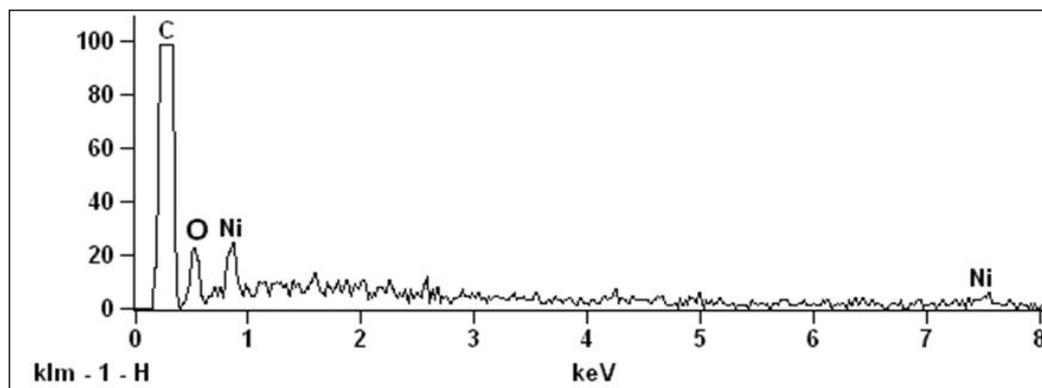
Uma indicação do sucesso da modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos e óxi-hidróxido de níquel é mostrado na Figura 8, onde através do espectro de EDS, são observados os picos dos elementos níquel e oxigênio, que é um indicativo do sucesso da modificação com partículas de níquel sobre os nanotubos de carbono.

Figura 7 - Imagens de MEV para nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) com ampliações: (A) 10.000; (B) 20.000 and CGE/MWCNT/NiOOH: (C) 200.000; (D) 300.000 vezes



Fonte: Autor (2015).

Figura 8: Espectro de EDS para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH



3.4. Eletro-oxidação de açúcares

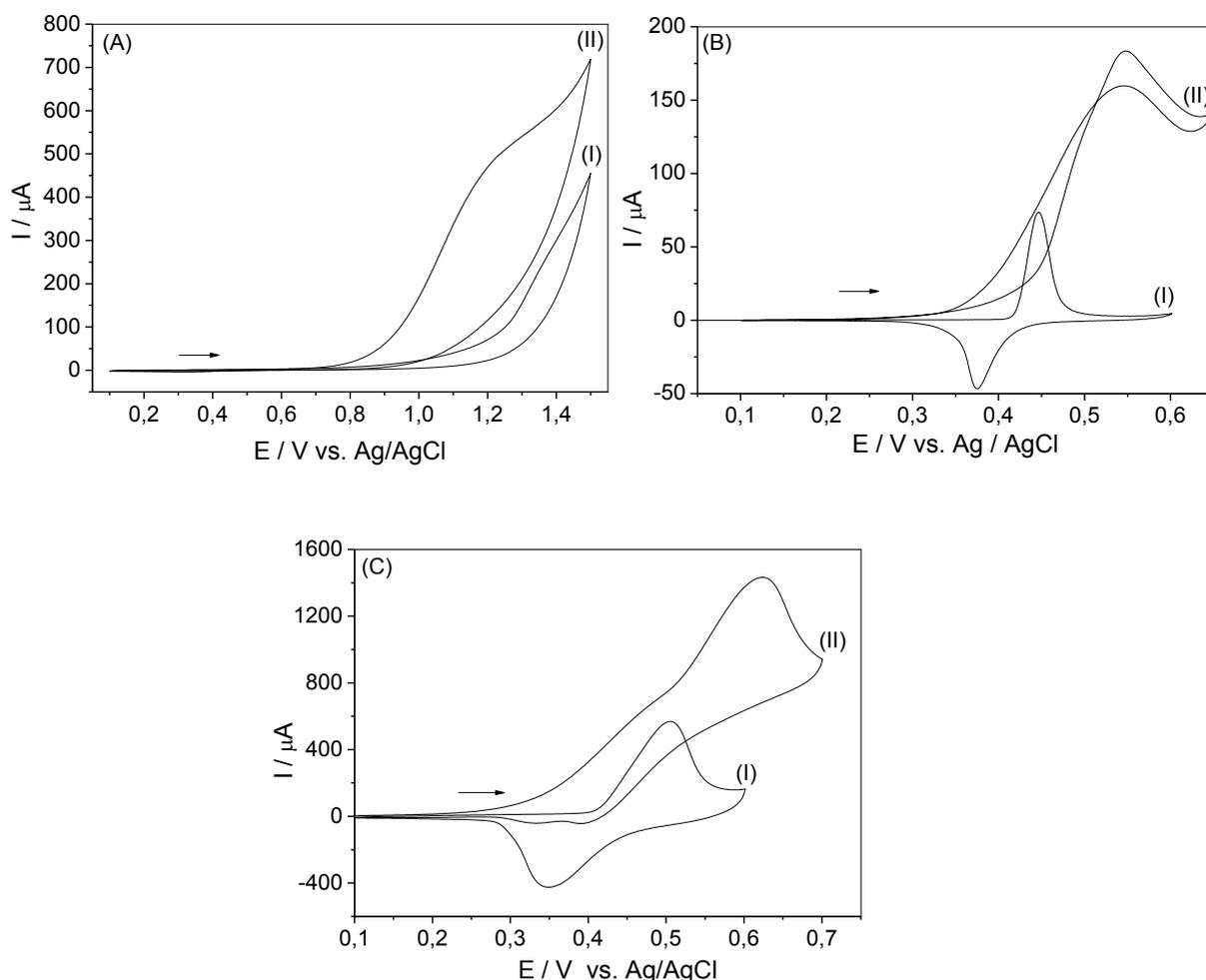
A eletro-oxidação de açúcares no eletrodo de carbono vítreo sem modificação foi estudada por voltametria cíclica, na Figura 9-A mostra a eletro-oxidação da galactose, que requereu potenciais de pico em torno de 1,2 V vs. Ag / AgCl.

A eletro-oxidação da galactose em eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH como mostra na Figura 9 (B e C) ocorreram em potenciais menores, em 0,55 V vs. Ag/AgCl associado com o aumento do pico de corrente anódica e diminuição do pico corrente catódica.

De acordo com a literatura (NIE et al., 2011), a eletro-oxidação dos carboidratos nos eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH ocorre na presença do catalisador Ni^(III), durante o processo de redução do catalisador para Ni^(II) e formação de cetonas (KUSEMA; MURZIN, 2013; KUSEMA et al., 2010; LI et al., 2012; MURZIN; SALMI, 2012; RIZZOTTO et al., 1996) as reações gerais propostas para a oxidação dos carboidratos são:



Figura 9 - Voltamogramas cíclicos contendo a eletro-oxidação de (I) ausência e (II) presença de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de galactose: (A) eletrodo GCE; (B) eletrodo GCE/NiOOH e (C) eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$; 50 mV s^{-1})



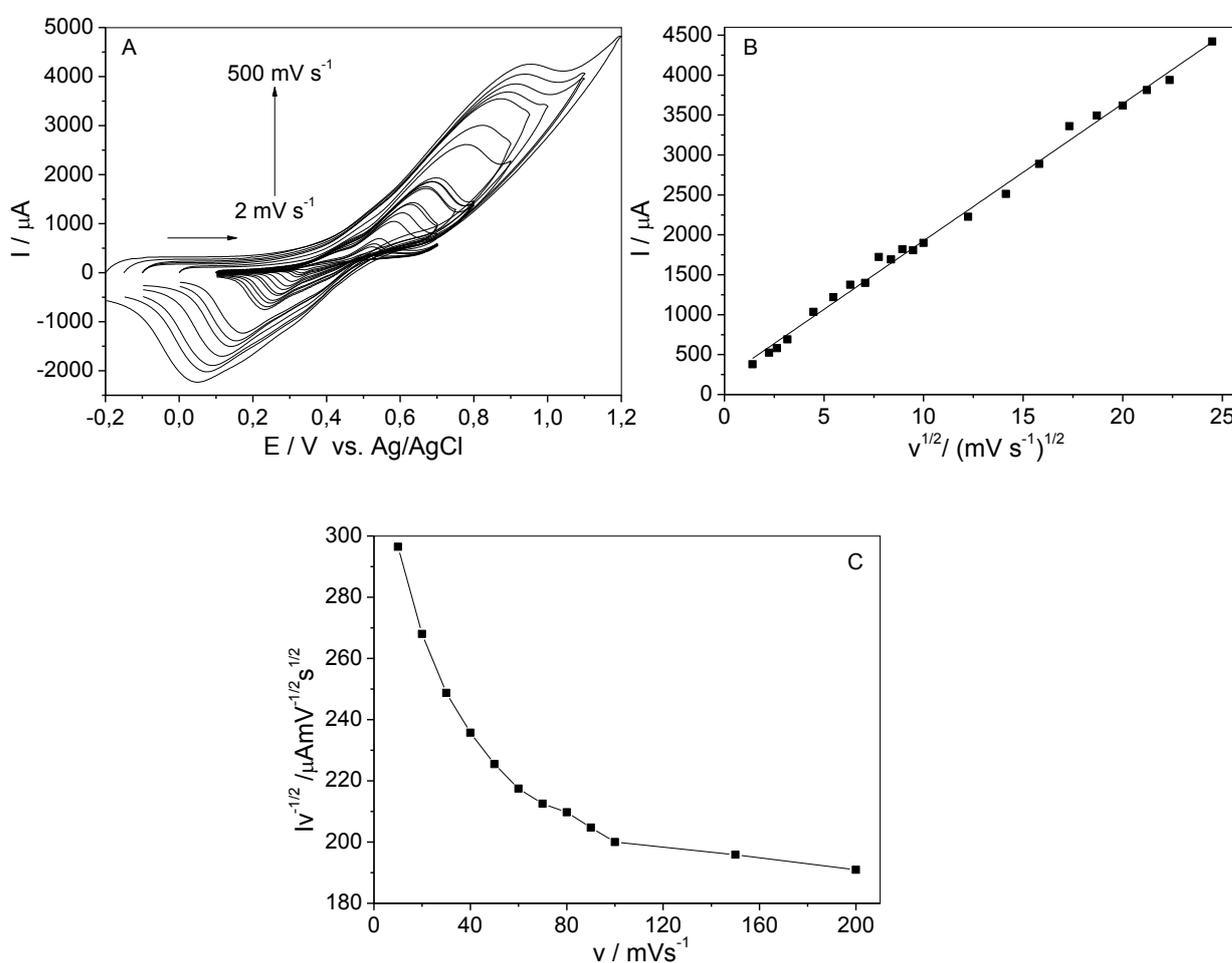
Fonte: Autor (2015).

A Figura 10-A mostra os voltamogramas cíclicos do estudo de velocidades de varredura do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em presença de galactose $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, observou-se que o potencial de pico da oxidação catalítica de galactose é deslocado para potenciais cada vez mais positivo com o aumento da velocidade de varredura, este resultado sugere a limitação cinética da reação nos locais redox do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH. A Figura 10-B mostra que a corrente anódica é proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando um processo eletroquímico controlado por difusão (BARD; FAULKNER, 2001; KARIM-NEZHAD et al., 2009) de acordo com a equação $I_{pa} = -2,50 \times 10^{-5} + 2,24 \times 10^{-4} v^{1/2}$ e coeficiente de correlação de 0,994. A Figura 10-C mostra uma relação entre a função $Iv^{-1/2}$ e v , o qual se observou um comportamento correspondente a um processo eletroquímico

acompanhado de uma reação química (EC) (SHAMSIPUR; NAJAFI; HOSSEINI, 2010).

Todos os estudos de influência da velocidade de varredura foram realizados para outros açúcares (arabinose, glicose, manose e xilose) e os comportamentos foram similares.

Figura 10 – (A) Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em galactose $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Estudo de velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mV s^{-1} . (B) Gráfico da dependência do pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura dos valores entre 2 a 500 mV s^{-1} . (C) Gráfico da função da corrente anódica ($Iv^{-1/2}$) vs. Velocidade de varredura (v).



Fonte: Autor (2015).

3.5. Estudo da área dos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH

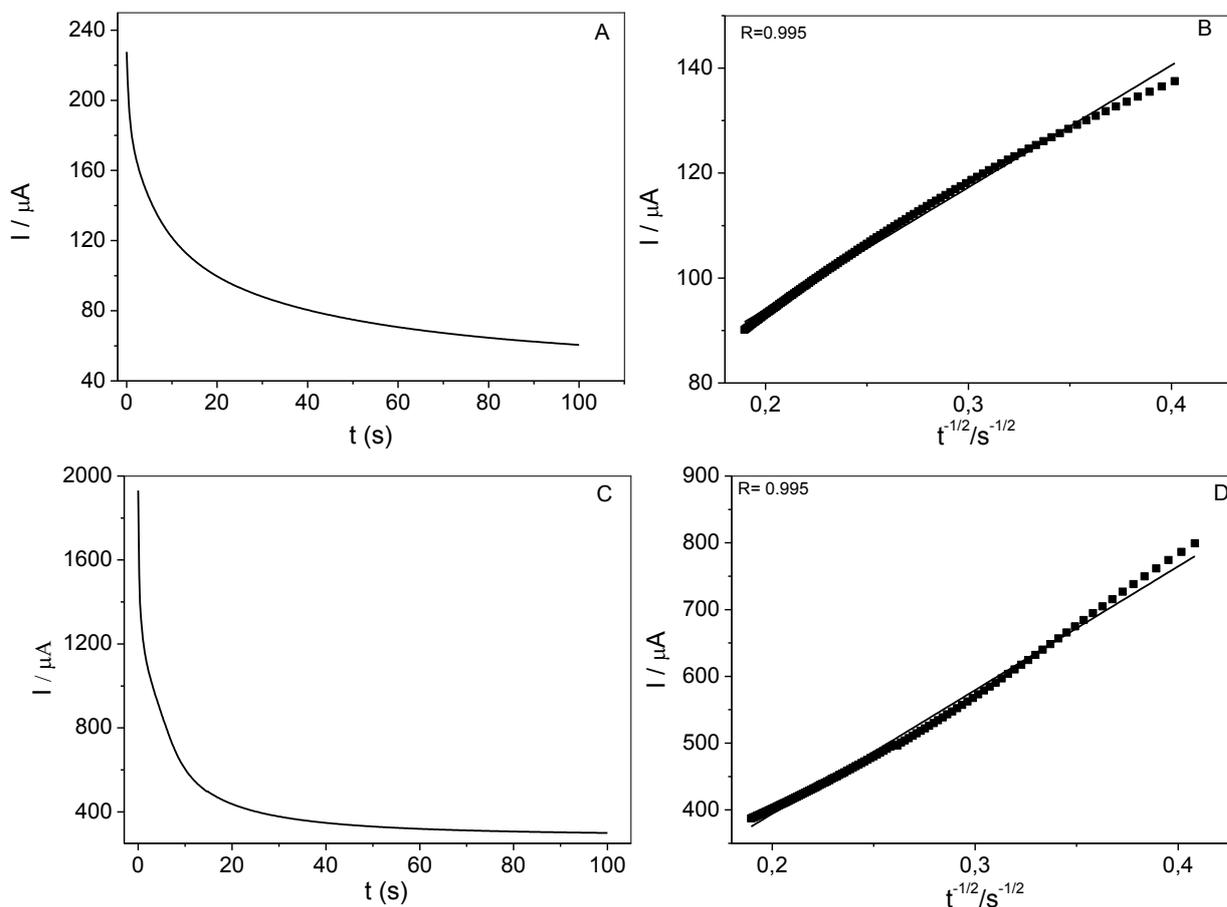
A cronoamperometria foi empregada para a investigação da superfície dos eletrodos modificados. A Figura 11 mostra a cronoamperometria de 0,01 mol L⁻¹ de galactose nos eletrodos modificados de GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH em um potencial fixo de 0,6 V vs Ag/AgCl.

De acordo com a equação de Cottrell foi possível determinar a intensidade de corrente conforme Equação 9 (BARD; FAULKNER, 2001; SHAMSIPUR; NAJAFI; HOSSEINI, 2010).

$$I = nFAD^{1/2}C / \pi^{1/2} t^{1/2} \quad (\text{Equação 9})$$

onde: I é a corrente a um tempo t, n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, C é a concentração das espécies oxidadas, D é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas e A é a área do eletrodo, que foram determinadas utilizando as equações para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH, a qual foi utilizado o coeficiente angular do gráfico I vs t^{-1/2} obtendo assim as equações I_{μA}=4,47×10⁻⁵ + 2,33×10⁻⁴ s^{-1/2} para GCE/NiOOH e I_{μA}=2,38×10⁻⁵ + 0,00185 s^{-1/2} para GCE/MWCNT/NiOOH, indicando que o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH é em torno de 8 vezes maior que a área do eletrodo GCE/NiOOH, comprovando que os nanotubos de carbono aumentam a área superficial dos eletrodos (SHAMSIPUR; NAJAFI; HOSSEINI, 2010).

Figura 11 - (A) cronoamperograma do eletrodo GCE/NiOOH (B) regressão linear da corrente anódica em função da raiz quadrada de tempo para o eletrodo GCE/NiOOH. (C) cronoamperograma do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH (D) regressão linear da corrente anódica em função da raiz quadrada de tempo para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH; todos estes estudos foram realizados contendo 0,01 mol L⁻¹ de galactose em NaOH 0,1 mol L⁻¹.



Fonte: Autor (2015).

3.6. Estudo cinético da oxidação eletrocatalítica dos açúcares

A semi-reação da oxidação para a galactose pode ser representada através da seguinte equação:



onde a galactose está na forma eletroativa reduzida, galactonolactona são espécies eletroativas na sua forma oxidada e k é a constante de velocidade eletrocatalítica. Considerando a dependência exponencial da taxa de k com

sobrepotencial (CONWAY; MACKINNON; TILAK, 1970; RÜETSCHI; ANGSTADT; CAHAN, 1959; SANTANA; FARIA; BOODTS, 2005a, 2005b), a reação do processo eletroquímico, j , é dada pela equação:

$$j = k_f [\text{galactose}^{\text{red}}]^{\nu} \exp\left(\frac{\alpha n F \eta}{RT}\right) - k_b [\text{galactonolactona}^{\text{ox}}]^{\nu} \exp\left[\frac{-(1-\alpha)n F \eta}{RT}\right]$$

(Equação 11)

Sob a condição de alto campo ($\eta > 0,1$ V), o componente catódico da **Error! Reference source not found.** torna-se insignificante, o que resulta na seguinte expressão:

$$j = k_f [\text{galactose}^{\text{red}}]^{\nu} \exp\left(\frac{\alpha n F \eta}{RT}\right) \quad (\text{Equação 12})$$

onde k_f é a constante de velocidade na direção anódica, α é o coeficiente de transferência, $[\text{galactose}^{\text{red}}]$ é a concentração de espécies eletroativas na superfície do eletrodo, e ν é a ordem de reação correspondente para espécies galactonolactona, os demais símbolos são usuais, linearizando a Equação 12 é obtido a seguinte equação:

$$\ln j = \ln k_f + \nu \ln [\text{galactose}^{\text{red}}] + \frac{\alpha n F \eta}{RT} \quad (\text{Equação 13})$$

Considerando-se que a curva de Tafel é E vs. $\log j$, e que o coeficiente de Tafel, b , é definido como o coeficiente angular, a Equação 13 deve ser rearranjada de modo a obter dependência de E vs. $\log j$, que é dada pela seguinte expressão:

$$E = E^{\circ} + \frac{2,303RT(\log j - \log k_f - \nu \log [\text{galactose}^{\text{red}}])}{\alpha n F} \quad (\text{Equação 14})$$

A Equação 14 mostra que os valores de b devem ser calculados a partir da relação de E vs. $\log j$, de acordo com a derivada parcial:

$$b \equiv \left(\frac{\partial E}{\partial \log j}\right)_{T, [\text{galactose}^{\text{red}}]} \quad (\text{Equação 15})$$

Aplicando a definição do coeficiente de Tafel que é dado por:

$$b = \frac{2,303RT}{\alpha F} \quad (\text{Equação 16})$$

A Figura 12 mostra as curvas de Tafel para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH que foram registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em presença de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de galactose com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Os coeficientes de Tafel, coeficiente de transferência eletrônico (α) e constante da

velocidade eletrocatalítica (k) para todos os açúcares nos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de coeficientes de Tafel, coeficiente de transferência eletrônica (α) e constante da velocidade eletrocatalítica (k) para todos os açúcares no estudo com GCE/NiOOH e eletrodos de GCE/MWCNT/NiOOH.

Açúcar	GCE/NiOOH			GCE/MWCNT/NiOOH		
	Coeficiente de Tafel (mV)/década	α	k (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	Coeficiente de Tafel (mV)/década	α	k (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
Glicose	184,1	0,32	1,3×10 ³	128,3	0,46	4,3×10 ⁴
Galactose	190,5	0,31	1,1×10 ³	159,7	0,37	2,1×10 ⁴
Manose	163,0	0,21	8,3×10 ²	262,1	0,22	1,4×10 ⁴
Arabinose	221,0	0,26	8,9×10 ²	215,0	0,27	2,1×10 ⁴
Xilose	175,2	0,22	8,3×10 ²	251,8	0,23	2,0×10 ⁴

Fonte: Autor (2015).

A cinética da reação de oxidação de açúcares com os sítios redox dos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH foram investigados por cronoamperometria de acordo com a Equação 17 (BARD; FAULKNER, 2001; KARIM-NEZHAD et al., 2009).

$$\frac{I_{catal}}{I_d} = \lambda^{1/2} \left[\pi^{1/2} erf(\lambda^{1/2}) + \frac{\exp(-\lambda)}{\lambda^{1/2}} \right] \quad (\text{Equação 17})$$

Onde I_{catal} é a corrente catalítica em presença de açúcar, I_d é a corrente limite na ausência de açúcar, $\lambda = kCt$ (k, C e t são a constante de velocidade eletrocatalítica, concentração de açúcar durante o estudo e tempo da medida cronoamperométrica, respectivamente) e erf é descrito como função de erro. Para $\lambda > 1.5$, $erf(\lambda^{1/2})$ é igual à unidade e a Equação 17 se reduz para:

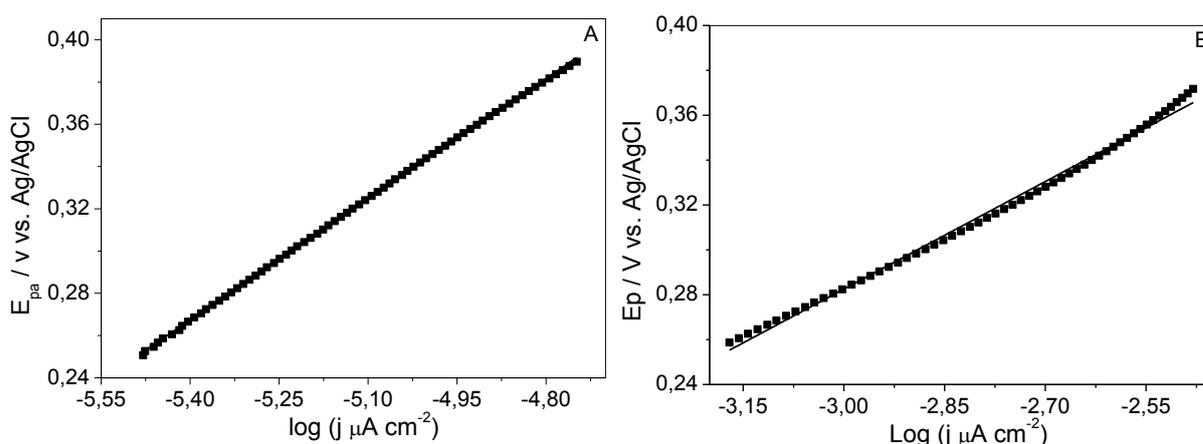
$$\frac{I_{catal}}{I_d} = \lambda^{1/2} \pi^{1/2} = \pi^{1/2} (kCt)^{1/2} \quad (\text{Equação 18})$$

A partir do coeficiente angular do gráfico I_{catal}/I_d o valor de k é derivado a uma dada concentração de açúcar. A Figura 13 mostra os cronoamperogramas de todos os açúcares. Os valores de k foram estudados em concentrações de $2,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de açúcares.

Observou-se maiores valores das constantes eletrocatalítica dos açúcares (k) para GCE/MWCNT/NiOOH pode ser atribuído ao fato da maior área superficial fornecida por nanotubos de carbono na superfície modificada do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, essa diferença de k observada entre diferentes açúcares pode ser atribuída à dificuldade de adsorção nos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH. Para sofrer oxidação eletroquímica estas moléculas devem estar adsorvidas sobre a superfície do eletrodo e formam diferentes intermediários que também são oxidados na superfície dos eletrodos altamente catalíticos, sendo assim as constantes eletrocatalíticas dos açúcares acabam também sendo diferentes.

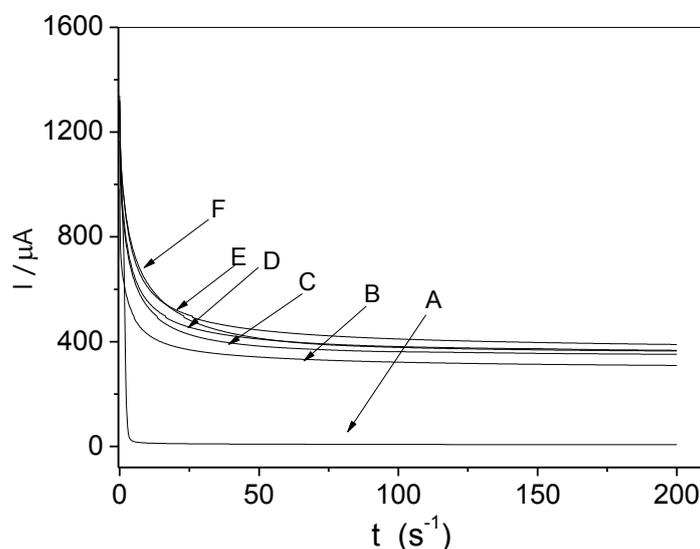
Como relatado por alguns autores (SCHÄFER; SCHNEIDER, 1991; VIDOTTI et al., 2009) a oxidação de açúcares na superfície dos eletrodos é realizado principalmente por grupos OH^- primários que podem ocorrer através da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos OH^- presentes nos açúcares e a camada de óxi-hidróxido de níquel, foi observado que tanto para GCE/NiOOH e/ou GCE/MWCNT/NiOOH os valores da constante de velocidade eletrocatalítica para a glicose é maior, uma vez que estes grupos OH^- são mais prontamente disponíveis para oxidação.

Figura 12 - Curva de Tafel representativa (A) eletrodo GCE/NiOOH e (B) eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de galactose ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH).



Fonte: Autor (2015).

Figura 13 - Cronoamperogramas do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na ausência (A) e presença de $25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de manose (B), xilose (C), arabinose (D), galactose (E) e glicose (F). Potencial aplicado de 550 mV vs. Ag/AgCl.



Fonte: Autor (2015).

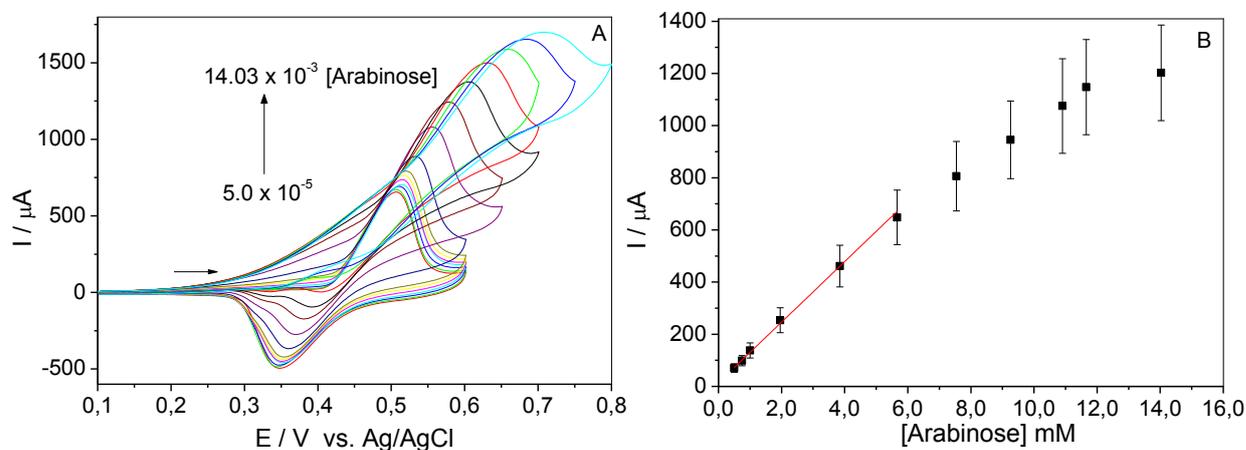
3.7. Estudos da concentração de açúcares

O comportamento eletroquímico dos açúcares arabinose, galactose, glicose, manose e xilose é mostrado nas Figuras 14-A, 15-A, 16-A, 17-A e 18-A, respectivamente, nos intervalos de concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ a $14,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , observou-se que entre os açúcares os comportamentos eletroquímicos são semelhantes.

Foi observado na Figura 14-B que a corrente de pico anódico é linear no intervalo de concentração de arabinose entre $5,0 \times 10^{-4}$ e $5,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ segundo a equação $I_{pa} = 2,23 \times 10^{-5} + 1,12 \times 10^{-1} [\text{arabinose}]$ e coeficiente de correlação de 0,999. Em concentrações mais elevadas a curva apresenta um desvio na linearidade, provavelmente devido a saturação dos sítios ativos na superfície do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH.

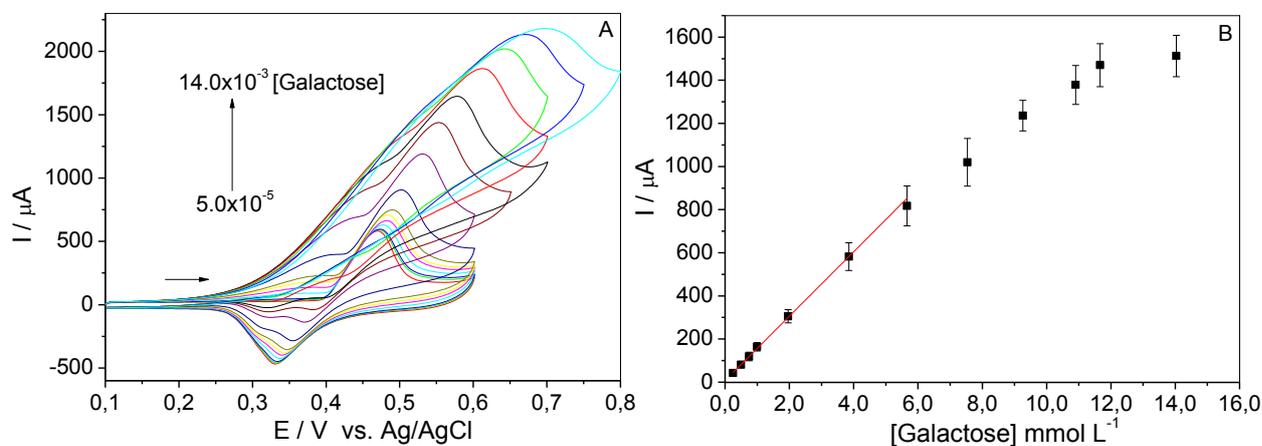
Observou-se na Figura 15-B que a corrente de pico anódico é linear no intervalo de concentração de galactose entre $2,5 \times 10^{-4}$ e $5,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ segundo a equação $I_{pa} = 1,4 \times 10^{-5} + 1,4 \times 10^{-1} [\text{galactose}]$ e coeficiente de correlação de 0,999.

Figura 14 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da variação da concentração de arabinose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Resposta da corrente anódica em função do estudo da variação da concentração de arabinose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH.



Fonte: Autor (2015).

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos do estudo da variação da concentração de galactose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiO em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (b) Resposta da corrente anódica em função do estudo da variação da concentração de galactose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiO

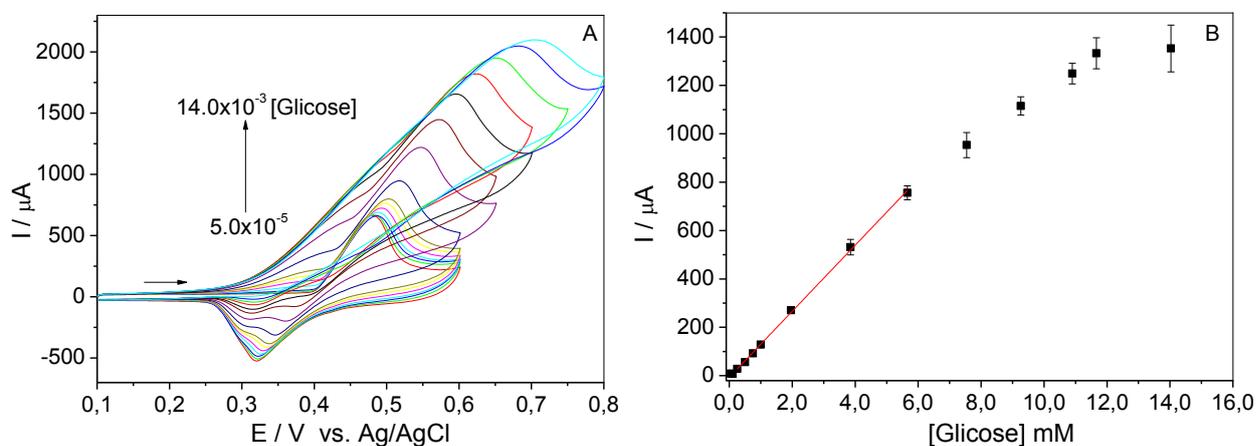


Fonte: Autor (2015).

Foi observado na Figura 16-B que a corrente de pico anódico é linear no intervalo de concentração de glicose entre $2,5 \times 10^{-4}$ e $5,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ segundo a equação $I_{pa} = -6,1 \times 10^{-6} + 1,3 \times 10^{-1} [\text{glicose}]$ e coeficiente de correlação de 0,998.

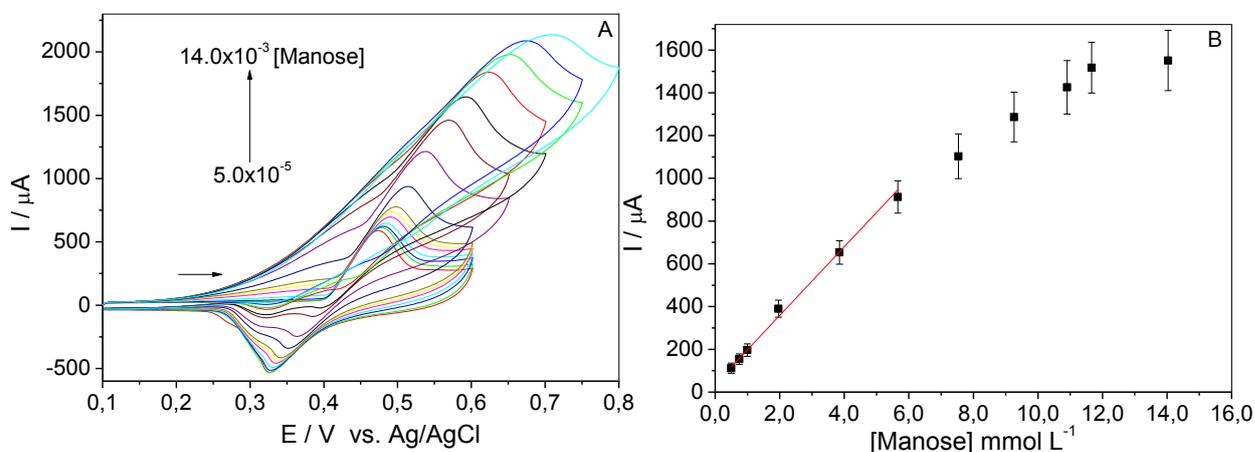
Já para o comportamento da manose, observou-se na Figura 17-B que a corrente de pico anódico é linear no intervalo de concentração entre $5,0 \times 10^{-4}$ e $5,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ segundo a equação $I_{pa} = 4,8 \times 10^{-5} + 1,5 \times 10^{-1} [\text{manose}]$ e coeficiente de correlação de 0,998.

Figura 16 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da variação da concentração de glicose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (50 mV s^{-1}); **(B)** Resposta da corrente anódica em função do estudo da variação da concentração de glicose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



Fonte: Autor (2015).

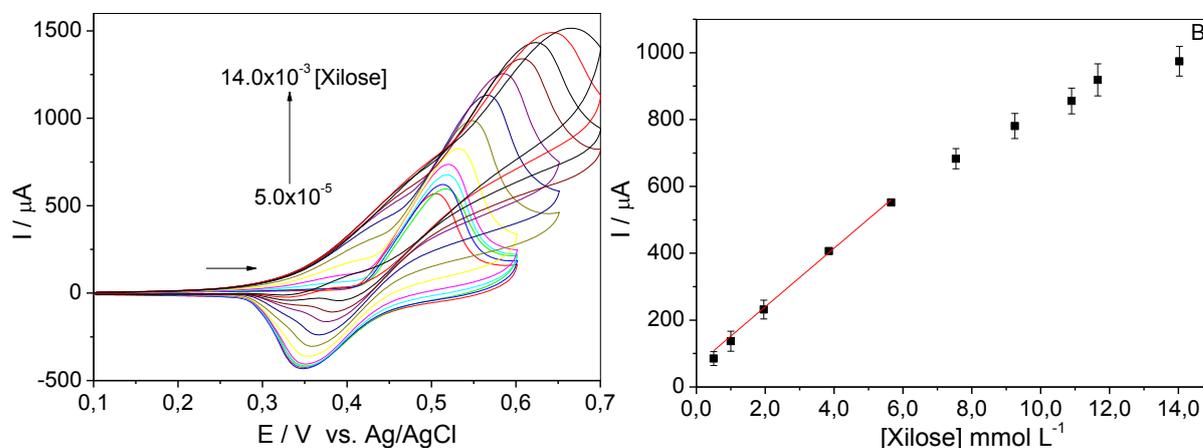
Figura 17 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da variação da concentração de manose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); **(B)** Resposta da corrente anódica em função do estudo da variação da concentração de manose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



Fonte: Autor (2015).

Foi observado na Figura 18 (B) que a corrente de pico anódico é linear no intervalo de concentração de xilose entre $5,0 \times 10^{-4}$ e $5,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ segundo a equação $I_{pa} = 4,7 \times 10^{-5} + 9,1 \times 10^{-2} [\text{xilose}]$ e coeficiente de correlação de 0,999.

Figura 18 - (A) Voltamogramas cíclicos de xilose sobre eletrodo CCE/MWCNT/NiOOH; ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$; 50 mV s^{-1}), variando as concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ a $14,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Curva analítica de xilose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH.



Fonte: Autor (2015).

Tabela 2 mostra as figuras de mérito para todos os açúcares em estudo. Foi observado que o GCE/MWCNT/NiOOH possui boa sensibilidade amperométrica, baixo limites de detecção e quantificação.

Tabela 2 – Figuras de mérito para vários açúcares no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em voltametria cíclica ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $n = 3$).

Açúcar	Intervalo de concentração (mol L^{-1})	LOD (mol L^{-1})	LOQ (mol L^{-1})	SA ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)
Arabinose	$5,0 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-4}$	$8,8 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^5$
Galactose	$2,5 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^5$
Glicose	$2,5 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$6,4 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^5$
Manose	$5,0 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^5$
Xilose	$5,0 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$9,1 \times 10^4$

Fonte: Autor (2015).

Na Tabela 3 são mostrados alguns estudos com eletrodos quimicamente modificados e constantes de velocidades electrocatalíticas publicadas para galactose, glicose em eletrodos modificados e os valores encontrados no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, observou-se que os valores estão em concordância com a literatura. Para arabinose, xilose e manose as constantes de velocidade electrocatalítica não foram encontrados nas bases de dados pesquisadas.

Tabela 3 - Comparação da constante de velocidade electrocatalítica (k) do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com eletrodos quimicamente modificados de acordo com a literatura.

Eletrodos quimicamente modificados	Açúcar	k (L mol⁻¹ s⁻¹)	Referência
Níquel (II) – Complexo de quercetina modificado com MWCNT e líquido iônico	Glicose	1.91×10 ³	(ZHENG; ZHANG; SONG, 2009)
Imobilização de glicose oxidase sobre nanopartículas de óxido de níquel	Glicose	1.1×10 ⁴	(SALIMI et al., 2007a)
Níquel (II), quercetina e grafeno	Glicose	2.93×10 ³	(SUN et al., 2011)
Poli(1-naftilamina)/níquel	Glicose	0.229	(OJANI; RAOOF; SALMANY-AFAGH, 2004)
Poli(1-naftilamina)/níquel	Galactose	0.275	(OJANI; RAOOF; SALMANY-AFAGH, 2004)
GCE/MWCNT/NiOOH	Glicose	4.36×10 ⁴	Autor (2015)
GCE/MWCNT/NiOOH	Galactose	2.09×10 ⁴	Autor (2015)

4. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida a preparação e utilização do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxi-hidróxido de níquel para detecção e quantificação de açúcares em meio alcalino.

Os parâmetros cinéticos para a oxidação dos açúcares foram calculados utilizando voltametria cíclica e cronoamperometria. Observou-se que as correntes catalíticas mais elevadas na eletro-oxidação dos açúcares foram sempre obtidas no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em comparação com o eletrodo GCE/NiOOH. O eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH apresentou coeficientes de transferência eletrônica e constante de velocidade catalítica em conformidade com outros eletrodos apresentados na literatura.

Estes estudos foram importantes para melhor compreensão dos processos eletródicos envolvidos do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH nas reações de eletro-oxidação dos açúcares para posterior desenvolvimento de métodos analíticos acoplados em HPLC para detecção e quantificação dos carboidratos presentes na biomassa.

Porém, não foi possível a aplicação e o desenvolvimento do método analítico em HPLC utilizando esta forma de modificação do carbono vítreo (GCE) com 35 μL de suspensão de com nanotubos de carbono, pois com esse volume foi observado a formação de uma camada de nanotubos na superfície do eletrodo GCE e como o espaço na célula eletroquímica do HPLC entre a superfície do eletrodo GCE e o eletrodo auxiliar é de apenas 0,25 μm não foi possível a interação entre os eletrodos, ficando impossível de realizar qualquer medida eletroquímica no HPLC, diante disso foi realizado os estudos citados no capítulo 3 da modificação do eletrodo GCE utilizando a técnica de eletrodeposição.

CAPÍTULO III

Determinação de açúcares em bagaço de cana de açúcar por cromatografia de troca aniônica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel

1. INTRODUÇÃO

Primeiramente foram estudados os parâmetros de eletrodeposição para confeccionar o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH). Esse eletrodo foi caracterizado por técnicas eletroquímicas, microscópio eletrônico de varredura (MEV) e foram estudadas as oxidações eletroquímicas diretas dos açúcares em meio alcalino.

Na literatura são encontrados vários trabalhos abordando o desenvolvimento de eletrodos modificados como detectores eletroquímicos em HPLC, tal como relatado por Xi et al. (2014) que modificaram o eletrodo de carbono vítreo com compósito de nanopartículas de cobre em óxido de grafeno e quitosana, este sensor foi acoplado ao HPLC com detecção amperométrica e foi possível analisar os açúcares de amotras de *phellinus igniarius* na faixa linear de 0,02 a 500 mg L⁻¹ de arabinose, fucose, galactose, glicose e manose.

Sendo assim foi desenvolvido um método analítico utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH como detector eletroquímico nas análises cromatográficas em amostras de hidrolisados de bagaço de cana de açúcar contendo os seguinte analitos: arabinose, galactose, glicose e xilose.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico para os açúcares em estudo foi utilizado um eletrodo de ouro a fim de elucidar todos os parâmetros cromatográficos tais como, composição da fase móvel, fluxo da fase móvel, temperatura do forno da coluna e temperatura do forno do detector.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

Todos os experimentos foram realizados utilizando reagentes de grau de pureza analítica. Na preparação das soluções foi utilizada água deionizada (Millipore, Billerica, MA, USA). Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas com pureza de 95% adquiridos da Dropsens (Spain), Sulfato de níquel hexahidratado ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), N,N-dimetilformamida (DMF) 99,8% ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$), L-arabinose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, 99%), D-glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%), D-galactose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%), D-manose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%), D-xilose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, 99%) e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solução tampão fosfato (pH 6,5) foi preparada utilizando $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 . A solução de $\text{Ni}(\text{SO}_4)_2$ foi preparada em tampão fosfato. As soluções de açúcares foram preparadas imediatamente antes do uso. Para a modificação da superfície do eletrodo foi preparada uma suspensão de MWCNT/DMF, preparada com 1,0 mg de MWCNT em 10,0 mL de DMF e levados ao banho ultrassônico por 30 minutos.

2.2. Funcionalização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram funcionalizados antes da preparação do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos, o objetivo da funcionalização dos nanotubos foi a geração de grupos funcionais $-\text{COOH}$ que atuam como sítios de nucleação para obtenção de partículas de menores dimensões e maiores dispersões.

A funcionalização dos nanotubos foi realizada da seguinte forma: 2,0 g de nanotubos de carbono foram sonificados por 4h em uma mistura de 60 mL de ácido sulfúrico (18 mol L^{-1}) e 20 mL de ácido nítrico (16 mol L^{-1}) para obtenção dos nanotubos de carbono funcionalizados com grupos $-\text{COOH}$. Após a sonificação os MWCNTs foram filtrados em membrana de PTFE de $5,0 \mu\text{m}$ e lavados com aproximadamente 3,0 L de água ultrapura e até o pH do sobrenadante ficar próximo de 6,0. Após a lavagem e neutralização, os MWCNTs foram levados a estufa para

secagem por 12h a 80°C ou até se obter uma massa constante (CARSON et al., 2012).

2.3. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel GCE/MWCNT/NiOOH

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) já funcionalizados foram pesados e dispersos em N,N-dimetilformamida (DMF) com agitação no equipamento de ultrassom por 30 minutos e obteve-se a concentração de 0,1 mg mL⁻¹.

Na modificação do eletrodo de carbono vítreo foi adicionado em sua superfície 5,0 µL de suspensão de nanotubos de carbono de concentração de 0,1 mg mL⁻¹, secou-se o eletrodo GCE contendo nanotubos de carbono durante 1,0 hora em uma estufa com 50 °C. Logo após a modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono (GCE/MWCNT), foram realizados estudos de eletrodeposição das nanopartículas de níquel, foi utilizado 5,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de sulfato de níquel (NiSO₄) em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), preparado pela mistura das soluções de dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) 0,2 mol L⁻¹ e hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄) 0,2 mol L⁻¹. O potencial foi mantido constante em -1,3 V. Os tempos de eletrodeposição investigados foram de 10, 30 e 60 segundos.

Após cada modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/Ni) foi realizado a formação de óxi-hidróxido de níquel em NaOH 0,5 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de -0,5 a 1,0 V em uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ durante 30 ciclos. Em seguida, o GCE/MWCNT/NiOOH foi lavado abundantemente com água deionizada e seco. O comportamento eletroquímico do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foi avaliado em eletrólito suporte de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

2.4. Determinações dos açúcares (Arabinose, Galactose, Glicose, Xilose e Manose) em cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-D-PAD)

A determinação dos açúcares foi realizada em soluções padrões e em amostras de hidrolisado de biomassa (bagaço e palha de cana-de-açúcar) utilizando um cromatógrafo de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-D-PAD) da marca metrohm 850 Professional IC Cation-HP-Gradient com módulo extensor 872 (bomba C, pós-coluna), com injetor automático com um loop de 20 µL.

Foi utilizado um detector amperométrico pulsado com célula eletroquímica Wall-Jet composta por um o eletrodo de trabalho de ouro ou eletrodo carbono vítreo de 3 mm de diâmetro (área aproximadamente igual a 0,07 cm²) modificado com nanotubos contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH), eletrodo pseudo-referência de paládio (Pd) e eletrodo auxiliar de liga de platina conforme especificação do fabricante. O HPAEC foi ligado a um microcomputador e gerenciado pelo software MagIC Net 2.4.

As separações destes açúcares foram efetuadas utilizando uma coluna DIONEX® CarboPac™ Pa 10 4x250 mm, coluna de guarda DIONEX® CarboPac™ Pa 10 4x50 mm, ambas contendo uma matriz de 10 µm de diâmetro, revestida de poliestireno/divinilbenzeno, associada ao poliacrilato MicroBead™ de 460 nm e funcionalizado com um sal de amônio quaternário altamente estável nos potenciais hidrogeniônicos de 0 a 14.

Foram realizados estudos de temperatura do forno da coluna entre 20°C e 35°C, da temperatura do detector eletroquímico entre 30°C e 40°C, de fluxo entre 1,0 ml min.⁻¹ e 1,4 ml min.⁻¹, do potencial de oxidação para análise dos açúcares e também foram investigados a força de eluição (força eluotrópica) do solvente água/NaOH 0,150 mol L⁻¹ em módulo gradiente. Durante o reabastecimento dos reagentes da fase móvel (H₂O e NaOH) foi purgado e borbulhado gás nitrogênio para eliminar a presença de dióxido de carbono e subsequente evitar a produção de carbonato na fase móvel, pois como o carbonato é um íon bivalente em pH de 12, liga-se fortemente na fase estacionária da coluna, interferindo na retenção dos açúcares, provocando tempos de retenção mais curtos, a seletividade da coluna é

diminuída, perda de resolução e diminuição da eficiência de separação dos açúcares.

Durante as medidas o fluxo $0,2 \text{ ml min.}^{-1}$ de $0,6 \text{ mol L}^{-1}\text{NaOH}$ da fase móvel foi mantido contínuo no modulo extensor 872 (bomba C, pós-coluna) para manter constante a força iônica no detector amperométrico.

Foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos para análise dos açúcares contidos na biomassa, o primeiro foi com o eletrodo de ouro, tendo como objetivo estudar o comportamento dos açúcares durante a separação nesta coluna cromatográfica e o segundo foi para desenvolver o método analítico utilizando o eletrodo modificado com nanotubos contendo nanopartículas de óxido hidróxido de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH).

2.5. Curvas analíticas

As curvas analíticas para os açúcares arabinose, galactose, glicose e xilose foram construídas com a variação da área do pico cromatográfico em função da concentração do analito, através de adições sucessivas de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de soluções padrões.

2.6. Preparo das amostras de hidrolisado de biomassa para determinação cromatográfica

A biomassa foi doada por uma usina da região de Araraquara-SP. A hidrólise do bagaço e da palha segue a metodologia baseada no Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos (SLUITER et al., 2010).

Primeiramente a biomassa seca foi colocada em aparelho Soxhlet para eliminação dos extrativos. Inicialmente foi usada água para eliminação dos extrativos aquosos e posteriormente, extração com etanol para eliminação dos extrativos etanólicos. Secou-se o bagaço em estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas, obtendo a biomassa seca. Amostras de 300 mg dessa biomassa foram transferidas para um frasco de 250 mL e tratados com 3 mL de H_2SO_4 72% (v/v), sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45°C por 60 min. A reação foi interrompida com a adição de 85 mL de água destilada. Para completar a hidrólise dos oligômeros restantes, o frasco foi fechado e autoclavado por 60 minutos a 1,05 bar. Após a descompressão

da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e 20 mL do hidrolisado foi transferido para um erlenmeyer de 50 mL onde foi então neutralizado com CaCO_3 , filtrado com filtros de 0,45 e 0,22 μm de porosidade e por fim injetado diretamente na coluna cromatográfica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização microscópica.

Os eletrodos de carbono vítreo (GCE) modificados com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel GCE/MWCNT/NiOOH e o eletrodo modificado somente com nanopartículas de níquel GCE/NiOOH foram estudados através da comparação das imagens das superfícies em diversas ampliações das imagens das micrografias geradas por MEV.

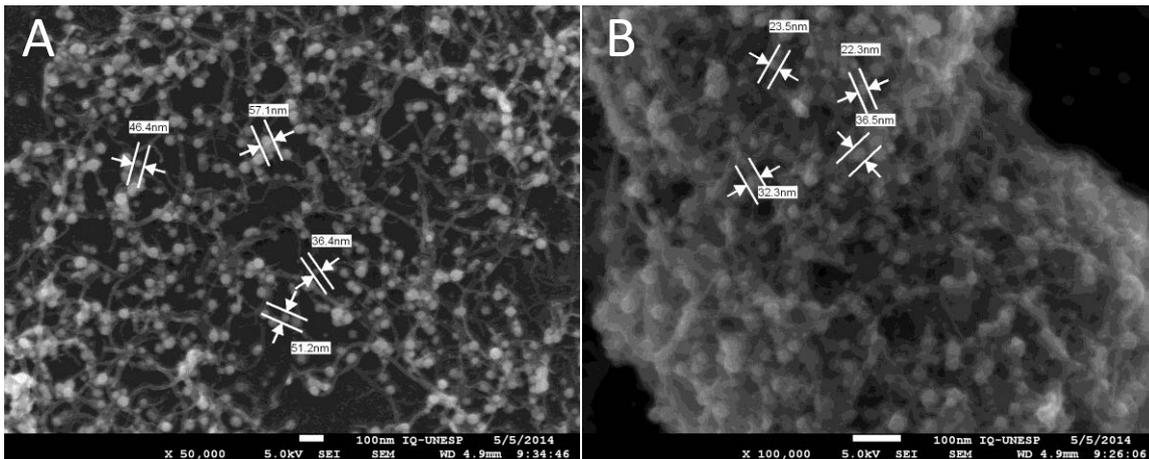
Os eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH e GCE/NiOOH foram preparados de acordo com cada tempo de eletrodeposição conforme método descrito no item 2.3.

Durante o processo de deposição das nanopartículas na superfície do eletrodo GC contendo nanotubos ou do eletrodo GC sem nanotubos foi observado a formação de gás hidrogênio devido à aplicação do potencial $-1,3\text{ V}$ em $5,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de níquel. Essa produção de gás está relacionada à reação de desproporcionamento do $\text{Ni}^{(I)}$ proveniente da redução de $\text{Ni}^{(II)}$, devido ao potencial aplicado ser muito negativo. Sob estas condições, pode ocorrer simultaneamente a reação do $\text{Ni}^{(I)}$ com a água, produzindo hidróxido de níquel^(I) e hidrogênio, o que auxilia na distribuição uniforme das nanopartículas sobre a superfície do eletrodo GCE na presença e na ausência de nanotubos de carbono evitando a formação de aglomerados (GÓMEZ et al., 1992).

A Figura 19 mostra as imagens de MEV com tempo de eletrodeposição de 10 segundos no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, observou-se partículas de diversos tamanhos entre 20 e 60 nm, a não formação de partículas de tamanhos uniformes pode ser atribuído que o tempo de eletrodeposição de 10 segundos foi relativamente pequeno para a formação de hidrogênio e conseqüentemente não foi possível se obter uma distribuição e tamanhos uniformes de nanopartículas de níquel sobre os nanotubos de carbono.

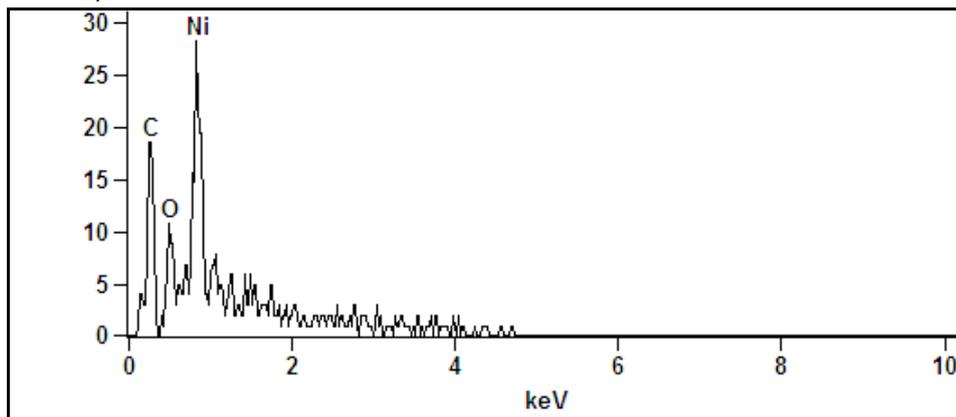
A caracterização química mostra a presença de carbono procedente do substrato de carbono vítreo e dos nanotubos de carbono, já a presença de oxigênio e níquel é um indicativo do sucesso da modificação com nanopartículas de óxido hidróxido de níquel, esses comportamentos são ilustrados nas Figuras 20, 22 e 24.

Figura 19 - Imagens de MEV para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com tempo de eletrodeposição de 10 s. com potencial aplicado de $-1,3$ V na solução de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ de NiSO $_4$ com magnitudes de A) 50.000 vezes e B) 100.000 vezes



Fonte: Autor (2015).

Figura 20 - Espectro de EDS do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com tempo de eletrodeposição de 10 s. com potencial aplicado de $-1,3$ V na solução de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ de NiSO $_4$ (10,0 keV)



Fonte: Autor (2015).

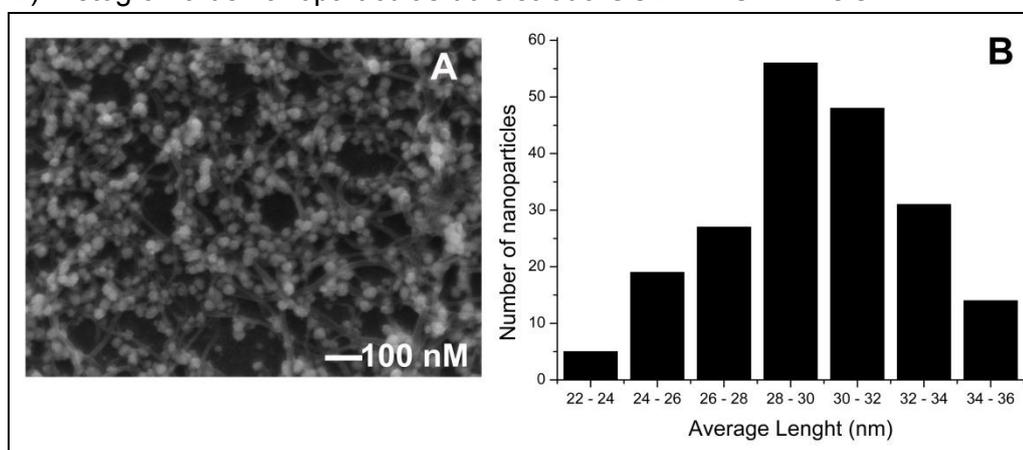
A Figura 21-A apresenta a imagem de MEV do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH para o tempo de eletrodeposição de 30 segundos. Foi observado nanopartículas de óxi-hidróxido de níquel regulares e esféricas na superfície dos nanotubos. O

histograma do tamanho das nanopartículas (Figura 21-B) mostra nanopartículas entre 22 a 36 nm (diâmetro médio de 30 nm \pm 3 nm).

Estas nanopartículas têm uma grande área específica com distribuição e tamanhos mais uniformes, essas características são indicadas como responsáveis por menores limites de detecção nas análises dos açúcares, quando comparado com os eletrodos construídos a partir das eletrodeposições de 10 e 60 segundos.

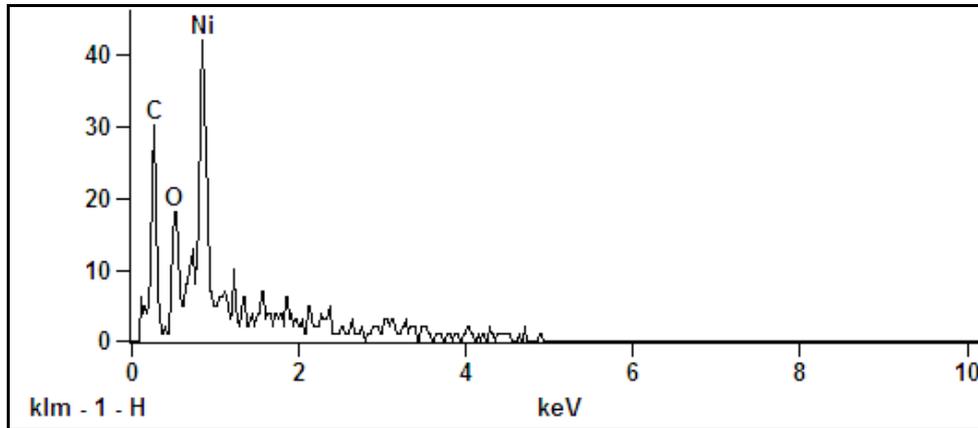
A formação, crescimento e recobrimento das nanopartículas de óxido/hidróxido de níquel na superfície do eletrodo de GCE contendo nanotubos de carbono são menos regulares com o tempo de 60 segundos conforme mostra a Figura 23 - A, sendo que as nanopartículas apresentam tamanhos mais variados. Portanto, baseado na relação área/volume, a qual aumenta com a diminuição do tamanho das nanopartículas, foi selecionado o tempo de 30 segundos para preparo dos eletrodos modificados com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel.

Figura 21 – A) Imagens de MEV para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com tempo de eletrodeposição de 30 s. com potencial aplicado de -1,3 V na solução de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄; B) Histograma de nanopartículas do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH



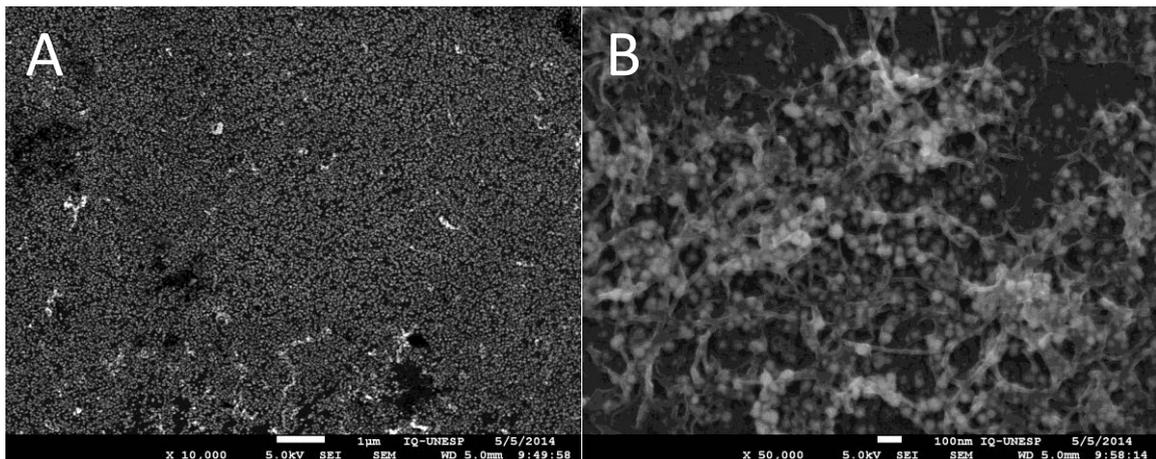
Fonte: Autor (2015).

Figura 22 - Espectro de EDS do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com tempo de eletrodeposição de 30 s. com potencial aplicado de -1,3 V na solução de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄ (10,0 keV)



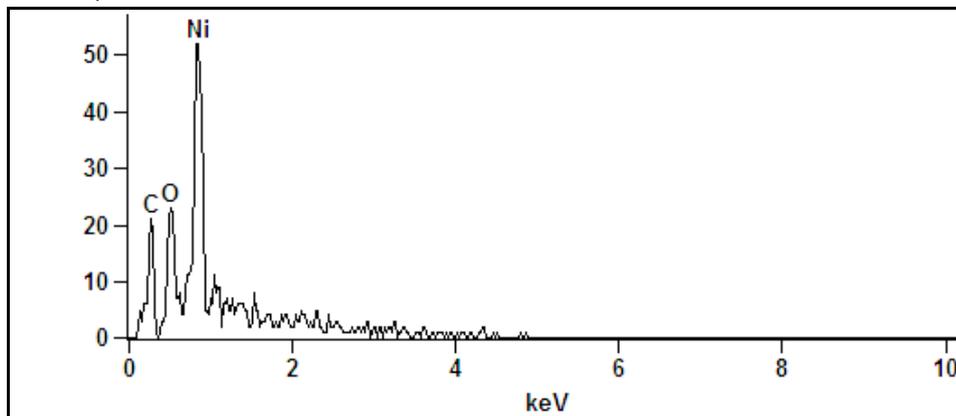
Fonte: Autor (2015).

Figura 23 - Imagens de MEV para o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com tempo de eletrodeposição de 60 s. com potencial aplicado de -1,3 V na solução de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄ com magnitudes : A) 10.000 vezes e B) 50.000 vezes



Fonte: Autor (2015).

Figura 24 - Espectro de EDS do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com tempo de eletrodeposição de 60 s. com potencial aplicado de -1,3 V na solução de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄ (10,0 keV)



Fonte: Autor (2015).

3.2. Caracterização eletroquímica do eletrodo GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH

A Figura 25 ilustra a deposição por cronoamperometria de níquel na superfície do carbono vítreo contendo nanotubos de carbono, observou-se um decaimento da corrente até aproximadamente 1 segundo, havendo em seguida um aumento da corrente devido ao depósito de metal na superfície do eletrodo GCE/MWCNT.

No mecanismo de eletrodeposição a primeira etapa é a redução de Ni^{2+} conforme representado através da Equação 19, seguido por mais uma etapa que leva a deposição que é relacionada com a reação de desproporcionamento do Ni^{+1} que gera o Ni^0 e Ni^{+2} conforme Equação 20, simultaneamente a reação entre Ni^{+1} e H_2O gera o complexo NiOH^{+1} e hidrogênio que conduz a uma estrutura mais dispersa (GÓMEZ et al., 1992).

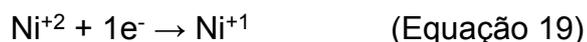
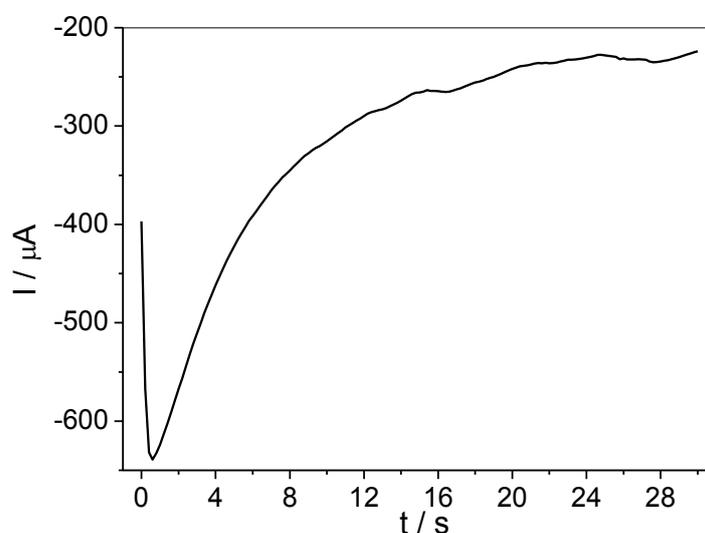


Figura 25 - Eletrodeposição das nanopartículas de níquel em eletrodo de carbono vítreo contendo nanotubos de carbono (GCE/MWCNT/NiOOH), utilizando a técnica de cronoamperometria com solução $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de níquel (NiSO_4) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) em potencial (E) constante de $-1,3 \text{ V}$ e tempo (t) de eletrodeposição de 30 s



Fonte: Autor (2015).

A Figura 26 apresenta os voltamogramas cíclicos durante a estabilização para formação de óxi-hidróxido de nanopartículas de níquel após serem depositadas por cronoamperometria conforme citado anteriormente. É possível observar que a primeira e segunda varredura apresentaram picos de oxidação diferentes dos demais e exibiram um pico de oxidação em torno de 0,41 V vs. Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹), o qual pode ser atribuído à dissolução das nanopartículas de níquel metálico e formação de nanopartículas de óxido/hidróxido de níquel na superfície do eletrodo, essa transformação de Ni para Ni(OH)₂ pode ser acelerada em condições alcalinas conforme é indicado na Equação 21, após a imersão do eletrodo CGE/MWCNT/Ni em eletrólito alcalino (ou seja 0,5 mol L⁻¹ de NaOH), após sucessivos ciclos de potencial a eletro-oxidação de hidróxido de níquel é convertido em óxido-hidróxido de níquel conforme mostra a Equação 22 (FLEISCHMANN; KORINEK; PLETCHER, 1971; GIOVANELLI et al., 2003; MIAO et al., 2014).

O par redox correspondente à oxidação e a redução de Ni^{II}/Ni^{III} estabilizam-se a partir do Terceiro ciclo em 0,43 V e 0,36 V vs. Ag/AgCl, respectivamente, no entanto, a intensidade da corrente do par redox continua aumentando (Figura 26). Esse ganho de magnitude da corrente pode ser atribuído a subsequente estabilização do crescimento das nanopartículas de óxido/hidróxido de níquel. (FLEISCHMANN; KORINEK; PLETCHER, 1971, 1972a, 1972b; GIOVANELLI et al., 2003; HAHN et al., 1986; SCHREBLER GUZMÁN, 1978; SEDENHO et al., 2015).

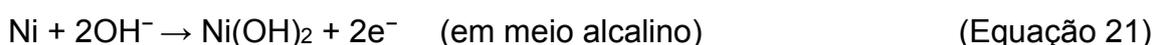
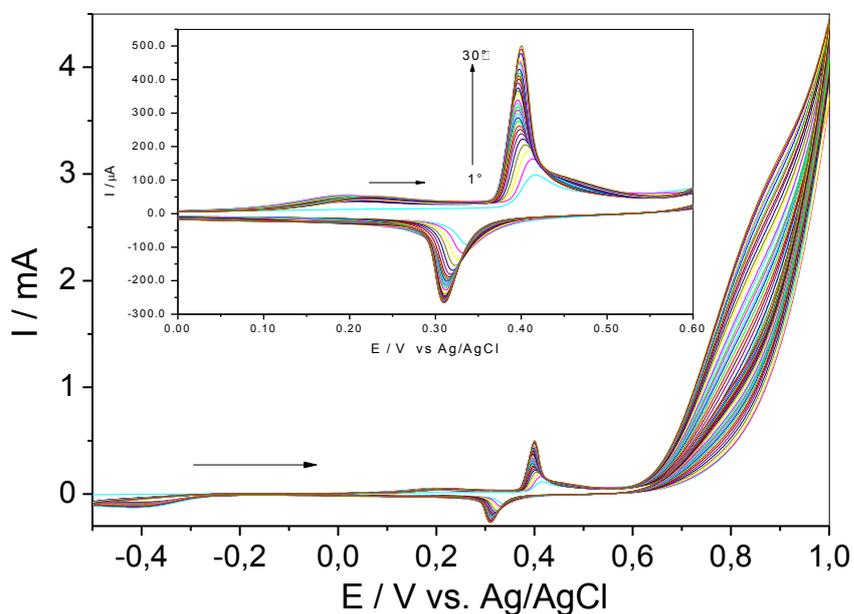


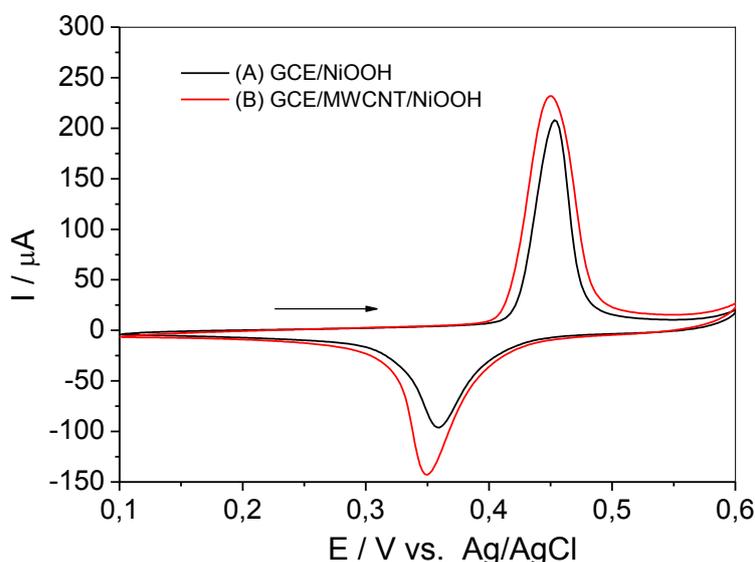
Figura 26 - Estabilização do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH para formação das nanopartículas de óxi-hidróxido de níquel em $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, $v=100 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: Autor (2015).

Na Figura 27 é apresentado o comportamento para os eletrodos contendo nanopartículas de níquel, na ausência de nanotubos GCE/NiOOH e na presença GCE/MWCNT/NiOOH, observou-se que os potenciais de pico anódico e catódico apresentem praticamente os mesmos valores, tanto para o eletrodo GCE/NiOOH e quanto para GCE/MWCNT/NiOOH, as correntes de pico anódicas e catódicas no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH apresentam valores maiores em relação ao eletrodo GCE/NiOOH, estes aumentos relativos das correntes de pico são provavelmente resultantes de uma maior área superficial fornecida pelos nanotubos de carbono de paredes múltiplas na modificação do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH (BURATTI; BRUNETTI; MANNINO, 2008; SALINAS-TORRES et al., 2011; SHAMSIPUR; NAJAFI; HOSSEINI, 2010).

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos da resposta eletroquímica do eletrodo (A)GCE/NiOOH e (B)GCE/MWCNT/NiOOH em NaOH 0,1 mol, L⁻¹ (50 mV s⁻¹)

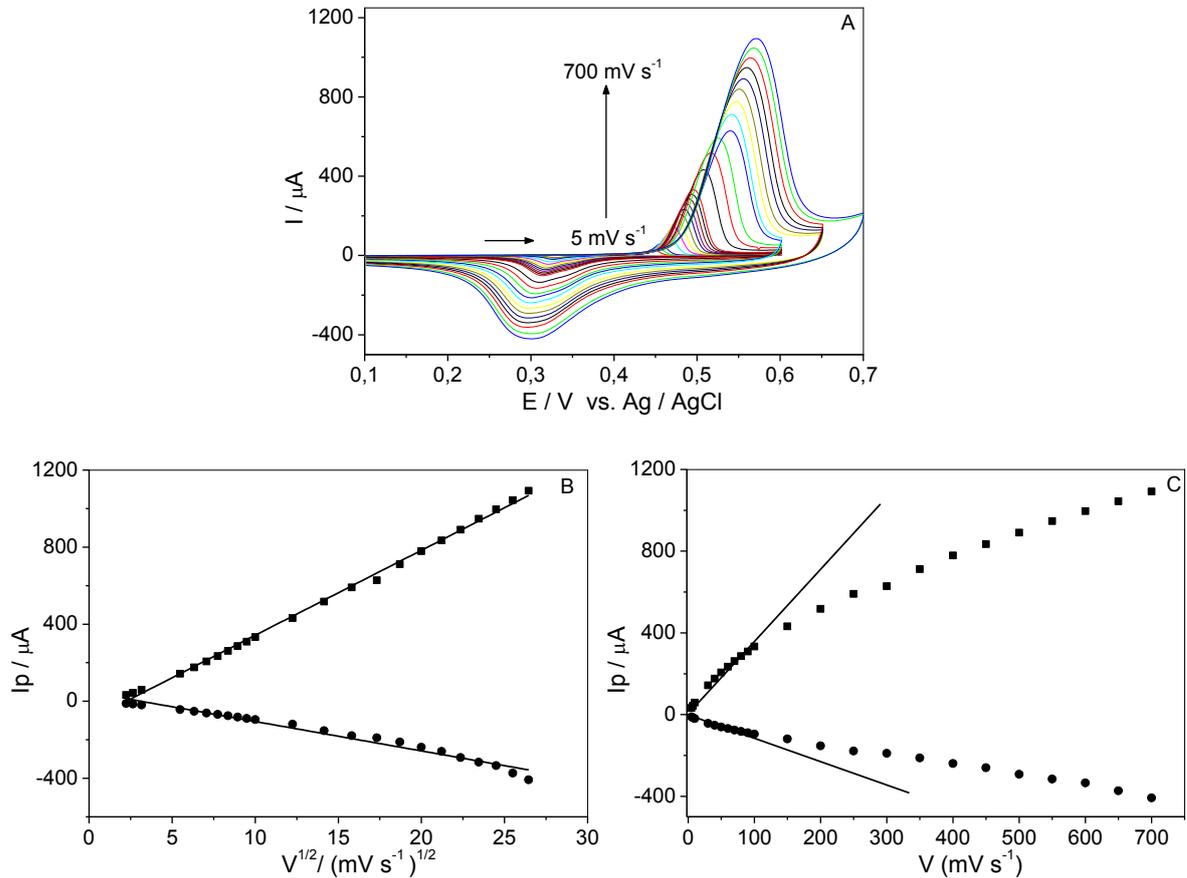


Fonte: Autor (2015).

A Figura 28-A e Figura 29-A mostraram os comportamentos dos voltamogramas cíclicos dos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH em diferentes velocidades de varredura (2-700 mV s⁻¹) em NaOH 0,1 mol L⁻¹ na faixa de potencial de -0,1 a 0,8 V. Observou-se uma separação de potenciais de pico, que aumentou com velocidades de varredura mais elevadas. Em acordo com a literatura (KARIM-NEZHAD et al., 2009; LAVIRON, 1979) estes resultados indicam uma limitação nas cinéticas de transferência de carga, atribuídas a vários fatores, tais como interações químicas entre os íons do eletrólito e do eletrodo modificado, domínio de fatores eletrostáticos, interações adjacentes do par redox presentes na superfície do eletrodo e sítios não equivalentes presentes na superfície do eletrodo.

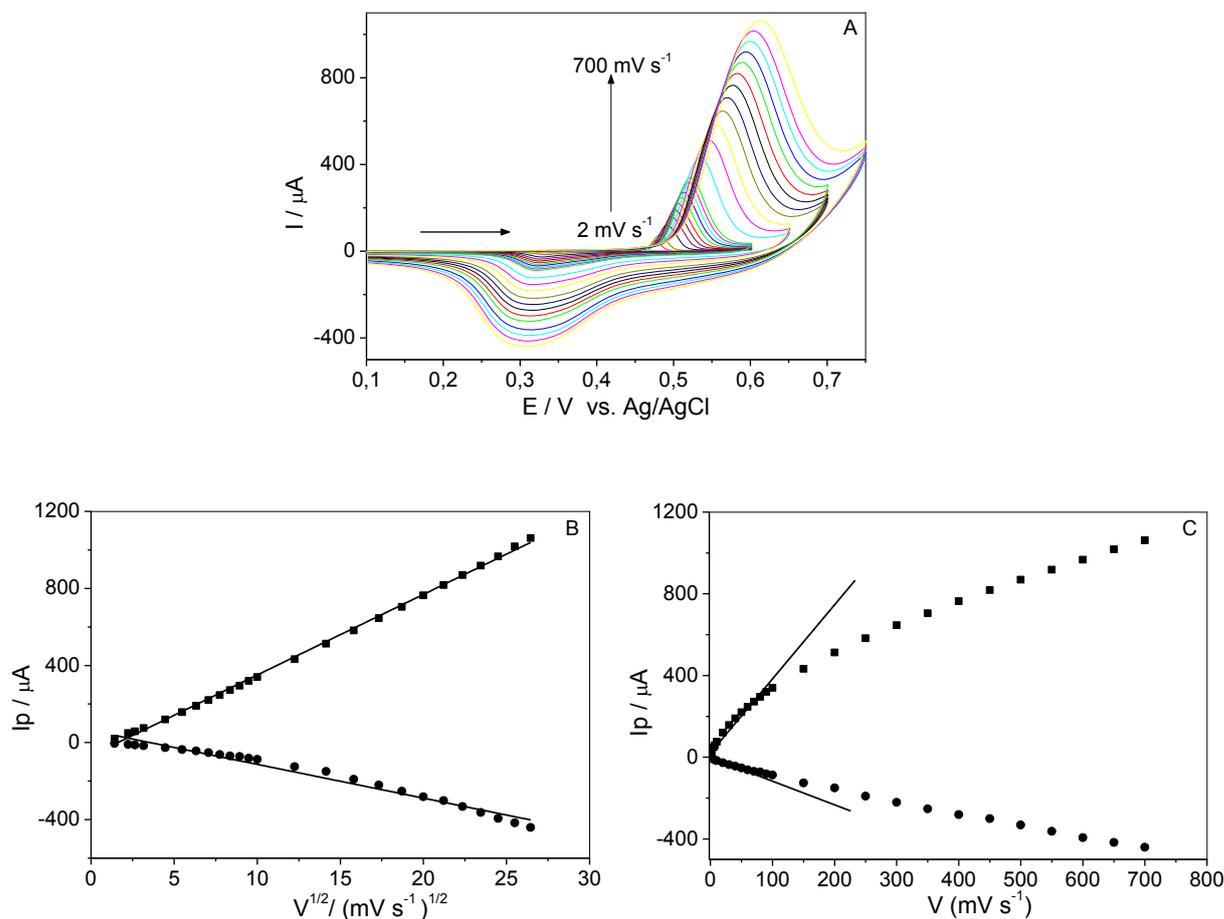
A Figura 28-B e Figura 29-B apresentaram a relação de corrente de pico em função da velocidade de varredura no intervalo de 2 - 700 m V s⁻¹, sendo que as correntes de pico anódica e catódica foram proporcionais a raiz quadrada da velocidade de varredura indicando um processo eletródico controlado por difusão para os eletrodos GCE/NiOOH e GCE/ MWCNT/NiOOH. No entanto, as correntes de picos são proporcionais a velocidade de varredura no intervalo de 2 a 100 mV s⁻¹, que aponta para a um comportamento controlado por adsorção conforme Figura 28-C e Figura 29-C (BARD; FAULKNER, 2001).

Figura 28 - (A) Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/NiOOH em NaOH 0,1 mol L⁻¹. Taxas de velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 e 700 mV s⁻¹. (B) Dependência dos picos de correntes anódicas e catódicas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura entre 2 – 700 mV s⁻¹. (C) Dependência dos picos de correntes anódicas e catódicas em função da velocidade de varredura entre 2-700 mV s⁻¹



Fonte: Autor (2015).

Figura 29 - (A) Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em NaOH 0,1 mol L⁻¹. Taxas de velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 e 700 mV s⁻¹. (B) Dependência dos picos de correntes anódicas e catódicas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura entre 2 – 700 mV s⁻¹. (C) Dependência dos picos de correntes anódicas e catódicas em função da velocidade de varredura entre 2-700 mV s⁻¹



Fonte: Autor (2015).

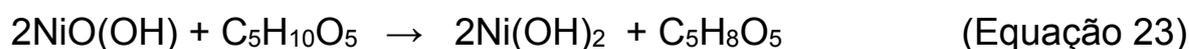
3.3. Eletro-oxidação dos açúcares

A eletro-oxidação da arabinose em eletrodos modificados GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH foi apresentada na Figura 30 (A e B), foram observados nos eletrodos um deslocamento de potencial de 0,48 V vs. Ag/AgCl para 0,55 vs. Ag/AgCl durante as oxidações de arabinose, associado com o aumento do pico de corrente anódica e diminuição do pico corrente catódica, esse comportamento pode ser atribuída ao ciclo catalítico das espécies NiOOH durante a reação química da oxidação de arabinose (Equação 23), que suporta a oxidação irreversível dos

carboidratos (TOGHILL et al., 2010b), aminas (FLEISCHMANN; KORINEK; PLETCHER, 1972a) e álcoois (ASGARI et al., 2011).

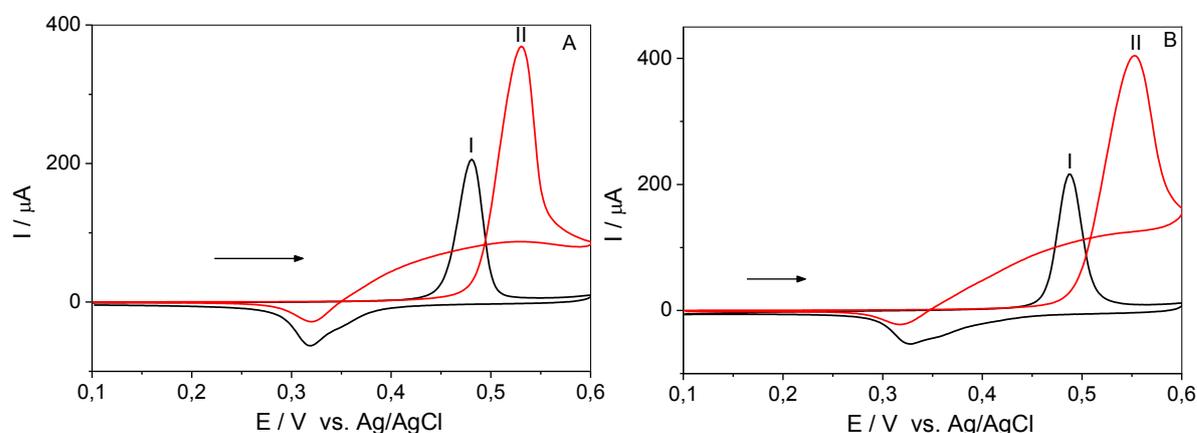
Esse comportamento dos açúcares no eletrodo de níquel são semelhantes a outras moléculas orgânicas tais como ácido láctico (SEDENHO et al., 2015), álcoois (ASGARI et al., 2011; TOGHILL et al., 2010a), aminas (CARPANI; TONELLI, 2006) entre outras (CISZEWSKI; STEPNIAK, 2013; WANG et al., 2014).

Em baixas velocidades de varredura (Figura 31-A), a redução do pico catódico é mais pronunciado, o que sugere que a reação química de oxidação dos açúcares por NiOOH é lento e a velocidade é a etapa determinante (FLEISCHMANN; KORINEK; PLETCHER, 1971, 1972a).



Foi observado na Figura 30 a formação de uma onda catódica conhecida também como reoxidação, que foi formada durante a redução nos eletrodos contendo NiOOH em potenciais entre 0,55 e 0,45. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato que nestes potenciais ainda há presença do catalisador Ni(III), que mesmo durante a varredura catódica é possível oxidar moléculas de açúcares que estão nas superfícies dos eletrodos GCE/NiOOH e GCE/MWCNT/NiOOH (FLEISCHMANN; KORINEK; PLETCHER, 1972a).

Figura 30 - Voltamogramas cíclicos contendo a eletro-oxidação de (I) ausência e (II) presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de arabinose: (A) eletrodo GCE/NiOOH e (B) eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$; 50 mV s^{-1})



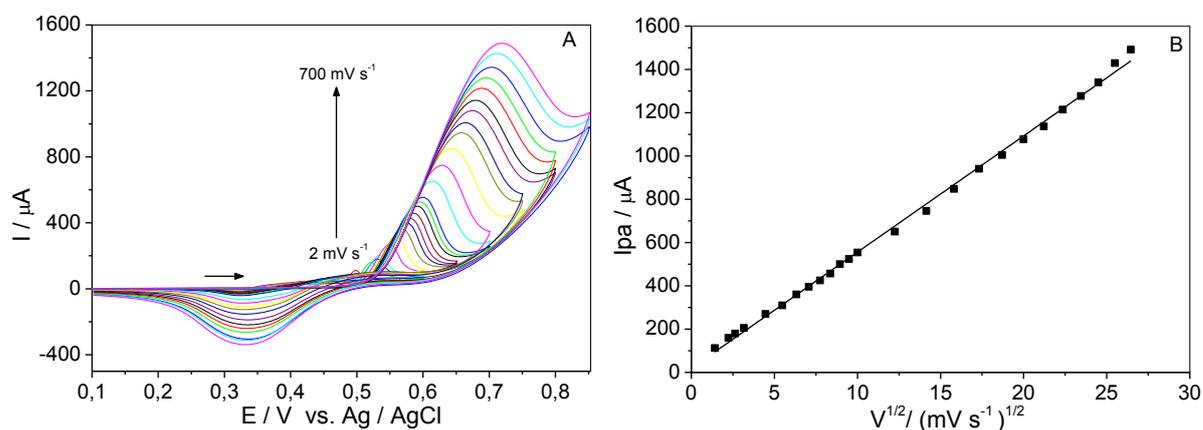
Fonte: Autor (2015).

A Figura 31-A mostra os voltamogramas cíclico do estudo de velocidades de varredura do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de arabinose, observou-se que o potencial de pico da oxidação catalítica de arabinose é deslocado para potenciais cada vez mais positivo com o aumento velocidade de varredura, este resultado sugere a limitação cinética da reação entre o par redox do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH e arabinose, comportamento semelhante ao eletrodo de níquel apresentado no capítulo 2.

A Figura 31-B mostra que a corrente anódica é proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando um processo eletródico controlado por difusão (BARD; FAULKNER, 2001) de acordo com a equação $I_{pa} = 1,8 \times 10^{-5} + 5,3 \times 10^{-5} v^{1/2}$ e coeficiente de correlação de 0,998.

Todos os estudos de influência da velocidade de varredura foram realizados para outros açúcares (galactose, glicose, manose e xilose) e os comportamentos foram similares.

Figura 31 - (A) Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de arabinose (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Estudo de velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 e 700 mV s^{-1} . (B) Gráfico da dependência do pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura dos valores entre 2 a 700 mV s^{-1}



Fonte: Autor (2015).

3.4. Estudos da concentração de açúcares

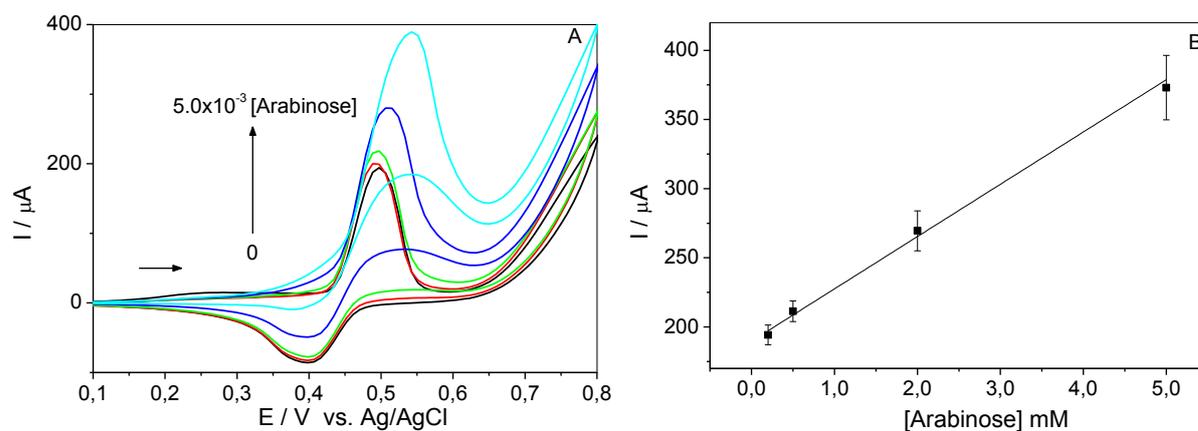
Os comportamentos dos açúcares no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foram avaliados através dos voltamogramas apresentados nas Figuras 32-A, 33-A, 34-A, 35-A e 36-A, mostraram que os comportamentos dos açúcares são similares.

Através destes estudos foram construídas curvas analíticas com variações de concentração nos intervalos de $4,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, os coeficientes de correlação para estas curvas analíticas ficaram próximas de 0,999. Através destes estudos foi possível desenvolver e avaliar as equações da reta e as figuras de mérito presentes na Tabela 4.

Foi observado que o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH possui boa sensibilidade amperométrica, os valores de limites de detecção e quantificação e apresentaram valores próximos entre os açúcares.

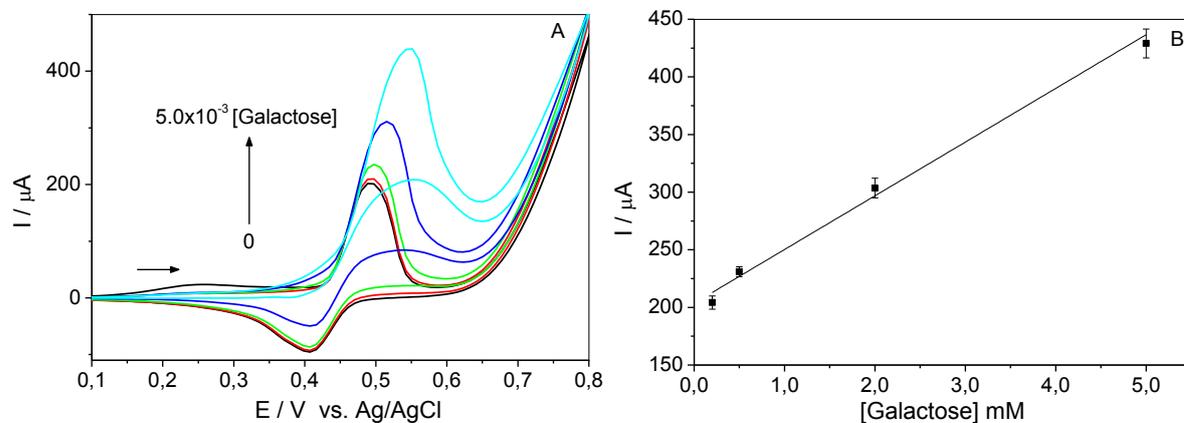
Estes estudos foram importantes para compreender a interação do eletrodo com os açúcares, para posterior desenvolvimento do método analítico utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH acoplado ao HPLC.

Figura 32 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de arabinose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L⁻¹ de NaOH (50 mV s⁻¹); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



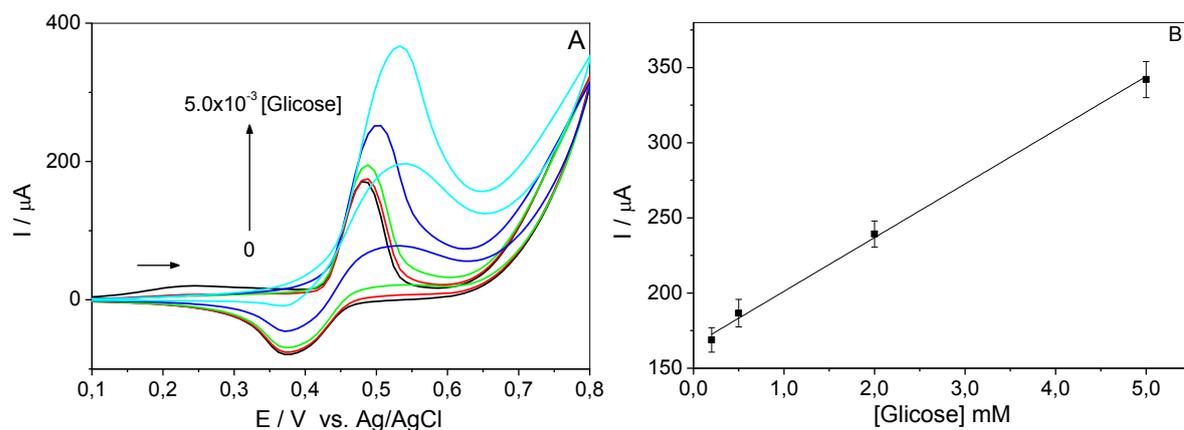
Fonte: Autor (2015).

Figura 33 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de galactose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



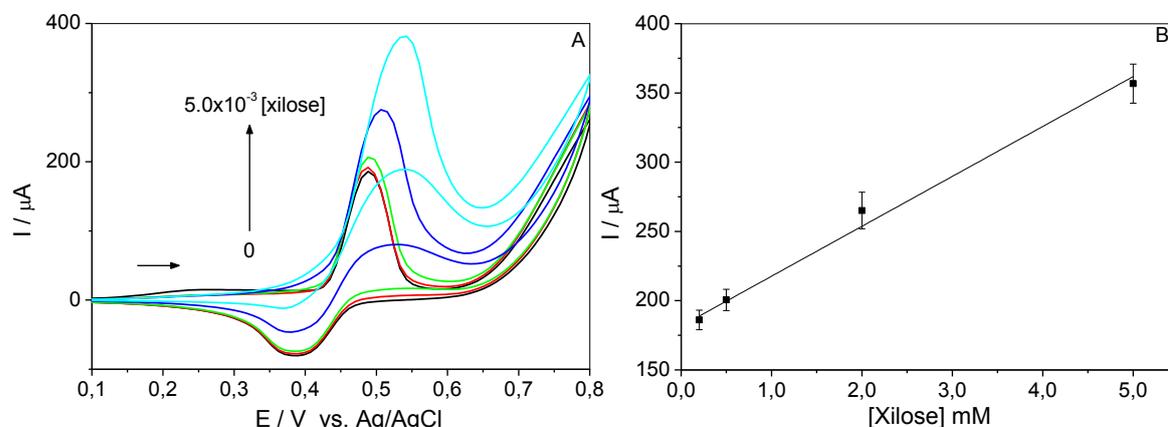
Fonte: Autor (2015).

Figura 34 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de glicose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



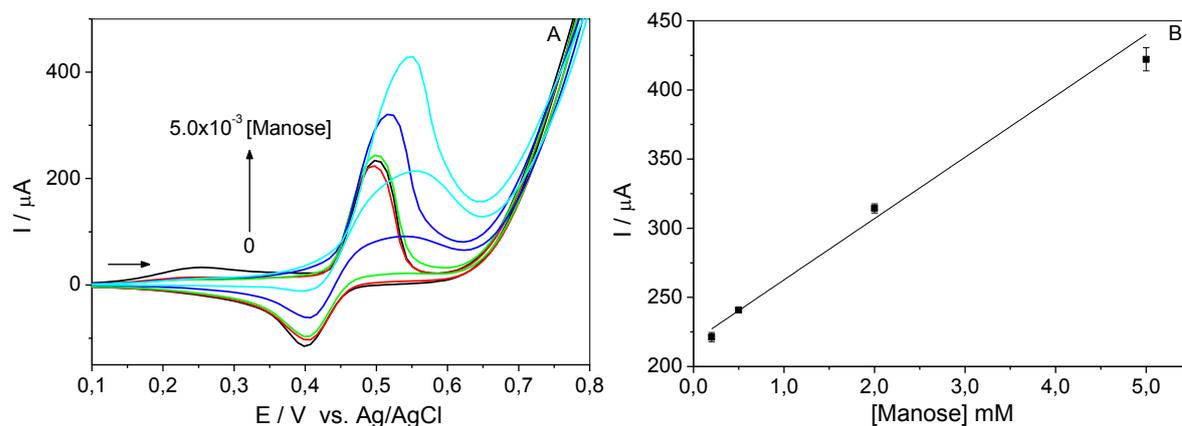
Fonte: Autor (2015).

Figura 35 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de xilose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



Fonte: Autor (2015).

Figura 36 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de manose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/NiOOH



Fonte: Autor (2015).

Tabela 4 - Figuras de mérito para vários açúcares no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em voltametria cíclica ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $n = 3$)

Açúcar	Equação da Retra	LOD (mol L^{-1})	LOQ (mol L^{-1})	SA ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	r
Arabinose	$I_{pa} = 1,9 \times 10^{-4} + 3,7 \times 10^{-2} [\text{ara}]$	$2,1 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^4$	0,995
Galactose	$I_{pa} = 2,3 \times 10^{-4} + 4,6 \times 10^{-2} [\text{gal}]$	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^4$	0,990
Glicose	$I_{pa} = 1,6 \times 10^{-4} + 3,5 \times 10^{-2} [\text{glic}]$	$2,4 \times 10^{-4}$	$7,9 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^4$	0,998
Manose	$I_{pa} = 2,1 \times 10^{-4} + 4,4 \times 10^{-2} [\text{man}]$	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^4$	0,989
Xilose	$I_{pa} = 1,8 \times 10^{-4} + 3,6 \times 10^{-2} [\text{xil}]$	$3,3 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^4$	0,995

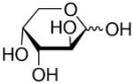
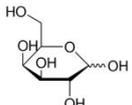
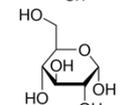
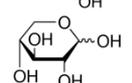
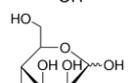
Fonte: Autor (2015).

3.5. Otimização dos parâmetros cromatográficos dos utilizando o eletrodo de ouro

Foi necessário o desenvolvimento do método cromatográfico utilizando o eletrodo de ouro utilizando as especificações do fabricante. Para esse método foi utilizada uma coluna de troca aniônica (CarboPac Pa10) e uma pré-coluna (CarboPac Pa10). A separação foi realizada com eluente em modo gradiente. Devido a baixa afinidade dos açúcares pela fase estacionária, a separação cromatográfica requereu eluentes no caso hidróxido de sódio em baixa concentração.

A massa molecular e o pKa dos açúcares encontrados no bagaço de cana-de-açúcar são listados na Tabela 5. Em geral, a sequência de eluição dos componentes da matriz é relativo ao valor do pKa. Os açúcares são ácidos fracos e conseqüentemente em valores de pH elevados os grupos hidroxilos presentes nos açúcares são parcialmente ou totalmente transformados em óxi-ânions, permitindo que ocorra a esta classe de compostos uma eluição seletiva como ânions na cromatografia de troca aniônica de alto desempenho em uma única corrida cromatográfica (CORRADINI; CAVAZZA; BIGNARDI, 2012).

Tabela 5 – Estrutura molecular, massa molecular e valor do pKa para os açúcares em estudo.

Açúcar	Estrutura Molecular	Massa Molecular	pKa*
D-(-)-Arabinose		150,10	12,43
D-(+)-Galactose		180,20	12,35
D-(+)-Glicose		180,20	12,28
D-(+)-Xilose		150,10	12,15
D-(+)-Manose		180,20	12,08

*pKa: medida logarítmica da constante de dissociação do ácido, 25°C.

Fonte: Autor (2015).

Para otimização do método de separação para os açúcares no intuito de avaliar a composição da fase móvel frente ao tempo de retenção e resolução, a

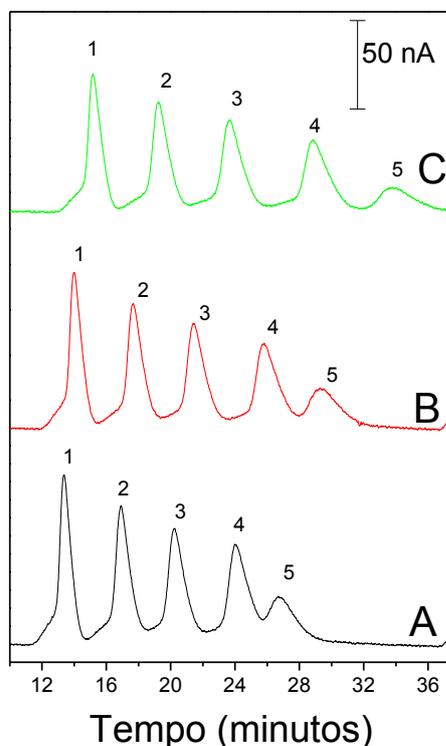
Figura 37 apresenta os cromatogramas contendo os açúcares com estudos de três condições de fase móvel, sendo (98% de H₂O e 2% de 0,150 mol L⁻¹NaOH), (99% de H₂O e 1% de 0,150 mol L⁻¹NaOH) e (100% de H₂O).

Observou-se que com 98% de H₂O o cromatograma apresentou menor tempo de retenção conforme é mostrado na Figura 38-B, porém a separação dos picos é afetada conforme mostram os picos 4 e 5 de xilose e manose respectivamente ilustrados na Figura 37-A.

Já para o cromatograma com 99% de H₂O foi observado um melhor comportamento na separação, sendo que a área dos picos 1 a 3 mante-se praticamente constante quando comparado com 98% de H₂O (Figura 38-A), porém para xilose e manose mostrados na Figura 37-B há um ganho de separação diminuindo assim a área da manose e aumentando a área de xilose conforme Figura 38-A.

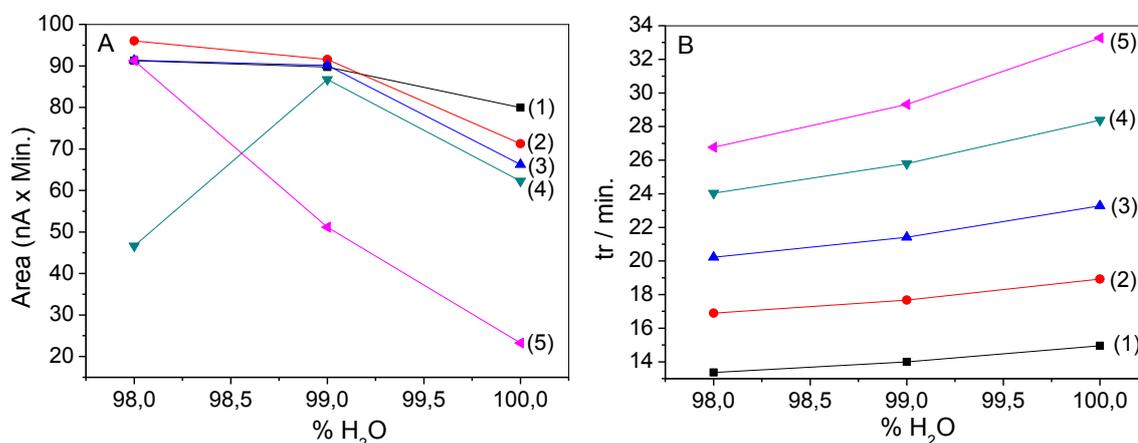
Para os estudos de 100% de H₂O foi observado um cromatograma com boa separação, porém é observado um aumento dos tempos de retenção e diminuição da área de todos os picos, isso pode ser devido á um alargamento de pico ou até mesmo uma possível interação maior dos analitos com a coluna e obtendo como consequência a saída desses açúcares no momento da limpeza da coluna. Diante dos resultados apresentados a fase móvel foi fixada em 99% de H₂O e 1% de 0,150 mol L⁻¹NaOH para otimização dos demais parâmetros do método de separação dos açúcares.

Figura 37 – Cromatogramas dos estudos das concentrações de fase móvel na separação dos açúcares de acordo com as seguintes proporções de H₂O e NaOH (A) 98% de H₂O e 2% NaOH 0,150 mol L⁻¹, (B)99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹ e (C)100 % de H₂O, contendo 1,1×10⁻⁵ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Fluxo 1,0 ml min.⁻¹, potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, temperatura da coluna 25°C, temperatura do detector 35°C em coluna Carbopac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

Figura 38: A) Efeito da concentração de H₂O e hidróxido de sódio na fase móvel em função área de pico de acordo com os açúcares contendo 1,1×10⁻⁵ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. B) Efeito da concentração de H₂O na fase móvel em função do tempo de retenção de acordo com os açúcares contendo 1,1×10⁻⁵ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Fluxo 1,0 ml min.⁻¹, potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, temperatura da coluna 25°C, temperatura do detector 35°C em coluna Carbopac Pa 10.

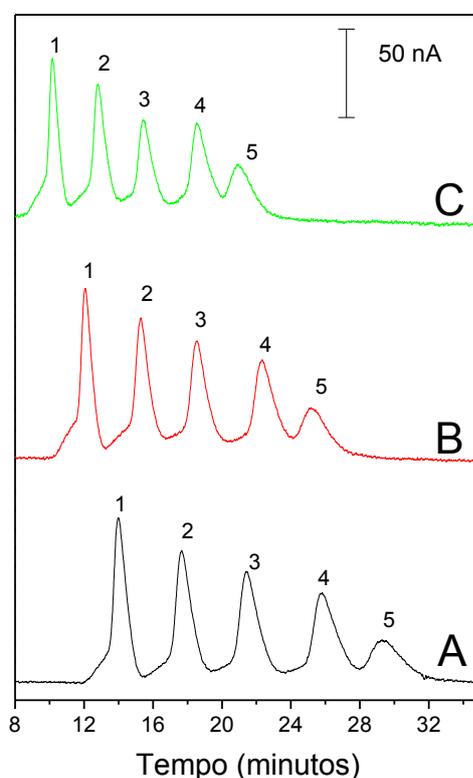


Fonte: Autor (2015).

A Figura 39 mostra os estudos de fluxo da fase móvel para $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ e $1,4 \text{ ml min}^{-1}$, foi observado que o cromatograma com $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ apresentou uma melhor separação com maiores áreas de pico (Figura 40-A), já para os cromatogramas de $1,2$ e $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ foram observados menores tempos de retenção, menores áreas de picos e diminuição da separação conforme ilustra a Figura 39 (B e C).

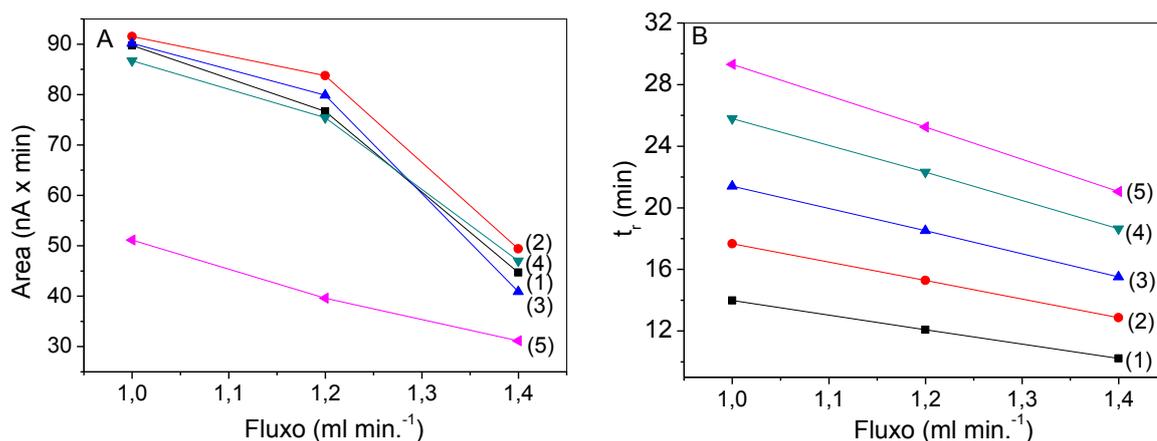
Não foram realizados estudos de fluxo menores que $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, pois uma das bombas do equipamento de cromatografia trabalha com uma porcentagem de 1% de fase móvel conforme estudos mostrados acima, sendo assim essa configuração de equipamento não permite trabalhar com fluxos menores que $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Diante desses resultados apresentados o método foi desenvolvido com um fluxo de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

Figura 39 - Cromatogramas dos estudos de fluxo da fase móvel 99% de H_2O e 1% NaOH $0,150 \text{ mol L}^{-1}$ na separação dos açúcares de acordo com as seguintes fluxos: (A) $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, (B) $1,2 \text{ ml min}^{-1}$, (C) $1,4 \text{ ml min}^{-1}$, contendo $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Potencial de detecção para eletrodo de ouro $0,05 \text{ V vs. Pd}$, temperatura da coluna 25°C , temperatura do detector 35°C em coluna Carbpac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

Figura 40 - A) Efeito do fluxo da fase móvel (99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹) em função área de pico de acordo com os açúcares contendo 1,1×10⁻⁵ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. B) Efeito do Fluxo da fase móvel (99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹) em função do tempo de retenção de acordo com os açúcares contendo 1,1×10⁻⁵ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, temperatura da coluna 25°C, temperatura do detector 35°C em coluna Carbopac Pa 10.

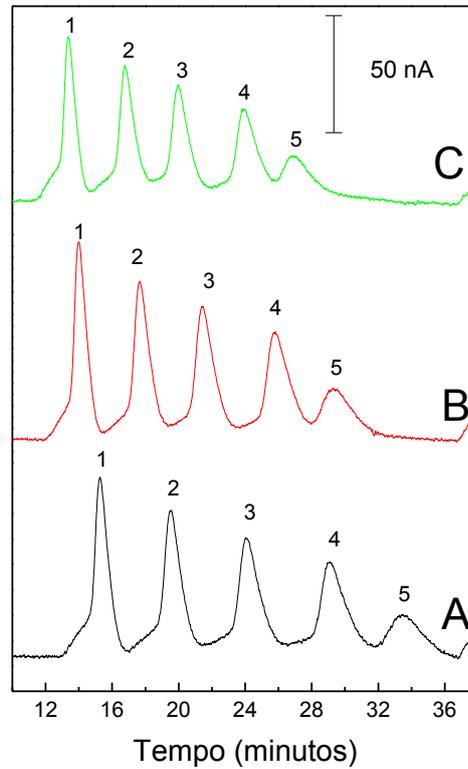


Fonte: Autor (2015).

A Figura 41 mostrou os cromatogramas com os açúcares para a otimização da temperatura do forno da coluna nas condições de 20 °C, 25 °C e 30 °C, foram observados maiores tempos de retenção com menores áreas de pico (Figura 42-A) para estudos com temperatura de 20 °C.

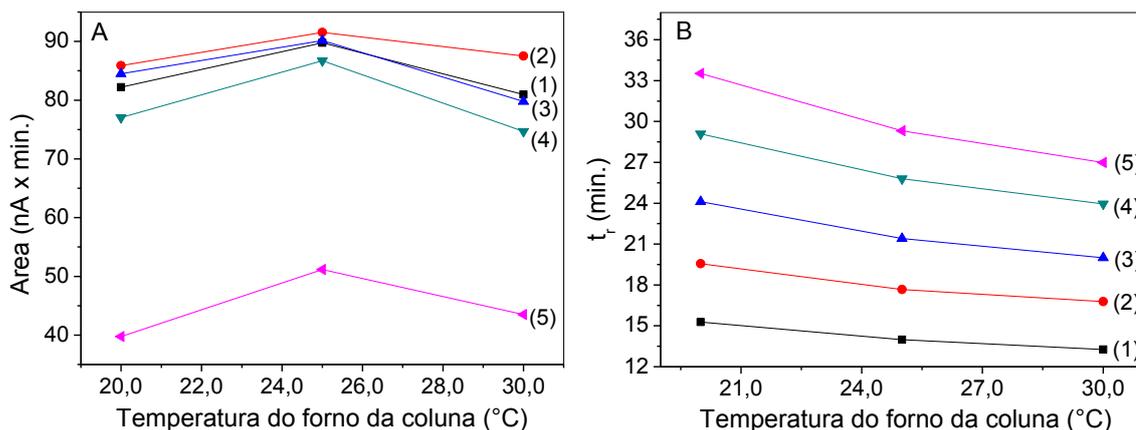
Para temperatura de 25 °C foi observado uma melhor separação e maiores áreas para os açúcares (Figura 42-B) e para os estudos em 30 °C foi observado um menor tempo de retenção (Figura 42-B), uma diminuição na separação (Figura 41-C) principalmente nos picos 4 e 5 que são atribuídos aos picos de xilose e manose. De acordo com os estudos discutidos foi escolhido 25 °C como melhor temperatura para o forno da coluna na separação dos açúcares.

Figura 41 - Cromatogramas dos estudos de temperaturas do forno da coluna na separação dos açúcares de acordo com as seguintes temperaturas: (A) 20 °C, (B) 25 °C e (C) 30 °C.; contendo $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do detector 35°C em coluna Carbopac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

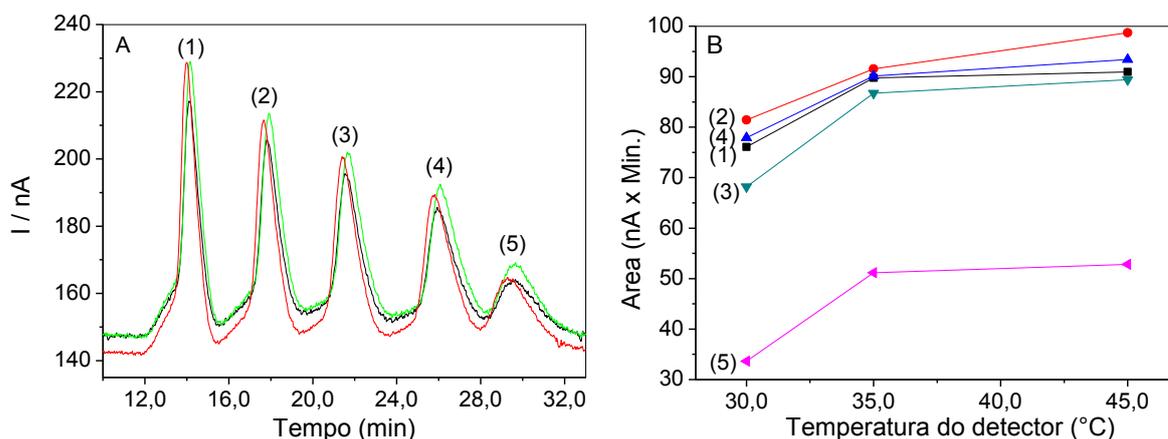
Figura 42 - A) Efeito da temperatura do forno da coluna em função área de pico de acordo com os açúcares contendo $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose B) Efeito da temperatura do forno da coluna em função do tempo de retenção de acordo com os açúcares contendo $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H_2O e 1% NaOH $0,150 \text{ mol L}^{-1}$, fluxo da fase móvel $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, temperatura do detector 35°C em coluna Carbpac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

A Figura 43-A mostrou os cromatogramas dos açúcares de acordo com os estudos de temperatura do detector, nas condições de 30°C , 35°C e 40°C . Na Figura 43-B foi observado que em 30°C os picos apresentam com áreas menores do que em 35°C e 40°C , sendo que as áreas entre 35°C e 40°C se mantem constante. Tendo em vista as discussões anteriores a temperatura do detector escolhido para o desenvolvimento do método foi de 35°C .

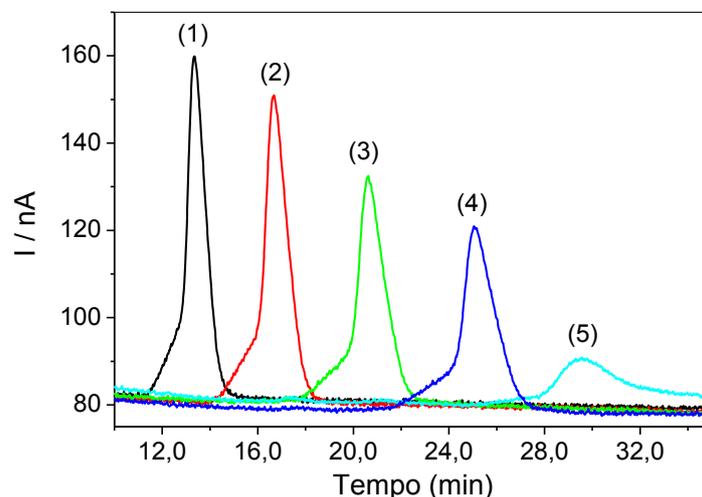
Figura 43 - A) Cromatogramas dos estudos de temperaturas do detector na separação dos açúcares de acordo com as seguintes temperaturas: (—) 30 °C, (—) 35 °C, (—) 40 °C; contendo $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. B) Efeito da temperatura do detector eletroquímico em função área de pico de acordo com os açúcares contendo $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C em coluna Carbpac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

Para elucidar os tempos de retenção e melhores condições cromatográficas para a separação dos açúcares foram realizados esses experimentos citados utilizando o eletrodo de ouro, são mostrados na Figura 44 os tempos de retenção dos açúcares de acordo com parâmetros desenvolvidos para o método com o eletrodo de ouro, esse método de separação será aplicado nos próximos estudos com o eletrodo modificado com nanotubos contendo nanopartículas de óxi-hidróxidos de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH).

Figura 44 - Cromatogramas dos açúcares contendo $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de acordo com os seguintes picos: (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose. Potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbowpac Pa 10



Fonte: Autor (2015).

3.5.1. Estudo de otimização dos parâmetros para formação das nanopartículas do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH para aplicação no HPLC

O eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com nanotubos contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH) foi utilizado no HPLC para detecção de açúcares arabinose, galactose, glicose, xilose e manose.

Foi utilizada a mesma metodologia de separação utilizada na detecção dos açúcares com eletrodo de ouro, tais como: fase móvel, fluxo da fase móvel, temperatura da coluna e temperatura do detector, porém foram realizados alguns estudos específicos na parte de detecção, tais como: estudo do tempo de eletrodeposição na formação das nanopartículas, estabilidade do eletrodo na análise utilizando o HPLC e o potencial aplicado na análise dos açúcares.

Como no método de separação com o eletrodo de ouro a corrida cromatográfica ficou extensa na eluição de todos os açúcares devido a limpeza da coluna, totalizando 75 minutos para cada injeção.

Para os estudos com eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foi escolhido o primeiro açúcar da eluição, no caso a arabinose, pois o mesmo elui em torno de 12 a 13 minutos, essa estratégia foi realizada no intuito de otimização de tempo, devido aos vários experimentos que foram realizados no HPLC com o eletrodo

GCE/MWCNT/NiOOH, pois foi constatado que o eletrodo no potenciostato apresentou um comportamento diferente com o apresentado no HPLC.

Logo após a modificação do eletrodo de carbono vítreo com os nanotubos de carbono (MWCNT) foi realizada a eletrodeposição das nanopartículas de níquel (CHENG et al., 2011).

Foi utilizado uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 de tampão fosfato e como precursor $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NiSO_4 . O potencial de redução é muito importante para a preparação das nanopartículas de metais, em potenciais de redução maiores que $-1,0 \text{ V}$ a formação das nanopartículas praticamente não é favorecida, esse comportamento foi observado também em potenciais $-1,1 \text{ V}$ e $-1,2 \text{ V}$. Diante disso uma vez que o potencial de redução afeta em grande parte a forma das nanopartículas, o potencial aplicado escolhido para a eletrodeposição das nanopartículas de níquel sobre os nanotubos de carbono foi de $-1,3 \text{ V}$.

Foi estudado a influência do tempo de deposição sobre a atividade eletroquímica das nanopartículas de níquel. As Figuras 45, 46 e 47 apresentam os comportamentos cromatográficos de arabinose, onde é mostrada a estabilidade do eletrodo após cada eluição de arabinose e curva analítica de arabinose de acordo com os tempos de deposição de 10, 30 e 60 segundos tendo um potencial de deposição de $-1,3 \text{ V}$.

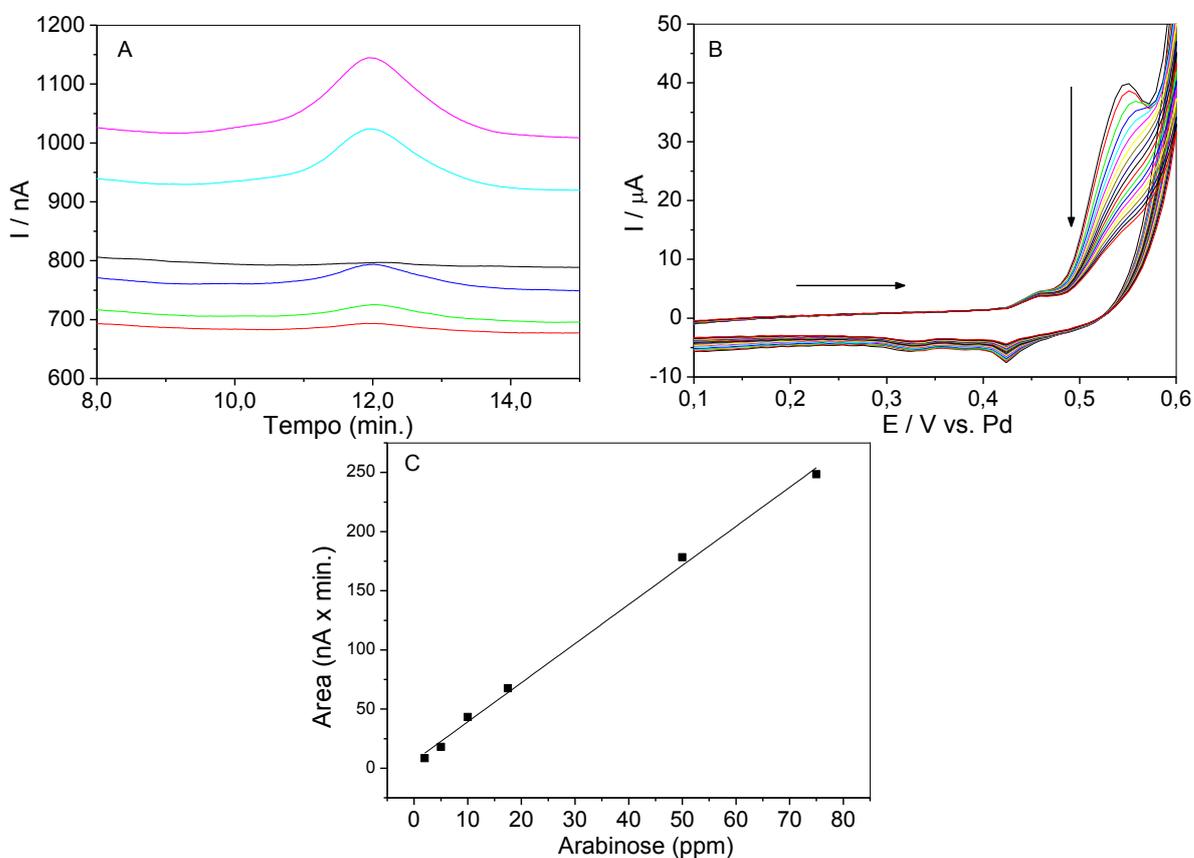
São mostrados nas Figuras 45-B, 46-B e 47-B, os voltamogramas cíclicos entre cada eluição cromatográfica para arabinose, nas Figuras 45-B e 47-B que compreende os tempos de deposição de 10 e 60 segundos respectivamente, foi observado que o pico de oxidação do níquel no voltamograma diminui conforme é processada as análises de arabinose, isso é um indicativo que o eletrodo não é estável para estes tempo de deposição. Na Figura 46 são mostrado os voltamogramas cíclicos do níquel para tempo de deposição de 30 segundos entre cada eluição de arabinose e é observada uma melhor estabilidade, pois o pico do níquel se mantém praticamente constante.

Nas Figuras 45-C, 46-C e 47-C são mostradas as curvas analíticas para arabinose de acordo com os tempo de 10, 30 e 60 segundos respectivamente, sendo os limites de detecção de $3,70 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para 10 segundos, $1,07 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para 30 segundos e $9,38 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para 60 segundos. De acordo com esses estudos de tempo de eletrodeposição, foi observado que para 30 segundos foi obtida uma melhor atividade eletrocatalítica para detecção de arabinose. Em 10

segundos os limites de detecção foram maiores possivelmente devido a menores quantidades de nanopartículas na superfície do nanotubos ou tamanho e dispersão de partículas não regulares na superfície do eletrodo causando menor estabilidade do eletrodo na aplicação no HPAEC-PAD.

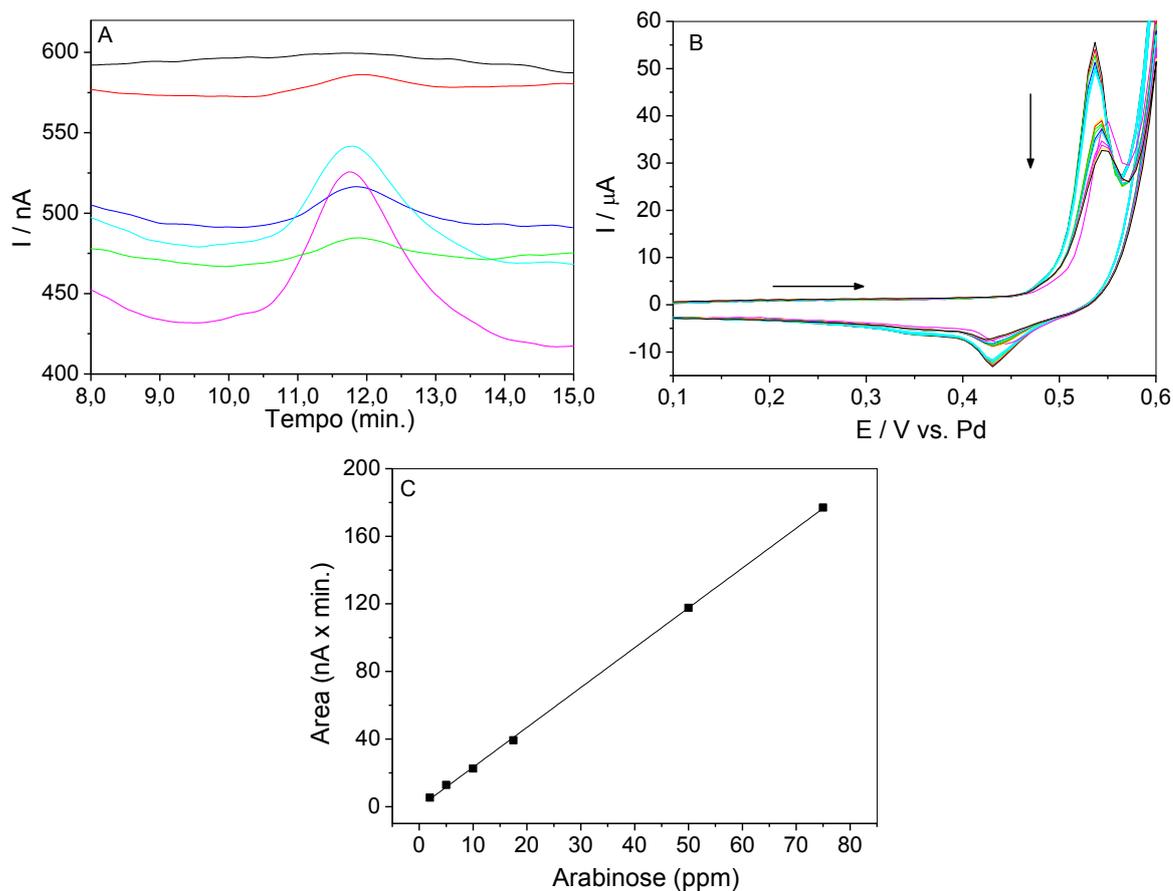
Para o eletrodo preparado com o tempo de eletrodeposição de 60 segundos foi observado um aumento significativo no limite de detecção, devido ao fato que conforme se aumenta o tempo de deposição o tamanho das nanopartículas é aumentado como mostrou as imagens de MEV e as partículas ficaram alocadas em toda superfície do eletrodo, por conseguinte a atividade eletroquímica do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH na oxidação da arabinose também diminui.

Figura 45 - Estudos de eletrodeposição de níquel do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com 10 segundos de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄. A) Cromatogramas da influência da concentração de arabinose: (—) 2,0; (—) 5,0; (—) 10,0; (—) 17,5; (—) 50,0 e (—) 75,0 ppm; B) Voltamogramas cíclicos entre medidas realizadas nas concentrações da curva A. C) Curva analítica para arabinose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH 0,50 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbopac Pa 10.



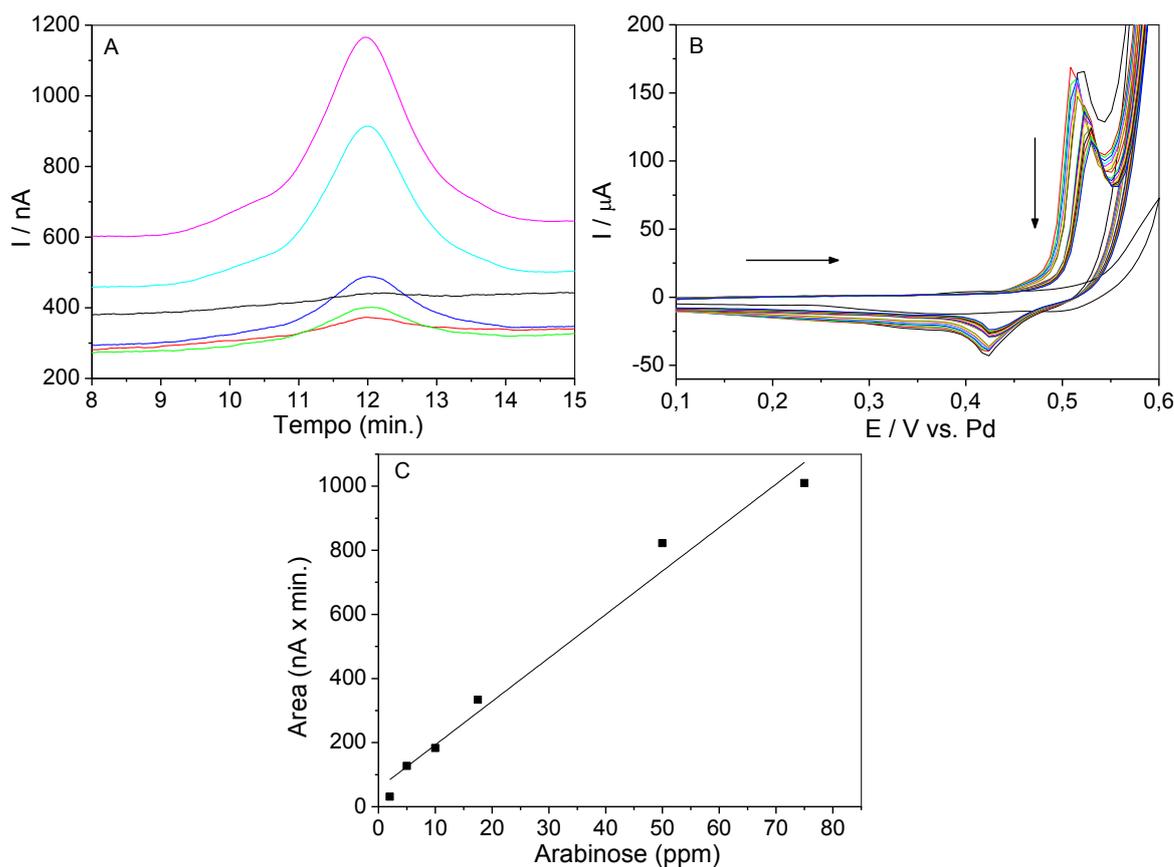
Fonte: Autor (2015).

Figura 46 - Estudos de eletrodeposição de níquel do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com 30 segundos de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄. A) Cromatogramas da influência da concentração de arabinose: (—) 2,0; (—) 5,0; (—) 10,0; (—) 17,5; (—) 50,0 e (—) 75,0 ppm; B) Voltamogramas cíclicos entre medidas realizadas nas concentrações da curva A. C) Curva analítica para arabinose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH 0,50 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna CarboPac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

Figura 47 - Estudos de eletrodeposição de níquel do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH com 60 segundos de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NiSO₄. A) Cromatogramas da influência da concentração de arabinose: (—) 2,0; (—) 5,0; (—) 10,0; (—) 17,5; (—) 50,0 e (—) 75,0 ppm; B) Voltamogramas cíclicos entre medidas realizadas nas concentrações da curva A. C) Curva analítica para arabinose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH 0,50 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna CarboPac Pa 10



Fonte: Autor (2015).

A técnica de detecção amperométrica pulsada é realizada com uma sequência de pulsos de potenciais após a aplicação do potencial de oxidação dos açúcares conforme mostra a Figura 48, sendo que na Tabela 6 é apresentada a programação de pulso descrito a seguir:

1º pulso (E₁) – A duração deste pulso é de 250 ms e o potencial aplicado é de 0,50 V vs. Pd. Os primeiros 50 ms são utilizados para o acondicionamento do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, e os outros 200 ms são utilizados para detecção dos açúcares e aquisição dos dados;

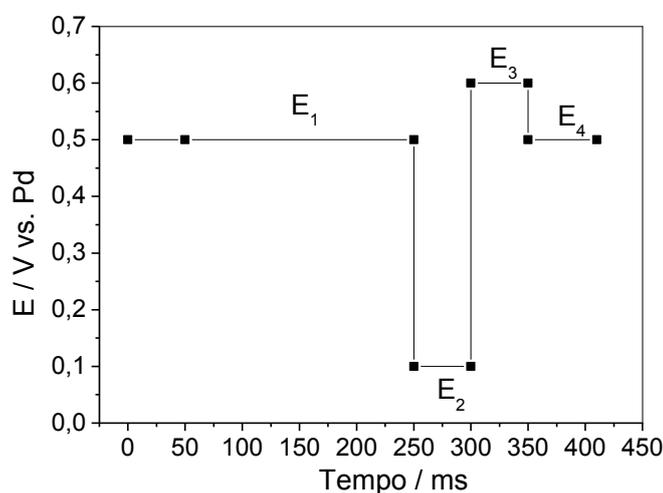
2º pulso (E₂) – É aplicado um pulso de potencial de 0,10 V vs. Pd. por 50 ms para redução total de todas as espécies que estão na superfície do eletrodo.

3º pulso (E_3) – A duração deste pulso é de 50 ms com potencial positivo de 0,60 V vs. Pd. para oxidar todas as espécies de níquel na superfície do eletrodo e formação do $Ni^{(III)}$ que está atuando na oxidação dos açúcares, e;

4º pulso (E_4) – É aplicado no potencial de 0,50 V vs. Pd. por 60 ms para iniciar a estabilização do eletrodo para posterior oxidação dos açúcares.

Os potenciais utilizados nos pulsos amperométricos são importantes para o monitoramento dos açúcares, pois influência diretamente na resolução dos cromatogramas.

Figura 48 - Sequência de pulsos otimizados para análise dos açúcares com detecção amperométrica pulsada utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH.



Fonte: Autor (2015).

Tabela 6 - Sequência de pulsos aplicados na análise dos açúcares com detecção amperométrica pulsada utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH

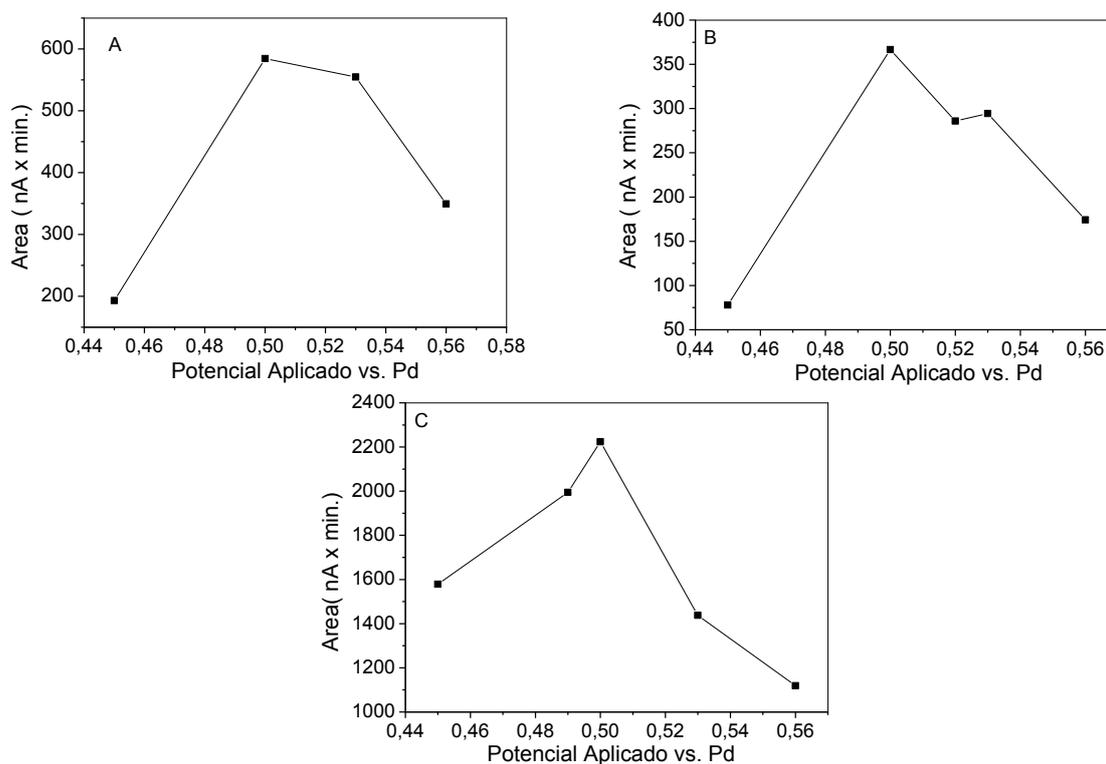
Tempo / ms	Potencial / V	Integração
0	0,50	
50	0,50	Início
250	0,50	Final
300	0,10	
350	0,60	
410	0,50	

Fonte: Autor (2015).

Para se obter a melhor programação de potencial da sequência de pulsos utilizado para a determinação, inicialmente, foi realizada a otimização dos pulsos

aplicados na oxidação dos açúcares para detecção amperométrica pulsada. Esses estudos de detecção e quantificação de arabinose foram realizados para construção da curva analítica para cada tempo de deposição de níquel, sendo feitos estudos da influência de potencial de oxidação para arabinose. Como pode ser observado na Figura 49, em todos os tempos de eletrodeposição estudados que compreende 10, 30 e 60 segundos a maior corrente de resposta foi para o potencial de detecção de 0,50 V vs. Pd, esse comportamento pode ser atribuído ao fato que este potencial aplicado tem maior facilidade em promover a eletro-oxidação da arabinose com o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH.

Figura 49 - Estudos do efeito de potencial de oxidação aplicado no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH de acordo com os tempos de eletrodeposição A) 10 segundos, B) 30 segundos e C) 60 segundos em função área de pico de arabinose. Composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna CarboPac Pa 10



Fonte: Autor (2015).

A Tabela 7 mostra os parâmetros de otimização para a preparação do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, para aplicação como detector no HPLC na detecção e quantificação dos açúcares em soluções padrões e amostras de hidrolisados de biomassa.

Tabela 7 - Parâmetros otimizados para preparação do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH

Concentração de nanotubos de carbono (MWCNT):	0,1 mg mL ⁻¹
Volume de MWCNT adicionado no eletrodo GCE:	5,0 µL
Eletrólito suporte de deposição:	Tampão fosfato (pH 6,5)
Solução de deposição:	5,0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ de NiSO ₄
Potencial de eletrodeposição:	-1,3 V vs. Ag/AgCl
Tempo de eletrodeposição:	30 segundos
Solução de formação de NiOOH:	0,5 mol L ⁻¹ de NaOH

Fonte: Autor (2015).

A Figura 50 apresenta o cromatograma dos açúcares das soluções padrões aplicando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH como detector eletroquímico no HPLC. As curvas analíticas foram construídas para avaliar as figuras de mérito da técnica com o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH. Para isso foram preparadas soluções nas concentrações de 5,5×10⁻⁶ a 5,5×10⁻⁵ mol L⁻¹, avaliando os limites de detecção, quantificação e a sensibilidade amperométrica da técnica.

A Figura 51 apresenta as curvas analíticas para os açúcares arabinose, galactose, glicose e xilose. Para a manose que até aqui foi denominado pelo pico 5 nas figuras, foi observado um pequeno pico em torno de 32,0 minutos (Figura 50) o qual foi atribuído a este açúcar, porém não foi possível a quantificação desse açúcar.

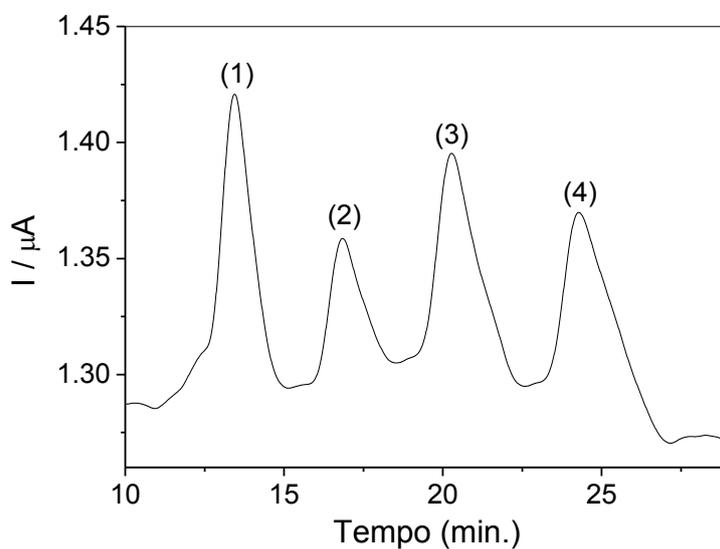
Através da Figura 50 foi possível calcular a resolução entre os picos obtendo assim os seguintes valores, 2,77 para arabinose, 3,29 para galactose, 2,64 para glicose e 2,87 para xilose.

A Tabela 8 mostra as figuras de mérito para os açúcares, para arabinose o limite de detecção foi de 2,5×10⁻⁶ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de 8,4×10⁻⁶ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de 0,1×10⁶ A L mol⁻¹.

Para galactose o limite de detecção foi de 5,4×10⁻⁶ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de 1,7×10⁻⁵ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de 0,5×10⁵

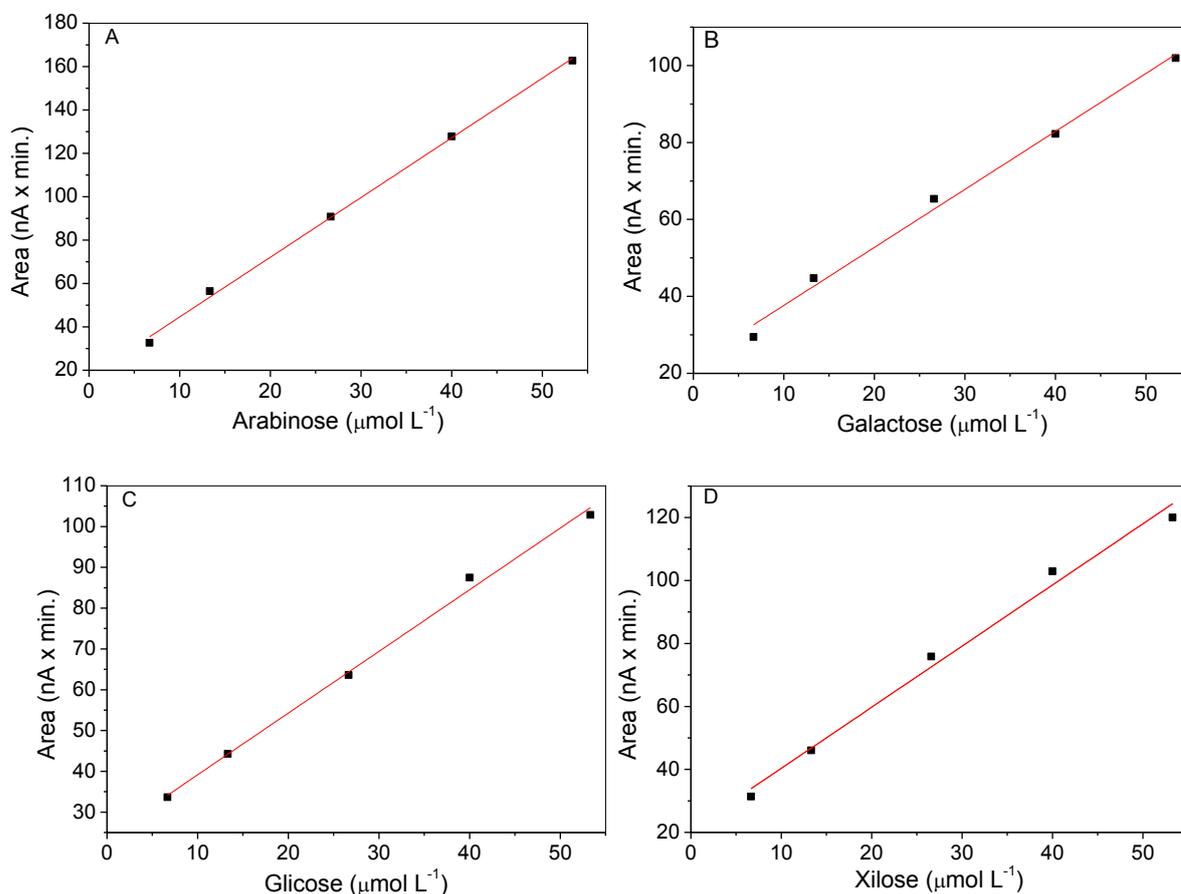
A L mol⁻¹. Para glicose o limite de detecção encontrado foi de $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de $0,5 \times 10^5$ A L mol⁻¹. A xilose apresentou um limite de detecção de $6,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de $2,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e sensibilidade amperométrica de $0,8 \times 10^5$ A L mol⁻¹.

Figura 50 - Cromatograma dos açúcares contendo $4,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose e (4) Xilose; Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH 0,50 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbopac Pa 10



Fonte: Autor (2015).

Figura 51 - Curvas analíticas para (A) Arabinose, (B) Galactose, (C) Glicose e (D) Xilose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH 0,50 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbowac Pa 10



Fonte: Autor (2015).

Tabela 8 - Figuras de mérito para detecção dos açúcares utilizando técnica cromatográfica com eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH

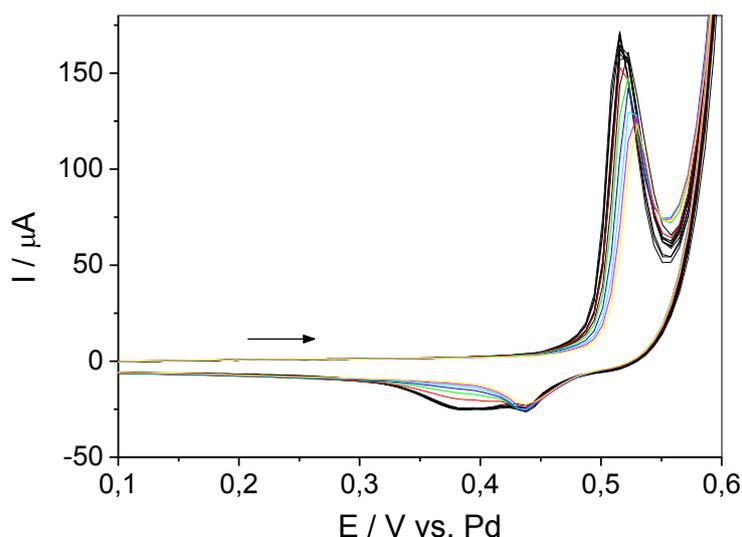
Açúcares	LOD (mol L ⁻¹)	LOQ (mol L ⁻¹)	SA ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	r
Arabinose	$2,5 \times 10^{-6}$	$8,4 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^4$	0,999
Galactose	$5,4 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^4$	0,997
Glicose	$3,4 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^4$	0,998
Xilose	$6,6 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^4$	0,995
Manose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d

Fonte: Autor (2015).

3.6. Estabilidade do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH como detector no HPLC

Para estudar a estabilidade do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, foi obtido um voltamograma cíclico entre cada injeção durante a construção das curvas analíticas no HPLC (Figura 52), foi avaliado a estabilidade do eletrodo durante as análises através da intensidade do pico do $\text{Ni}^{\text{II/III}}$ que não diminuem, isso é um indicativo que o eletrodo é estável durante as medidas em HPLC.

Figura 52 - Voltamogramas cíclicos realizados no HPLC entre as medidas da curva analítica para os estudos de estabilidade do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, composição da fase móvel 99% de H_2O e 1% NaOH $0,150 \text{ mol L}^{-1}$, fluxo da fase móvel $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, temperatura do forno da coluna 25°C , temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbopac Pa 10



Fonte: Autor (2015).

3.7. Determinação dos açúcares presentes no bagaço de cana-de-açúcar utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH como detector no HPLC

Conforme objetivo desta tese, a separação e detecção dos açúcares presentes no bagaço e palha de cana-de-açúcar são de grande interesse para as indústrias de álcool e açúcar, uma vez que estes compostos podem ser utilizados para a produção de etanol de segunda geração.

Para desenvolver este método analítico foram adquiridos amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar e submetidas ao processo de hidrólise, neutralização e filtragem como descrito na seção 3.8.

As amostras foram injetadas no HPLC nas condições otimizadas e a identificação dos picos cromatográficos foi baseada no tempo de retenção dos analitos específicos.

A Figura 53 mostra o cromatograma obtido para a amostra de hidrolisado de biomassa. O método utilizado para determinar a concentração de açúcares presentes na amostra foi o método de adição de padrão, este método é importante quando a amostra é muito complexa, como é o caso do bagaço da cana.

Na Tabela 9 é possível observar os constituintes, as equações das curvas de adição de padrão, concentrações determinadas nas amostras diluídas e concentrações determinadas na amostra de bagaço de cana-de-açúcar.

Na curva do método de adição de padrão para a arabinose foi obtida a equação de regressão de $y = 23,4 + 18,3 x$, com uma correlação linear de 0.997. Para glicose obteve-se uma equação de regressão de $y = 122,8 + 4.6 x$, com correlação linear de 0,998. Na xilose foi observada uma equação de regressão de $y = 59,2 + 9,7 x$, com correção linear de 0.996. Foram realizadas diluições de ordem de 70 vezes para arabinose, glicose e xilose devido que as amostras apresentaram concentrações elevadas.

Foram determinadas as seguintes concentrações na amostra: $5,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para arabinose, $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ para glicose e $2,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para xilose.

As adições de padrão foram realizadas em três diferentes eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH, a fim de verificar a repetibilidade de detecção.

A galactose não foi detectada nesta amostra de biomassa e manose não foi detectada no intervalo de concentração estudado neste detector utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH.

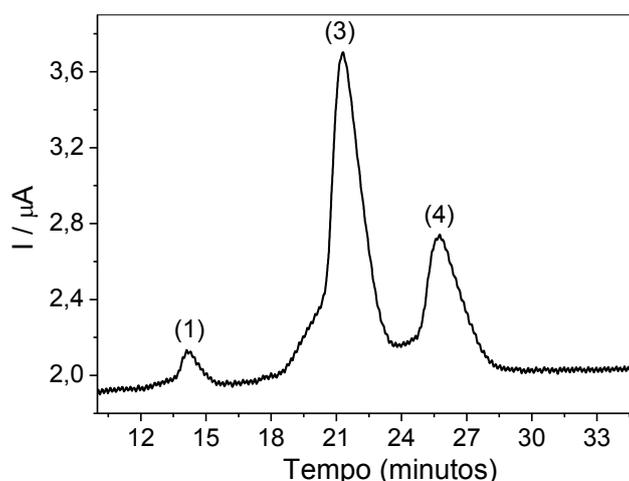
Tabela 9 - Parâmetros analíticos dos constituintes encontrados em amostras de bagaço de cana-de-açúcar utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH

Açúcares	Equação linear	Concentração da amostra diluída mol L ⁻¹	Concentração da amostra mol L ⁻¹
1-Arabinose	$y = 23,4 + 18,3 x$	$8,5 \times 10^{-6}$	$5,9 \times 10^{-4}$
2-Galactose	$y = 22,5 + 10,0 x$	n.d.	n.d.
3-Glicose	$y = 122,8 + 4,6 x$	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-2}$
4-Xilose	$y = 59,2 + 9,7 x$	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-3}$

n.d= não detectado

Fonte: Autor (2015).

Figura 53: Cromatograma para a amostra hidrolisada do bagaço de cana-de-açúcar contendo os seguintes açúcares: (1) Arabinose, (3) Glicose e (4) Xilose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH 0,50 V vs. Pd, composição da fase móvel 99% de H₂O e 1% NaOH 0,150 mol L⁻¹, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna CarboPac Pa 10.



Fonte: Autor (2015).

Após ser realizado o método de adição de padrão, foi avaliada a validação do método analítico através dos estudos de recuperação para os açúcares, arabinose, glicose e xilose. Três concentrações diferentes de açúcares foram injetadas na amostra, como mostrado na Tabela 10. A recuperação média de arabinose foi de 102.49%, com um coeficiente de variação (CV) de 3.95%, para glicose recuperação média foi de 99.19% com um coeficiente de variação de 2.02% e para xilose a recuperação média foi de 100.55% com um coeficiente de variação de 3.31%.

Estes estudos mostraram que o método pode ser considerado robusto e adequado para a detecção dos açúcares em bagaço de cana de açúcar.

Tabela 10: Porcentagem recuperação dos analitos na amostra utilizando a técnica de HPLC com GCE/MWCNT/NiOOH para os açúcares Arabinose, Glicose e Xilose

Arabinose / mol L ⁻¹	Concentração encontrada / mol L ⁻¹	% Recuperada
1,3×10 ⁻⁵	1,4×10 ⁻⁵	105,1
4,0×10 ⁻⁵	3,9×10 ⁻⁵	97,8
5,3×10 ⁻⁵	5,5×10 ⁻⁵	104,4
Glicose / mol L ⁻¹		
1,1×10 ⁻⁵	1,1×10 ⁻⁵	99,2
3,3×10 ⁻⁵	3,2×10 ⁻⁵	97,2
4,4×10 ⁻⁵	4,4×10 ⁻⁵	101,2
Xilose / mol L ⁻¹		
1,3×10 ⁻⁵	1,3×10 ⁻⁵	99,1
4,0×10 ⁻⁵	3,9×10 ⁻⁵	98,2
5,3×10 ⁻⁵	5,5×10 ⁻⁵	104,3

Fonte: Autor (2015).

4.0. CONCLUSÃO

O eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas óxi/hidróxido de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH) pode ser utilizado com sucesso como um detector amperométrico para a determinação dos açúcares por HPLC. O método desenvolvido para detecção amperométrica pulsada dos quatro açúcares demonstrou ser seletivo, sensível e reprodutível. Estas propriedades fazem com que este novo método poderá ser uma alternativa interessante para outras aplicações analíticas, envolvendo diferentes amostras lignocelulósicas.

O eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foi utilizado para determinar açúcares em amostra de hidrolisado de biomassa, as concentrações determinadas em bagaço de cana de açúcar foram de arabinose $6,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, a glicose foi de $1,03 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e xilose foi de $2,84 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, a espécie galactose não foi detectada nos testes desta amostra de bagaço de cana.

Os resultados demonstram que o método proposto pode ser utilizado para a detecção destes açúcares com considerável precisão e confiabilidade, sem a

necessidade de derivatização que ocorre nos detectores uv-vís durante as análises. O método analítico não sofreu nenhuma interferência, mesmo em amostra complexa como é o bagaço de cana de açúcar.

CAPÍTULO 4

Determinação dos açúcares em bagaço de cana de açúcar por cromatografia de troca aniônica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo foram descritos os parâmetros estudados de eletrodeposição utilizando duas metodologias diferentes para confeccionar o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/CoOO). Esse eletrodo foi caracterizado por técnicas eletroquímicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e foi aplicado nas oxidações eletroquímicas diretas dos açúcares em meio alcalino.

Na literatura são encontrados vários trabalhos abordando o desenvolvimento de eletrodos modificados com cobalto, tal como relatado por Gualandi et al. (2015) que utilizaram um eletrodo de platina modificado com hidróxido de cobalto/alumínio acoplado ao sistema de análise por injeção em fluxo para determinação amperométrica dos açúcares glicose, frutose e sacarose sendo encontrados os limites de detecção na ordem de $1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Sendo assim, foi desenvolvido um método analítico com o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO que foi acoplado no HPLC para determinação dos açúcares presentes em amostras de hidrolisados de bagaço de cana de açúcar

Para o desenvolvimento do método cromatográfico para os açúcares foi utilizada uma coluna carboxypac PA-1, sendo necessário a utilização do eletrodo de ouro nos estudos de composição da fase móvel. Foi realizado também estudos de potencial de detecção para o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Todos os experimentos foram realizados utilizando reagentes de grau de pureza analítica.

Na preparação das soluções foi utilizada água deionizada (Millipore, Billerica, MA, USA). Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas com pureza de 95% já funcionalizados conforme descrito no capítulo 3, cloreto de cobalto (II) ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nitrato de cobalto ($\text{CoNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), N,N-dimetilformamida (DMF) 99,8% ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$), L-arabinose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, 99%), D-glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%), D-galactose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%), D-manose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 99%), D-xilose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, 99%) e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solução tampão fosfato (pH 6,5) foi preparada utilizando $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 . A solução de cobalto foi preparada em tampão fosfato. As soluções de açúcares foram preparadas imediatamente antes do uso. Para a modificação da superfície do eletrodo foi utilizada uma suspensão de MWCNT/DMF, preparadas com 1,0 mg de MWCNT em 10,0 mL de DMF em banho ultrassônico por 30 minutos.

2.2. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto GCE/MWCNT/CoOO

Os eletrodos de carbono vítreo (GCE) foram polidos com alumina, depois imersos em acetona por cerca de 1 min. e lavados com água destilada e etanol, esse procedimento foi realizado em cada limpeza nos eletrodos de carbono vítreo.

O procedimento de preparação da suspensão de nanotubos de carbono aconteceu de forma eficiente de acordo com o seguinte procedimento:

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) já funcionalizados foram pesados e dispersos em N,N-dimetilformamida (DMF) com agitação ultrassônica por 30 minutos obtendo-se a concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Na modificação do eletrodo de carbono vítreo, foi adicionado em sua superfície $5,0 \mu\text{L}$ de suspensão de nanotubos de carbono de concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e o eletrodo GCE contendo nanotubos de carbono foi secado durante 1,0 hora em uma estufa com $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os eletrodos de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) foram estudados com dois diferentes métodos de modificação com cobalto.

O primeiro método foi realizado de acordo com Razmi e Habibi (2010), o eletrodo GCE/MWCNT foi primeiro imerso em $20,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de cobalto $(\text{CoNO}_3)_2$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) preparado pela mistura das soluções de dihidrogenofosfato de sódio $(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrogenofosfato dissódico $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, a modificação foi realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica, o potencial aplicado no eletrodo foi de 0,3 a 0,9 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} durante 50 ciclos consecutivos.

Após cada modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/Co) foi realizado a formação de óxi-hidróxido de cobalto em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de -0,3 a 0,7 V em uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} durante 45 voltamogramas cíclicos. Em seguida, o GCE/MWCNT/CoOO foi lavado abundantemente com água deionizada e secado.

O segundo método para modificação do eletrodo GCE/MWCNT com nanopartículas de cobalto foi realizado de acordo com a metodologia de Salimi et al. (2007b, 2008), onde o eletrodo de carbono vítreo já modificado com nanotubos de carbono foi imerso em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de cobalto (CoCl_2) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) preparado pela mistura das soluções de dihidrogenofosfato de sódio $(\text{NaH}_2\text{PO}_4)$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrogenofosfato dissódico $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. A eletrodeposição foi realizada por voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -1,1 a 1,2 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} durante 30 ciclos.

Para completar a modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/Co) foi realizado a formação de oxi-hidróxido de cobalto em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em uma janela de potencial de -0,3 a 0,7 V com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , nestes experimentos para a formação das espécies óxido e hidróxido foram realizados estudos da quantidade de ciclos entre 35 e 55 ciclos.

Após cada modificação o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO foi lavada abundantemente com água deionizada e secado.

2.3. Determinações dos açúcares (Arabinose, Galactose, Glicose, Xilose e Manose) em cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada

Os açúcares foram determinados em soluções padrões e do hidrolisado de biomassa (bagaço e palha de cana-de-açúcar) em um cromatógrafo de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPLC) da marca metrohm 850 Professional IC Cation-HP-Gradient com modulo extensor 872 (bomba C, pós-coluna), injetor automático com um loop de 20 μ L, com detector amperométrico pulsado com célula eletroquímica Wall-Jet composta por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo de 3 mm de diâmetro (área aproximadamente igual a 0,07 cm²) modificado com nanotubos contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/CoOO), eletrodo pseudo-referência de paládio (Pd) e eletrodo auxiliar de liga de platina conforme especificação desse fabricante.

O HPLC foi ligado a um microcomputador e gerenciado pelo software MagIC Net 2.4. As separações destes açúcares foram efetuadas utilizando uma coluna DIONEX[®] CarboPac[™] Pa 1 4x250 mm, coluna de guarda DIONEX[®] CarboPac[™] Pa 1 4x50 mm, ambas contendo uma matriz de 10 μ m de diâmetro, revestida de poliestireno/divinilbenzeno, associada ao poliacrilato MicroBead[™] de 500 nm e funcionalizado com um sal de amônio quaternário altamente estável nos potenciais hidrogeniônicos de 0 a 14.

Foram realizados estudos de força de eluição (força eluotrópica) do solvente água/NaOH 0,150 mol L⁻¹ em modo gradiente, estes estudos foram realizados novamente devido que a coluna utilizada no capítulo 2 foi a PA 10 e neste capítulo foi utilizado a coluna PA 1. Foram realizados também estudos de potencial de oxidação para análise dos açúcares.

No reabastecimento dos reagentes de separação (H₂O e NaOH) foi purgado e borbulhado gás nitrogênio para eliminar a presença de dióxido de carbono e subsequente evitar a produção de carbonato na fase móvel.

Durante as medidas o fluxo 0,3 ml min.⁻¹ de 0,3 mol L⁻¹NaOH da fase móvel foi mantido contínuo no modulo extensor 872 (bomba C, pós-coluna) para manter constante a força iônica no detector amperométrico.

2.4. Curvas analíticas

As curvas analíticas para os açúcares arabinose, galactose, glicose e xilose foram construídas com a variação da área do pico cromatográfico em função da concentração do analito, através de adições sucessivas de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de soluções padrões.

2.5. Preparo das amostras de hidrolisado de biomassa para determinação cromatográfica

A biomassa (bagaço e palha de cana-de-açúcar) foi doada por uma usina da região de Araraquara-SP. A hidrólise do bagaço segue a metodologia baseada no Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos (SLUITER et al., 2010).

A biomassa seca foi colocada em aparelho Soxhlet para eliminação dos extrativos. Inicialmente foi usada água para eliminação dos extrativos aquosos e posteriormente, extração com etanol para eliminação dos extrativos etanólicos. O bagaço foi seco em estufa a 40 °C por 12 horas, obtendo a biomassa seca. Amostras de 300 mg dessa biomassa foram transferidas para um frasco de 250 mL e tratados com 3 mL de H₂SO₄ 72% (v/v), sob vigorosa agitação, em um banho termostaticado a 45°C por 60 min. A reação foi interrompida com a adição de 85 mL de água destilada. Para a completa hidrólise dos oligômeros restantes, o frasco foi fechado e autoclavado por 60 minutos a 1,05 bar. Após a decompressão da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e 20 mL do hidrolisado foi transferido para um erlenmeyer de 50 mL onde foi então neutralizado com CaCO₃, filtrado com filtros de 0,45 e 0,22 µm de porosidade e por fim, injetado diretamente na coluna cromatográfica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Estudos de eletrodeposição do cobalto

A modificação do eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/CoOO) foi realizada com dois tipos de estudos diferentes conforme citado nos materiais e métodos deste capítulo no item 2.3.

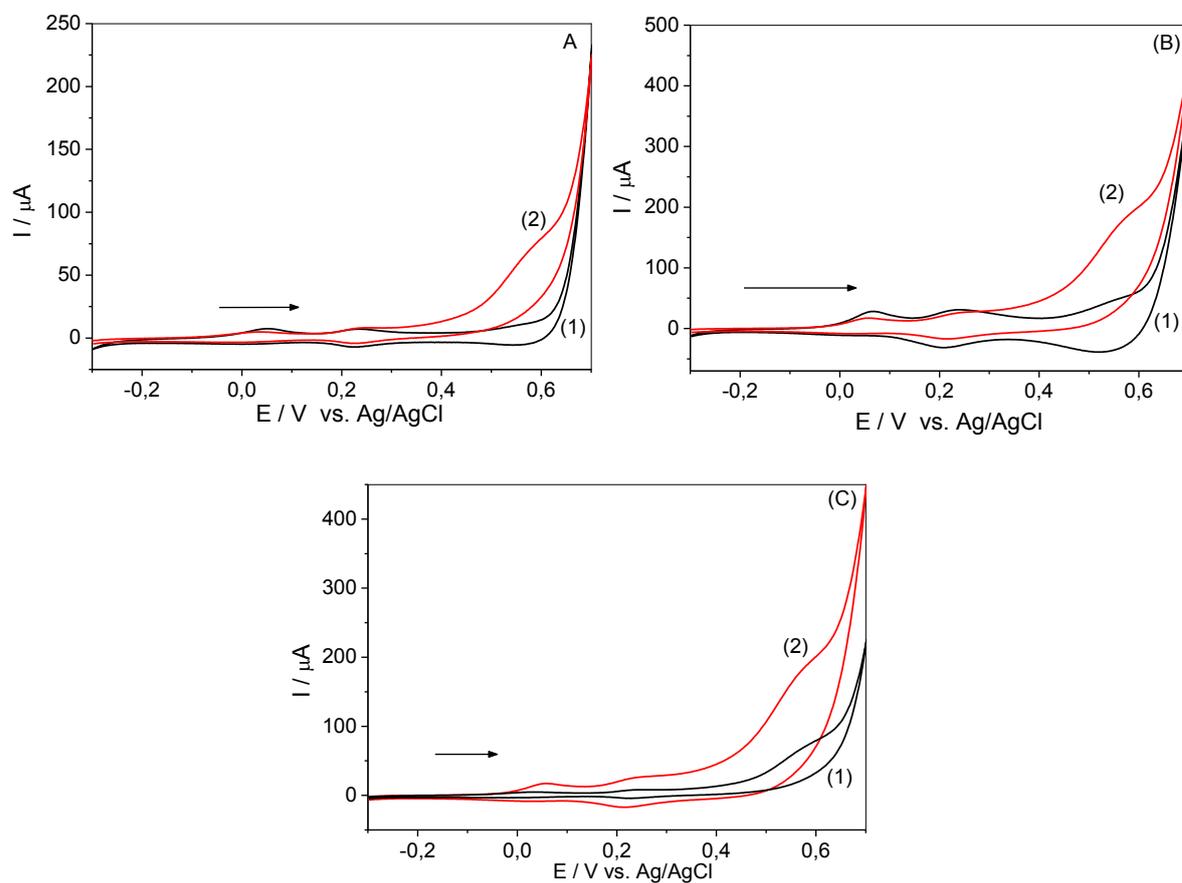
A Figura 54-A mostra o comportamento do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO modificado conforme o primeiro método descrito por Razmi, já a Figura 54-B mostra o comportamento do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO modificado conforme descrito para o segundo método de acordo com Salimi na presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose.

Foi possível observar que a intensidade de corrente no voltamograma cíclico apresentado com glicose para a Figura B foi em torno de duas vezes maior do que a intensidade de corrente do voltamograma cíclico apresentado na Figura A, esse comportamento é mostrado através da Figura 54-C.

Esta diferença de corrente pode estar relacionada com a forma ou dispersão das nanopartículas de cobalto na superfície dos nanotubos de carbono, pois conforme literatura o primeiro método favorece a formação de nanopartículas mais compactas, chegando a formar em muitos casos um filme de nanopartículas, já para o segundo método conforme ilustrado na Figura 61-B foi possível observar nanopartículas mais dispersas na superfície favorecendo uma melhor oxidação da glicose na superfície do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO.

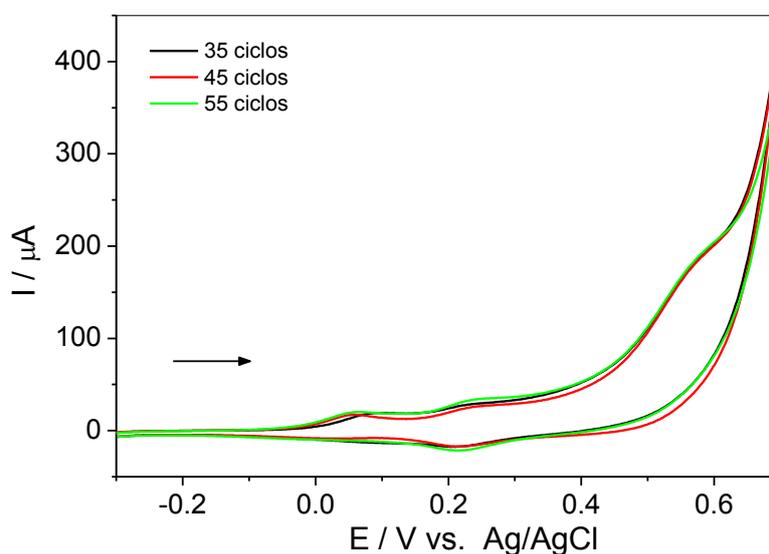
Foram realizados estudos de número de voltamogramas cíclicos durante a formação de óxido/hidróxido de cobalto, foram realizados estudos com 35, 45 e 55 ciclos conforme estudos relatados na literatura e após cada estudo de ciclos os eletrodos foram aplicados na detecção de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose conforme mostra a Figura 55, foi observado que não existe diferença no número de ciclos estudados, diante disso foi definido que a modificação do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO para o desenvolvimento do método analítico para quantificação dos açúcares será realizado de acordo com o segundo método e com 45 ciclos para formação das espécies de óxi-hidróxido de cobalto.

Figura 54 - Estudos para eletrodeposição no eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono para cobalto utilizando diferentes metodologias: (A) 1º método com 1- ausência e 2- presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose; (B) 2º método com 1- ausência e 2- presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose; (C) 1º método presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose e 2º método com presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose. (NaOH 0,1 mol L⁻¹; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹)



Fonte: Autor (2015).

Figura 55 - Estudos de estabilização para o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO utilizando o 2º método com presença de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose de acordo com os estudos de ciclos realizados durante a estabilização (35, 45 e 55 ciclos); (NaOH 0,1 mol L⁻¹; Taxa de velocidade de varredura 50 mV s⁻¹)



Fonte: Autor (2015).

A Figura 56 ilustra 30 voltamogramas cíclicos durante a eletrodeposição no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) contendo solução de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de cloreto de cobalto (CoCl₂), é possível observar um pico catódico em -1,0 V foi (pico I) na primeira varredura, este pico esta relacionado com a equação Equação 24. O pico catódico diminuiu conforme é aumentado o número de ciclos, indicando que o íon Co(II) foi lentamente reduzida sobre a camada de óxido de cobalto depositada sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono.

Foi observado um pico anódico em -0,30 V vs Ag/AgCl (pico II), este pico esta relacionado com a dissolução da camada de cobalto depositado na superfície do eletrodo (MOURA et al., 2014; SALIMI et al., 2007b).

Foi observado um pico em 1,05 V vs. Ag/AgCl e um aumento de corrente relacionado com a evolução de oxigênio (pico III) que pode ser atribuída à formação de CoOOH (Equação 25 e 26) como resultado da oxidação de Co(OH)₂ ou de Co₃O₄ formado em potenciais menores porém não é possível observar esse pico. As correntes de pico catódica (pico III) em potencial de 0,85 V vs. Ag/AgCl correspondem à redução de CoOOH para Co(OH)₂ ou Co₃O₄ (MOURA et al., 2014; SALIMI et al., 2007b).

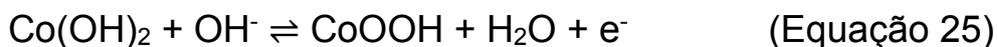
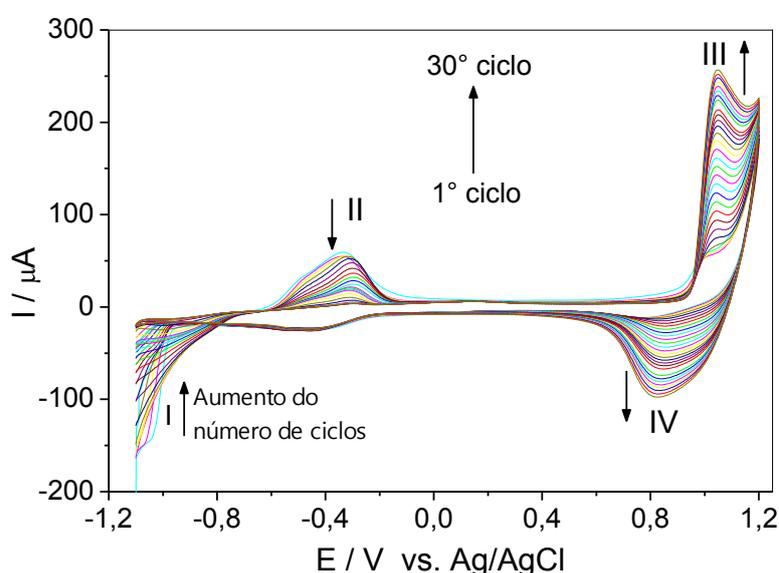


Figura 56 - Voltamogramas cíclicos consecutivos para formação das nanopartículas de cobalto no eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) contendo solução de 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ de cloreto de cobalto (CoCl₂). (Taxa de velocidade de varredura 50 mV s⁻¹)



Fonte: Autor (2015).

3.2. Caracterização eletroquímica do GCE/MWCNT/CoOO

O comportamento do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO é mostrado na Figura 57, sendo possível observar um comportamento relativamente complexo, pois estas espécies possuem vários estados de oxidação com diferentes variedades de espécies de óxidos e hidróxidos de cobalto presentes na região de potencial estudado.

As espécies hidratadas de Co^(II) são gradualmente convertidos para Co^(III) na forma de espécies Co₃O₄, Co₂O₃, CoHO₂ e diferentes formas cristalográficas estão presentes na forma de CoOOH (CASELLA; GATTA, 2002; CATALDI et al., 1992).

Estudos citados na literatura realizados com fotoelétrons de raios-X sobre de óxido/hidróxido de cobalto mostraram uma estrutura detalhada, indicando a

presença simultânea de várias espécies de óxido/hidróxido de $\text{Co}^{(II)}$ e $\text{Co}^{(III)}$ na superfície do eletrodo (CASELLA; GATTA, 2002).

As espécies mais relevantes de óxido/hidróxido de cobalto estão relacionadas com a composição da solução e com os potenciais aplicados, no caso da Figura 57 é mostrado o voltamograma cíclico em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e foi obtido três conjuntos de picos, sendo eles Ia, IIa / IIc e IIIa / IIIc em potenciais de 0,07, 0,24 e 0,56 V versus Ag/AgCl, respectivamente.

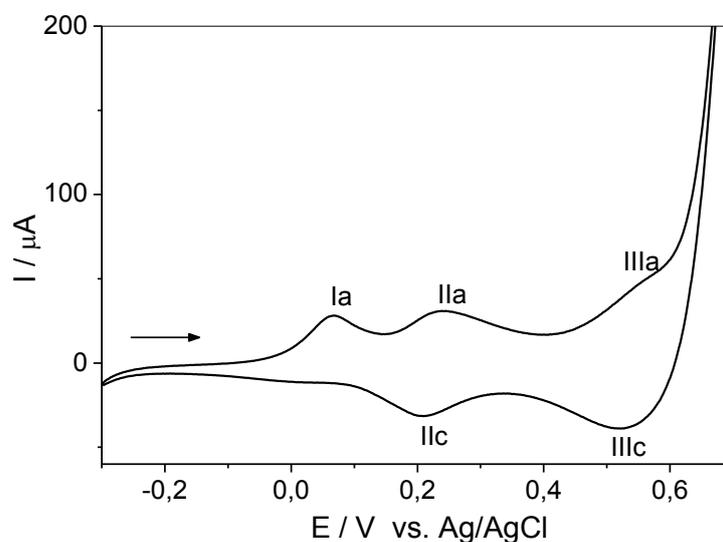
O pico (Ia) apresentou um comportamento irreversível, que na maioria das vezes não é relatado na literatura, pois esse pico geralmente se sobrepõe com o grupo de picos (IIa/IIc) e sua intensidade pode ser reduzida se a janela de potencial for restringida para potencial de -0,15 V vs Ag/AgCl. Esse potencial de pico pode ser atribuído provavelmente a transição eletroquímica envolvendo $\text{Co}^{(II)}$ hidratado formando uma espécie intermediária de óxido de cobalto Co_3O_4 (CASELLA; GATTA, 2002), conforme Equação 27.



Os picos de potencial redox IIa/IIc podem ser atribuídos na oxi-redução do cobalto durante a conversão de $\text{Co}_3\text{O}_4/\text{CoOOH}$ formando a espécie óxido hidróxido de cobalto (III) conforme apresentado na Equação 28. O comportamento observado nos picos de potencial redox IIIa/IIIc pode ser atribuído ao processo de oxi-redução de $\text{CoOOH}/\text{CoO}_2$, onde o $\text{Co}(\text{III})$ é oxidado a $\text{Co}(\text{IV})$ conforme Equação 29 (CASELLA; GATTA, 2002; CATALDI et al., 1992), essa espécie será a responsável na oxidação dos açúcares na superfície do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO.



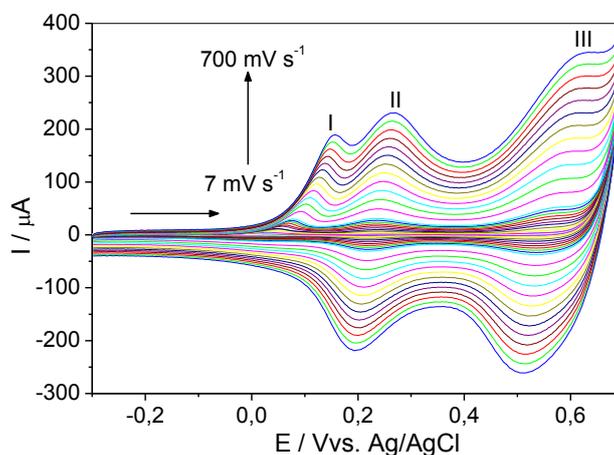
Figura 57 - Comportamento voltametrico do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO (NaOH 0,1 mol L⁻¹; velocidade de varredura 50 mV s⁻¹)



Fonte: Autor (2015).

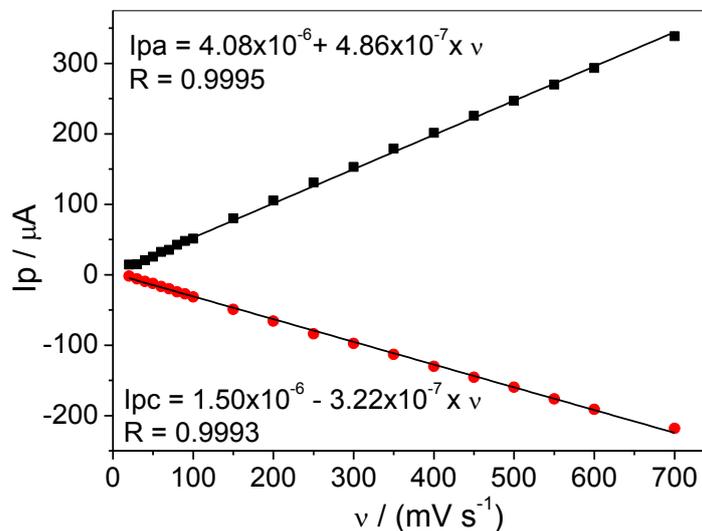
A Figura 58 mostrou os voltamogramas cíclicos do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em diferentes velocidades de varredura (7 - 700 mV s⁻¹) em NaOH 0,1 mol L⁻¹ na faixa de potencial de -0,3 a 0,7 V. Na Figura 59 mostra que as correntes de picos foram proporcionais à velocidade de varredura em relação ao intervalo de 7 a 700 mV s⁻¹ para o pico (III), as equações e os coeficientes de correlação lineares (r) estão inseridos na Figura 59. De acordo com a literatura esta relação linear indica um processo eletródico controlado por adsorção (BARD; FAULKNER, 2001).

Figura 58 - Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em NaOH 0,1 mol L⁻¹. Velocidades de varredura: 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 e 700 mV s⁻¹



Fonte: Autor (2015).

Figura 59 - Dependência dos picos de correntes anódicos e catódicos em função da raiz quadrada da velocidade de varredura entre 7 – 700 mV s^{-1}



Fonte: Autor (2015).

3.3. Caracterização microscópica

Os eletrodos de carbono vítreo (GCE) modificado com nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) e o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/CoOO) foram estudados através da comparação das imagens das superfícies em diversas ampliações das imagens das micrografias geradas por MEV-FEG.

Na Figura 60-A foi observado que os nanotubos de carbono estão dispersos na superfície de GCE, como os nanotubos estão espalhados de forma aleatória, essa dispersão pode atuar como sítios de adsorção das nanopartículas nestes emaranhados de nanotubos de carbono. A Figura 60-B mostra os detalhes dos nanotubos, sendo possível observar o diâmetro em torno de 10 a 20 nm, sendo consistente com a especificação emitida pelo fabricante.

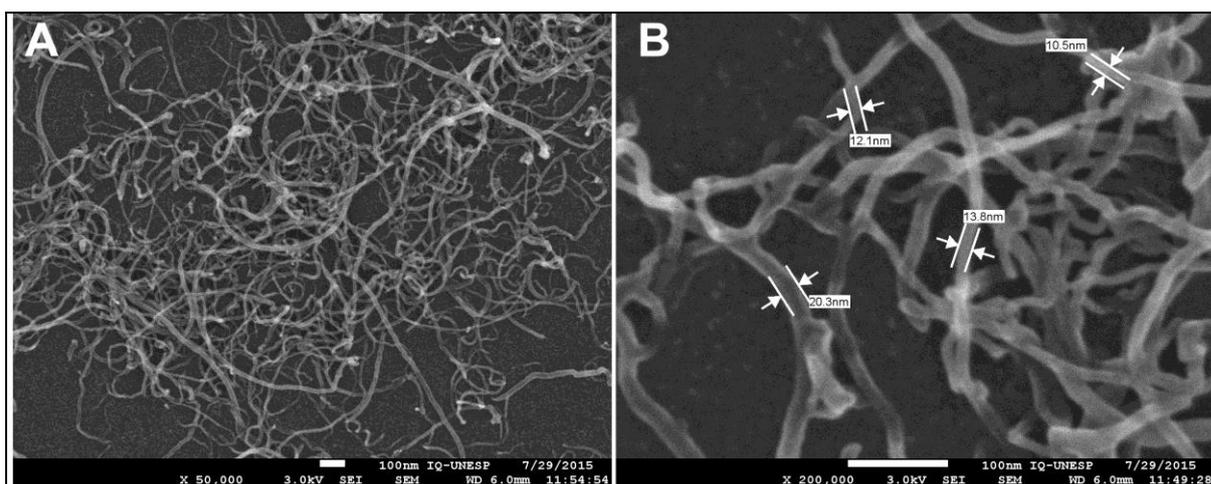
O histograma contendo o tamanho das nanopartículas foi apresentado na Figura 61-A, foi observado que a maioria das nanopartículas caracterizadas apresentaram tamanhos entre 50 e 100 nm de diâmetro com média de $75,05 \pm 19,61$ nm.

A Figura 61-B mostrou a imagem da superfície do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO, foi observado que as nanopartículas possuem característica esférica e estão dispersas na superfície dos nanotubos de carbono, este comportamento de dispersão por toda superfície poderá resultar no melhoramento da detecção, quantificação dos analitos e ainda aumentar a estabilidade e detectabilidade do eletrodo quando aplicado no HPLC.

A Figura 62 mostra a caracterização química através da técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), sendo possível observar picos intensos de carbono devido à presença do carbono vítreo utilizado como substrato e nanotubos de carbono da modificação do eletrodo, os picos mais insetos de cobalto e oxigênio é um indicativo que a modificação ocorreu de forma efetiva na formação de óxido-hidróxido de cobalto.

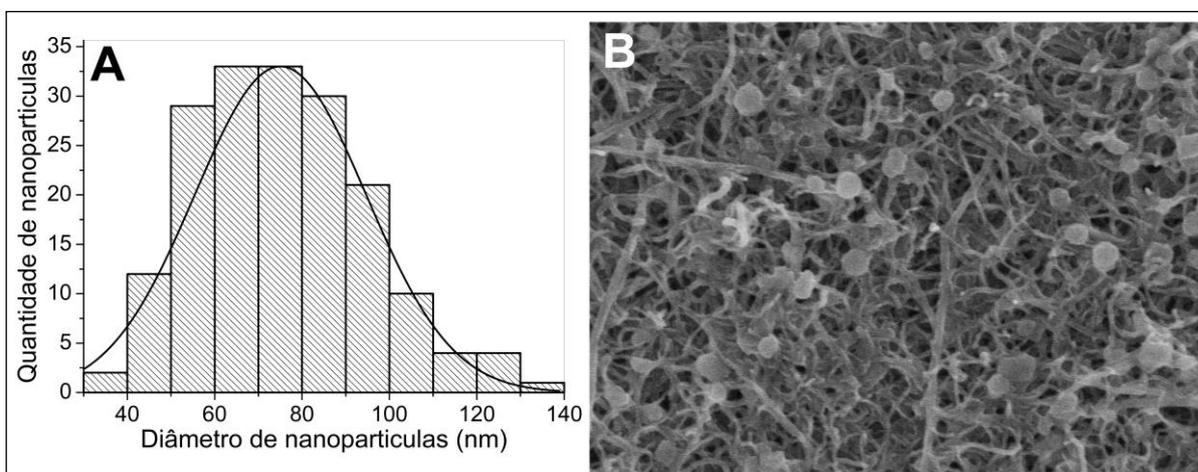
A presença do pico de sódio é devido que para a formação do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO é necessário utilizar como eletrólito suporte o hidróxido de sódio, mesmo com sucessivas limpezas com água, ainda foi possível detectar sódio na superfície do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO.

Figura 60 - Imagens de MEV para nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) com ampliações: (A) 50.000; (B) 200.000 vezes



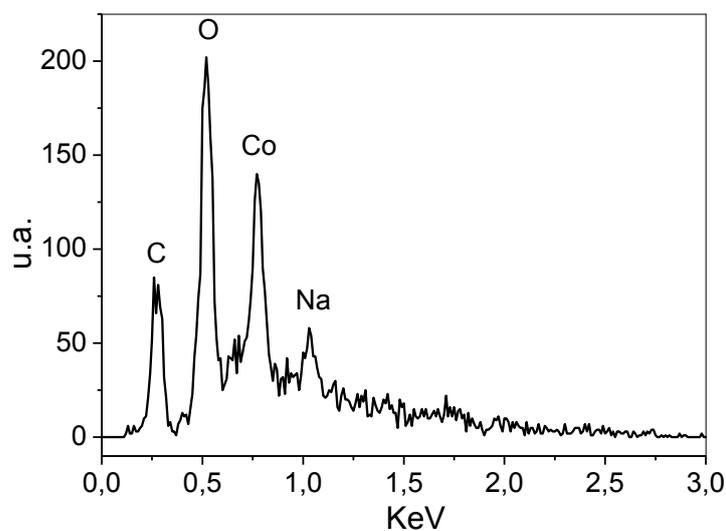
Fonte: Autor (2015).

Figura 61 - (A) Histograma da nanopartículas do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO; B Imagens de MEV para o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO com ampliação de 50.000 vezes



Fonte: Autor (2015).

Figura 62 - Espectro de energia dispersiva (EDS) do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO



Fonte: Autor (2015).

3.4. Eletro-oxidação dos açúcares

A eletro-oxidação da glicose no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO apresentado na Figura 63 ocorreu em potencial em torno de 0,58 V vs. Ag/AgCl associado com a formação de uma onda anódica em vez de um pico e aumento da corrente anódica e diminuição do pico corrente catódica.

A eletro-oxidação dos carboidratos no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO ocorre na presença do catalisador $\text{Co}^{(\text{IV})}$ através de uma unidade ativa de mediador redox, durante o processo de oxidação do açúcar o catalisador é reduzido para $\text{Co}^{(\text{III})}$ ocorrendo a formação de cetonas antes da evolução de oxigênio conforme Equação 30. Neste caso a glicose é oxidada via mecanismo EC. Os demais açúcares apresentaram comportamentos similares ao da glicose.

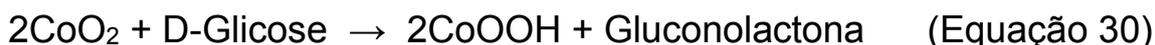
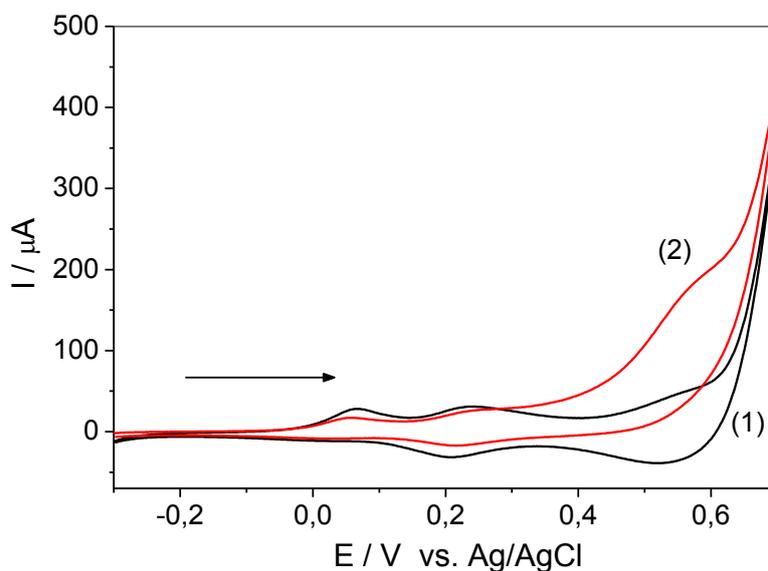


Figura 63 - Comportamento voltamétrico do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO (1) ausência e (2) presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; velocidade de varredura 50 mV s^{-1})



Fonte: Autor (2015).

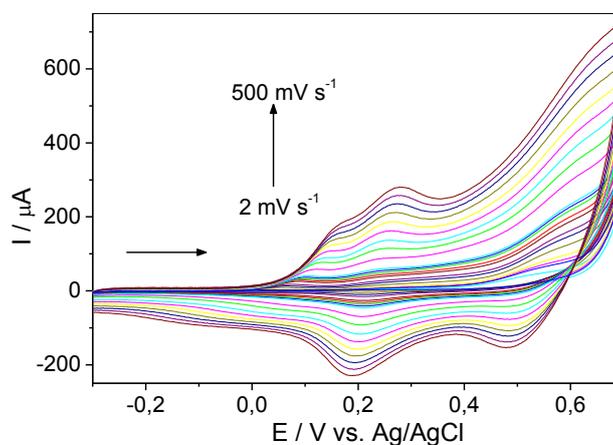
A Figura 64 mostra os voltamogramas cíclico do estudo de velocidades de varredura do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose, foi observado que a onda anódica da oxidação de glicose aumenta de intensidade conforme é aumentado a velocidade de varredura. A Figura 65 demonstrou que as correntes de picos foram proporcionais à velocidade de varredura no intervalo de 2 a 60 mV s^{-1} para o pico (III), indicando que nessa região um processo eletródico é controlado por adsorção (BARD; FAULKNER, 2001).

A Figura 66 mostra que a corrente anódica é proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando um processo eletródico controlado por difusão

(BARD; FAULKNER, 2001; KARIM-NEZHAD et al., 2009) de acordo com a equação $I_{pa} = -5,6 \times 10^{-7} + 2,6 \times 10^{-5} v^{1/2}$ e coeficiente de correlação de 0,997.

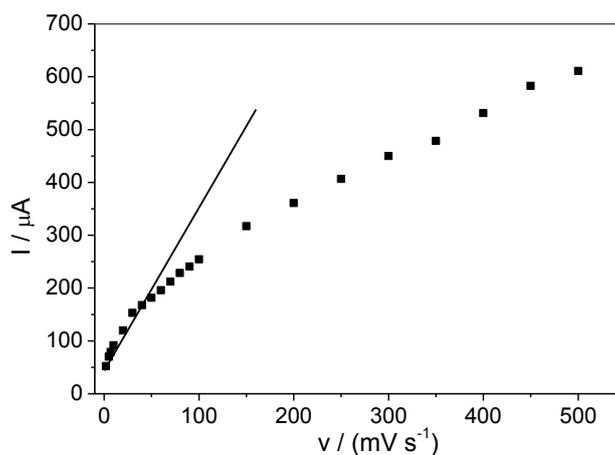
Todos os estudos de influência da velocidade de varredura foram realizados para outros açúcares (arabinose, galactose e xilose) e apresentaram comportamentos iguais ao da glicose.

Figura 64 - Voltamogramas cíclico do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Estudo de velocidades de varredura: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 mV s^{-1}



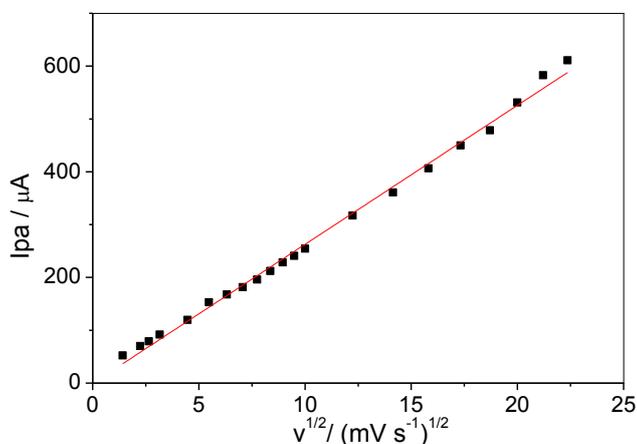
Fonte: Autor (2015).

Figura 65 - Gráfico da dependência do pico anódico em função da velocidade de varredura dos valores entre 2 a 500 mV s^{-1} no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$)



Fonte: Autor (2015).

Figura 66 - Gráfico da dependência do pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura dos valores entre 2 a 500 mV s^{-1} no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose (NaOH 0,1 mol L^{-1})



Fonte: Autor (2015).

3.5. Estudos da influência da concentração de açúcares

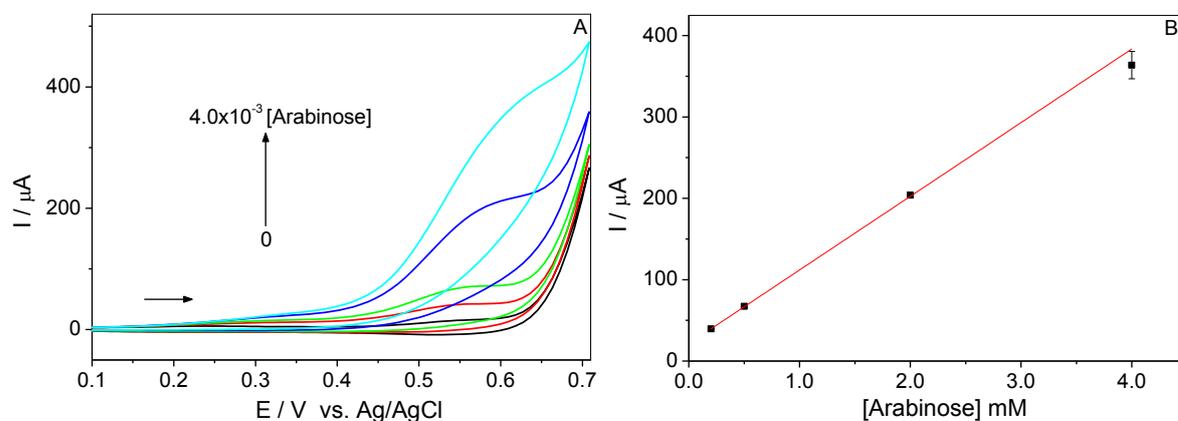
Os comportamentos dos açúcares no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO foram avaliados através dos voltamogramas mostrados nas Figuras 67, 68, 69, 70 e 71, foi possível observar que os comportamentos dos açúcares são similares.

Através destes estudos foram construídas curvas analíticas com variações de concentração nos intervalos de $2,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, os coeficientes de correlação para estas curvas analíticas ficaram próximas de 0,999.

Através destes estudos foi possível desenvolver e avaliar as equações da reta e as figuras de mérito presentes na Tabela 11. Foi observado que o GCE/MWCNT/CoOO possui boa sensibilidade amperométrica. O eletrodo apresentou baixos valores de limites de detecção e quantificação, isso é uma boa característica para o desenvolvimento do método analítico.

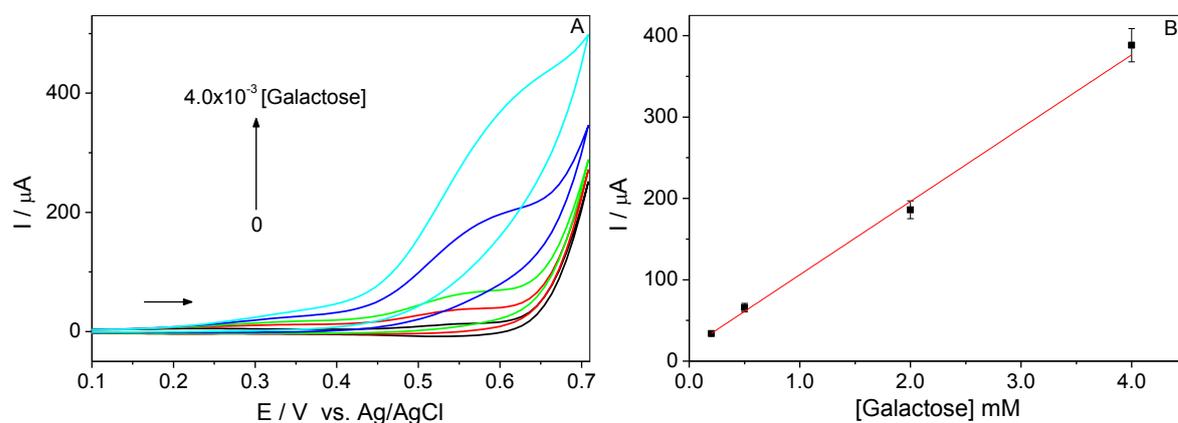
Estes estudos foram importantes para compreender a interação do eletrodo com os açúcares, para posterior desenvolvimento do método no HPLC.

Figura 67 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de arabinose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO



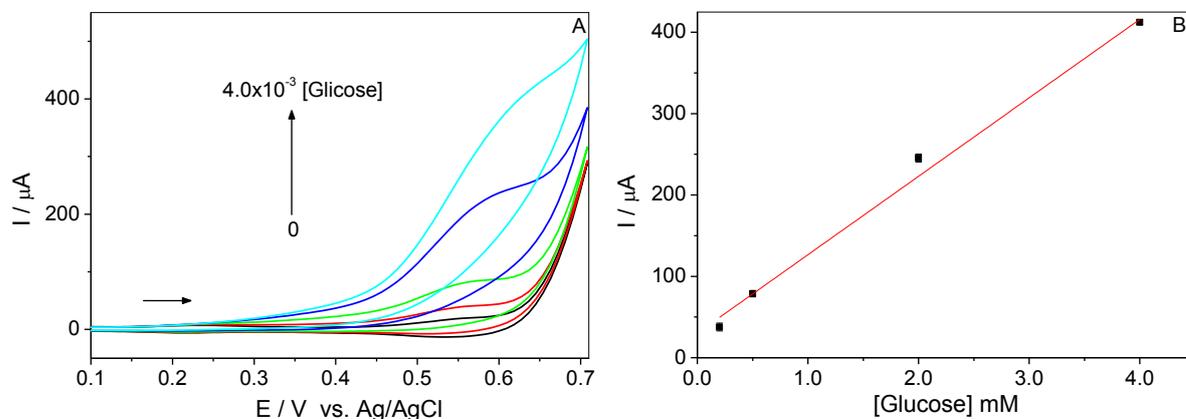
Fonte: Autor (2015).

Figura 68 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de galactose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO



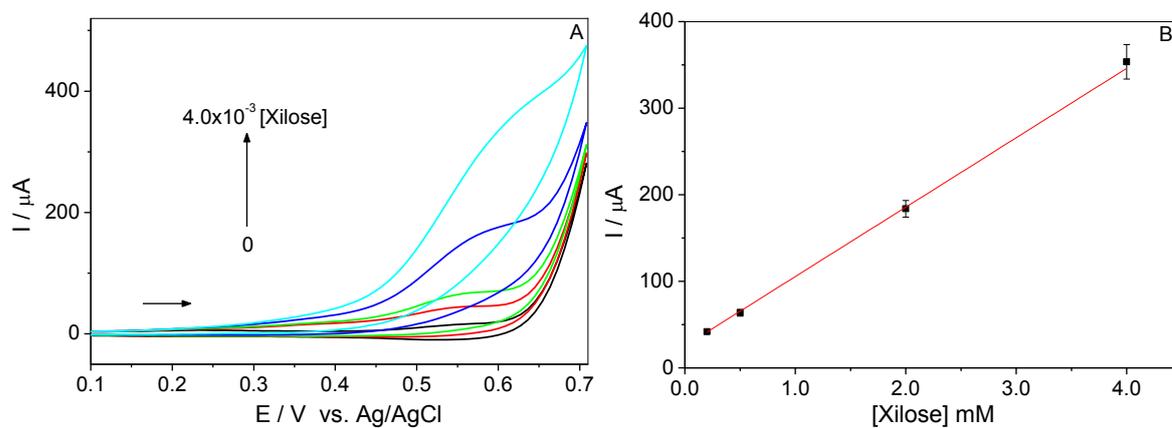
Fonte: Autor (2015).

Figura 69 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de glicose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO



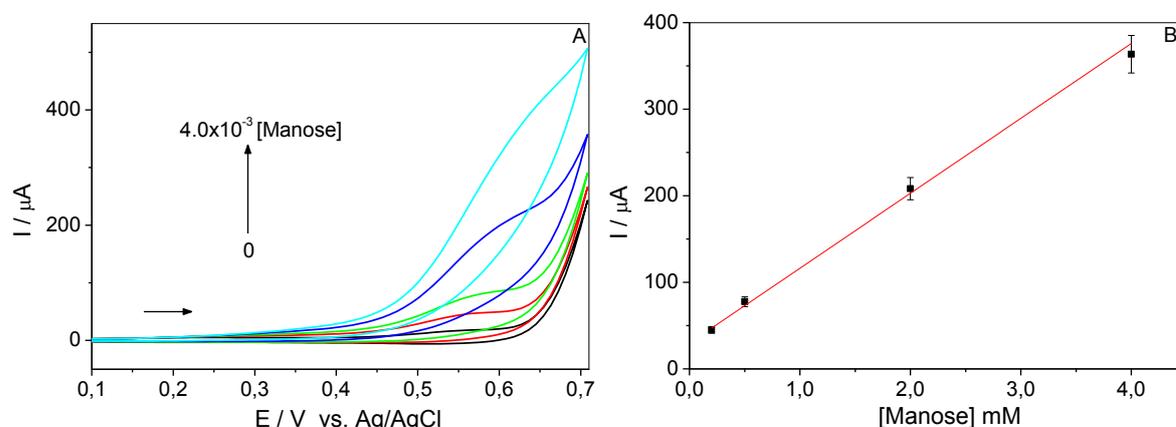
Fonte: Autor (2015).

Figura 70 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de xilose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO em 0.1 mol L^{-1} de NaOH (50 mV s^{-1}); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO



Fonte: Autor (2015).

Figura 71 - (A) Voltamogramas cíclicos do estudo de concentração de manose sobre o eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO em 0.1 mol L⁻¹ de NaOH (50 mV s⁻¹); (B) Curva analítica do eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO



Fonte: Autor (2015).

Tabela 11 - Figuras de mérito para vários açúcares no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH em voltametria cíclica ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $n = 3$).

Açúcar	Equação da Retas	LOD (mol L ⁻¹)	LOQ (mol L ⁻¹)	SA ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)
Arabinose	$I_{pa} = 2,1 \times 10^{-5} + 9,0 \times 10^{-2} [\text{ara}]$	$6,4 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^4$
Galactose	$I_{pa} = 1,6 \times 10^{-5} + 9,0 \times 10^{-2} [\text{gal}]$	$6,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^4$
Glicose	$I_{pa} = 3,0 \times 10^{-5} + 9,6 \times 10^{-2} [\text{gli}]$	$2,6 \times 10^{-4}$	$8,5 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^5$
Xilose	$I_{pa} = 2,5 \times 10^{-5} + 8,0 \times 10^{-2} [\text{xil}]$	$6,1 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^4$
Manose	$I_{pa} = 2,9 \times 10^{-4} + 8,8 \times 10^{-2} [\text{man}]$	$1,0 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$8,6 \times 10^4$

Fonte: Autor (2015).

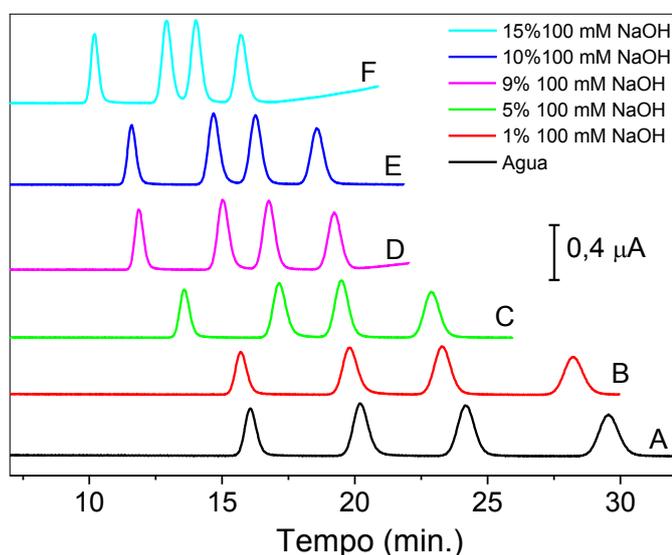
3.6. Otimização do método cromatográfico utilizando coluna CarboPac PA-1

Para o desenvolvimento do método analítico foi utilizada uma coluna cromatográfica diferente da utilizada nos estudos anteriores, diante disso foi realizado a otimização do método de separação para os açúcares no intuito de avaliar a composição da fase móvel frente ao tempo de retenção utilizando o eletrodo de ouro, a Figura 72 mostra os cromatogramas contendo os açúcares com estudos de seis condições de fase móvel, sendo (A - 100% H₂O), (B - 1% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 99% de H₂O), (C - 5% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 95% de H₂O), (D - 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O), (E - 10% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 90 % de H₂O) e (F - 15% de 0,100 mol L⁻¹ NaOH e 85% de H₂O).

Os cromatogramas foram mostrados de acordo com cada composição de fase móvel, nas figuras A, B e C, foi observado uma separação maior entre os picos com o alargamento dos picos e um aumento significativo dos tempos de retenção, esse comportamento é devido a uma possível interação maior dos analitos com a coluna.

Já para os cromatogramas ilustrados nas figuras D, E e F, foi possível observar uma diminuição dos tempos de retenção, porém os cromatogramas E e F apresentaram uma menor separação entre os picos, diante disso a fase móvel escolhida para o desenvolvimento do método analítico foi o cromatograma mostrado na figura D, sendo a composição formada de 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O, pois foi observado um melhor comportamento na separação.

Figura 72 - Cromatogramas para os estudos de concentração de fase móvel na separação dos açúcares de acordo com as seguintes proporções de H₂O e NaOH (A) 100% H₂O, (B) 1% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 99% de H₂O, (C) 5% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 95% de H₂O, (D) 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O, (E) 10% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 90 % de H₂O e (F) 15% de 0,100 mol L⁻¹ NaOH e 85% de H₂O; contendo 3,3×10⁻⁵ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose e (4) Xilose. Fluxo 1,0 ml min.⁻¹, potencial de detecção para eletrodo de ouro 0,05 V vs. Pd, temperatura da coluna 25°C, temperatura do detector 35°C em coluna Carbopac Pa 1.



Fonte: Autor (2015).

A técnica de detecção amperométrica pulsada é realizada com uma sequência de potenciais após a aplicação do potencial de oxidação dos açúcares conforme mostra a Figura 73 sendo que na Tabela 12 é apresentada a programação de pulso descrita a seguir:

1° pulso (E_1) – A duração deste pulso é de 250 ms e o potencial aplicado foi de 0,58 V vs. Pd. Os primeiros 50 ms são utilizados para o condicionamento do eletrodo GCE/MWCNT/CoOO, e os outros 200 ms são utilizados para detecção dos açúcares e aquisição dos dados;

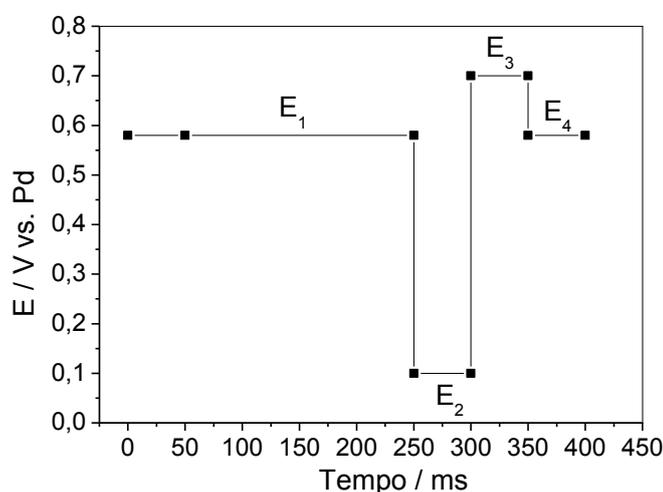
2° pulso (E_2) – É aplicado um pulso de potencial de 0,10 V vs. Pd. por 50 ms para redução total de todas as espécies que estão na superfície do eletrodo.

3° pulso (E_3) – A duração deste pulso é de 50 ms com potencial positivo de 0,70 V vs. Pd. para oxidar todas as espécies de cobalto na superfície do eletrodo e formação do $\text{Co}^{(IV)}$ que está atuando na oxidação dos açúcares, e;

4° pulso (E_4) – É aplicado no potencial de 0,58 V vs. Pd. por 50 ms para iniciar a estabilização do eletrodo para posterior oxidação dos açúcares.

Os potenciais utilizados nos pulsos amperométricos são importantes para o monitoramento dos açúcares, pois influencia diretamente na resolução dos cromatogramas.

Figura 73 - Sequência de pulsos otimizados para análise dos açúcares com detecção amperométrica pulsada utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO



Fonte: Autor (2015).

Tabela 12 - Sequência de pulsos aplicados na análise dos açúcares com detecção amperométrica pulsada utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO

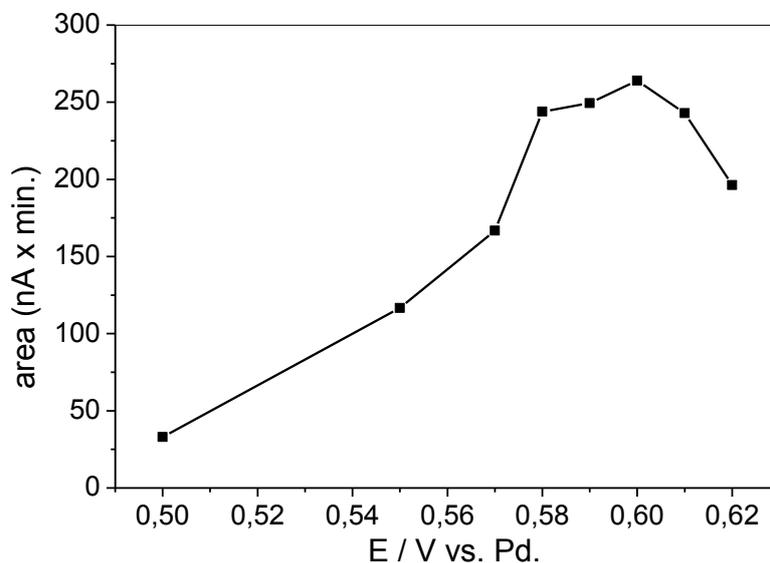
Tempo / ms	Potencial / V	Integração
0	0,58	
50	0,58	Início
250	0,58	Final
300	0,10	
350	0,70	
400	0,58	

Fonte: Autor (2015).

Para obter a melhor programação de potencial da sequência de pulsos utilizado para a determinação, inicialmente, foi realizada a otimização dos pulsos aplicados na oxidação dos açúcares para detecção amperométrica pulsada.

Esses estudos foram realizados com arabinose, a Figura 74 mostrou que a área de pico para arabinose é aumentada de acordo com o aumento do potencial até 0,58 V vs. Pd., mantendo-se constante até 0,60 V vs. Pd, após esse potencial a área de pico tende a diminuir, indicando que em potenciais maiores as espécie de Co(IV) não estão mais eletroativas, diante disso 0,58 V vs. Pd foi o melhor potencial de análise para os estudos utilizando o eletrodo de GCE/MWCNT/CoOO, o potencial de 0,60 V não foi selecionado devido que através de estudos em estado estacionário foi observado que nesta região de potencial a descarga produzida por oxigênio contribuiu para o aumento de corrente e por conseguinte aumentando assim a área do pico no cromatograma.

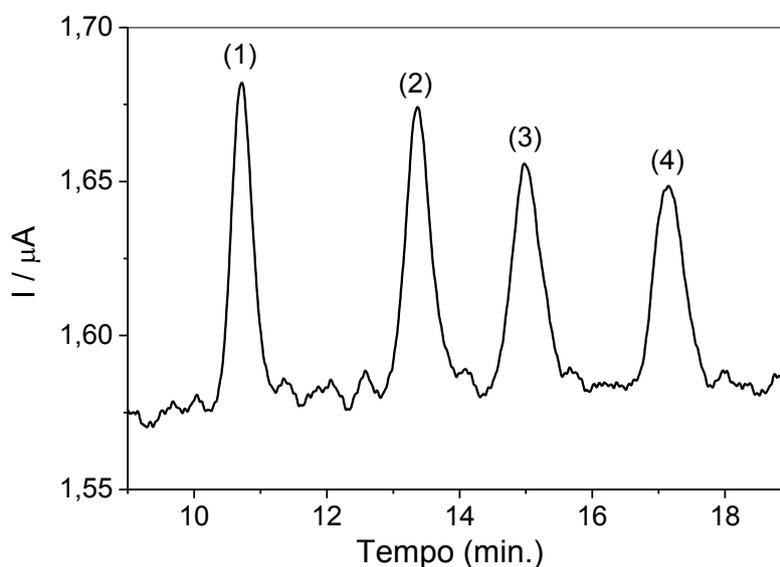
Figura 74 - Estudos do efeito de potencial de oxidação aplicado no eletrodo GCE/MWCNT/CoOO em função área de pico de arabinose. Composição da fase 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbopac Pa 1



Fonte: Autor (2015).

A Figura 75 apresenta o cromatograma contendo arabinose, galactose, glicose e xilose utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO como detector eletroquímico. O método desenvolvido favoreceu uma boa separação entre os picos dos açúcares.

Figura 75 - Cromatograma dos açúcares contendo $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose, (4) Xilose e (5) Manose; Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/CoOO 0,58 V vs. Pd; Composição da fase 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbopac Pa 1



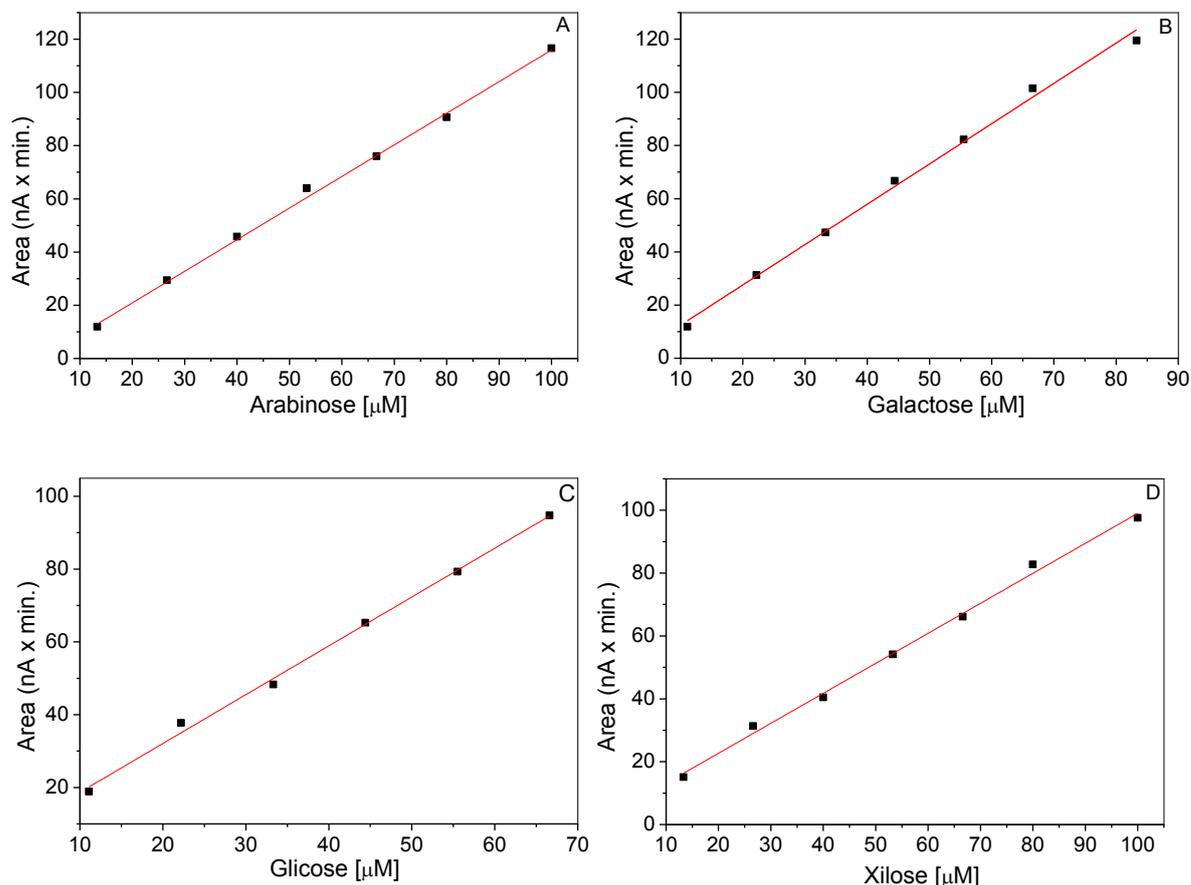
Fonte: Autor (2015).

As curvas analíticas foram construídas para avaliar as figuras de mérito da técnica com o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO. Para isso foram preparadas soluções padrões das concentrações de $1,1 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, avaliando os limites de detecção, quantificação e a sensibilidade amperométrica da técnica de HPLC.

A Figura 76 mostrou as curvas analíticas para os açúcares arabinose, galactose, glicose e xilose, foi observado uma boa linearidade e coeficientes de correlações linear são próximos de 0,999.

A Tabela 13 mostrou as figuras de mérito para os açúcares, onde o intervalo de trabalho foi linear de $1,1 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para os açúcares estudados. Para arabinose o limite de detecção foi de $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de $1,2 \times 10^6$ A L mol⁻¹. Para galactose o limite de detecção foi de $4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de $1,5 \times 10^6$ A L mol⁻¹. Para glicose o limite de detecção encontrado foi de $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de $1,3 \times 10^6$ A L mol⁻¹. A xilose apresentou um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, o limite de quantificação foi de $2,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e sensibilidade amperométrica de $0,9 \times 10^6$ A L mol⁻¹.

Figura 76 - Curvas analíticas para (A) Arabinose, (B) Galactose, (C) Glicose e (D) Xilose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/CoOO 0,58 V vs. Pd, Composição da fase 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbpac Pa 1



Fonte: Autor (2015).

Tabela 13 - Figuras de mérito para detecção dos açúcares utilizando técnica cromatográfica com eletrodo GCE/MWCNT/CoOO

Açúcares	LOD (mol L ⁻¹)	LOQ (mol L ⁻¹)	SA (A L mol ⁻¹)	r
Arabinose	$3,4 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^6$	0,999
Galactose	$4,4 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^6$	0,997
Glicose	$3,6 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^6$	0,998
Xilose	$5,0 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$0,9 \times 10^6$	0,997

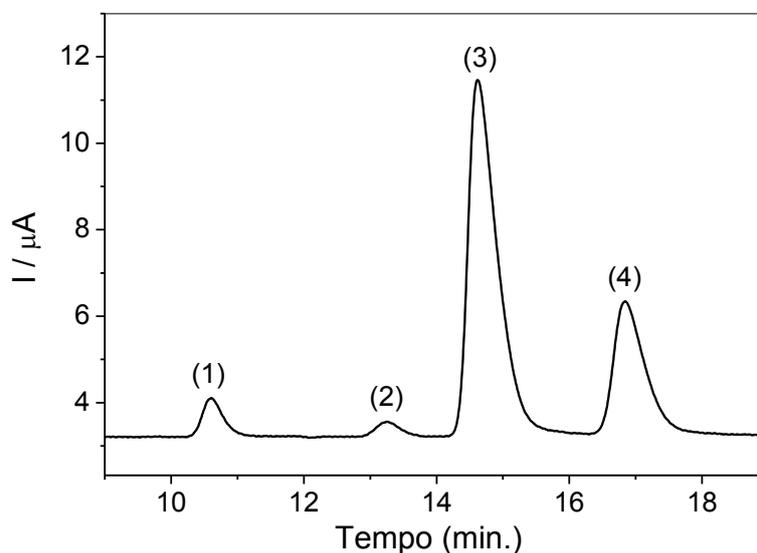
Fonte: Autor (2015).

3.7. Determinação dos açúcares presentes no bagaço e palha de cana-de-açúcar utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO

As amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar foram submetidas ao processo de hidrólise, neutralização e filtragem. As amostras foram injetadas no HPLC contendo o detector GCE/MWCNT/CoOO nas condições otimizadas e a identificação dos picos cromatográficos foi baseada no tempo de retenção dos analitos específicos.

A Figura 77 mostra o cromatograma obtido para a amostra de hidrolisado de biomassa. Foram determinados nesta amostra os 4 açúcares arabinose, galactose, glucose e xilose.

Figura 77 - Cromatograma para a amostra hidrolisada do bagaço de cana-de-açúcar contendo os seguintes açúcares: (1) Arabinose, (2) Galactose, (3) Glicose e (4) Xilose. Potencial de detecção para eletrodo GCE/MWCNT/CoOO 0,58 V vs. Pd; Composição da fase 9% de 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 81% de H₂O, fluxo da fase móvel 1,0 ml min.⁻¹, temperatura do forno da coluna 25°C, temperatura do detector eletroquímico 35°C em coluna Carbopac Pa 1



Fonte: Autor (2015).

Na Tabela 14 é possível observar os tipos de açúcares, as equações da reta referente à adição de padrão para o método cromatográfico utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO, concentrações determinadas na amostra de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

O método utilizado para determinar a concentração de açúcares presentes na amostra foi o método de adição de padrão, esse método é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, como é o caso do bagaço da cana.

Na curva para o método de adição de padrão para a Arabinose obteve-se a equação de regressão de $y = 23,0 + 1,6 \times 10^6 x$, com correlação linear de 0,998, a amostra foi diluída 70 vezes e a concentração de arabinose determinada na amostra foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Já para galactose foi obtido uma equação de regressão de $y = 97,1 + 1,3 \times 10^6 x$, com correlação linear de 0,999, não foram necessárias diluições na amostra e a concentração determinada para galactose foi de $7,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para glicose obteve-se uma equação de regressão de $y = 76,4 + 1,8 \times 10^6 x$, com correlação linear de 0,995, a amostra foi diluída 70 vezes e a concentração encontrada na amostra foi de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Na xilose foi observada uma equação de regressão de $y = 44,8 + 1,3 \times 10^6 x$, com correção linear de 0.998 sendo necessária a diluição da amostra na ordem de 70 vezes devido as amostras apresentarem concentrações elevadas, foi determinado para xilose a concentração de $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

As adições de padrão foram realizadas em três diferentes eletrodos GCE/MWCNT/CoOO, a fim de verificar a repetibilidade de detecção. Também foi observado que não foi detectado e quantificado manose nesta amostra de bagaço de cana de açúcar.

Tabela 14 - Parâmetros analíticos dos constituintes encontrados em amostras de bagaço de cana-de-açúcar utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO

Açúcares	Equação linear	Concentração na amostra diluída mol L ⁻¹	Concentração na amostra mol L ⁻¹
1-Arabinose	$y = 23,0 + 1,6 \times 10^6 x$	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-3}$
2-Galactose	$y = 97,1 + 1,3 \times 10^6 x$	ND	$7,2 \times 10^{-5}$
3-Glicose	$y = 76,4 + 1,8 \times 10^6 x$	$4,3 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-3}$
4-Xilose	$y = 44,8 + 1,3 \times 10^6 x$	$3,5 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-3}$

ND= não diluído

Fonte: Autor (2015).

Depois de realizar o método de adição de padrão, foi avaliada a validação do método através dos estudos de recuperação para os açúcares, arabinose,

galactose, glicose e xilose. Três concentrações diferentes de açúcares foram injetadas na amostra, como mostrado na Tabela 15.

A recuperação média de arabinose foi de 100,0%, com um coeficiente de variação (CV) de 3,6%, para galactose a recuperação média foi de 98,5%, com um coeficiente de variação de 1,9%, já para glicose recuperação média foi de 93,3% com um coeficiente de variação de 10,1% e para xilose a recuperação média foi de 101,1% com um coeficiente de variação de 6,9%. Estes testes mostram que o método possui uma confiabilidade elevada para a detecção dos açúcares em bagaço de cana de açúcar.

Tabela 15 - Estudos de recuperação dos açúcares (Arabinose, Galactose, Glicose e Xilose) utilizando o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO no HPLC em hidrolisado de biomassa

Arabinose / mol L⁻¹	Concentração encontrada / mol L⁻¹	% Recuperação
1,3×10 ⁻⁵	1,2×10 ⁻⁵	96,2
4,0×10 ⁻⁵	4,1×10 ⁻⁵	103,5
6,6×10 ⁻⁵	6,7×10 ⁻⁵	100,3
Galactose / mol L⁻¹		
1,1×10 ⁻⁵	1,0×10 ⁻⁵	96,4
3,3×10 ⁻⁵	3,3×10 ⁻⁵	99,8
5,5×10 ⁻⁵	5,5×10 ⁻⁵	99,5
Glicose / mol L⁻¹		
1,1×10 ⁻⁵	9,2×10 ⁻⁶	82,5
3,3×10 ⁻⁵	3,2×10 ⁻⁵	97,2
5,5×10 ⁻⁵	5,5×10 ⁻⁵	100,1
Xilose / mol L⁻¹		
1,3×10 ⁻⁵	1,4×10 ⁻⁵	108,27
4,0×10 ⁻⁵	3,8×10 ⁻⁵	94,3
6,6×10 ⁻⁵	6,7×10 ⁻⁵	100,9

Fonte: Autor (2015).

4.0. CONCLUSÃO

O eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de óxidos de cobalto (GCE/MWCNT/CoOO) foi utilizado com sucesso como um detector amperométrico para a determinação dos açúcares por HPLC.

O método desenvolvido para detecção amperométrica pulsada dos quatro açúcares demonstrou ser seletivo, sensível, reprodutível e confiável. Estas propriedades fazem com que este novo método poderá ser uma alternativa interessante para outras aplicações analíticas, envolvendo diferentes amostras lignocelulósicas.

O GCE/MWCNT/CoOO foi aplicado para a detecção da amostra de hidrolisado de biomassa, em que a concentração de arabinose determinada em amostras de bagaço de cana foi de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a galactose foi de $7,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a glicose foi de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e xilose o valor determinado foi de $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados demonstram que o método proposto pode ser utilizado para a detecção destes açúcares, sem a necessidade de derivatização e ainda o método não sofre interferências mesmo em amostras complexas como o bagaço de cana de açúcar apresentando considerável precisão e confiabilidade.

CAPÍTULO 5

Determinação de galactose, glicose, xilose e manose em bagaço de cana empregando uma língua eletrônica voltamétrica formada por eletrodos modificados de MWCNT/óxi-hidróxido de metais.

1. INTRODUÇÃO

O uso de eletrodos modificados não enzimáticos representa uma alternativa interessante para métodos analíticos para detecção de carboidratos. Infelizmente, estes sensores apresentam baixa seletividade para discriminar todos os carboidratos individualmente. Embora isto possa ser uma possibilidade de prever os açúcares totais, a única alternativa para resolver a falta de seletividade seria o uso de uma técnica acoplada, no caso o HPLC que foi descrito.

Porem, uma nova metodologia no campo sensores é a utilização de sensores em matrizes acopladas com o tratamento de dados complexos, isto é, o uso de línguas eletrônicas, que são sistemas de sensores versáteis capazes de monitorar simultaneamente o nível de diferente analitos, ou analitos na presença de seus interferentes, ou para resolver misturas de analitos semelhantes.

Este trabalho foi realizado durante o estágio de pesquisa na Universidade Autônoma de Barcelona-UAB.

O objetivo foi a caracterização e aplicação de uma língua eletrônica voltamétrica usando uma matriz de eletrodos de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas contendo nanopartículas de óxi-hidróxido de metais (paládio, ouro, cobre, níquel e cobalto) (GCE/MWCNT/MetaisOOH) para uma análise simples de carboidratos (glicose, xilose, galactose e manose). Foi desenvolvido uma Rede Neural Artificial (ANN) que resultou em um modelo de previsão satisfatório para todos os carboidratos e a resposta obtida demonstrou ser satisfatória para esses açúcares.

Esses sensores foram caracterizados por técnicas eletroquímicas, microscópio eletrônico de varredura (MEV) e foi aplicado nas oxidações eletroquímicas diretas dos açúcares em meio alcalino. Em uma segunda etapa foi desenvolvido a língua eletrônica, os modelos de ANN e foram aplicados em amostras sintéticas de açúcares.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) purificados com diâmetro externo de 30 nm foram adquiridos da empresa SES Research (Houston, Texas, USA). Cloreto de cobalto (II) hexaidratado ($\text{Cl}_2\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato de níquel (II) hexaidratado ($\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto de paládio (PdCl_2), fluoreto de amônio (NH_4F), ácido bórico (H_3BO_3), borohidreto de sódio (NaBH_4), N-N-dimetilformamida 99.8% ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$), D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido sulfúrico 96% (H_2SO_4), ácido nítrico 69% (HNO_3) e amônia 32% (NH_3) foram adquiridos da empresa Merck (Darmstadt, Germany). Todas as soluções foram feitas com água do sistema de Milli Q (Millipore, Billerica, MA, USA). A solução tampão utilizada para a formação das nanopartículas de níquel e cobalto foram $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 mono-hidratado pH 7,0.

2.2. Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e varredura

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e padrões de microanálise foram registradas com um microscópio JEOL JEM-2011 equipado com um detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram feitas em um microscópio JSM 7500F modelo Jeol FE-SEM.

2.3. Medidas eletroquímicas

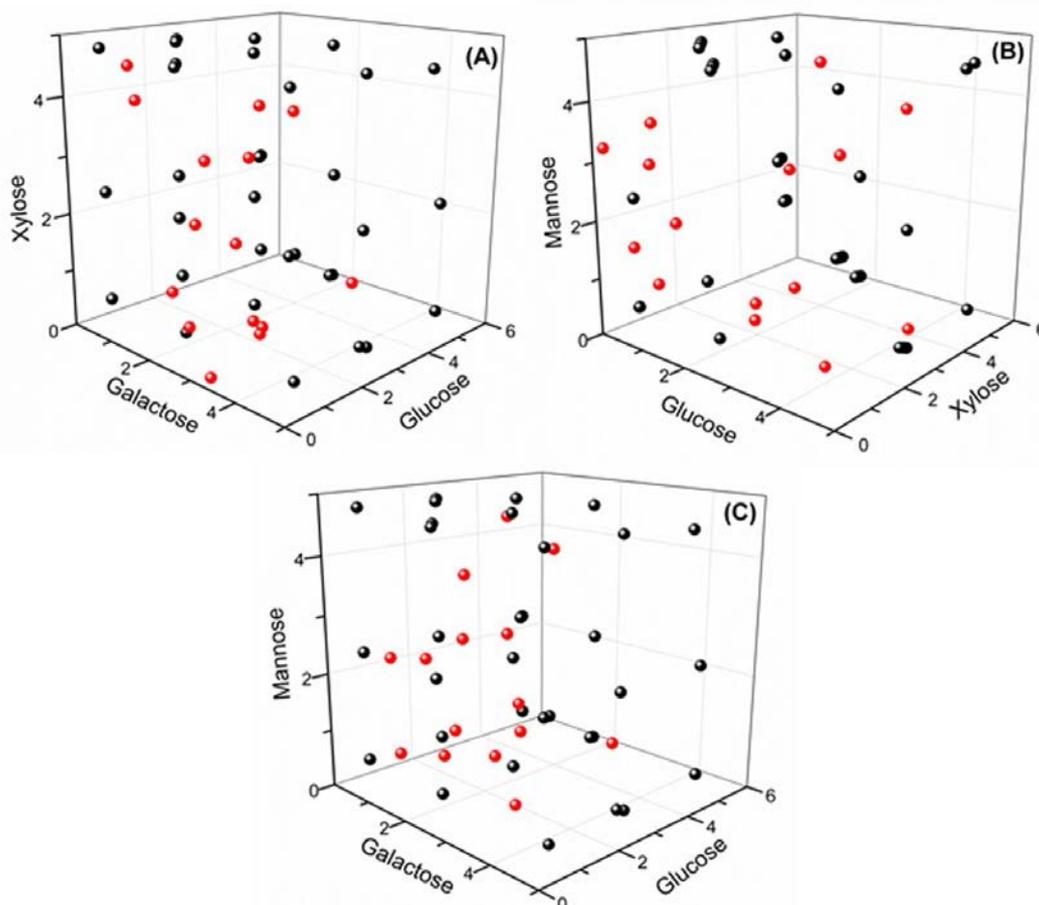
A célula amperométrica para realizar os experimentos foi formada por 5 (cinco) eletrodos modificados com nanotubos e óxi-hidróxido de metais GCE/MWCNT/MetaisOOH além de um eletrodo de referência de junção dupla de Ag/AgCl (Thermo Orion 900.200, Beverly, MA, EUA) e um eletrodo auxiliar de platina (Modelo 52-67, Crison Instruments, Barcelona, Espanha).

As Medidas de voltametria cíclica foram feitas usando um potenciostato AUTOLAB 6 canais PGSTAT20 (Ecochemie, Países Baixos), na configuração multicanal, utilizando o pacote de software multicanal GPES 4.7. As janelas de potenciais estudado foram entre -0,7 V e +0,8 V vs. Ag / AgCl, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Os experimentos eletroanalíticos foram realizados à temperatura ambiente (25°C) em condição estacionária. Resumidamente, as amostras foram medidas com uma matriz voltamétrica de sensores de GCE/MWCNT/MetaisOOH, e posteriormente as respostas foram analisadas por meio de diferentes ferramentas quimiométricas descritas abaixo.

2.4. Desenho experimental para o modelo de quantificação

A fim de comprovar a capacidade da língua eletrônica (LE) de atingir a quantificação simultânea de diferentes misturas de açúcares, foi preparado um modelo de resposta utilizando uma ANN para resolução de galactose, glicose, xilose e manose. Para alcançar esse objetivo, um conjunto total de 46 amostras foram preparadas manualmente em uma faixa de concentração de $0,5 \times 10^{-3}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de cada carboidrato. O conjunto de amostras foi dividido em dois subconjuntos de dados: o primeiro subconjunto de treinamento formado por 36 amostras (78%) que foram distribuídos baseados no L36 do projeto Taguchi (TAGUCHI W., 1979), com 4 fatores e 3 níveis usados para construir o modelo de resposta, foi usado mais 10 amostras adicionais (22%) para o subconjunto de testes, distribuídos aleatoriamente ao longo do domínio experimental conforme Figura 78 e foi utilizado para avaliar a habilidade do modelo de previsão.

Figura 78 – Amostras que foram medidas empregando a língua eletrônica formada por eletrodos modificados com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de óxi-hidróxido de metais, obtendo um completo voltamograma cíclico para cada sensor, para cada amostra de (•) Subconjunto de treinamento e (•) Subconjunto de teste para as seguintes misturas de amostras: (A) Galactose, Glicose e Xilose, (B) Glicose, Xilose e Manose e (C) Galactose, Glicose e manose



Fonte: Autor (2015).

2.5. Processamento de dados

A fim de reduzir o grande conjunto de dados gerados para cada amostra (5 sensores x 336 valores de correntes de diferentes potenciais) um estágio de pré-processamento foi necessário para comprimir os dados originais. O objetivo desta etapa foi de reduzir a complexidade dos dados de entrada, preservando as informações relevantes, a compressão dos dados permite também reduzir o tempo de treinamento, para evitar redundância nos dados de entrada e de obter um modelo com melhor capacidade de generalização.

Os dados foram compactados usando Discrete Wavelet Transform (DWT) (VALLE; MUÑOZ GUERRERO; GUTIERREZ SALGADO, 2011): cada voltamograma

foi comprimido utilizando Daubechies 4 wavelet mother function e quatro níveis de decomposições. Desta maneira, os dados originais foram reduzidos para 135 coeficientes, sem qualquer perda de informação relevante; Além disso, a estratégia de Causal Index pruning (JOHNSON; WICHESTEIN, 2007) foi utilizada para refinar ainda mais o modelo, eliminando as entradas que tornam relativamente pequenas as contribuições para o modelo. Com isso, as 135 entradas por amostra foram ainda mais reduzidos até 36 coeficientes, alcançando um total de taxa de compressão de até 97,9%.

2.6. Preparação dos eletrodos para língua eletrônica

2.6.1. Modificação dos MWCNTs com nanopartículas de Pd, CuO e Au

Antes das modificações com nanopartículas de metais, os MWCNTs foram purificados com pré-tratamento em ácido. Resumidamente, os MWCNTs foram dispersos em uma mistura de 3:1 de ácidos concentrados $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ usando um banho ultrassônico por 90 min. (CIPRI; VALLE, 2014). Os MWCNTs purificados foram então utilizados para posterior modificação com diferentes nanopartículas.

2.6.2. Modificação dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas com paládio (MWCNT/Pd)

Esta modificação foi realizada de acordo com Cipri e Valle (2014). Primeiramente, em um frasco foi preparado um solução contendo PdCl_2 ($14,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}), H_3BO_3 ($1,57 \times 10^{-1}$ mol L^{-1}) e NH_4F ($6,67 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}). Em seguida, os MWCNTs (100 mg) purificados foram dispersos na solução acima citada através de ultra-som durante 1 hora e o pH foi ajustado entre 8-9. Uma solução de NaBH_4 (17 mL) foi adicionada gota a gota sob agitação vigorosa e seguida por outra agitação durante 8 horas para completar a reação. Os MWCNT/Pd foram filtrados, lavados e em seguida secados sob vácuo a 50°C .

2.6.3. Modificação de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com ouro (MWCNT/Au)

A modificação com ouro foi realizada seguindo e modificando ligeiramente o procedimento relatado por Shi, Yang e Yuet (2009). Resumidamente, foi preparado em um frasco uma solução de 0,5 ml de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}), 0,5 ml de

uma solução aquosa de citrato trissódico ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e 18,4 ml de água bidestilada. Os MWCNTs purificados (20 mg para uma relação de carga de 10% de Au % em peso) foram adicionados à solução acima referida e depois 10-12 mL de etanol foram imediatamente introduzidos sob agitação vigorosa e misturados em um banho de ultra-som durante 10 min. Uma solução aquosa gelada de NaBH₄ preparada imediatamente durante o uso (0,6 mL; 0,1 mol L⁻¹) foi em seguida adicionada à mistura acima referida sob agitação durante a noite. O MWCNT/Au foi separado por centrifugação, foi lavado com água duplamente destilada por vários ciclos e em seguida secado sob vácuo durante a noite a 50 °C.

2.6.4. Nanotubos de carbono integrado com nanofolhas de óxido de cobre (MWCNT / CuO)

A modificação com cobre foi realizado modificando o procedimento relatado por Yang et al. (2012). Resumidamente, em um balão dodecil sulfato sódio (SDS) foi dissolvido (0,1 mol L⁻¹) em 300 ml de água destilada sob agitação a 60 °C; Em seguida 50 mg de MWCNTs purificados foram dispersos em 25 mL de DMF utilizando um banho de ultra-som e depois a solução de SDS foi adicionada e ultrasonificada por 10 min. Em seguida, CuSO₄x5H₂O (2,5 g) foi adicionado a solução acima citada e foi misturada por 10 min. em banho de ultrassom. A solução de 100 ml de NaOH (0,5 mol L⁻¹) foi lentamente gotejada na solução acima e em seguida agitada por 10 min. A solução resultante foi em seguida centrifugada e lavada com água bidestilada por alguns ciclos e, em seguida, foi secado a 60 °C.

2.6.5. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de paládio (GCE/MWCNT/PdOOH)

Todas as superfícies dos eletrodos de GCE foram polidos com pó de alumina de 0,3 µm (Merck) e lavadas em etanol e água Milli-Q.

2,0 mg MWCNT/Pd foram dispersos em 1,0 ml de N, N-dimetilformamida (DMF) utilizando um banho ultrassônico obtendo uma solução preta (2,0 mg mL⁻¹). Esta solução de MWCNT/Pd foi adicionado na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) em 3 etapas de 10 ul para a preparação do eletrodo, secou-se o eletrodo a 50 °C durante 3,0 horas. Após a modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de paládio

(GCE/MWCNT/Pd) foi aplicado a técnica de voltametria cíclica para formar óxi-hidróxido de paládio usando uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na faixa de potencial de $-0,8$ a $0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ com uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} durante 20 ciclos. Em seguida, o GCE/MWCNT/PdOOH foi lavada abundantemente com água desionizada e secado. O comportamento eletroquímico do GCE/MWCNT/PdOOH foi avaliado em soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

2.6.6. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de ouro (GCE/MWCNT/AuOOH)

2,0 mg MWCNT/Au foram dispersos em 1,0 ml de N, N-dimetilformamida (DMF) utilizando um banho ultra-sônico obtendo uma solução preta ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$). Esta solução de MWCNT/Au foi adicionado na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) em 3 etapas de 10 μl para a preparação do eletrodo, eletrodo foi secado a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3,0 horas. Após a modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de ouro (GCE/MWCNT/Au) foi aplicado a técnica de voltametria cíclica para formar óxi-hidróxido de ouro usando uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na faixa de potencial de $-0,4$ a $0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ com uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} durante 20 ciclos. Em seguida, o GCE/MWCNT/AuOOH foi lavada abundantemente com água desionizada e secado. O comportamento eletroquímico do GCE/MWCNT/AuOOH foi avaliada em soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

2.6.7. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanofolhas de cobre (GCE/MWCNT/CuOOH)

2,0 mg MWCNT/CuO foram dispersos em 20,0 ml de N, N-dimetilformamida (DMF) utilizando um banho ultra-sônico obtendo uma solução preta ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$). Esta solução de MWCNT/Cu foi adicionado na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) em 2 etapas de 10 μl para a preparação do eletrodo, eletrodo foi secado a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2,0 horas. Após a modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobre (GCE/MWCNT/Cu) foi aplicado a técnica de voltametria cíclica para formar óxi-hidróxido de paládio usando uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH na faixa de potencial de $-0,5$ a $0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1}

durante 20 ciclos. Em seguida, o GCE/MWCNT/CuOOH foi lavada abundantemente com água desionizada e secado. O comportamento eletroquímico do GCE/MWCNT/CuOOH foi avaliada em soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

2.6.8. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/NiOOH)

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) já funcionalizados foram pesados e dispersos em N,N-dimetilformamida (DMF) com agitação ultrassônica por 30 minutos obtendo-se a concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Na modificação do eletrodo de carbono vítreo, foi adicionado em sua superfície $5,0 \mu\text{L}$ de suspensão de nanotubos de carbono de concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, o eletrodo GCE contendo nanotubos de carbono foi secado durante 1,0 hora em uma estufa com $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Logo após o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (GCE/MWCNT) foi realizado os estudos da formação de eletrodeposição das nanopartículas de níquel, foi utilizado $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de níquel (NiSO_4) em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) preparado pela mistura das soluções de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. O potencial foi mantido constante em $-1,3 \text{ V}$.

Após cada modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel (GCE/MWCNT/Ni) foi realizado a formação de óxi-hidróxido de níquel em NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de $-0,5$ a $1,0 \text{ V}$ em velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} durante 30 ciclos. Em seguida, o GCE/MWCNT/NiOOH foi lavado abundantemente com água deionizada e seco. O comportamento eletroquímico do eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foi avaliado em soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

2.6.9. Modificação da superfície de carbono vítreo com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/CoOO)

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) já funcionalizados foram pesados e dispersos em N,N-dimetilformamida (DMF) com agitação ultrassônica por 30 minutos obtendo-se a concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Na

modificação do eletrodo de carbono vítreo, foi adicionado em sua superfície 5,0 μL de suspensão de nanotubos de carbono de concentração de 0,1 mg mL^{-1} , o eletrodo GCE contendo nanotubos de carbono foi secado durante 1,0 hora em uma estufa com 50 $^{\circ}\text{C}$. O eletrodo de carbono vítreo já modificado com nanotubos de carbono foi imerso em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de cobalto (CoCl_2) em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,5) preparado pela mistura das soluções de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) 0,2 mol L^{-1} e hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) 0,2 mol L^{-1} . A eletrodeposição foi realizada por voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -1,1 a 1,2 V vs. Ag/AgCl com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} durante 30 ciclos (SALIMI et al., 2008). Para completar a modificação, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de cobalto (GCE/MWCNT/Co) foi utilizado na formação de oxi-hidróxido de cobalto em 0,1 mol L^{-1} de NaOH em uma janela de potencial de -0,3 a 0,7 V com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , durante 45 ciclos. Após cada modificação o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO foi lavada abundantemente com água deionizada e secado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização microscópica dos eletrodos GCE/MWCNT/MetaisOOH

A caracterização microscópica do MWCNT/Pd foi realizada por TEM, exibida na Figura 79 – A, observou-se que o tamanho das nanopartículas está abaixo de 10 nm. A distribuição quase homogênea pode ser devida a dimensão longitudinal que é maior quando comparado com o diâmetro dos nanotubos para o crescimento “in situ” de nanopartículas de paládio. Esta distribuição quase homogênea é esperada para obter melhores propriedades catalíticas para aos nanocompósitos em comparação com as suas propriedades nativas.

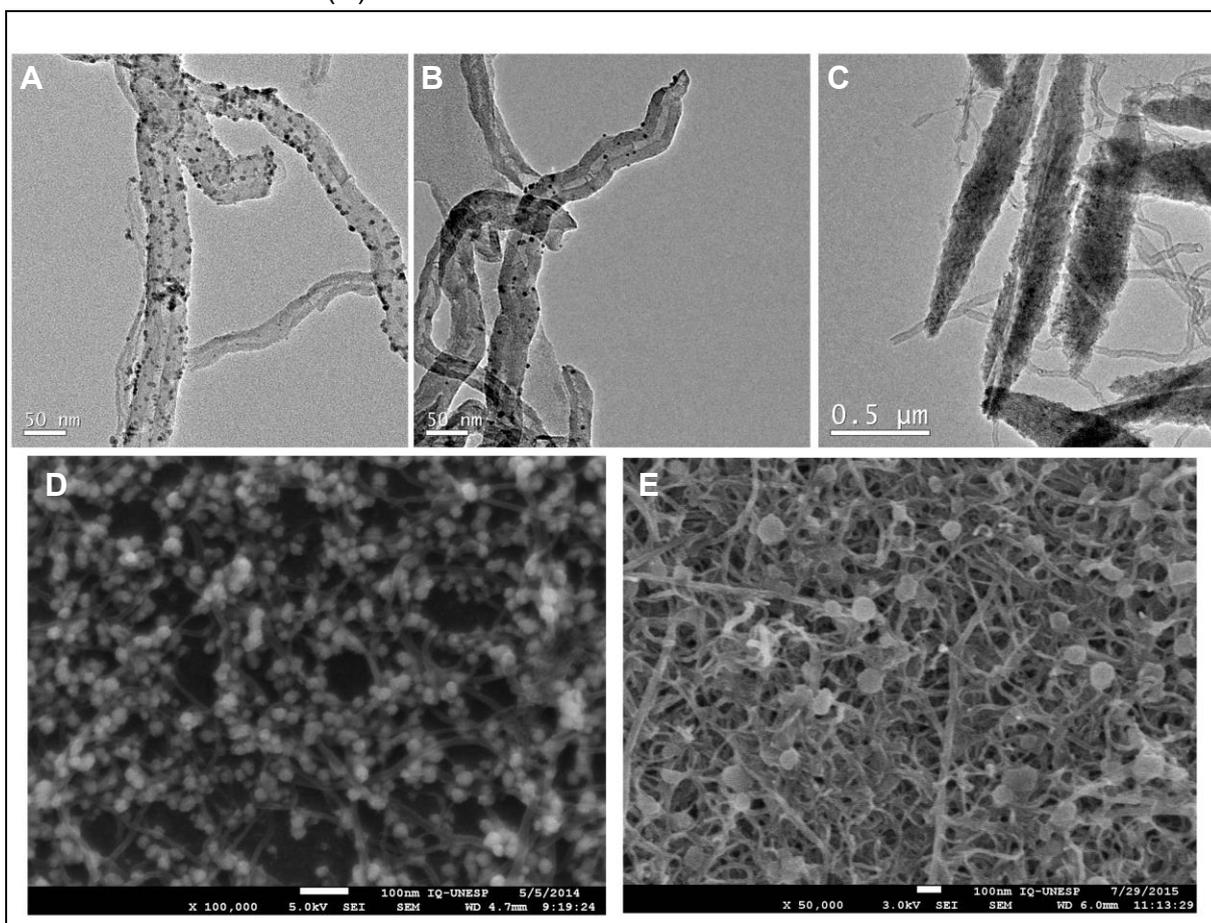
A morfologia do compósito MWCNT/Au foi caracterizada com TEM (Figura 82-B) e confirmou que as nanopartículas de ouro foram adsorvidas nos MWCNT e nas extremidades, mostrando um diâmetro de cerca de 4-7 nm.

A Figura 79-C mostra a microscopia de TEM de MWCNT/CuO, foi observado que cada folha policristalina de CuO é composto de várias peças monocristalinas, o que sugere a coexistência de CuO e MWCNTs. Portanto, MWCNTs e nanofolhas de

CuO formam um nanocompósito, e não são simplesmente misturados em conjunto. Conforme já discutido no capítulo 3, foram observados tamanhos de partículas mais regulares e esféricas entre 20 e 40 nm, distribuídas na superfície dos nanotubos de carbono conforme mostra a Figura 79-D. Essa melhor distribuição e tamanhos mais uniformes pode ser o responsável por menores limites de detecção nas análises dos açúcares pelo eletrodo modificado com as nanopartículas eletrodepositadas.

No capítulo 4 foi discutido o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO e o tamanho das nanopartículas encontradas em torno de 75,05 nm, a Figura 79-E apresentou esse comportamento e foi observado que as nanopartículas possuem característica esférica e estão dispersas na superfície dos nanotubos de carbono, este comportamento de dispersão por toda superfície poderá resultar no melhoramento da detecção, quantificação dos analitos.

Figura 79- Imagens de microscopia de transmissão (TEM) (A) MWCNT/Pd, (B) MWCNT/Au e (C)MWCNTCuO; Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (D) GCE/MWCNT/NiOOH e (E) GCE/MWCNT/CoOO



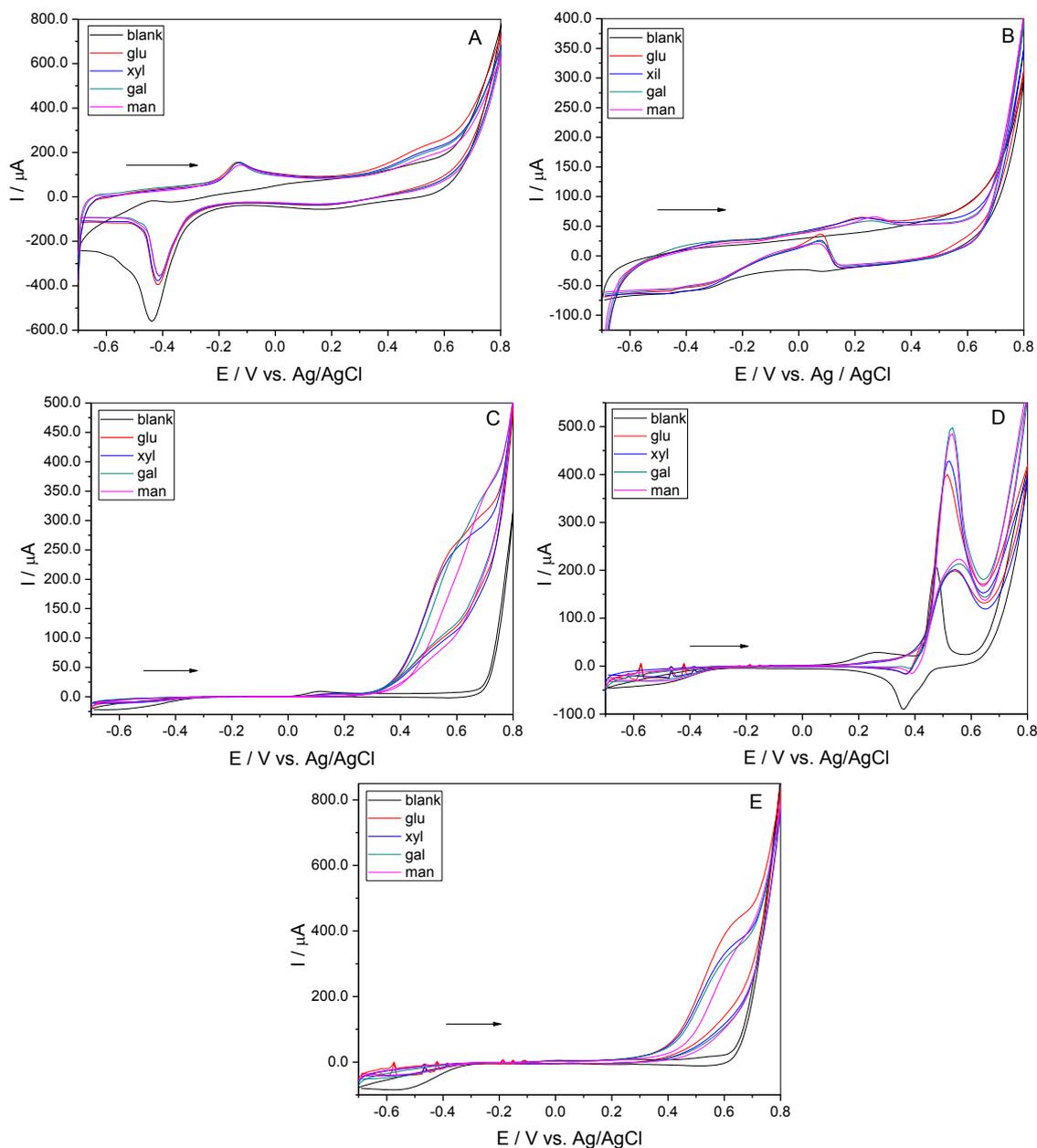
Fonte: Autor (2015).

3.2. Resposta dos eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH

As respostas voltamétricas para cada um dos eletrodos individuais em relação a cada composto foi à primeira característica de resposta verídica. Isto é, para assegurar que foram observados sinais diferenciados para os diferentes eletrodos, gerando dados ricos que podem ser um ponto de partida útil para o modelo de calibração multivariada.

Para esse objetivo, e sob as condições descritas na seção 2.5 deste capítulo, soluções padrões individuais foram analisadas de galactose, glicose, xilose e manose e seus respectivos voltamogramas foram inspecionados, na Figura 80 mostra o comportamento voltamétrico dos diferentes eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH na eletrooxidação dos açúcares em estudo.

Figura 80 – Diferentes voltamogramas cíclicos obtidos com (A) GCE/MWCNT/PdOOH, (B) GCE/MWCNT/AuO, (C) GCE/MWCNT/CuOOH, (D) GCE/MWCNT/NiOOH e (E) GCE/MWCNT/CoOO contendo $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cada açúcar (glicose (glu), xilose (xyl), galactose (gal) e manose (man)) em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (velocidade de varredura 50 mV s^{-1})



Fonte: Autor (2015).

Na Figura 80-A apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo GCE/MWCNT/PdOOH durante a eletro-oxidação dos açúcares que ocorre em potenciais em torno de $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$ associados com um pico de corrente anódico e também com a redução da corrente de pico catódico, os resultados

sugerem que o par redox $\text{Pd}^{(III)}/\text{Pd}^{(I)}$ na forma de óxido hidróxido de paládio (PdOOH) pode catalisar a eletro-oxidação dos carboidratos (HU; WEN, 1994).

Na Figura 80-B é mostrado os voltamogramas do eletrodo GCE/MWCNT/AuO durante a eletro-oxidação dos açúcares que ocorre em torno de 0,25 V vs. Ag/AgCl, com o aparecimento do pico de corrente anódico e pico de corrente catódico referente a reoxidação dos açúcares em potenciais em torno de -0,07 V vs. Ag/AgCl. Este comportamento é típico do eletrodo de ouro, pois a atividade eletrocatalítica pode ser racionalizada através do modelo óxido hidratado de átomos adsorvidos, podendo assim catalisar a oxidação dos açúcares (JENA; RAJ, 2006; PASTA; LA MANTIA; CUI, 2010; ZHOU et al., 2009).

O voltamograma do GCE/MWCNT/CuOOH é mostrado na Figura 80- C, a eletro-oxidação dos carboidratos ocorre em potenciais em torno de 0,60 vs. Ag/AgCl, com o aparecimento de uma onda anódica. Durante a varredura de potencial positivo as nanopartículas de Cu podem ser oxidadas para a obtenção de CuOOH. O par redox $\text{Cu}^{(III)}/\text{Cu}^{(II)}$ pode catalisar a oxidação dos carboidratos (ENSAFI; ABARGHOUI; REZAEI, 2014; YANG; ZHANG; GUNASEKARAN, 2010; ZHOU et al., 2013).

A eletro-oxidação de carboidratos sobre o eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, conforme de ilustra a Figura 80-D, ocorreu no potencial em torno de 0,52 V vs. Ag/AgCl associado ao aumento da corrente de pico anódica e diminuição da corrente de pico catódico. Os resultados sugerem que o par redox de $\text{Ni}^{(III)}/\text{Ni}^{(II)}$ pode catalisar a eletro-oxidação dos açúcares (TOGHILL; COMPTON, 2010).

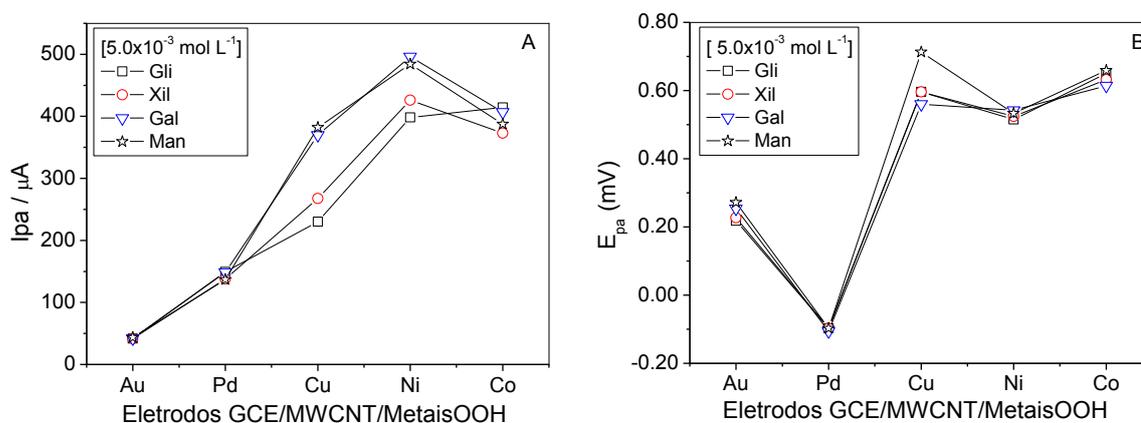
O voltamograma do eletrodo GCE/MWCNT/CoOOH apresentado na Figura 80-E mostra a eletro-oxidação dos carboidratos que ocorrem em torno de 0,65 V potencial vs. Ag/AgCl, com o aparecimento da onda anódica. Este fato sugere que os açúcares são oxidados por espécies CoOOH através do par redox $\text{Co}^{(IV)}/\text{Co}^{(III)}$ e através de uma processo de mediação redox cíclico (CATALDI et al., 1992; KARIM-NEZHAD et al., 2009).

Os resultados observados como um todo, indicam que diferentes eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH que formam a língua eletrônica podem catalisar a eletro-oxidação dos açúcares (galactose, glicose, xilose e manose) em cetonas, formando galactonolactona, gluconolactona, xilonolactona e manonalactona, respectivamente (KUSEMA; MURZIN, 2013; KUSEMA et al., 2010; LI et al., 2012; MURZIN; SALMI, 2012; RIZZOTTO et al., 1996). Além disso, as

curvas são claramente diferenciadas obtidas para cada eletrodo modificado e fornecendo a cada açúcar desejável condição para um estudo de Língua Eletrônica (ET).

A natureza da resposta cruzada dos voltamogramas pode ser resumido ao plotar correntes máximas e potencial de pico de oxidação observados para os 5 eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH. Esta representação é mostrada na Figura 81, onde pode ser observado que o pico de corrente anódica (I_{pa}) dos açúcares são diferentes de acordo com cada metal da língua eletrônica formada pelos eletrodos GCE/MWCNT/MetaisOOH e também se observou que os potenciais de oxidação (E_{pa}) mostraram comportamentos diferentes de acordo com cada metal, esta é uma condição desejável para qualquer estudo de língua eletrônica .

Figura 81 – Estudos da resposta para a língua eletrônica formada pelos eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH (metais: Ouro, Paládio, Cobre, Níquel e Cobalto) (A) Pico de corrente anódico (I_{pa}) e (B) Potencial de oxidação anódico (E_{pa}) contendo 5.0×10^{-3} mol L⁻¹ de açúcares (glicose, xilose, galactose e manose)



Fonte: Autor (2015).

A Análise de Componente Principal (PCA) é um dos métodos mais importantes utilizados em quimiometria servindo de base para o reconhecimento de diversos padrões, é uma maneira de reduzir uma grande matriz de dados multivariados para uma matriz com um número muito menor de variáveis, sem perder informações importantes dentro dos dados.

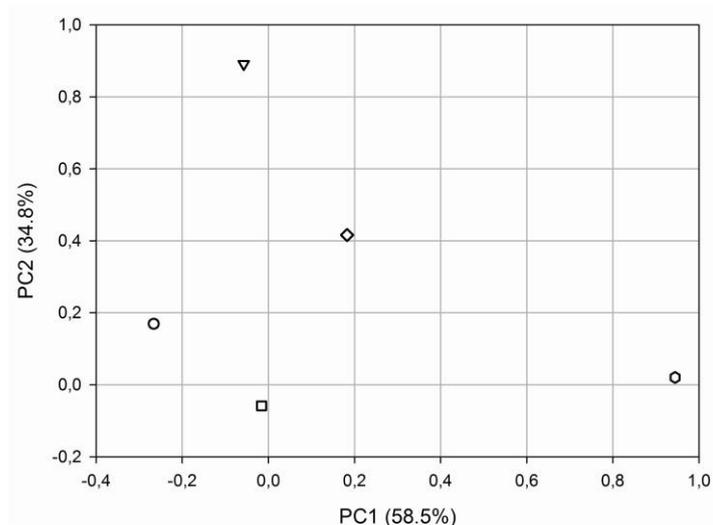
O princípio do PCA é que os dados multivariados podem ser decompostos por projeções lineares para um novo sistema de coordenadas. Os novos eixos, conhecido como componentes principais (PCs), estão orientados de modo que o

primeiro PC captura a maior quantidade de variância comum (RICHARDS; BESSANT; SAINI, 2002).

PCA pode ser uma maneira de mostrar a complementaridade das informações geradas por cada eletrodo, se os eletrodos são redundantes eles aparecem sobrepostos, enquanto resposta diferente irá se manifestar em sua separação.

A Figura 82 mostra o PCA para os cinco eletrodos GCE/MWCNT/MetaisOOH (metais = ouro, paládio, cobre, níquel e cobalto), o PCA foi preparado por tratamento das sensibilidades dos carboidratos e observou-se que cada sensor mostrou desempenho em diferentes regiões, isto é muito positivo, que é uma condição desejável para qualquer estudo de língua eletrônica, isso justifica a inclusão dos cinco eletrodos preparados na matriz de sensores.

Figura 82 - Gráfico de PCA para 5 eletrodos modificados de GCE/MWCNT/MetaisOOH (metais = (□) ouro, (▽) paládio, (○) cobre, (◇) níquel e (○) cobalto)



Fonte: Autor (2015).

A reprodutibilidade analítica (% RSD) para os sensores foi estimada usando solução padrão de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicose medida ao longo de 3 dias diferentes, obtendo os seguintes percentuais: 3,2% para GCE/MWCNT/AuO, 6,8% para GCE/MWCNT/PdO, 3,8% para GCE/MWCNT/CuOOH, 1,7% para GCE/MWCNT/NiOOH e 6,3% para GCE/MWCNT/CoOO. As reprodutibilidades analíticas apresentaram valores razoáveis, essa característica é importante devido

que os eletrodos são submetidos à análise de muitas amostras, exigindo manter a sua estabilidade e reprodutibilidade.

As curvas analíticas para os açúcares foram realizadas em solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ a fim de caracterizar completamente os sensores utilizados. Observou-se em todos os estudos um aumento do pico de corrente anódica, que foi linear com o aumento da concentração de açúcares.

A Tabela 16 mostra os parâmetros eletroquímicos para todos os açúcares estudados. Observou-se que a língua eletrônica formado pelos eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH tem elevada sensibilidade amperométrica. Os valores de limite de detecção e quantificação são próximos entre os analitos, o que significa que os comportamentos dos diferentes açúcares nos eletrodos são comparáveis. Portanto, é possível aplicar a língua eletrônica na mesma faixa de concentração para todos os açúcares considerados.

Tabela 16 – Parâmetros analíticos para vários açúcares na língua eletrônica formada por eletrodos modificados GCE/MWCNT/MetaisOOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH por voltametria cíclica ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; $n = 3$).

Paládio			
Açúcar	LOD (mol L^{-1})	LOQ (mol L^{-1})	SA ($\mu\text{A mol L}^{-1}$)
Glicose	$3,2 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^4$
Xilose	$3,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^4$
Galactose	$8,7 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^4$
Manose	$8,0 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^4$
Ouro			
Glicose	$6,4 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$7,3 \times 10^3$
Xilose	$6,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^3$
Galactose	$5,7 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^3$
Manose	$1,0 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^4$
Cobre			
Glicose	$1,0 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$5,1 \times 10^4$
Xilose	$6,0 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^4$
Galactose	$3,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^4$
Manose	$3,6 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^4$
Níquel			
Glicose	$2,3 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^4$
Xilose	$3,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^4$
Galactose	$4,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^4$
Manose	$4,7 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^4$
Cobalto			
Glicose	$3,1 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$8,4 \times 10^4$
Xilose	$1,0 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^4$
Galactose	$2,5 \times 10^{-4}$	$8,3 \times 10^{-4}$	$7,6 \times 10^4$
Manose	$3,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$6,9 \times 10^4$

Fonte: Autor (2015).

3.3. Construção do modelo da Rede Neural artificial (ANN)

Para o estudo da língua eletrônica, um conjunto total de 46 misturas de soluções padrões foram preparadas manualmente conforme mostrado na Figura 78, 36 amostras correspondente ao subconjunto de treinamento e 10 para o subconjunto de teste com variação de concentrações de $5,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para cada composto.

Estes padrões foram primeiro analisados e depois usados para construir e validar o modelo de ANN nas condições acima descritas, os conjuntos de treinos e testes de amostras foram medidas empregando a matriz de sensores GCE/MWCNT/MetaisOOH, obtendo um voltamograma completa para cada um dos eletrodos e para cada uma das amostras. Devido a alta dimensionalidade e complexidade de informações descritivas geradas (5 Voltamogramas por cada amostra), foram utilizados como estratégia a compressão duplo com transformada Wavelet e Causal Index Pruning.

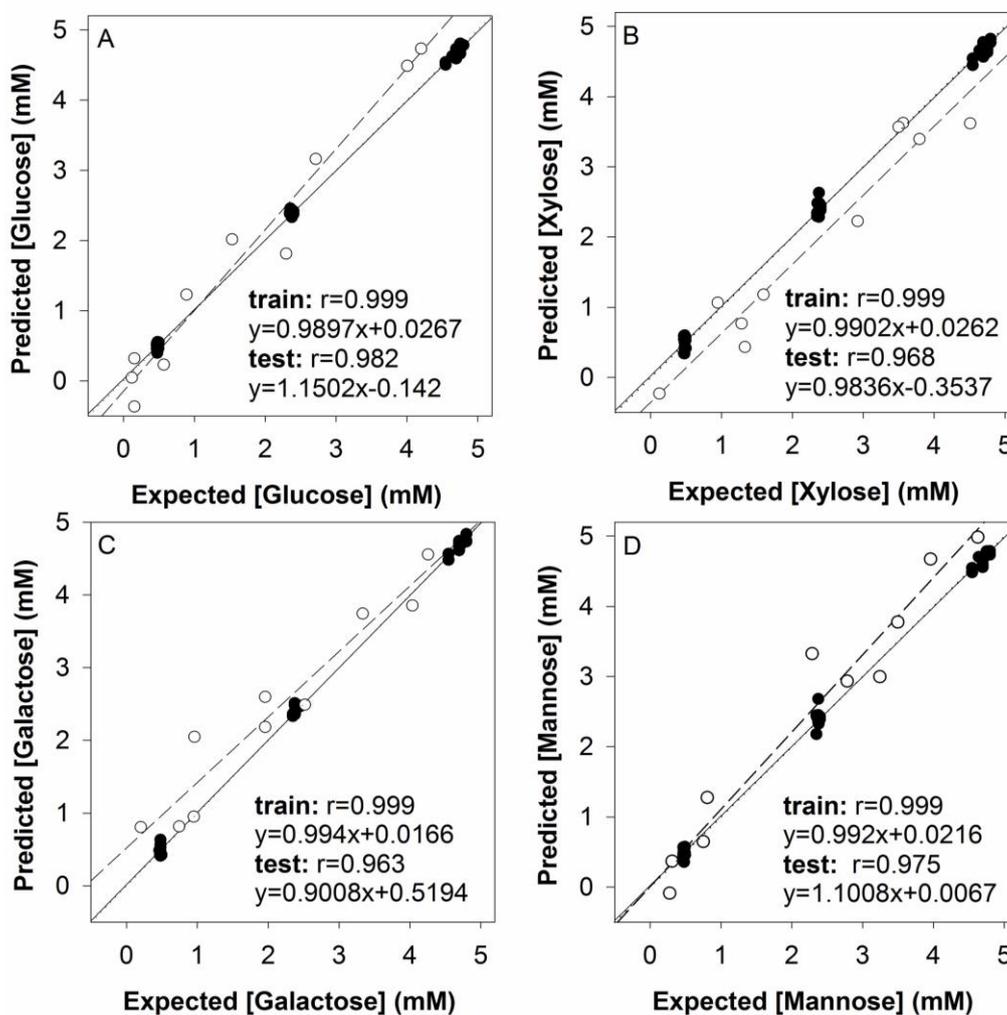
Para construir a arquitetura definitiva (ANN) o melhor conjunto de coeficientes foi selecionado através de compressão Wavelet e pruning. Foram otimizados 4 funções de transferência utilizadas nas camadas oculta e na camada de saída, as funções avaliadas foram tansig, logsig, satlins e purelin, e o número de neurônios na camada oculta foi de 1 a 12 neurônios.

Deste modo, foram avaliados 192 arquiteturas, a arquitetura final do modelo da propagação da ANN possui 36 neurônios de entrada, uma camada oculta com 5 neurônios e função de transferência tansig, uma camada de saída com 4 neurônios e função de transferência purelin.

A representação do modelo de desempenho do sistema é ilustrada na Figura 83. Esta figura mostra os gráficos de comparação entre as concentrações previstas vs. esperadas para os quatro açúcares nos estudos realizados com os subconjuntos de treinamento e teste, foram construídos para verificar a capacidade de previsão do modelo da ANN. Foi observado que a tendência satisfatória foi obtida, com a linha de regressão quase indistinguível do teórico para o subconjunto de treinamento. A partir destes dados todas as espécies apresentaram bons coeficientes de correlação com um valor de $R \geq 0,999$ no subconjunto de treinamento.

O modelo de previsão é satisfatório para todos os açúcares e a precisão da resposta obtida é confiável. Os resultados obtidos para subconjunto de teste é mais importante do que o subconjunto de treinamento, são próximos dos valores ideais, com 0 para o intercepto, 1 para a inclinação e bom coeficientes de correlação valores de $R \geq 0,96$.

Figura 83 – Capacidade de modelagem da língua eletrônica utilizando dos eletrodos GCE/MWCNT/MetaisOOH. Gráficos de comparação das concentrações prevista vs. esperada para (A) glicose, (B) Xilose, (C) galactose e (D) manose, tanto para treinamento (•, linha sólida) e subconjuntos de teste (linha ◦, tracejado). Linha pontilhada corresponde à teórica $Y = X$.



Fonte: Autor (2015).

Após otimizar o desempenho, a língua eletrônica foi avaliada através de estudos em amostras sintéticas de açúcares mostrados na Tabela 17, com três

diferentes misturas de açúcar. Como pode ser visto resultados encontrados estão em boa concordância com os esperados.

Tabela 17 – Resultados em amostras sintéticas obtidos através da língua eletrônica formada por eletrodos GCE/MWCNT/MetaisOOH na análise de Glicose, Xilose, Galactose e Manose

Amostras	Glicose mol L⁻¹	Glicose encontrada mol L⁻¹
1	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-3}$
2	$2,7 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$
3	$4,2 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$
Xilose mol L⁻¹		Xilose encontrada mol L⁻¹
1	$3,6 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$
2	$2,9 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
3	$3,5 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$
Galactose mol L⁻¹		Galactose encontrada mol L⁻¹
1	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$
2	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
3	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$
Manose mol L⁻¹		Manose encontrada mol L⁻¹
1	$4,0 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^{-3}$
2	$4,6 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-3}$
3	$0,3 \times 10^{-3}$	$0,4 \times 10^{-3}$

Fonte: Autor (2015).

4. CONCLUSÃO

A aplicação de uma língua eletrônica formado eletrodos modificados contendo nanopartículas de óxi-hidróxido de metais CGE/MWCN/MetaisOOH foi descrito para a detecção e quantificação de açúcares em amostras sintéticas.

A resposta complexa obtida da língua eletrônica foi desenvolvida com sucesso empregando uma rede neural artificial (ANN) de multicamadas que provou ser especialmente adequado para a construção do modelo de resposta.

Esta língua eletrônica tem um enorme potencial para determinar açúcares em amostras de hidrolisados de bagaço de cana de açúcar. O mérito do sistema proposto é conseguir resolução de misturas de carboidratos, com um desempenho

equivalente ao equipamento de HPLC, sem a necessidade de utilizar qualquer componente de biosensores permitindo assim respostas mais estável.

CONCLUSÕES

Foi desenvolvida a preparação e utilização do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo óxi-hidróxido de níquel GCE/MWCNT/NiOOH para detecção e quantificação de açúcares em meio alcalino.

Foram estudados as constante de velocidade eletrocatalíticas dos açúcares no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH, esses estudos foram importantes para melhor compreensão dos processos eletródicos envolvidos no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH durante a eletro-oxidação dos açúcares para o desenvolvimento de métodos analíticos acoplados em HPLC na detecção e quantificação dos carboidratos presentes na Biomassa.

Foram desenvolvidos os métodos analíticos utilizando o HPLC com os eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH e GCE/MWCNT/CoOO para quantificação dos açúcares em amostras de bagaço de cana de açúcar,

O eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH apresentou limites de detecção de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para arabinose, $5,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para galactose, $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para glicose e $6,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para xilose. Já o eletrodo GCE/MWCNT/CoOO apresentou os seguintes limites de detecção de $3,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para arabinose, $4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para galactose, $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para glicose e a xilose foi de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Foi possível observar que ambos os eletrodos apresentaram limites de detecção semelhantes, outra característica foi que em ambos os métodos foram adequados na determinação dos açúcares presentes nas amostras de bagaço de cana de açúcar, sendo que no eletrodo GCE/MWCNT/NiOOH foi determinado $5,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de arabinose, $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de glicose e $2,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para xilose.

A determinação dos açúcares utilizando o GCE/MWCNT/CoOO foi de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para arabinose, $7,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para galactose, $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para glicose e $2,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para xilose.

Os valores não foram iguais, pois as amostras foram processadas em dias e lotes diferentes, porém as concentrações determinadas no bagaço e palha de cana de açúcar estão próximas quando comparados os eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH e GCE/MWCNT/CoOO.

Os métodos desenvolvidos mostraram serem seletivos e sensíveis. Estas propriedades fazem com que estes novos métodos poderão ser uma alternativa

interessante para outras aplicações analíticas, envolvendo diferentes amostras lignocelulósicas.

Os eletrodos GCE/MWCNT/NiOOH e GCE/MWCNT/CoOO podem ser utilizado como um detector amperométrico para a determinação dos açúcares por HPLC com considerável precisão sem a necessidade de derivatização e os métodos analíticos não sofreram nenhuma interferência, mesmo em amostra complexa como é o bagaço de cana de açúcar apresentando considerável confiabilidade.

Como alternativa, foi estudado um método que não requereu o uso de HPLC para determinação dos açúcares, foi desenvolvido um língua eletrônica utilizando uma matriz de 5 sensores modificados com nanopartículas de óxi-hidróxido de metais (paládio, ouro, cobre, níquel e cobalto) empregando uma rede neural artificial.

Esta língua eletrônica tem um enorme potencial para determinar açúcares em amostras de hidrolisados de bagaço de cana de açúcar. O mérito do sistema proposto foi conseguir determinar diferentes açúcares em uma mistura de carboidratos sem a necessidade de utilizar qualquer componente de biosensores, permitindo assim respostas mais estável.

REFERÊNCIAS

- ABO-STATE, M. A. et al. Effect of different pretreatments on egyptian sugar-cane bagasse saccharification and bioethanol production. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 22, n. 1, p. 161-167, June 2013.
- AGBLEVOR, F. A. et al. Analysis of biomass sugars using a novel HPLC method. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 3, p. 309-326, Mar. 2007.
- ANDRADE, M. F.; COLODETTE, J. L. Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 58-64, Jan. 2014.
- ASGARI, M. et al. Methanol electrooxidation on the nickel oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode prepared using pulsed electrodeposition. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 158, n. 12, p. 225-229, Jan. 2011.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (Org). **Bioetanol de cana-de-açúcar : energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2008.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BERCHMANS, S.; GOMATHI, H.; RAO, G. P. Electrooxidation of alcohols and sugars catalysed on a nickel oxide modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 394, p. 267-270, Apr. 1995.
- BOLZAN, A. E. On the electrochemical oxidation of glucose. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 134, n. 12, p. 3052-3058, Dec. 1987.
- BURATTI, S.; BRUNETTI, B.; MANNINO, S. Amperometric detection of carbohydrates and thiols by using a glassy carbon electrode coated with Co oxide/multi-wall carbon nanotubes catalytic system. **Talanta**, v. 76, n. 2, p. 454-457, July 2008.
- BURKE, L. D. Premonolayer oxidation and its role in electrocatalysis. **Electrochimica Acta**, v. 39, n. 11/12, p. 1841-1848, Aug. 1994.
- BURKE, L. D. Scope for new applications for gold arising from the electrocatalytic behaviour of its metastable surface states. **Gold Bulletin**, v. 37, n. 1/2, p. 125-135, Mar. 2004.
- CARA, C. et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1869-1876, May 2008.
- CARPANI, I.; TONELLI, D. Electrooxidation of aliphatic and aromatic amines at a Ni,Al based hydrotalcite modified electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 24, p. 2421-2425, Dec. 2006.

- CARSON, L. et al. Synthesis, characterization and stability of chitosan and poly(methyl methacrylate) grafted carbon nanotubes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 96, p. 380-386, Oct. 2012.
- CASELLA, I. G.; GATTA, M. Study of the electrochemical deposition and properties of cobalt oxide species in citrate alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 534, n. 1, p. 31-38, Oct. 2002.
- CATALDI, T. R. I. et al. Cobalt-based glassy-carbon chemically modified electrode for constant-potential amperometric detection of carbohydrates in flow-injection analysis and liquid-chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 270, n. 1, p. 161-171, Dec. 1992.
- CHENG, Q. et al. Electrochemical tuning the activity of nickel nanoparticle and application in sensitive detection of chemical oxygen demand. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 46, p. 22845-22850, Nov. 2011.
- CIPRI, A.; VALLE, M. del. Pd nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes electrode system for voltammetric sensing of tyrosine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 9, p. 6692-6698, Sept. 2014.
- CISZEWSKI, A.; STEPNIAK, I. Nanoparticles of Ni(OH)₂ embedded in chitosan membrane as electrocatalyst for non-enzymatic oxidation of glucose. **Electrochimica Acta**, v. 111, p. 185-191, Nov. 2013.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2009.
- CONWAY, B. E.; MacKINNON, D. J.; TILAK, B. V. Significance of electrochemical Bronsted factors. Kinetic studies over a wide range of temperatures. **Transactions of the Faraday Society**, v. 66, p. 1203-1226, June 1970.
- CORRADINI, C.; CAVAZZA, A.; BIGNARDI, C. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and applications. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2012, Feb. 2012. doi:10.1155/2012/487564.
- CUNHA-PEREIRA, F. da et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4218-4225, Mar. 2011.
- DAMASCENO, C. M. B. et al. A importância da lignina para a produção de etanol de segunda geração. **Documentos/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo**, n. 108, 2010. Disponível em :< <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884400/1/doc108.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2015.
- DAVIS, M. W. A rapid modified method for compositional carbohydrate analysis. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 18, n. 2, p. 235-252, 1998.

- DIAS, M. O. S. et al. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, v. 43, n. 1, p. 246-252, July 2012.
- DIEN, B. S. et al. Enhancing alfalfa conversion efficiencies for sugar recovery and ethanol production by altering lignin composition. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6479-6486, July 2011.
- DODIĆ, S. et al. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 5, p. 822-827, May 2009.
- ENGLING, G. et al. Determination of levoglucosan in biomass combustion aerosol by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 299-311, Dec. 2006.
- ENSAFI, A. A.; ABARGHOUI, M. M.; REZAEI, B. A new non-enzymatic glucose sensor based on copper/porous silicon nanocomposite. **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 219-226, Mar. 2014.
- FERREIRA, S. et al. Bioethanol from the portuguese forest residue pterospartum tridentatum - an evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7797-7803, Oct. 2010.
- FLANANGAN, R. J.; PERRETT, D.; WHELPTON, R. **Electrochemical detection in HPLC**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.
- FLEISCHMANN, M.; KORINEK, K.; PLETCHER, D. The kinetics and mechanism of the oxidation of amines and alcohols at oxide-covered nickel, silver, copper, and cobalt electrodes. **Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions 2**, n. 10, p. 1396-1403, Jan. 1972a.
- FLEISCHMANN, M.; KORINEK, K.; PLETCHER, D. The oxidation of hydrazine at a nickel anode in alkaline solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 34, n. 2, p. 499-503, Feb. 1972b.
- FLEISCHMANN, M.; KORINEK, K.; PLETCHER, D. The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 31, n. 1, p. 39-49, June 1971.
- FOYLE, T.; JENNINGS, L.; MULCAHY, P. Compositional analysis of lignocellulosic materials: evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3026-3036, Dec. 2007.
- GARCÍA-APARICIO, M. et al. Evaluation of triticale bran as raw material for bioethanol production. **Fuel**, v. 90, n. 4, p. 1638-1644, Apr. 2011.
- GEORGE, J. de M. R. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663-670, Jan. 2011.

GIOVANELLI, D. et al. Electrochemical determination of sulphide at nickel electrodes in alkaline media: a new electrochemical sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 88, n. 3, p. 320-328, Feb. 2003.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, July 2010.

GÓMEZ, E. et al. Electrodeposition of nickel on vitreous carbon: influence of potential on deposit morphology. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 22, n. 9, p. 872-876, Sept. 1992.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. da S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1/2, p. 72-78, Aug. 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GUALANDI, I. et al. Co/Al layered double hydroxide coated electrode for in flow amperometric detection of sugars. **Electrochimica Acta**, v. 173, p. 67-75, Aug. 2015.

GUZMÁN, R. S. S. Rate processes related to the hydrated nickel hydroxide electrode in alkaline solutions. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 125, n. 10, p. 1578-1587, Oct. 1978.

HAAGENSEN, F. et al. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 11, p. 1643-1651, Nov. 2009.

HAHN, F. et al. In situ uv visible reflectance spectroscopic investigation of the nickel electrode-alkaline solution interface. **Electrochimica Acta**, v. 31, n. 3, p. 335-342, Mar. 1986.

HARUN, R. et al. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3464-3467, Oct. 2011.

HONGZHANG, C.; LIYING, L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 666-676, Mar. 2007.

HU, C. C.; WEN, T. C. Voltammetric investigation of palladium oxides .2. Their formation reduction behavior during glucose-oxidation in NaOH. **Electrochimica Acta**, v. 39, n. 18, p. 2763-2771, June 1994.

IINUMA, Y. et al. A highly resolved anion-exchange chromatographic method for determination of saccharidic tracers for biomass combustion and primary bio-particles in atmospheric aerosol. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 6, p. 1367-1371, Feb. 2009.

JAFARIAN, M. et al. Electrochemical oxidation of saccharose on copper (Hydr)oxide-modified electrode in alkaline media. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 31, n. 11/12, p. 1351-1357, Jan. 2010.

JENA, B. K.; RAJ, C. R. Enzyme-free amperometric sensing of glucose by using gold nanoparticles. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, n. 10, p. 2702-2708, Mar. 2006.

JOHNSON, R. A.; WICHESTEIN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. Harlow: Pearson Education, 2007.

KARIM-NEZHAD, G. et al. Kinetic study of electrocatalytic oxidation of carbohydrates on cobalt hydroxide modified glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 141-151, Nov. 2009.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 653-658, Mar. 2006.

KUMAR, S. S.; NARAYANAN, S. S. Electrocatalytic oxidation of sulfite on a nickel aquapentacyanoferrate modified electrode: application for simple and selective determination. **Electroanalysis**, v. 20, n. 13, p. 1427-1433, July 2008.

KUSEMA, B. T.; MURZIN, D. Y. Catalytic oxidation of rare sugars over gold catalysts. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, n. 2, p. 297-307, Jan. 2013.

KUSEMA, B. T. et al. Selective catalytic oxidation of arabinose—a comparison of gold and palladium catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 386, n. 1/2, p. 101-108, Sept. 2010.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, July 1979.

LENIHAN, P. et al. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 2, p. 395-403, Jan. 2010.

LI, L. et al. A selective and sensitive d-xylose electrochemical biosensor based on xylose dehydrogenase displayed on the surface of bacteria and multi-walled carbon nanotubes modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 33, n. 1, p. 100-105, Mar. 2012.

LI, X. et al. Self-assembled microstructure of carbon nanotubes for enzymeless glucose sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 136, n. 2, p. 444-450, Mar. 2009.

LIANG, P. et al. Determination of carbohydrates in honey and milk by capillary electrophoresis in combination with graphene-cobalt microsphere hybrid paste electrodes. **Food Chemistry**, v. 190, p. 64-70, Jan. 2016.

LIU, L. et al. Variability of biomass chemical composition and rapid analysis using FT-NIR techniques. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 820-829, July 2010.

LIYAKATHALI, N. A. M. et al. Effect of frequency and reaction time in focused ultrasonic pretreatment of energy cane bagasse for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 262-271, Oct. 2015.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MATHEW, A. K. et al. Dilute acid pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 36, n. 9, p. 2424-2432, Sept. 2011.

MATÍAS, J. et al. Analysis of sugars by liquid chromatography-mass spectrometry in Jerusalem artichoke tubers for bioethanol production optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2006-2012, May 2011.

MIAO, Y. et al. Electrocatalysis and electroanalysis of nickel, its oxides, hydroxides and oxyhydroxides toward small molecules. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 53, p. 428-439, Mar. 2014.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, Apr. 2005.

MOURA, S. L. et al. Electrochemical detection in vitro and electron transfer mechanism of testosterone using a modified electrode with a cobalt oxide film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 469-474, Oct. 2014.

MURZIN, D. Y.; SALMI, T. Catalysis for lignocellulosic biomass processing: methodological aspects. **Catalysis Letters**, v. 142, n. 7, p. 817-829, June 2012.

NEWMAN, J. D.; TURNER, A. P. F.; MARRAZZA, G. Ink-jet printing for the fabrication of amperometric glucose biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 262, n. 1, p. 13-17, June 1992.

NIE, H. et al. Nonenzymatic electrochemical detection of glucose using well-distributed nickel nanoparticles on straight multi-walled carbon nanotubes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 28-34, Dec. 2011.

NORONHA, L. D. L. et al. Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolisado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1698-1702, Aug. 2010.

OJANI, R.; RAOOF, J.-B.; SALMANY-AFAGH, P. Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by poly(1-naphthylamine)/nickel modified carbon paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 571, n. 1, p. 1-8, Sept. 2004.

PASTA, M.; La MANTIA, F.; CUI, Y. Mechanism of glucose electrochemical oxidation on gold surface. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 20, p. 5561-5568, Aug. 2010.

PRAKASH, G. et al. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3304-3308, Mar. 2011.

- RAELE, R. et al. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 87, p. 205-223, Sept. 2014.
- RAZMI, H.; HABIBI, E. Amperometric detection of acetaminophen by an electrochemical sensor based on cobalt oxide nanoparticles in a flow injection system. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8731-8737, Dec. 2010.
- RICHARDS, E.; BESSANT, C.; SAINI, S. Multivariate data analysis in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 14, n. 22, p. 1533-1542, Nov. 2002.
- RIZZOTTO, M. et al. Oxidation of l-rhamnose and d-mannose by chromium(VI) in aqueous acetic acid. **Polyhedron**, v. 15, n. 9, p. 1517-1523, May 1996.
- RÜETSCHI, P.; ANGSTADT, R. T.; CAHAN, B. D. Oxygen overvoltage and electrode potentials of alpha- and Beta-PbO₂. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 106, n. 7, p. 547-551, July 1959.
- SÁ, A. C. de et al. Sugars electrooxidation at glassy carbon electrode decorate with multi-walled carbon nanotubes with nickel oxy- hydroxide. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 12, p. 7746-7762, Oct. 2014.
- SALIMI, A. et al. Immobilization of glucose oxidase on electrodeposited nickel oxide nanoparticles: direct electron transfer and electrocatalytic activity. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 3146-3153, June 2007a.
- SALIMI, A. et al. Nanomolar detection of hydrogen peroxide on glassy carbon electrode modified with electrodeposited cobalt oxide nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, n. 1, p. 24-31, June 2007b.
- SALIMI, A. et al. Electrochemical detection of trace amount of arsenic(III) at glassy carbon electrode modified with cobalt oxide nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 129, n. 1, p. 246-254, Jan. 2008.
- SALINAS-TORRES, D. et al. Study on electroactive and electrocatalytic surfaces of single walled carbon nanotube-modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 2464-2470, Feb. 2011.
- SANTANA, M. H. P.; FARIA, L. A. de; BOODTS, J. F. C. Effect of preparation procedure of IrO₂-Nb₂O₅ anodes on surface and electrocatalytic properties. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 35, n. 9, p. 915-924, Sept. 2005a.
- SANTANA, M. H. P.; FARIA, L. A. de; BOODTS, J. F. C. Electrochemical characterisation and oxygen evolution at a heavily boron doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 10, p. 2017-2027, Mar. 2005b.
- SANTOS, F. C. U. et al. Electrochemical determination of total reducing sugars from bioethanol production using glassy carbon electrode modified with graphene oxide containing copper nanoparticles. **Fuel**, v. 163, p. 112-121, Jan. 2016.
- SANTOS, J. R. A. dos; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n. 81, p. 27-33, June 2009.

- SANTOS, J. R. A. dos et al. Comparison of shf and ssf processes from sugar cane bagasse for ethanol production by *Saccharotnyces cerevisiae*. **Quimica Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.
- SCHÄFER, H. J.; SCHNEIDER, R. Oxidation of partially protected carbohydrates at the nickel hydroxide electrode. **Tetrahedron**, v. 47, n. 4/5, p. 715-724, Jan. 1991.
- SEDENHO, G. C. et al. Nanoelectrocatalytic oxidation of lactic acid using nickel nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 12, p. 6896-6905, Mar. 2015.
- SEVCIK, R. S. et al. Rapid analysis of carbohydrates in aqueous extracts and hydrolysates of biomass using a carbonate-modified anion-exchange column. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 9, p. 1236-1243, Mar. 2011.
- SHAMSIPUR, M.; NAJAFI, M.; HOSSEINI, M.-R. M. Highly improved electrooxidation of glucose at a nickel(II) oxide/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 77, n. 2, p. 120-124, Feb. 2010.
- SHI, Y.; YANG, R.; YUET, P. K. Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold nanoparticles and the use of the material as an electrocatalyst. **Carbon**, v. 47, n. 4, p. 1146-1151, Apr. 2009.
- SIQUEIRA, P. F. et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156-8163, Nov. 2008.
- SLUITER, J. B. et al. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9043-9053, Aug. 2010.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.
- SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, July 2010.
- SUGAWARA, K. et al. Electrochemical behavior of sugar investigated using a carbon paste electrode modified with copper(II)-porphyrin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 394, n. 1/2, p. 263-265, Feb. 1995.
- SUN, J.-Y. et al. Glassy carbon electrode modified with a film composed of Ni(II), quercetin and graphene for enzyme-less sensing of glucose. **Microchimica Acta**, v. 174, n. 3/4, p. 289-294, May 2011.
- TAGUCHI, G.; WU, Y. **Introduction to off-line quality control**. Nagaya: Central Japan Quality Control Assoc, 1985.

- TANG, Y. et al. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 909-914, Apr. 2006.
- TOGHILL, K. E.; COMPTON, R. G. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 9, p. 1246-1301, 2010.
- TOGHILL, K. E. et al. The determination of methanol using an electrolytically fabricated nickel microparticle modified boron doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 5, p. 491-500, Mar. 2010a.
- TOGHILL, K. E. et al. The non-enzymatic determination of glucose using an electrolytically fabricated nickel microparticle modified boron-doped diamond electrode or nickel foil electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 147, n. 2, p. 642-652, June 2010b.
- VALLE, M. del; MUÑOZ GUERRERO, R.; GUTIERREZ SALGADO, J. M. **Wavelets: classification, theory and applications**. New York: Nova Science, 2011.
- VASSILYEV, Y. B.; KHAZOVA, O. A.; NIKOLAEVA, N. N. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: part I. Adsorption and oxidation on platinum. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 196, n. 1, p. 105-125, Dec. 1985a.
- VASSILYEV, Y. B.; KHAZOVA, O. A.; NIKOLAEVA, N. N. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: part II. Effect of the nature of the electrode and the electrooxidation mechanism. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 196, n. 1, p. 127-144, Dec. 1985b.
- VIDOTTI, M. et al. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 636, n. 1/2, p. 18-23, Nov. 2009.
- WANG, B. et al. Preparation of nickel nanoparticle/graphene composites for non-enzymatic electrochemical glucose biosensor applications. **Materials Research Bulletin**, v. 49, p. 521-524, Jan. 2014.
- WIDMER, W. Analysis of biomass sugars and galacturonic acid by gradient anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection without post-column addition. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 2, p. 365-368, Feb. 2011.
- WRING, S. A. et al. Development of screen-printed carbon electrodes, chemically modified with cobalt phthalocyanine, for electrochemical sensor applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 231, p. 203-212, Jan. 1990.
- WU, X. et al. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 164-170, Jan. 2010.

XI, L. et al. Ion-exchange chromatography combined with direct current amperometric detection at CuNPs/reduced graphene oxide-chitosan composite film modified electrode for determination of monosaccharide composition of polysaccharides from *Phellinus igniarius*. **Talanta**, v. 119, p. 440-446, Feb. 2014.

YAMADA, H. et al. Old oil palm trunk: a promising source of sugars for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 11, p. 1608-1613, Nov. 2010.

YANG, J.; ZHANG, W.-D.; GUNASEKARAN, S. An amperometric non-enzymatic glucose sensor by electrodepositing copper nanocubes onto vertically well-aligned multi-walled carbon nanotube arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 279-284, 2010.

YANG, Z. et al. Copper oxide nanoleaves decorated multi-walled carbon nanotube as platform for glucose sensing. **Analytical Methods**, v. 4, n. 7, p. 1924-1926, May 2012.

ZHENG, L.; ZHANG, J.; SONG, J. Ni(II)-quercetin complex modified multiwall carbon nanotube ionic liquid paste electrode and its electrocatalytic activity toward the oxidation of glucose. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 19, p. 4559-4565, July 2009.

ZHOU, S. et al. Direct growth of vertically aligned arrays of Cu(OH)₂ nanotubes for the electrochemical sensing of glucose. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 445-452, Feb. 2013.

ZHOU, Y.-G. et al. Gold nanoparticles integrated in a nanotube array for electrochemical detection of glucose. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 1, p. 216-219, Jan. 2009.