

MAÍSA AZEVEDO BELUOMINI

**Detecção eletroquímica de ácidos urônicos presentes no bagaço de
cana-de-açúcar utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de cobre
em técnica de HPLC**

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

B453d	<p>Beluomini, Maísa Azevedo</p> <p>Detecção eletroquímica de ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em técnica de HPLC / Maísa Azevedo Beluomini. – Araraquara : [s.n], 2013 96 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Nelson Ramos Stradiotto</p> <p>1. Química analítica. 2. Ácidos urônicos. 3. Biomassa. 4. Eletrodo modificado. 5. Nanopartículas. I. Título.</p>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

DADOS CURRICULARES

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Maísa Azevedo Beluomini
Nacionalidade: Brasileira
Nascimento: 25/03/1988 – Orândia/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 mabeluomini@gmail.com

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2011-2013 Mestrado em Química
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP,
Araraquara, Brasil.
Título: "Detecção eletroquímica de ácidos urônicos presentes no
bagaço de cana-de-açúcar utilizando eletrodo modificado com
nanopartículas de cobre em técnica de HPLC."
Orientador: Nelson Ramos Stradiotto

2011-2011 Estágio
Produtos Alimentícios Orândia S/A Comércio e Indústria
Orândia, Brasil.

2006 - 2011 Graduação em Química (Bacharelado com Atribuição Industrial)
Universidade Federal de Uberlândia, UFU,

Uberlândia, Brasil

Título: "Produção de Biodiesel a partir de óleo de canola em conjunto com a Rede de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biocombustíveis de Minas Gerais".

Orientador: Manuel Gonzalo Hernández-Terrones (*in memoriam*).

3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Trabalhos publicados em anais de congresso

1. BELUOMINI, M. A.; SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determinação eletroquímica do ácido D-galacturônico utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de cobre. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão. Anais do XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013.
2. SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Determinação voltamétrica de furfural com eletrodo modificado com nanopartículas de níquel em bagaço de cana-de-açúcar. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão . Anais do XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013.
3. BELUOMINI, M. A.; SILVA, T. R.; SERQUEIRA, D. S.; PORTELA, F. M.; SQUISSATO A. L.; SANTOS, D.Q.; BORGES NETO, W.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G . Influência das variáveis no rendimento da reação de transesterificação etílica alcalina de óleo residual'. In: 34 Reunião Anual da SBQ, 2011, Florianópolis. Anais do 34 Reunião Anual da SBQ, 2011.
4. BELUOMINI, M. A.; CHIALASTRI, R. A.; SANTOS, D.Q.; VIEIRA, D. F.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G.; BORGES NETO, W. Algoritmo para Utilização na correção da Densidade de Biodiesel Etílico de Canola. In: XXIV ERSBQ-MG, 2010, Viçosa. Anais do XXIV ERSBQ-MG, 2010.

5. CHIALASTRI, R. A.; BELUOMINI, M. A.; VIEIRA, D. F.; SANTOS, D.Q.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Comportamento da massa específica em função da temperatura para biodiesel etílico de girassol. In: XXIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Viçosa, Anais do XXIV ERSBQ-MG, 2010.
6. BELUOMINI, M. A.; CHIALASTRI, R. A.; SANTOS, D.Q.; FABRIS, J. D.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Otimização dos parâmetros na obtenção de biodiesel a partir do óleo de canola. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL-RBTB, 2009, Brasília. Anais do III RBTB, 2009.
7. BELUOMINI, M. A.; CASTRO, B. E. V.; LIMA, A. P.; LEMES, V. C.; BATISTA, A. C. F.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Parâmetros físico-químicos do biodiesel de canola: vias rotas etílica e metílica. In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Belo Horizonte. Anais do XXII ERSBQ-MG, 2008.
8. LIMA, A. L.; LIMA, A. P.; PORTELA, F. M.; BELUOMINI, M. A.; BORGES, K. A.; GARCIA, L. V.; CHIALASTRI, R. A.; VIEIRA, A. T.; BATISTA, A. C. F.; HERNANDEZ-TERRONES, M. G. Propriedades físico-químicas e estabilidade oxidativa do biodiesel de milho obtido pelas rotas etílica e metílica. In: Congresso Brasileiro de Agrobiologia e Simpósio Internacional de Biocombustíveis, 2008, Uberlândia. Anais do CONBIEN, 2008.

3.2 Artigos aceitos para publicação

1. TORMIN, T. F.; LACERDA, N. M.; BELUOMINI, M. A.; REZENDE, H. P.; RODRIGUES, A. A. A. "Análise estatística da quantidade de cálcio presente no leite em pó". FAMAT em Revista , v. 11, p. 337-342, 2008.

MAÍSA AZEVEDO BELUOMINI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 15 de outubro de 2013.

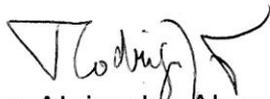
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo
Instituto de Química – USP, São Carlos



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
Instituto de Química – UFU, Uberlândia – MG

Aos meus pais, Enio e Elisa,

Com muito amor

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser em minha vida maior que um sonho, mais forte que o medo e maior que minhas expectativas.

Aos meus pais, Enio e Elisa, por toda dedicação em tornar meus sonhos realidade. Obrigada por todo amor, confiança e amizade. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Marcelo, pelo amor, companheirismo e paciência.

Ao Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto pela orientação, confiança e exemplo de ética, dedicação e amor à pesquisa.

Aos meus ex-professores da Universidade Federal de Uberlândia por todo carinho, ensinamentos e incentivo a minha vida acadêmica.

Aos companheiros de laboratório, Acelino, Marco Antônio, Josiel, Bruna, Thiago, Michele e Guilherme, pela convivência agradável, momentos de ajuda e descontração. Em especial ao Leonardo, José Luiz, e Bianca por sempre se apresentarem dispostos em compartilhar comigo seus conhecimentos.

As professoras do grupo de eletroanalítica, Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni, Dra. Hideko Yamanaka e Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor pela ajuda e amizade e aos seus alunos, com quem muito aprendi durante as reuniões de grupo.

A todos do Departamento de Eletroanalítica e ao NDCOM, muito obrigada.

Ao Instituto de Química pela oportunidade concedida,

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do aparelho de MEV.

A Capes e a Fapesp pelo apoio financeiro.

E a todos que eventualmente não foram aqui mencionados e que colaboraram de alguma maneira para a execução desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

"Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dúvida."
Sigmund Freud

"Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele e Ele tudo fará."
Salmo 37.

Resumo

Os ácidos urônicos, D-galacturônico e D-glucurônico são encontrados em materiais lignocelulósicos e podem ser utilizados na indústria de alimentos e química. Estão presentes na estrutura fibrosa do bagaço de cana-de-açúcar e não são oxidados eletroquimicamente em eletrodos de carbono vítreo. Para isto foi desenvolvido um detector modificado com nanopartículas de cobre através da eletrodeposição potenciostática. Os ácidos D-galacturônico e D-glucurônico se oxidam de modo irreversível em potenciais de 0,45 e 0,48 V vs Ag/AgCl, respectivamente em voltametria cíclica. Outras técnicas voltamétricas tais como voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada também foram estudadas e o limite de detecção foi na ordem de 10^{-5} mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica na ordem de 10^4 μA mol L⁻¹. O eletrodo desenvolvido foi utilizado em cromatografia com detecção amperométrica pulsada em célula wall-jet. Uma coluna de troca aniônica Carbo Pac Pa10 foi utilizada para separação dos ácidos urônicos em condições isocráticas, em fase móvel contendo 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,280 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺, potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A separação dos ácidos foi realizada em menos de 15 min. O limite de detecção ficou entre $5,8 \times 10^{-7}$ e $7,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e a sensibilidade amperométrica foi de $3,6 \pm 1,8 \times 10^6$ μA mol L⁻¹ e de $1,9 \pm 1,0 \times 10^6$ μA mol L⁻¹ para os ácidos D-galacturônico e D-glucurônicos, respectivamente. O método foi aplicado em amostras reais de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado e a quantidade encontrada nesta amostra foi de $15,8 \pm 0,5$ g/kg de ácido D-galacturônico e $12,5 \pm 0,5$ g/kg para o ácido D-glucurônico. Os resultados demonstram que o método proposto pode ser utilizado para a detecção desses ácidos sem a necessidade de derivatização com as vantagens de ter menos interferentes, mantendo adequadas precisão e exatidão.

Palavras-Chaves: Biomassa. Ácidos urônicos. Nanopartículas. HPLC.

Abstract

Uronic acid, D-glucuronic acid and D-galacturonic are found in lignocellulosic materials and can be used in the food industry and chemical industry. They are present in the fibrous structure of the sugarcane bagasse and are not oxidized at glassy carbon electrodes. For this we developed a detector modified with copper nanoparticles by potentiostatic electrodeposition. D-galacturonic acid and D-glucuronic irreversibly oxidize at potentials of 0.45 and 0.48 V vs. Ag/AgCl, respectively in cyclic voltammetry. Other voltammetric techniques such as differential pulse voltammetry and square wave voltammetry were also studied and the detection limit was in the order of 10^{-5} mol L⁻¹ and amperometric sensitivity in the order of 10^{-4} mol L⁻¹.

The developed electrode was used in chromatography with pulsed amperometric detection in wall-jet cell. An anion exchange column, Carbo Pac PA10, was used for separation of uronic acids in isocratic conditions, mobile phase containing 0.1 mol L⁻¹ NaOH and 0.28 mol L⁻¹ CH₃COO⁻Na⁺, the detection potential of 0.45 V vs. Pd and flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The separation of the acids was complete within 15 min. The detection limit was between 5.8×10^{-7} and 7.3×10^{-7} mol L⁻¹, the amperometric sensitivity was $3.6 \pm 1.8 \times 10^6$ and $1.9 \pm 1,0 \times 10^6$ mol L⁻¹ to D-galacturonic acid and D-glucuronic, respectively. The method was applied to real samples of 300 mg of hydrolyzate bagasse. The value found in this sample was 15.8 ± 0.5 g/kg of D-galacturonic acid and 12.5 ± 0.5 g/kg to D-glucuronic acid. The results demonstrate that the proposed method can be used to detect these acids without the need for derivatization with the advantage of having fewer interfering, considerable accuracy.

Key Words: Biomass. Uronic acids. Nanoparticles. HPLC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de um voltamograma cíclico reversível demonstrando os principais parâmetros eletroquímicos que podem ser obtidos.	30
Figura 2 -	Voltamograma cíclico para um sistema irreversível.	31
Figura 3 -	Voltamograma cíclico para um sistema quase-reversível.	31
Figura 4 -	Representação esquemática da voltametria de varredura linear; a) variação do potencial como o tempo, b) variação da corrente como o potencial.	32
Figura 5 -	Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.	33
Figura 6 -	Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível.	34
Figura 7 -	Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo voltametria de pulso diferencial em (a) instrumento analógico e (b) instrumentos digitais. A corrente é amostrada em S1 e S2 e a diferença entre elas é registrada.	35
Figura 8 -	Cromatograma obtido na separação de uma mistura de dois componentes	37
Figura 9 -	Voltamograma cíclica de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl em eletrodo de carbono vítreo na ausência (a) e na presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CuCl_2 (b), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.	45

- Figura 10 - Voltamograma linear de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 47
 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
- Figura 11 - Estudo do tempo deposição de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CuCl_2 em 47
eletrodo de carbono vítreo com potencial de acúmulo de $-0,4 \text{ V}$,
 $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
- Figura 12 - Efeito do tempo de acúmulo na área do pico para a formação de 48
CuNP em eletrodo de carbono vítreo com potencial de acúmulo de
 $-0,4\text{V}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
- Figura 13 - Voltamogramas de redissolução anódica por voltametria de 49
varredura linear em diferentes potenciais de eletrodeposição
(●) $-0,2 \text{ V}$, (●) $-0,3 \text{ V}$, (●) $-0,4\text{V}$, (●) $-0,5 \text{ V}$ e (●) $-0,6 \text{ V}$, de $2,0 \times 10^{-3}$
 mol L^{-1} de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na superfície do GC com tempo de
acúmulo de 120 s , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
- Figura 14 - Estudo da variação do potencial aplicado na eletrodeposição de 49
 $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre em eletrodo de carbono vítreo com
tempo de acúmulo de 120 s , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
- Figura 15 - Estudo de variações de concentração de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (●)1, (●)2, 50
(●)3, (●)4 e (●)5 $\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo de CV com $E = -0.4 \text{ V}$ e
tempo de acúmulo de 120 s , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$
- Figura 16 - Comportamento da concentração de íons Cu^{2+} em função área do 51
pico de corrente anódica (A_{ipa}) em $E = -0.4 \text{ V}$, tempo de acúmulo
de 120 s , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
- Figura 17 - Voltamograma cíclico do eletrodo de CuNP/CV em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de 52
NaOH, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

- Figura 18 - Voltamogramas cíclicos sucessivos de nanopartículas de cobre em superfície de carbono vítreo em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 53
- Figura 19 - Gráfico de Nyquist para o eletrodo de GC sem modificação (■) e modificado com as nanopartículas de cobre (●) em solução de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, potencial de $0,22 \text{ V}$. 54
- Figura 20 - MEV da superfície do eletrodo a) GC sem modificação, b) imagem de uma nanopartícula de cobre oxidada, ampliação de $150\,000$ vezes, c) e d) superfície modificada com as CuNP, ampliação de 1000 e 5000 vezes, respectivamente. 55
- Figura 21 - Respectivo espectro de EDX das nanopartículas eletrodepositadas sobre carbono vítreo a partir da solução de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CuCl_2 , no potencial de $-0,4 \text{ V}$ por 120 s . 55
- Figura 22 - Voltamograma cíclico de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico (a) e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glucurônico (b) na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ como eletrólito suporte (c), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 56
- Figura 23 - Voltamograma cíclico de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico na presença (a) e na ausência (b) de eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH . Em (c), voltamograma somente do eletrólito suporte em eletrodo sem modificação, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 57
- Figura 24 - Voltamograma cíclico em diferentes velocidades de varredura para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH 57
- Figura 25 - Corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de 58

NaOH em eletrodo de CuNP.

- Figura 26 - Estrutura do ácido D-galacturônico e D-glucurônico, respectivamente. 60
- Figura 27 - Voltamogramas cíclicos de 0,2 a 0,65 V para $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-galacturônico (●) e ácido D-glucurônico (●) na presença de 0,1 mol L⁻¹ NaOH para CuNP, $\nu = 50$ mV s⁻¹. 61
- Figura 28 - Mecanismo proposto para a oxidação do ácido D-glucurônico utilizando eletrodo de CuNP. 62
- Figura 29 - Voltamogramas cíclicos de eletrodo de CuNP em diferentes concentrações de solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ (●), 0,1 mol L⁻¹ (●) 0,01 mol L⁻¹ (●) e 0,001 mol L⁻¹ (●) para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico, $\nu = 50$ mV s⁻¹. 62
- Figura 30 - Voltamograma cíclico mostrando a variação da corrente de pico da CuNP em função do número de varreduras sucessivas em solução alcalina de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico, $\nu = 50$ mV s⁻¹ 63
- Figura 31 - Variação da corrente de pico anódico em função do número de varreduras sucessivas para três diferentes eletrodos em solução alcalina de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico, $\nu = 50$ mV s⁻¹. 64
- Figura 32 - Resposta cronoamperométrica de sucessivas adições de 2 μ L de solução alcalina de 0,1 mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico nos potenciais de 0,45, 0,50, 0,55 e 0,60 V, para o eletrodo de CuNP em diferentes potenciais. 64
- Figura 33 - Resposta cronoamperometria para $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D glucurônico em meio alcalino durante o período de 1000 s, potencial de 0,55 V. 67

- Figura 34 - Voltamograma de onda quadrada para diferentes frequências de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$). 68
- Figura 35 - Influência da frequência na corrente de pico anódico de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$). 69
- Figura 36 - Influência do aumento da amplitude dos pulsos com a corrente de pico anódica para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ e $f = 10 \text{ Hz}$). 69
- Figura 37 - Voltamogramas de onda quadrada de diferentes valores de incremento de potencial, para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($f = 10 \text{ Hz}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$). 70
- Figura 38 - Influência do aumento do incremento de varredura de potencial com a corrente de pico anódica para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_{sw} = 25 \text{ mV}$ e $f = 10 \text{ Hz}$). 70
- Figura 39 - Curvas analíticas para solução de ácido galacturônico (a) e ácido glucurônico (b) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH empregando a técnica de voltametria de onda quadrada, $f = 10 \text{ Hz}$; $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. 71
- Figura 40 - Voltamograma de pulso diferencial para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico (●) e D-galacturônico (●) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP. $E_p = 50,0 \text{ mV}$, $t_p = 5,0 \text{ ms}$ e $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$. 72

- Figura 41 - Influência da velocidade de varredura para $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (a) e a influência do potencial a meia altura na resolução dos picos. $E_p = 50,0$ mV, $t_p = 5,0$ ms. 72
- Figura 42 - Variação da amplitude do potencial de pulso para $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH em CuNP, (a) em relação a corrente de pico anódica e (b) em relação a largura do pico a meia altura. $t_p = 5,0$ ms, $v = 5,0$ mV s⁻¹. 73
- Figura 43 - Variação do tempo de pulso para $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH em CuNP, (a) em relação a corrente de pico anódica e (b) em relação a largura do pico a meia altura. $E_p = 50,0$ mV e $v = 5,0$ mV s⁻¹. 73
- Figura 44 - Curvas analíticas para uma solução de ácido D-galacturônico (a) e D-glucurônico (b) em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial. $\Delta E_p = 50,0$ mV, $t_p = 50,0$ ms, $v = 5,0$ mV s⁻¹. Em destaque no canto superior do gráfico (a), a melhor visualização da região de menor concentração. 74
- Figura 45 - Efeito da concentração de íons acetato no tempo de retenção dos ácidos (▪) D-galacturônico e (●) D-glucurônico. Fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Potencial de detecção 0,45 V vs Pd. Coluna CarboPac PA10. 78
- Figura 46 - Efeito da concentração de íons acetato na largura do pico a meia altura dos ácidos (▪) D-galacturônico e (●) D-glucurônico. Fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Potencial de detecção 0,45V vs Pd. Coluna CarboPac PA10. 79

- Figura 47 - Pulso amperométrico para a detecção cromatográfica dos ácidos urônicos em eletrodo de CuNP 80
- Figura 48 - Variação do potencial aplicado pela área do pico na detecção dos ácidos (▪) D-glucurônico e (●) D-galacturônico em eletrodo de CuNP. Fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Fase móvel: 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺. Coluna CarboPac PA10. 81
- Figura 49 - Perfil cromatográfico em diferentes potencial E₁, (●) 0,35 (●) 0,40 (●) 0,45, (●) 0,55 e (●) 0,50 V vs Pd, em detector modificado com CuNP para separação dos ácidos (1) D-galacturônico, 8,76 min e (2) D-glucurônico, 11,55 min. Fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Fase móvel: 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺. Coluna CarboPac PA10. 81
- Figura 50 - Eluição isocrática para a) ácido D-galacturônico, 8,75 min e b) ácido D-glucurônico, 11,57 min. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 82
- Figura 51 - Cromatograma de separação isocrática para (1) ácido D-galacturônico, 8,75 min e (2) ácido D-glucurônico, 11,56 min. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 82
- Figura 52 - Cromatogramas de corrida isocrática do (1) ácido D-galacturônico, 8,74 min e (2) ácido D-glucurônico, 11,56 min em detector de CuNP e em detector de GC (●). Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,280 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 85

- Figura 53 - Cromatograma para separação isocrática (1) D-(+)-glicose, D-(+)-xilose, D-(+)-manose D(-)-arabinose, (2) ácido D-galacturônico e (3) ácido D-glucurônico em detector de CuNP. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,280 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 85
- Figura 54 - Curva analítica para (a) ácido D-galacturônico e (b) ácido D-glucurônico na técnica de HPLC. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,280 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 85
- Figura 55 - Cromatograma para a amostra hidrolisada do bagaço de cana-de-açúcar. Em (a) o pico (1) referente à oxidação dos componentes da amostra, 2,02 min e em (b) a ampliação nos referidos tempos de retenção para (2) ácido D-galacturônico, 8,82 min e (3) ácidos D-glucurônico, 11,67. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 87
- Figura 56 - Método da adição de padrão para o ácido (a) D-galacturônico e (b) D-glucurônico em eletrodo de CuNP utilizados como detectores amperométricos em HPLC. Eluição isocrática. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Componentes químicos do bagaço da cana, base seca.	25
Tabela 2 -	Parâmetros ciclovoltamétricos da oxidação de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de ácido D-galacturônico em meio alcalino.	59
Tabela 3 -	Parâmetro analisados da resposta cronoamperometrica do ácido D-glucurônico para diferentes potenciais.	66
Tabela 4 -	Parâmetro analisados da resposta cronoamperometrica do ácido D-galacturônico para diferentes potenciais.	65
Tabela 5 -	Resumo dos parâmetros voltamétricos para o ácido D-galacturônico.	75
Tabela 6 -	Resumo dos parâmetros voltamétricos para o ácido D-glucurônico.	75
Tabela 7 -	Ensaio de recuperação em SWV e DPV para o ácido D-galacturônico.	76
Tabela 8 -	Ensaio de recuperação em SWV e DPV para o ácido D-glucurônico.	76
Tabela 9 -	Fórmula molecular, massa molecular e valor do pKa para seis compostos de açucares e os dois ácidos urônicos.	77
Tabela 10 -	Parâmetros cromatográficos para a separação dos ácidos D-galacturônico e D-glucurônico.	83
Tabela 11 -	Figuras de mérito para a técnica cromatográfica.	86

Tabela 12 - Porcentagem recuperada na técnica de HPLC para o ácido D-galacturônico. 89

Tabela 13 - Porcentagem recuperada na técnica de HPLC para o ácido D-glucurônico 89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

v	Velocidade de varredura
A	Amper
α	Fator de separação cromatográfica
α	Coefficiente de transferência eletrônico
Ag/AgCl	Prata cloreto de prata
CuNP	Nanopartículas de cobre
CV	Voltametria cíclica
DPV	Voltametria de pulso diferencial
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
ED	Deteção eletroquímica
EDX	Energia dispersiva de raios X
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_{p_a}	Potencial de pico anódico
$E_{p_a/2}$	Potencial a metade da corrente de pico anódica
E_{p_c}	Potencial de pico catódico
Eq	Equação
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
f	Frequência
$Fe(CN)_6^{4-/3-}$	Par redox de hexacianoferrato (4-, 3-)
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Hz	Hertz
i	Corrente
i_{pa}	Corrente de pico anódica
k	Fator de retenção
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
LSV	Voltametria de varredura linear
MEV	Microscopia eletrônico de varredura
mm	Milímetro
N	Eficiência cromatográfica
nm	Nanômetro
PAD	Deteção amperométrica pulsada
pKa	Medida logaritmo da constante de dissociação do ácido

r	Coeficiente de correlação linear
R	recuperação
R_s	Resolução cromatografica
R_{Tc}	Resistência de transferência de carga
s	Segundo
S_a	Sensibilidade amperométrica
SWV	Voltametria de onda quadrada
t'_r	Tempo de retenção ajustado
t_m	Tempo morto
t_p	Tempo de duração do pulso
t_r	Tempo de retenção
V	Volts
vs	Versus
$W_{1/2}$	Largura de pico a meia altura
W_h	Largura do pico a meia altura
Z'	Impedância real
Z''	Impedância imaginária
ΔE_p	Diferença entre potencial
ΔE_s	Incremento de aplicação do pulso de potencial
Δi	Diferença entre corrente

SUMÁRIO

1 Introdução	25
1.1 Material lignocelulósico	25
1.2 Eletrodos quimicamente modificados	27
1.3 Eletrodos quimicamente modificados com cobre	28
1.4 Eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas de cobre	29
1.5 Voltametria cíclica	30
1.6 Voltametria de varredura linear	33
1.7 Voltametria de onda quadrada	33
1.8 Voltametria de pulso diferencial	35
1.9 Cromatografia líquida de alta eficiência	36
1.10 Parâmetros cromatográficos	38
2 Objetivos	41
3 Parte experimental	42
3.1 Equipamentos	42
3.2 Pré-tratamento do eletrodo de carbono vítreo	42
3.3 Reagentes e soluções para experimentos eletroquímicos	43
3.4 Eletrodeposição de cobre na superfície do GC.	43
3.5 Caracterização morfológica do eletrodo modificado com CuNP	43
3.6 Caracterização por impedância eletroquímica	43
3.7 Estudo da estabilidade e comportamento eletroquímico dos ácidos urônicos em eletrodo modificado com CuNP	44
3.8 Reagentes e soluções para experimentos cromatográficos	44
3.9 Preparo da amostra para separação cromatográfica	44
3.10 Condições para separação cromatograficas	45
3.11 Interferentes presentes na amostra	45
3.11 Interferentes presentes na amostra	45
3.12 Curvas analíticas e método de adição de padrão	45
4 Resultados e discussões	46
4.1 Comportamento eletroquímico do cobre em eletrodo de GC	46

4.2 Eletrodeposição de nanopartículas de cobre em eletrodo de GC	47
4.3 Caracterização do eletrodo modificado com as CuNP	54
4.3.1 <i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, EIS</i>	54
4.3.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	55
4.4 Comportamento eletroquímico dos ácidos urônicos em GC e em CuNP	57
4.5 Eletrooxidação dos ácidos urônicos em eletrodo modificado com CuNP	61
4.6 Influência da concentração do eletrólito suporte	63
4.7 Estabilidade da corrente de pico	64
4.8 Determinação cronoamperométrica dos ácidos urônicos em CuNP	65
4.9 Otimização dos parâmetros voltamétricos de análise	68
4.9.1 <i>Voltametria de onda quadrada</i>	69
4.9.2 <i>Voltametria de pulso diferencial</i>	72
4.9.3 <i>Testes de recuperação para as técnicas voltamétricas</i>	76
4.10 Separação cromatográfica dos ácidos urônicos	78
4.10.1 <i>Otimização dos parâmetros cromatográficos.</i>	78
4.10.2 <i>Comportamento cromatográfico dos ácidos urônicos utilizando os eletrodos de GC e CuNP como detectores em PAD</i>	84
4.10.3 <i>Estudos dos principais interferentes presentes na amostra</i>	85
4.10.4 <i>Estudo da Concentração pela Área do Pico Cromatográfico</i>	86
4.10.5 <i>Determinação dos ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar</i>	87
5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Material lignocelulósico

Atualmente, a conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustíveis de segunda geração e demais subprodutos com valor agregado vem sendo considerada uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol, produtos químicos e energia.

Dentro desse contexto surgem as biorrefinarias. O Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos, NREL, define biorrefinarias como instalações industriais que visam à conversão de biomassa de diferentes fontes em diversos produtos, tais como combustíveis, energia e *commodities* industriais, além de intermediários químicos.¹

Através da produção de vários produtos, uma biorrefinaria pode tirar vantagem dos diferentes componentes da biomassa e intermediários e maximizar o valor obtido a partir da matéria-prima. A biorrefinaria poderia, por exemplo, produzir um ou vários produtos em menor quantidade, mas de alto valor, produtos químicos de baixo valor, mas em maiores quantidades e combustível líquido, enquanto a geração de eletricidade advindo do calor do processo pode ser utilizado para seu próprio uso e, talvez, o suficiente para venda de energia elétrica. Os produtos melhoram a rentabilidade, o combustível ajuda a satisfazer as necessidades energéticas e a produção de energia reduz custos e evita emissões de gases de efeito estufa.¹

As biorrefinarias podem utilizar diversas fontes de biomassa, entre elas materiais lignocelulósicos, tais como: cavacos de madeira, serragem, resíduos que contenham amido, bagaço de cana, soja, milho, farelo de mandioca, entre outros.

No Brasil, a quantidade de resíduos lignocelulósicos gerada anualmente é de aproximadamente 350 milhões de toneladas.² Considerando que uma das principais fontes de materiais lignocelulósicos é o setor sucroalcooleiro e adotando o teor de celulose, hemicelulose e lignina no bagaço como parâmetro de comparação, chega-se a quantidade potencial respectivamente de 164,5 , 96,25 e 71,05 milhões de toneladas respectivamente, que podem ser obtidas a partir de resíduos lignocelulósicos no Brasil.²

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose e

também por lignina. O termo hemicelulose é aplicado aos polissacarídeos, compostos por diferentes unidades de açúcares, formando cadeias ramificadas que representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol e demais subprodutos.

A composição química do bagaço da cana é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes químicos do bagaço da cana, base seca³.

Componentes do bagaço	%
Holocelulose	77,80
Lignina insolúvel em ácido	20,40
Lignina solúvel em ácido	1,40
Solúveis em etanol benzeno	5,40
Solúveis em água quente	10,20
Cinzas	3,30
Ácidos Urônicos	4,20

A hemicelulose é encontrada no bagaço da cana-de-açúcar na proporção de 25 a 27% podendo ser constituída por unidades de xilose, manose, glicose, galactose e arabinose, sendo esses açúcares fermentescíveis para o processo de obtenção de etanol celulósico.⁴

Na pectina, que envolve a hemicelulose em porcentagens que variam de 5 a 24%, encontram-se os ácidos urônicos (D-glucurônico e D-galacturônico) e outros açúcares em concentrações menores. Estes ácidos urônicos não são metabolizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* na obtenção de etanol celulósico, pois esta levedura apresenta baixa afinidade por esses ácidos.⁵ No entanto, essas pectinas são de grande interesse para as biorrefinarias, pois são uma potencial fonte de matéria-prima para bioprocessos.

Com isso, os ácidos urônicos que não são metabolizados na produção de etanol, podem ser recuperados dentro do conceito de biorrefinaria, podendo ser comercializado diretamente para a utilização na indústria alimentícia, como agente acidificante e na indústria química como agente tensoativo. Essa comercialização direta deve-se ao fato desses ácidos terem sua base carregada negativamente, característica que pode ser explorada para sua recuperação com alto rendimento e pureza. Eles também podem ser transformados química ou enzimaticamente em

substâncias de maior valor agregado como o ácido múcico, meso-galactárico e o ácido L-galactônico.⁶

Para a conversão da biomassa lignocelulósica existem basicamente dois processos envolvidos: a hidrólise química ou enzimática. O custo dessa bioconversão a partir de materiais lignocelulósicos é relativamente alto com base em tecnologias atuais⁷ e os principais desafios são o baixo rendimento e alto custo do processo de hidrólise.

Diversas estratégias para aperfeiçoar a conversão de materiais lignocelulósicos têm sido demonstradas em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para então submetê-la a hidrólise enzimática ou química. Para isso, é necessário “abrir” a estrutura da fibra do vegetal de forma a permitir que esses materiais possam ser bioconvertidos em demais produtos com maior valor agregado. Portanto é necessário conhecer os componentes menores da biomassa, como proteínas, ácidos orgânicos e outros materiais não-estruturais para melhor adaptar o processo e assim permitir a sua recuperação em escala industrial.

O conhecimento da composição da matéria-prima permite a avaliação dos rendimentos de conversão e é de primordial importância. Portanto, a contribuição dos ácidos urônicos para essas biorrefinarias e sua quantificação no bagaço da cana-de-açúcar é fundamental para ser possível seu aproveitamento dentro do conceito de biorrefinaria.

1.2 Eletrodos quimicamente modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido por Murray *et al* em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução.⁸ A modificação da superfície do substrato pode estabelecer uma boa estratégia para se obter uma ampla aplicabilidade da metodologia eletroanalítica.⁹ Também em 1975 com Murray, surgiu o clássico artigo que descreve a modificação química da superfície de eletrodos de SnO₂ via organosilanos.⁸

Os substratos de metais condutores tais como, Au, Ag e Pt e eletrodo de carbono são mais convenientes para a modificação superficial. As imobilizações de espécies químicas ativas para a construção de EQMs e suas aplicações têm gerado grande

interesse, principalmente em relação à melhoria da seletividade e detectabilidade das técnicas eletroquímicas em comparação aos eletrodos não modificados.^{10,11,12}

A partir destes trabalhos pioneiros, a preparação e utilização de EQMs têm se expandido de forma bastante acentuada, como pode ser inferido do expressivo número de artigos publicados sobre este tema nos últimos anos. Além da eletroanálise, que tem se destacado como uma das áreas mais ativas neste campo, os EQMs têm sido utilizados para outros fins que não analíticos, incluindo estudos básicos de eletrocatalise, cinética de transferência de elétrons, permeação de membranas, síntese eletroorgânica e fotoeletroquímica.

1.3 Eletrodos quimicamente modificados com cobre

O desenvolvimento e aplicação de eletrodos quimicamente modificados com cobre (EQM-Cu) têm apresentado crescente interesse nas áreas de ciências e tecnologia devido ao seu desempenho na oxidação dos carboidratos e sua detecção ser superior aos eletrodos de platina e ouro em quase todos os aspectos.¹³

Eletrodos de carbono vítreo modificados com cobre são de grande interesse, uma vez que os estudos mostram ser possível a quantificação de açúcares mesmo em baixas concentrações.^{14,15} Além disso, os ácidos urônicos não exibem nenhuma corrente significativa em voltametria cíclica quando não há modificação no eletrodo de carbono vítreo (GC), empregado no lugar do modificado com cobre.¹⁴ Outra vantagem para o uso desses eletrodos é a capacidade desses ácidos em formar complexos com íons cúpricos.¹⁶

Eletrodos modificados com cobre em solução fortemente alcalina têm sido aplicados nos processos de oxidação de carboidratos e derivados dos açúcares tais como os ácidos alditóis, aldônicos, urônicos e aldáricos. O uso desse tipo de eletrodo para oxidação de compostos nas regiões positivas (0,5 a 0,6 V vs ECS) apresenta grande vantagem pois em regiões de potencial positivo o cobre é mantido principalmente na forma cúprica, diminuindo a corrente de fundo e maximizando sua utilização na oxidação dos carboidratos.¹⁶

1.4 Eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas de cobre

O campo da nanociência e nanotecnologia compreende dimensões na ordem de 1 a 100 nm, o que possibilita entender, controlar e explorar a matéria em seu momento de origem. Desta forma é possível intervir no processo original e decidir em que etapa de crescimento se presta uma dada estrutura em função de suas propriedades físicas e químicas. Explorar estas propriedades pode assegurar a criação de dispositivos a nível atômico, molecular e supramolecular, o que constitui requisito essencial para a produção em qualquer área de interesse.¹⁷

Estes nanodispositivos permitem investigar processos eletroquímicos em sistemas anteriormente não possíveis de serem estudados utilizando os macro eletrodos. Exemplos de oportunidades únicas fornecidas pelas nanoestruturas incluem a possibilidade de estudos eletroquímicos em meio que apresenta alta resistividade, como os solventes orgânicos, soluções com baixos teores de eletrólitos suporte ou na sua completa ausência, além de permitirem investigação de processos cinéticos que ocorrem em dimensões ultra-microscópicas.¹⁸

Dentre as diversas técnicas para modificação dos eletrodos com nanopartículas (decomposição térmica, microemulsão e eletrodeposição),¹⁹ a eletrodeposição têm sido uma das mais empregadas.²⁰ Isso se deve a simplicidade da técnica, baixo custo, processamento à temperatura ambiente, além de possibilitar um maior controle no processo de nucleação e crescimento sobre a superfície do eletrodo, o qual é fundamental para a obtenção de nanopartículas com dimensões uniformes e densidade controlada. Esta última condição é alcançada controlando-se o potencial, a corrente, a carga e a composição química da solução (concentração da espécie eletroativa, eletrólito suporte e pH).

Modificar os eletrodos com nanopartículas apresentam quatro grandes vantagens: melhor transporte de massa, catálise, área superficial altamente eficaz e melhora na relação sinal/ruído.¹⁹

Existem diversas técnicas de eletrodeposição dependendo do sistema eletroquímico e das propriedades desejadas para o depósito. A eletrodeposição geralmente é realizada de dois modos principais: deposição potenciostática, quando o potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência é mantido constante no tempo e a variação da corrente elétrica, que ocorre durante o processo, informa a taxa com que ocorrem as reações eletroquímicas; ou deposição galvanostática,

quando a corrente entre eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo é mantida constante no tempo.

A eletrodeposição potencioestática de nanopartículas de cobre (CuNP) foi realizada por J.Yang,²¹ o qual desenvolveu um sensor para glicose a partir de nanotubos de carbono incorporado com nanopartículas de óxido cúprico (CuO). Primeiro as CuNP foram eletrodepositadas sobre os nanotubos em potencial constante e em seguida, foram oxidadas a CuO utilizando a técnica de voltametria cíclica. A atividade electrocatalítica de CuO foi investigada em condições alcalinas utilizando voltametria cíclica e cronoamperometria.

L.Wen-Zhi,²² desenvolveu um sensor electroquímico para a oxidação de H_2O_2 no eletrodo de CuNP, o qual também demonstrou boa resposta. As CuNP eram catodicamente depositadas sobre a superfície de carbono vítreo em uma solução de $CuCl_2$ no potencial de $-0,4$ V. Em seguida as nanopartículas eram convertidas em óxido de cobre utilizando a técnica de voltametria cíclica no intervalo de potencial de $-0,5$ a $0,3$ V em $0,1$ mol L^{-1} de solução de NaOH. O mecanismo de formação das nanopartículas foi investigado por voltametria cíclica, espectroscopia de impedância electroquímica e microscopia eletrônica. A detecção cronoamperométrica de H_2O_2 foi realizada em $0,2$ V com $0,01$ mol L^{-1} de solução de NaOH, obtendo um limite de detecção de $0,2$ nmol L^{-1} . Assim, os eletrodos modificados com CuNP sobre carbono vítreo podem constituir-se um dispositivo altamente promissor para a detecção electroquímica dos ácidos urônicos presentes na fibra da cana-de-açúcar utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

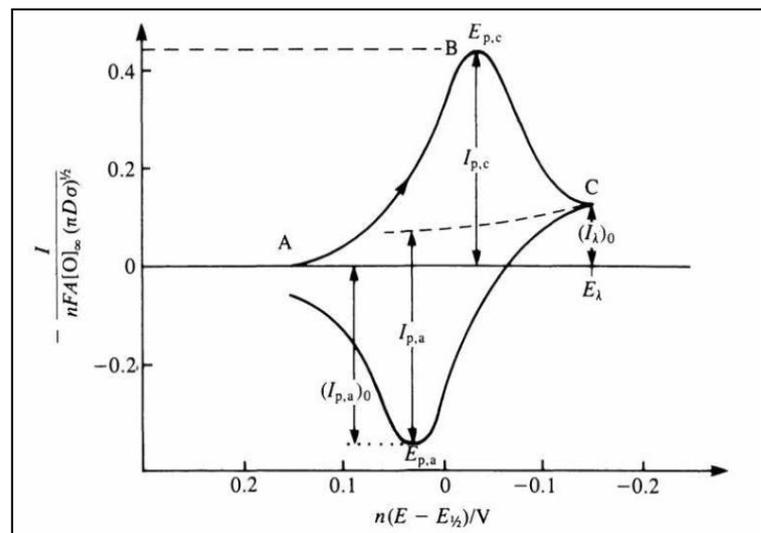
1.5 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre os processos electroquímicos, pois apesar de nem sempre fornecer resultados com elevada detectabilidade, permite que se obtenha rapidamente informações sobre um sistema electroquímico. A causa da menor detectabilidade (comparada a outras técnicas voltamétricas) é devido a variação contínua do potencial aplicado, que ao ser variado gera corrente capacitiva, que vai se somar à corrente faradaica. Em baixas concentrações do analito a contribuição da corrente capacitiva se torna significativa e como geralmente não pode ser distinguida da corrente faradaica, dificulta a análise.

Um voltamograma cíclico indica em que região de potencial determinada reação de oxidação ou redução irá ocorrer. A técnica também fornece outras informações a respeito de um sistema, como: reversibilidade do processo, número de elétrons envolvidos, formação de espécies intermediárias, processo difusional ou adsortivo, área efetiva do eletrodo, entre outros.²³

Os parâmetros mais importantes que podem ser obtidos a partir de um voltamograma cíclico são: potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódico (i_{pa}), corrente de pico catódico (i_{pc}) e a diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico (ΔE_p), como ilustra a Figura 1.

Figura 1 - Esquema de um voltamograma cíclico reversível demonstrando os principais parâmetros eletroquímicos que podem ser obtidos.²³



O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre na superfície do eletrodo. Portanto, a partir dos principais parâmetros extraídos de um voltamograma cíclico pode-se obter informações relacionadas à reversibilidade do sistema em estudo, bem como a elucidação de mecanismo de reações eletroquímicas, detecção de existência de reações acopladas a processos eletroquímicos, identificação de espécies presentes em solução (bem como de intermediários) e análise semiquantitativa das velocidades de reação.

Existem dois componentes principais que determinam as reações que podem ocorrer no eletrodo: a transferência difusional de massa do analito em solução para

a superfície do eletrodo e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo, em alguns casos ainda pode ocorrer reações químicas acopladas a alguns destes processos. Em função desses componentes, os sistemas podem ser classificados como reversíveis, irreversíveis ou quase irreversíveis (Figuras 2 e 3).^{25,26} Esta classificação dos processos que ocorrem no eletrodo foi inicialmente proposta por Matsuda e Ayabe.²⁵

Figura 2 - Voltamograma cíclico para um sistema irreversível.²⁵

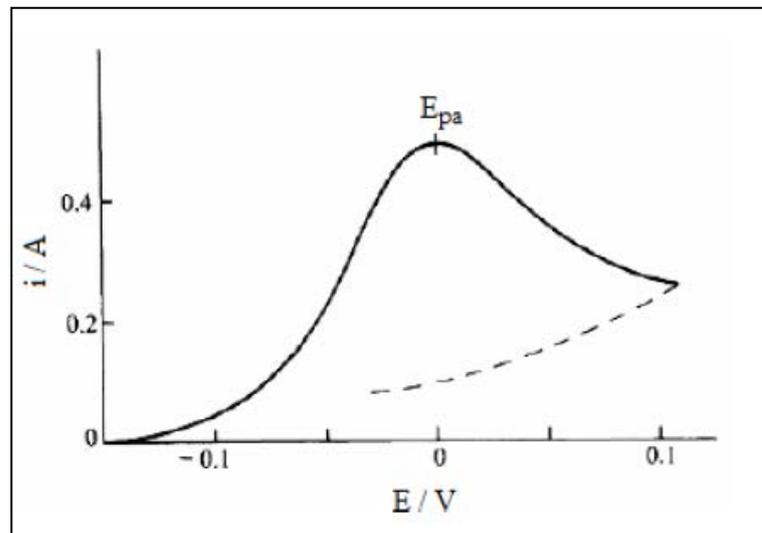
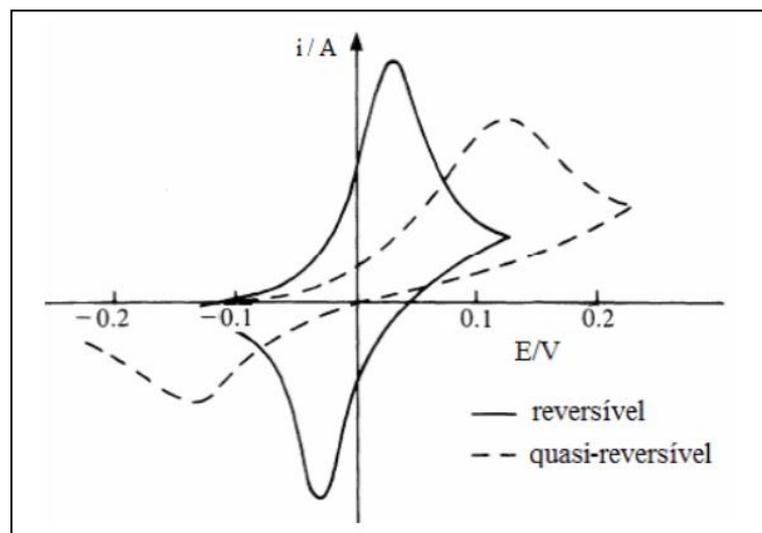


Figura 3 - Voltamograma cíclico para um sistema quase-reversível.²⁵

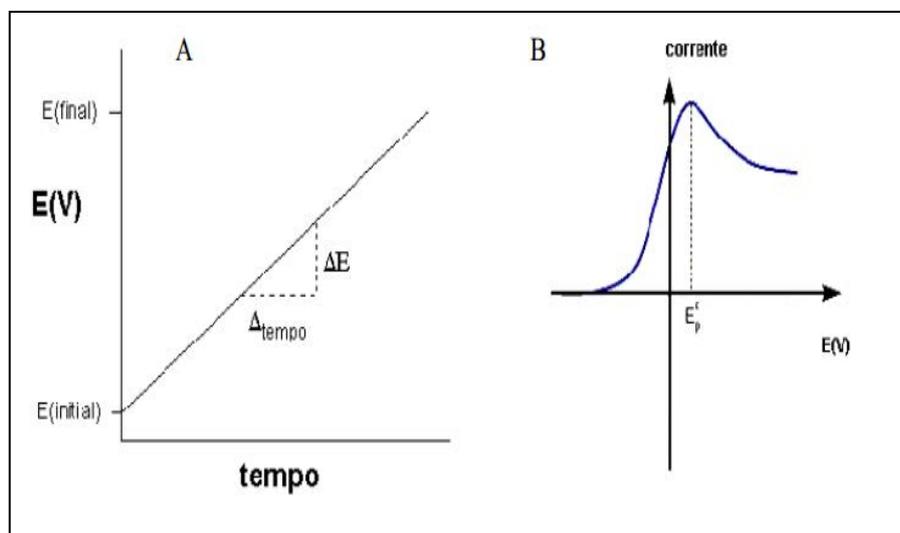


1.6 Voltametria de varredura linear

Dentre as técnicas voltamétricas a voltametria de varredura linear (LSV) destaca-se pela simplicidade, em que uma variação de potencial é aplicada linearmente no intervalo de tempo estudado, sendo extensivamente utilizada no estudo de cinética eletródica e mecanismos reacionais, apresentando limites de detecção da ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Esta técnica possibilita a aplicação de velocidades de varredura relativamente altas (até 1000 mV s^{-1}), no entanto não apresenta limites de detecção muito baixos.²⁶

A corrente é lida de forma direta, em função do potencial aplicado. Desta forma a corrente total lida possui contribuições tanto da corrente faradaica quanto da corrente capacitiva, o que prejudica em muito a aplicação desta técnica para aplicações quantitativas. A Figura 4 ilustra como os voltamogramas de varredura linear são obtidos.

Figura 4 - Representação esquemática da voltametria de varredura linear; a) variação do potencial como o tempo, b) variação da corrente como o potencial.²⁶

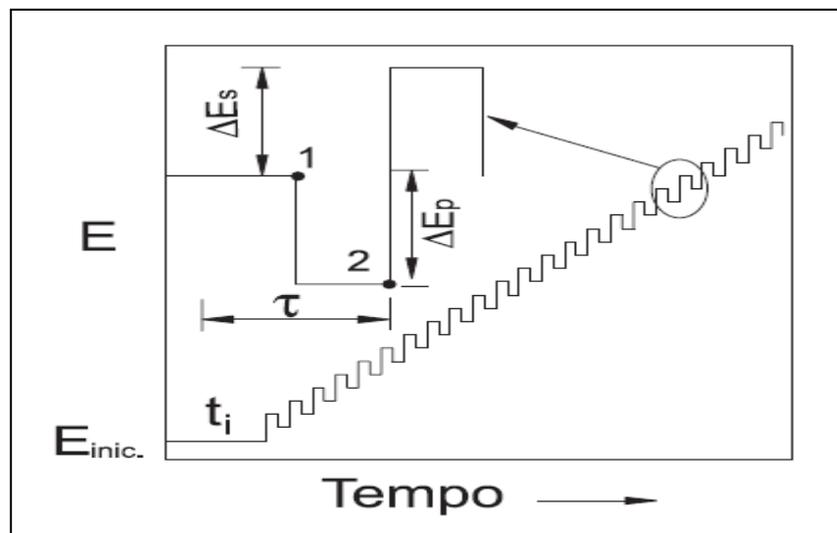


1.7 Voltametria de onda quadrada

Na Voltametria de Onda Quadrada (SWV), a forma do pico de corrente resultante é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s (amplitude do pulso aplicado), que variam de acordo com uma escada de potencial com largura

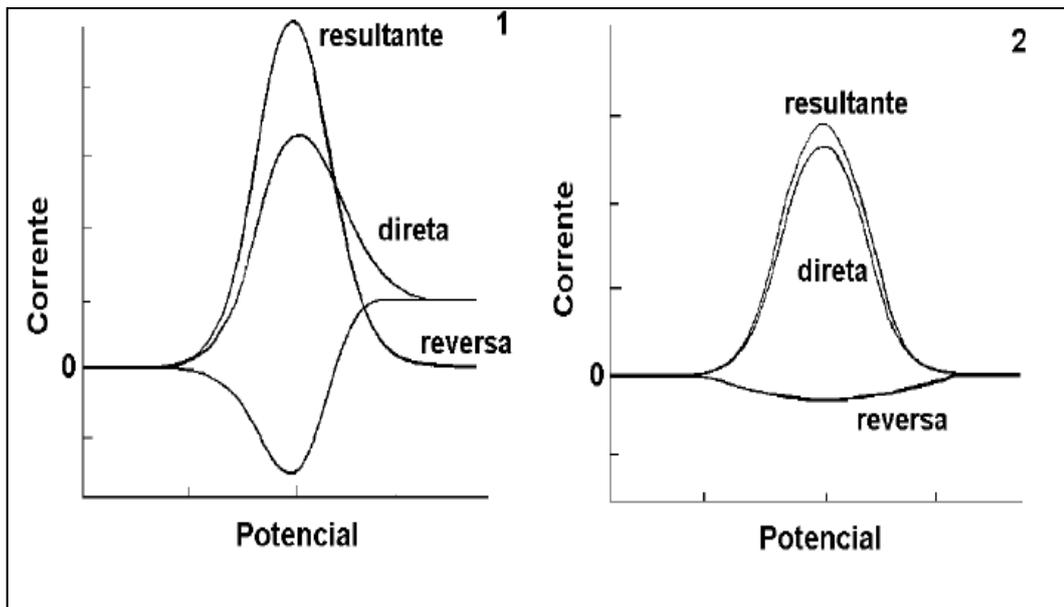
ΔE_p e duração t (período). As curvas de corrente-potencial apresentam perfil bem definido e são, geralmente, simétricas, isto porque as correntes são medidas somente no final de cada semiperíodo e as variações na altura e na largura do pulso de potencial são sempre constantes, para um determinado intervalo de potencial. As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos (1) e reversos (2) e o sinal é dado como uma intensidade da corrente resultante (ΔI) de forma diferencial, e apresenta excelente detectabilidade e baixa contribuição da corrente capacitiva.²⁷ A Figura 5 apresenta um detalhamento da forma de aplicação do potencial.

Figura 5 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.²⁷



De acordo com a teoria, magnitude, perfil e posição dos picos redox dependem do grau de reversibilidade e do valor do coeficiente de transferência eletrônica da espécie eletroativa, sendo que o caráter da reação redox pode causar um aumento ou diminuição significativa na resposta obtida.²⁶ A Figura 6 apresenta os voltamogramas teóricos de SWV associados a processos (1) reversível e (2) irreversível, com a separação das correntes direta, inversa e resultante.

Figura 6 - Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível.²⁶



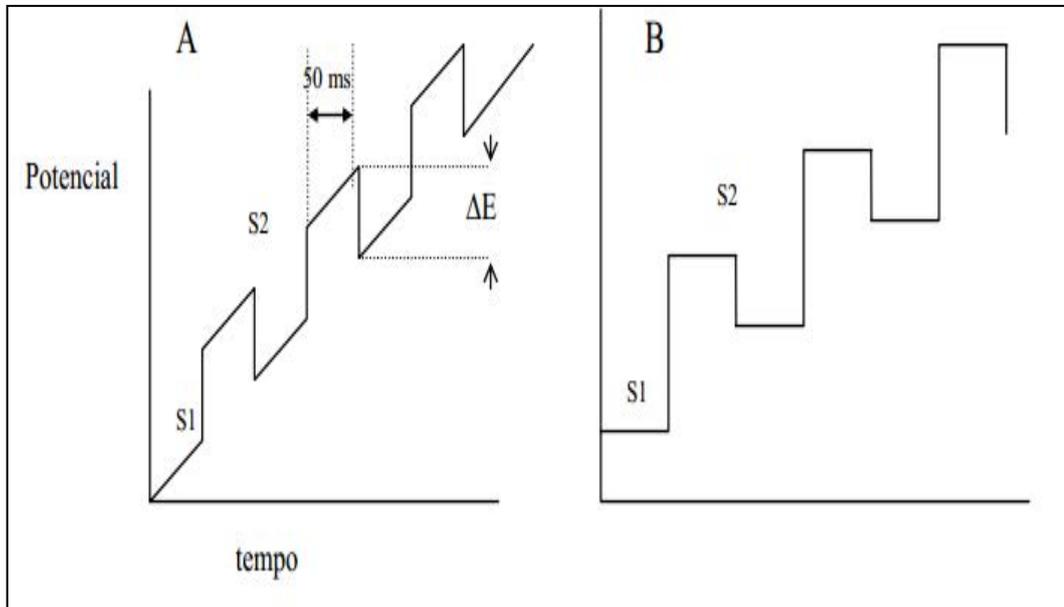
1.8 Voltametria de pulso diferencial

Esta modalidade de medição voltamétrica foi introduzida por Barker e Jenkin em 1958.²⁷ Tem como objetivo diminuir o limite de detecção das medidas voltamétricas pelo substancial aumento da discriminação entre a corrente faradaica e capacitiva, permitindo uma quantificação de até $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.²⁸

Na voltametria de pulso diferencial (DPV) a programação de potencial é feita aplicando-se um pulso de potencial superposto em uma rampa de potencial linearmente crescente e cada etapa de aplicação de pulso é definida pela varredura de potencial utilizado. O pulso aplicado é de pequena amplitude (10 a 100 mV) e é imposto durante 50 a 60 ms perto do final da vida da gota de mercúrio (t).²⁹

Como pode ser visto na Figura 7 duas medidas de corrente são feitas alternadamente, uma em S1 logo antes da aplicação do pulso e outra em S2, imediatamente após o final do pulso. A diferença de corrente por pulso Δi é registrada em função do aumento linear da voltagem. Como resultado, temos uma curva diferencial com um pico, em que a altura do pico é diretamente proporcional a concentração.³⁰

Figura 7 – Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo voltametria de pulso diferencial em (a) instrumento analógico e (b) instrumentos digitais. A corrente é amostrada em S1 e S2 e a diferença entre elas é registrada.³⁰



1.9 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação que consegue realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras em um tempo curto, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.³⁶ Utiliza colunas fechadas que contêm partículas muito finas que proporcionam separações eficientes.

Dentro da HPLC existem diferentes mecanismos que governam a separação de misturas. De acordo com esses mecanismos pode-se classificar a cromatografia líquida em: cromatografia por adsorção, cromatografia por partição, cromatografia com fase ligada, cromatografia líquida quiral, cromatografia por troca iônica, cromatografia por bioafinidade e cromatografia por exclusão.³⁷

A Cromatografia por troca iônica é um método de absorção que baseia-se na interação eletrostática entre o soluto e a fase estacionária, buscando o equilíbrio de troca entre íons em solução e íons de mesmo sinal na superfície de um sólido que deve ser insolúvel e de alto peso molecular. A amostra a ser separada é geralmente uma solução aquosa contendo íons orgânicos e inorgânicos; na superfície da fase estacionária cátions e ânions são covalentemente ligados e íons são trocados com a

fase móvel, separando assim os íons que não interagem com a resina daqueles que se ligam com os grupos carregados.³⁶

Verpoorte e Svendsen,³⁷ em 1974, divulgaram a técnica de cromatografia por troca iônica como uma das mais promissoras para a separação de misturas complexas de alcalóides utilizando um detector de absorção no ultravioleta. O sistema de detecção foi útil para a separação da maioria dos compostos orgânicos, como os corantes, as proteínas, os produtos farmacêuticos e os polímeros sintéticos. Porém, ainda continuava sendo um entrave para a separação dos analitos que não apresentam grupos cromóforos, pois esses não absorvem luz na região do ultravioleta visível.^{38,39}

Enquadra-se nesse contexto os ácidos urônicos. Eles não podem ser detectados por absorção devido à falta de grupos cromóforo e fluoróforos na sua estrutura molecular, o que limita sua detecção pelos tradicionais métodos espectrofotométricos. Assim, para ser detectado por esses meios é necessário que sejam derivatizados. No entanto, muitas vezes a derivatização é afetada pela complexidade da matriz, resultado em derivatizações incompletas ou na produção de múltiplos produtos derivatizados.³¹

Os métodos tradicionais para que os ácidos urônicos possam ser detectados são baseados em colorimetria utilizando ácido sulfúrico-carbazol^{32,33} e o meta-hidroxidifenil,^{34,35} que derivatizam o ácido urônico para que assim possam ser detectados. Porém esses métodos quantificam somente a totalidade de ácidos urônicos presentes na amostra. Assim os resultados da determinação não são os valores específicos de cada ácido urônico. Além disso, esses métodos de determinação exigem um tempo consideravelmente longo de análise além da complexidade de sua execução.³¹

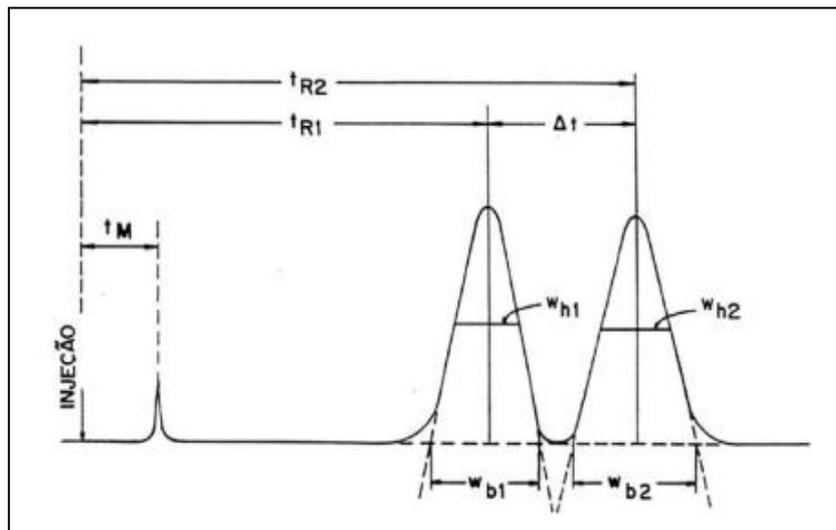
A cromatografia líquida com troca aniônica acoplada com detecção amperométrica pulsada tem se destacado na detecção de açúcares e ácidos orgânicos.⁴⁰ Essa nova técnica tem prontamente resolvido os problemas acima mencionados. Com base na diferença de permuta iônica entre os ácidos urônicos e a fase estacionária, ocorre a separação. A detecção eletroquímica (ED), que é normalmente operada em modo amperométrico, ganhou certa popularidade para a detecção de açúcares, alditóis e ácidos urônicos sem a necessidade de serem derivatizados.^{40,41} Além disso, o método tem a vantagem de ser simples, com alta sensibilidade e baixo limite de detecção.

Os eletrodos de metais nobres (Pt, Au) são muito utilizados como detectores eletroquímicos. A grande falha da detecção amperométrica é a perda de atividade durante detecções anódicas de substâncias orgânicas. A detecção amperométrica pulsada (PAD) soluciona esse problema da atividade perdida em metais nobres, alternando polarizações anódica e catódica para limpar e reativar a superfície do eletrodo.^{42, 43,44} No entanto, a dissolução lenta de partículas do metal e maiores níveis de ruído de fundo podem ocorrer durante a aplicação do pulso. Assim, se torna necessário buscar novos eletrodos que podem ser operados sem perda de atividade. Com isso, estudos que utilizam elétrodos de trabalho modificados com cobre demonstraram que várias moléculas orgânicas eletroativas podem ser determinadas com boa sensibilidade, a fim de melhorar o desempenho amperométrico e diminuir o envenenamento indesejado.⁴¹

1.10 Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos devem ser calculados a fim de avaliar o potencial de separação da coluna. Esses cálculos são realizados com os dados experimentais obtidos em um cromatograma típico, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Cromatograma obtido na separação de uma mistura de dois componentes.³⁶



O tempo de retenção do analito, t_r , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção máxima da banda cromatográfica. O tempo de retenção de

um composto não retido, t_m , é o tempo gasto por ele para percorrer todo o sistema cromatográfico desde a injeção até a saída da coluna e representa o tempo gasto para a fase móvel fazer este percurso. Esses valores são obtidos diretamente do cromatograma quando se tem um integrador ou *softwares* apropriados. O tempo de retenção ajustado, t'_r , é o tempo real que as moléculas ou íons do analito ficam retidas na fase estacionária, calculado por:

$$t_r = t'_r - t_m \quad (\text{eq. 1})$$

O fator de retenção, k , é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas ou íons do analito ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna através da fase móvel. Valores de $2 < k < 10$ são considerados ideais, mas se aceita $1 < k < 20$.^{45,46}

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{eq. 2})$$

A resolução, R_s , é a medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a equação:

$$R_s = 1,177 \left[\frac{t_{r1} - t_{r2}}{W_{h1} + W_{h2}} \right] \quad (\text{eq. 3})$$

onde, w_{h1} e w_{h2} são as larguras dos picos a meia altura, com a largura medida em unidades de tempo. Quanto maior o valor de R_s , melhor será a separação entre picos de substâncias que eluem seguidamente.

O fator de separação, α , entre dois picos adjacentes é calculado pela razão entre k_2 (do soluto mais retido) e k_1 (do soluto menos retido) e deve ser sempre superior a 1.

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (\text{eq. 4})$$

A eficiência, medida pelo número de pratos teóricos, N , representa o número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, calculada por meio da equação:

$$N = 5,545 \left[\frac{t_r}{W_h} \right]^2 \text{ (eq. 5)}$$

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é elaborar um método para detecção de ácidos urônicos utilizando eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas de cobre para que possam ser empregados como detectores amperométricos em cromatografia líquida por troca aniônica. Para isto foi estudado comportamento eletroquímico desses ácidos na superfície do eletrodo quimicamente modificado com as nanopartículas de cobre em diversas técnicas voltamétricas, avaliando seu desempenho e estabilidade. Em seguida, este eletrodo foi utilizado como detector amperométrico em cromatografia líquida por troca aniônica e a aplicabilidade do método foi demonstrada pela análise desses ácidos contidos em amostras de bagaço da cana-de-açúcar, que dentro do contexto das biorrefinarias, podem ser utilizados para diversas aplicações industriais. Assim os objetivos de cada etapa deste trabalho foram:

- Desenvolvimento do eletrodo quimicamente modificados com nanopartículas de cobre (CuNP) para detecção dos ácidos urônicos;
- Estudar o comportamento eletroquímico, desempenho e estabilidade na oxidação dos ácidos urônicos na superfície do eletrodo de CuNP;
- Utilizar o eletrodo de CuNP como detector amperométrico pulsado em cromatográfica;
- Aplicar o método para detecção de ácidos urônicos presentes em amostras de bagaço da cana-de-açúcar.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da marca Autolab PGSTAT30, acoplado a um microcomputador que registra e armazena os dados obtidos, utilizando o software de controle GPES 4.9. Célula eletroquímica convencional com três eletrodos, sendo um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹); um eletrodo auxiliar de fio de platina e um eletrodo de carbono vítreo (GC) (d = 3,0 mm) como eletrodo de trabalho.

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados à temperatura ambiente e as leituras de varreduras de potencial foram feitas em triplicata para assegurar a sua reprodutibilidade.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo 850-Professional IC, Metrohm, injetor manual com um *loop* de 25µL, com detector amperométrico pulsado. O software interligado ao sistema é o MagicNet, versão 2.4.

A coluna cromatográfica de troca iônica utilizada foi da 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 quartenário altamente estável nos potenciais hidrogênioônicos de 0-14. A célula amperométrica é do tipo wall-jet. O detector eletroquímico é composto por: um eletrodo auxiliar de platina (Pt), paládio (Pd) como eletrodo de referência e o eletrodo modificado com CuNP como eletrodo de trabalho.

3.2 Pré-tratamento do eletrodo de carbono vítreo

Antes de cada medida experimental, o eletrodo de GC foi polido em feltro contendo suspensão aquosa de alumina de granulometria 0,3 µm. Após o polimento, o eletrodo foi lavado com água deionizada em abundância para a remoção de partículas adsorvidas em sua superfície. Em seguida, a fim de garantir uma total remoção das impurezas da superfície eletródica, foram feitas varreduras sucessivas com o eletrodo de carbono vítreo em solução de eletrólito suporte, KCl 1,0 mol L⁻¹, isto é, oxidando e reduzindo a superfície em velocidade de varredura de 300 mV s⁻¹

até que as impurezas adsorvidas fossem removidas do perfil do voltamograma cíclico obtido.

3.3 Reagentes e soluções para experimentos eletroquímicos

Para todos os experimentos eletroquímicos foram utilizados reagentes de pureza analítica adquiridos da Sigma-Aldrich, para a preparação das soluções foi utilizada água deionizada (MILLI-Q). As soluções dos ácidos D-glucurônico e D-galacturônico foram preparadas em meio alcalino ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH).

3.4 Eletrodeposição de cobre na superfície do GC.

Para a eletrodeposição das nanopartículas foi preparado 50 mL de uma solução de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de cobre II dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Utilizando cronoamperometria, aplicou-se potencial de $-0,40 \text{ V}$ por 120 s. Em seguida, o eletrodo foi seco com gás inerte, N_2 e submetido a varreduras cíclicas sucessivas em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH para passivação da superfície.

3.5 Caracterização morfológica do eletrodo modificado com CuNP

Para investigar a morfologia das nanopartículas eletrodepositadas na superfície do carbono vítreo foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio eletrônico de varredura de canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG), da marca Jeol, modelo-JSM-7500F. Também o espectro de energia dispersiva de raios X (EDX) foi empregado para analisar as espécies químicas presentes na superfície do eletrodo.

3.6 Caracterização por impedância eletroquímica

Para realização do estudo de impedância eletroquímica foi preparada uma solução de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, o potencial aplicado foi de $0,22 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, com frequência variando entre 10000 a $0,1 \text{ Hz}$ no eletrodo de carbono vítreo sem modificação e, em seguida modificado com as nanopartículas de cobre.

3.7 Estudo da estabilidade e comportamento eletroquímico dos ácidos urônicos em eletrodo modificado com CuNP

O estudo da estabilidade dos processos eletródicos foi realizado por voltametria cíclica na faixa de potencial de 0,2 a 0,75 V na velocidade de 50 mV s⁻¹ durante 100 ciclos para uma concentração de 1,0 mol L⁻¹ de ácido glucurônico. O eletrólito suporte utilizado foi 0,1 mol L⁻¹ de NaOH. O estudo do comportamento eletroquímico dos ácidos urônicos na superfície de CuNP também foi realizado por voltametria cíclica.

As técnicas de SWV e DPV foram estudadas para a determinação dos ácidos urônicos. As curvas analíticas para o ácido D-galacturônico e D-glucurônico foram construídas com a variação da corrente de pico em função da concentração do analito, através de adições sucessivas de soluções padrão.

3.8 Reagentes e soluções para experimentos cromatográficos

As soluções preparadas para a fase móvel e para as soluções padrões são de pureza analítica adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.9 Preparo da amostra para separação cromatográfica

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido 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.¹

Primeiramente o bagaço *in natura* foi colocado 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 (*overnight*), 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 é interrompida com a adição de 85 mL de água destilada. Para a completa hidrólise dos oligômeros restantes, o frasco é fechado e autoclavado por 60 minutos a 1,05 bar. Após a descompressão da

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

3.10 Condições para separação cromatográfica

A separação dos ácidos urônicos foi realizada isocraticamente em solução contendo 0,1 mol L^{-1} de NaOH e 0,28 mol L^{-1} de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ no fluxo de 1,0 mL min^{-1} durante 15 min. Para a detecção amperométrica pulsada foram utilizados três potenciais, E_1 , E_2 e E_3 , sendo o potencial de oxidação E_1 de 0,45 V, E_2 e E_3 os potencial de limpeza da superfície do eletrodo e iguais a 0,60 e -0,05 V.

3.11 Interferentes presentes na amostra

Foi prepara uma solução padrão de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} contendo D-(+)-glicose, D-(+)-xilose, D-(+)-manose, D(-) arabinose, D-glucurônico e D-galacturônico e submetida à corrida cromatográfica

3.12 Curvas analíticas e método de adição de padrão

As curvas analíticas para o ácido D-galacturônico e D-glucurônico foram construídas com a variação da área do pico cromatográfico em função da concentração do analito, através de adições sucessivas de soluções padrão.

O método de adição padrão foi utilizado para determinar as concentrações de ácidos urônicos presentes na amostra adicionando quantidades conhecidas de cada ácido na amostra e relacionando as quantidades adicionadas na amostra com as respectivas áreas obtidas.

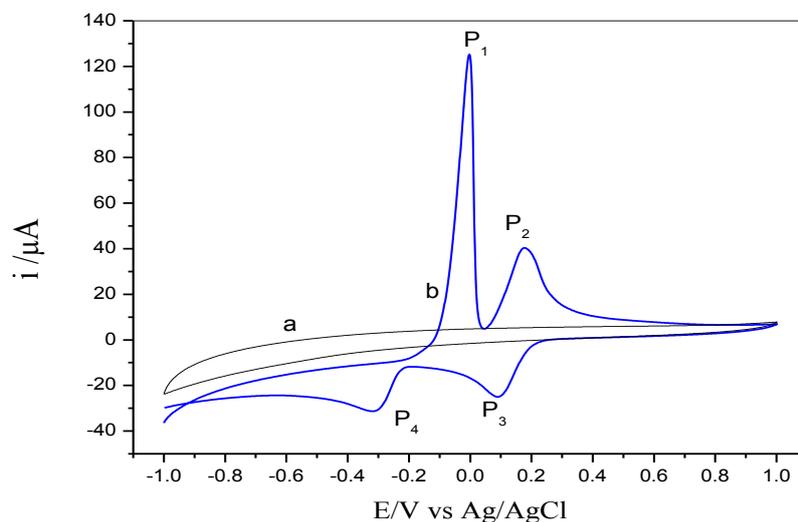
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento eletroquímico do cobre em eletrodo de GC

Inicialmente foi realizado o estudo do comportamento de íons cobre na superfície do eletrodo de GC. O eletrodo foi colocado em solução contendo $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), eletrólito suporte $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e submetido a uma varredura cíclica na faixa entre $-1,0$ e $1,0 \text{ V}$, na velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

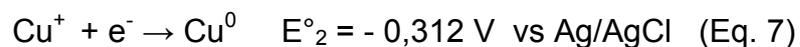
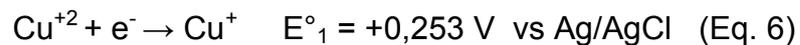
Como se pode ver na Figura 9, no intervalo de potencial estudado, o voltamograma obtido apresenta quatro picos, que para facilitar a identificação foram numerados como P_1 , P_2 , P_3 e P_4 . Os picos P_1 e P_2 surgem à medida que o potencial é deslocado para regiões anódicas, correspondendo assim as oxidações de: Cu^0 a Cu^{1+} e de Cu^{1+} a Cu^{2+} . Já os picos P_3 e P_4 surgem à medida que o potencial aplicado é deslocado para regiões catódicas, correspondendo assim aos picos referentes a processos de redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} e Cu^{1+} a Cu^0 .

Figura 9 - Voltamograma cíclica de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl em eletrodo de carbono vítreo na ausência (a) e na presença de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CuCl_2 (b), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A análise da Figura 9 nos mostra uma alta intensidade da corrente de pico anódico em relação a corrente de pico catódico para o $\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^0$. Isso se deve a um processo característico de redissolução anódica que se origina a partir da rápida reoxidação do cobre metálico que é depositado sobre a superfície do eletrodo durante a redução de $\text{Cu(I)}/\text{Cu(0)}$.

Para o sal de cloreto de cobre a literatura relata processos eletroquímicos envolvendo um mecanismo caracterizado pela transferência consecutiva de elétrons em etapas elementares (Mecanismo EE – transferência consecutiva de elétrons em etapas elementares). Em meio aquoso pode ocorrer a redução dos íons Cu(II) em Cu(0) em um processo envolvendo dois elétrons. Porém essa transferência ocorre em duas etapas consecutivas, sendo cada elétron transferido em uma etapa elementar caracterizada por seu potencial padrão.⁴⁷

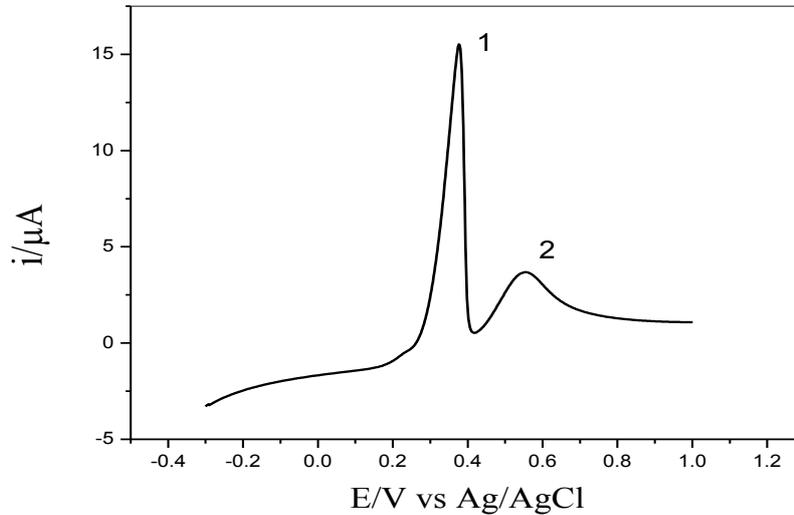


Assim, como podemos observar, o Cu^{2+} sofre redução no potencial de aproximadamente 0,20 V para Cu^{1+} que em - 0,27 V é reduzido a Cu^0 . Com isso podemos esperar que o potencial de eletrodeposição potencioestática de cobre na superfície do GC seja inferior a - 0,27 V.

4.2 Eletrodeposição de nanopartículas de cobre em eletrodo de GC

A eletrodeposição potencioestática de nanopartículas de cobre sobre a superfície do GC foi estudo por voltametria de varredura linear em solução contendo $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A Figura 10 mostra a oxidação do cobre nas espécies, Cu^{1+} e Cu^{2+} , sobre a superfície do eletrodo de GC variando o potencial de -0,3 a 1,0 V. Podemos observar que a oxidação do cobre inicia em + 0,3 V formando o Cu^{1+} (pico 1), que se oxida em 0,55 V para formação do Cu^{2+} (pico 2).

Figura 10 - Voltamograma linear de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em eletrodo de carbono vítreo, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

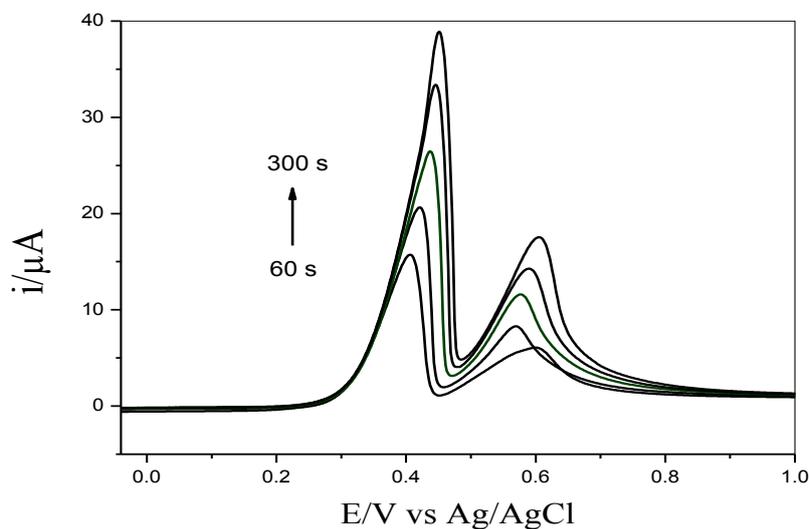


Nesta solução foi analisada uma série de parâmetros que afetam o tamanho e a forma das nanopartículas, tais como: o tempo de eletrodeposição, a concentração de cloreto de cobre e o potencial aplicado afim de obter partículas uniformes e menores que 100 nm de diâmetro.

Para dar início ao processo de otimização, o tempo de acúmulo de íons cobre na superfície do GC foi estudado nos tempos de 60, 120, 180, 240 e 300 s com potencial constante de -0,4 V.

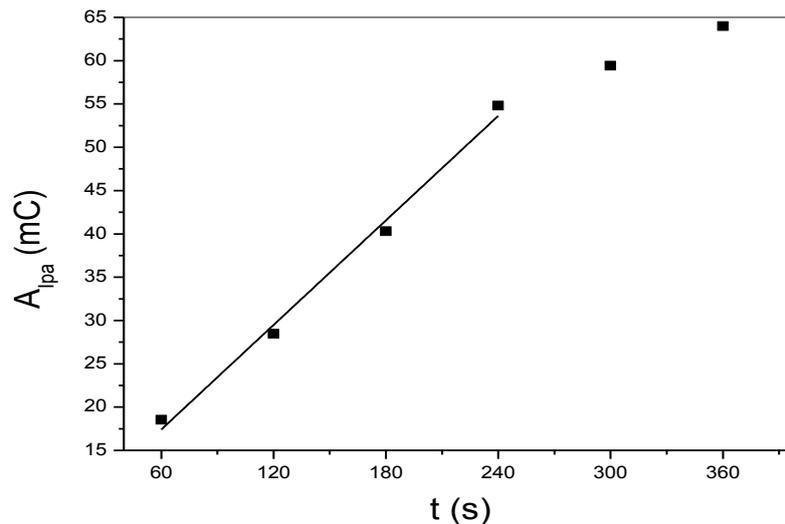
A Figura 11 mostra os voltamogramas de redissolução anódica por voltametria de varredura linear do cobre eletrodepositado em diferentes tempos.

Figura 11 - Estudo do tempo deposição de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CuCl_2 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl em eletrodo de carbono vítreo com potencial de acúmulo de -0,4 V, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A relação do tempo de eletrodeposição em função da área do pico de corrente anódica (A_{Ipa}), Figura 12, apresentou $r = 0,998$. Para encontrar a A_{Ipa} subtraiu-se a área encontrada para cada tempo pela área do branco mostrada na Figura 10.

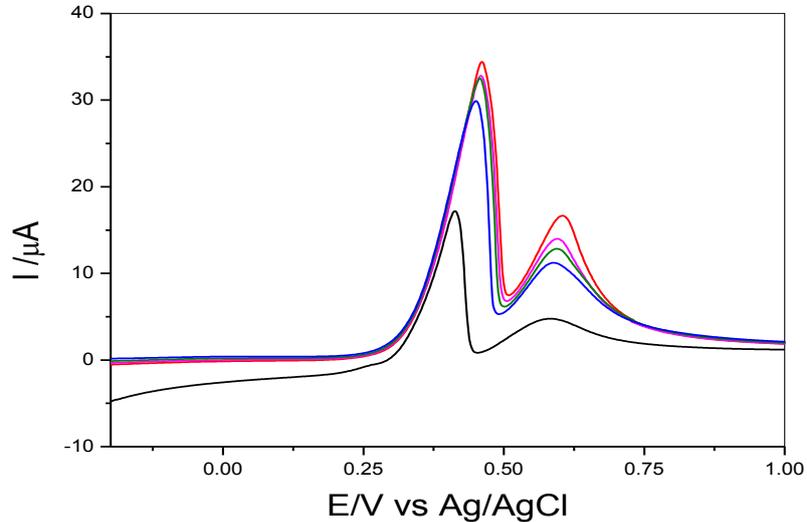
Figura 12 - Efeito do tempo de acúmulo na área do pico para a formação de CuNP em eletrodo de carbono vítreo com potencial de acúmulo de $-0,4V$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



O estudo do tempo de acúmulo começou com 60 s, pois em tempos inferiores a este o cobre não reveste satisfatoriamente a superfície do eletrodo, ocasionando um número insuficiente de sítios ativos.⁴⁷ Com o aumento do tempo de eletrodeposição o cobre pode aglomerar e formar filmes, perdendo assim a característica de nanomaterial. O tempo de deposição apropriado seria então aquele dentro da faixa linear do gráfico, ou seja, entre 60 e 240 s. Como em 60 s a literatura relata pouca cobertura da superfície do carbono vítreo e em 180 s foi observado por microscopia eletrônica de varredura aglomeração das nanopartículas, o tempo de 120 s foi escolhido como apropriado para a eletrodeposição.

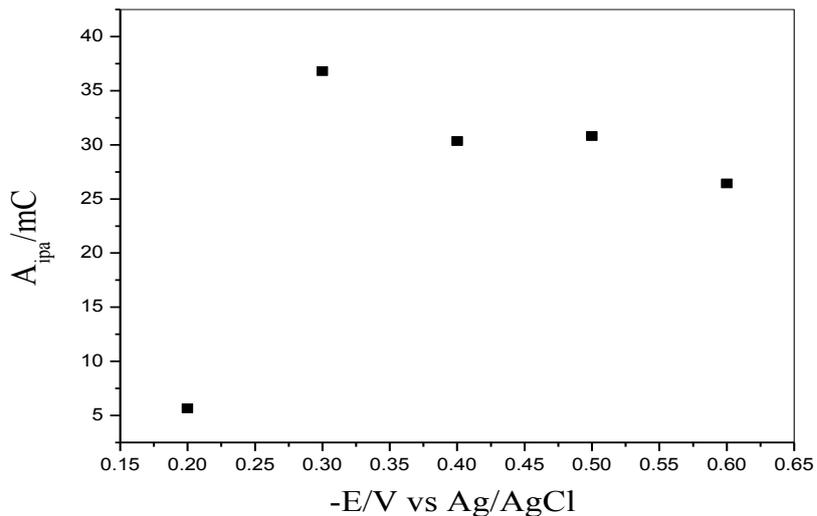
A Figura 9 demonstra que a deposição de cobre deve ocorrer em potenciais menores que $-0,27 \text{ V}$. Quanto mais negativo for o potencial, mais rápido será a taxa de filme de cobre eletrodepositada. O potencial de acúmulo foi então investigado entre $-0,2V$ e $-0,6 \text{ V}$. A Figura 13 ilustra os voltamogramas de redissolução anódica por voltametria de varredura linear nesses diferentes potenciais.

Figura 13 - Voltamogramas de redissolução anódica por voltametria de varredura linear em diferentes potenciais de eletrodeposição (●) -0,2 V, (●) -0,3 V, (●) -0,4V, (●) -0,5 V e (●) -0,6 V, de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na superfície do GC com tempo de acúmulo de 120 s, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



A eletrodeposição do metal foi mais acentuada entre -0,3 V e -0,5 V como é mostrado na curva do potencial de eletrodeposição em função da área do pico de corrente anódica (A_{ipa}), ilustrado na Figura 14.

Figura 14 - Estudo da variação do potencial aplicado na eletrodeposição de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre em eletrodo de carbono vítreo com tempo de acúmulo de 120 s, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

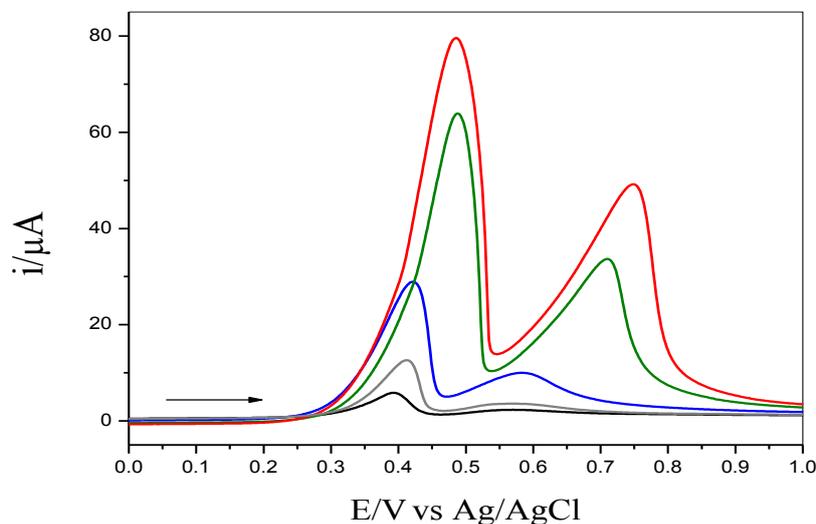


Observando o gráfico de potencial de acúmulo pela área do pico, podemos observar que em potenciais menores que -0,4 V há um decréscimo da corrente o

que pode indicar que capacidade catalítica é reduzida lentamente, sendo então o potencial de -0,4 V escolhido como o mais adequado para a deposição de cobre.

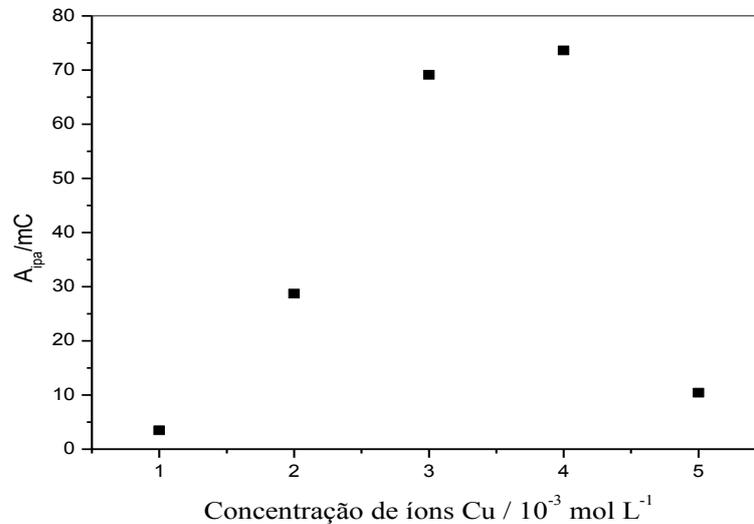
O efeito da concentração de íons Cu^{2+} para a formação das nanopartículas de cobre foi estudada variando a concentração de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ entre $1,0$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 15 demonstra os voltamogramas de varredura linear nessas diferentes concentrações.

Figura 15 - Estudo de variações de concentração de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (●)1, (●)2, (●)3, (●)4 e (●) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodo de CV com $E = -0,4 \text{ V}$ e tempo de acúmulo de 120 s, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Com o aumento da concentração de íons Cu^{2+} a área dos picos também aumentou até a concentração de $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A partir desta concentração é possível observar pela Figura 16 o decréscimo na área do pico indicando que a superfície do eletrodo já está totalmente revestida por cobre. Assim, foi escolhido a concentração de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para a eletrodeposição das CuNP.

Figura 16 - Comportamento da concentração de íons Cu^{2+} em função área do pico de corrente anódica (A_{ipa}) em $E = -0.4 \text{ V}$, tempo de acúmulo de 120 s, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

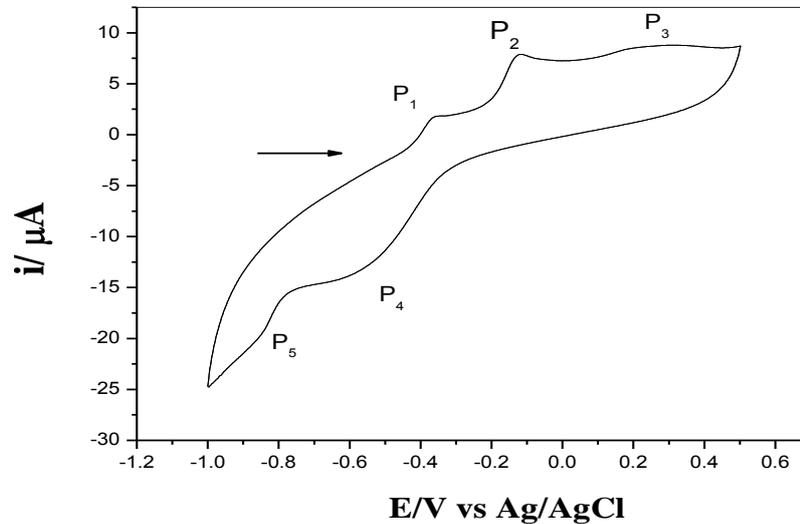


Assim, as melhores condições para a eletrodeposição foram: solução de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no potencial de $-0,4 \text{ V}$ por 120 s.

Como o objetivo do trabalho é o desenvolvimento de um eletrodo modificado com nanopartículas de cobre, nas suas várias espécies oxidadas (CuO , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuOH}$, Cu_2O), após escolher a melhor condição para que a superfície do GC seja revestida uniformemente por nanopartículas deste material, o eletrodo passou por sucessivos voltamogramas cíclicos em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH .

A Figura 17 ilustra o voltamograma cíclico das CuNP em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH . Podemos observar que há três picos anódicos e dois picos catódicos no intervalo de potencial de -1.0 V a 0.5 V . Os picos P_1 , P_2 e P_3 são atribuídos a oxidação do Cu^0 em Cu_2O e $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuOH}$ e deste para CuO , respectivamente. Os picos P_4 e P_5 demonstram a redução do CuO para $\text{CuOH}/\text{Cu}_2\text{O}$ e Cu_2O .

Figura 17 - Voltamograma cíclico do eletrodo de CuNP/CV em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH, $\nu = 50$ mV s⁻¹.

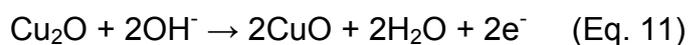
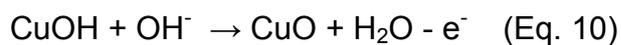


O possível mecanismo envolvido nas diferentes etapas do processo redox na superfície do eletrodo pode ser expresso pelas seguintes equações:

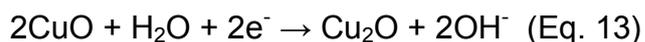
Pico P₁



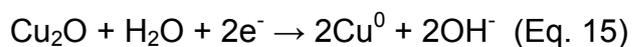
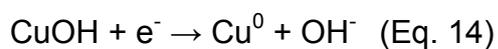
Pico P₂/P₃



Pico P₄

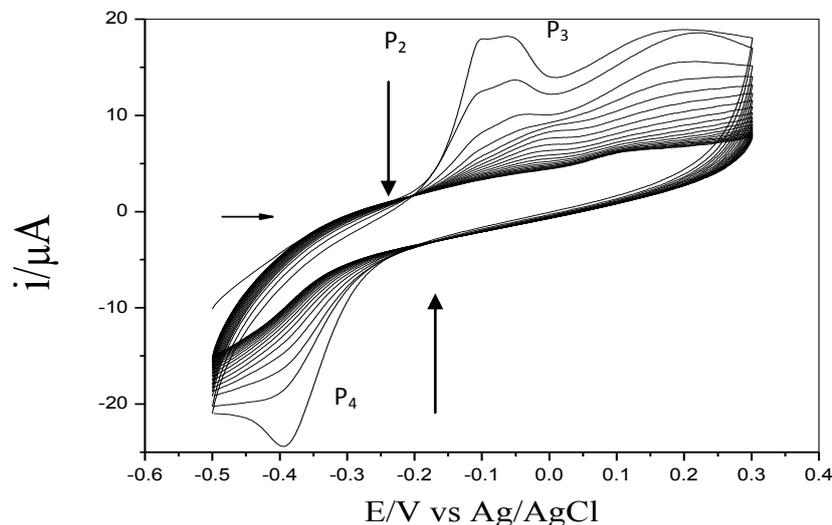


Pico P₅



A Figura 18 mostra os voltamogramas cíclicos sucessivos da eletrodeposição de óxido de cobre na superfície do GC em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Em comparação com a Figura 17 foi possível observar o desaparecimento do pico P_1 e P_5 e com isso verificar que são par redox correspondentes. Com o processo de varredura no potencial de formação dos óxidos de cobre, $-0,5$ a $+0,3$ V, observou-se que a corrente diminuiu, indicando que os óxidos de cobre foram depositados com sucesso na superfície do eletrodo. O número de ciclos necessários para a estabilização da corrente foi de 20 ciclos. Após isso, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com gás inerte, N_2 .

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos sucessivos de nanopartículas de cobre em superfície de carbono vítreo em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



4.3 Caracterização do eletrodo modificado com as CuNP

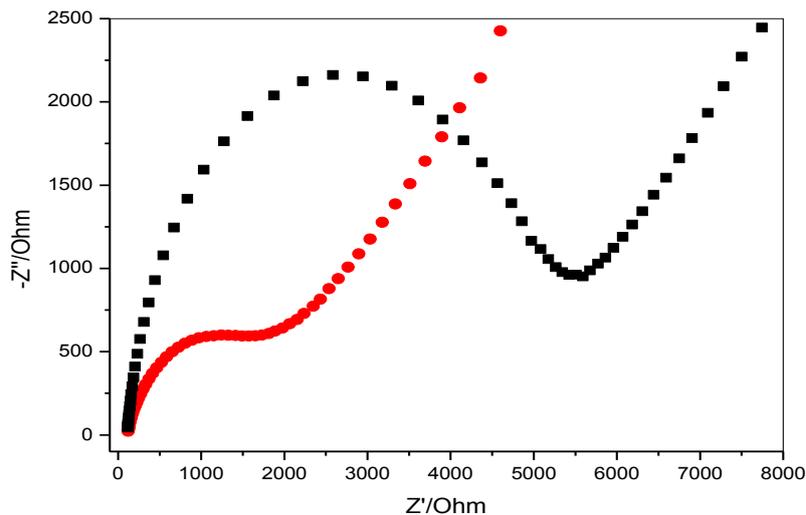
4.3.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, EIS

O EIS é uma ferramenta poderosa para estudar as propriedades da interface de eletrodos de superfície modificada. Os gráficos de Nyquist incluem uma parte semicircular e uma porção linear: a porção semicircular corresponde a frequências mais elevadas para o processo de transferência eletrônica limitada, e a parte linear corresponde a frequências mais baixas para o processo de difusão.⁴⁸

Para realização do estudo foi preparada uma solução de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, potencial aplicado de $0,22 \text{ V vs Ag/AgCl}$, com as frequências variando

entre 10000 a 0,1 Hz. A Figura 19 mostra respectivamente os gráficos de Nyquist para eletrodo de GC sem modificação e modificado com CuNP.

Figura 19 - Gráfico de Nyquist para o eletrodo de GC sem modificação (▪) e modificado com as nanopartículas de cobre (●) em solução de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, potencial de 0,22 V.



Analisando os estudos de impedância é possível observar que o eletrodo modificado apresentou menor resistência de transferência de carga (R_{ct}), indicando que o processo é facilitado. A R_{ct} para o eletrodo modificado com as CuNP foi de 2048,18 Ohm e para o eletrodo de GC de 4913,18 Ohm. Isso pode ser devido ao fato de que com a adição das nanopartículas de cobre a R_{ct} diminui mostrando que a reação eletroquímica acontece com maior velocidade do que no eletrodo de GC. A diminuição da resistência pode ser atribuída ao aumento da área superficial causada pelas nanopartículas eletrodepositadas na superfície do eletrodo.

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para investigar a morfologia das nanopartículas eletrodepositadas na superfície do GC foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens da superfície do eletrodo de carbono vítreo sem modificação e com eletrodeposição das CuNP são mostradas na Figura 20. A superfície modificada mostra uma película uniformemente distribuída sobre o eletrodo de GC, como pode ser observado nas imagens ampliadas de 1000 e 5000 vezes. O tamanho médio de cada partícula está

na ordem de 100 nm. A Figura 21 mostra o espectro de energia dispersiva de raios X (EDX), comprovando que a superfície de GC contém apenas cobre e oxigênio, confirmando assim a pureza das CuNP.

Figura 20 - MEV da superfície do eletrodo a) GC sem modificação, b) imagem de uma nanopartícula de cobre oxidada, ampliação de 150 000 vezes, c) e d) superfície modificada com as CuNP, ampliação de 1000 e 5000 vezes, respectivamente.

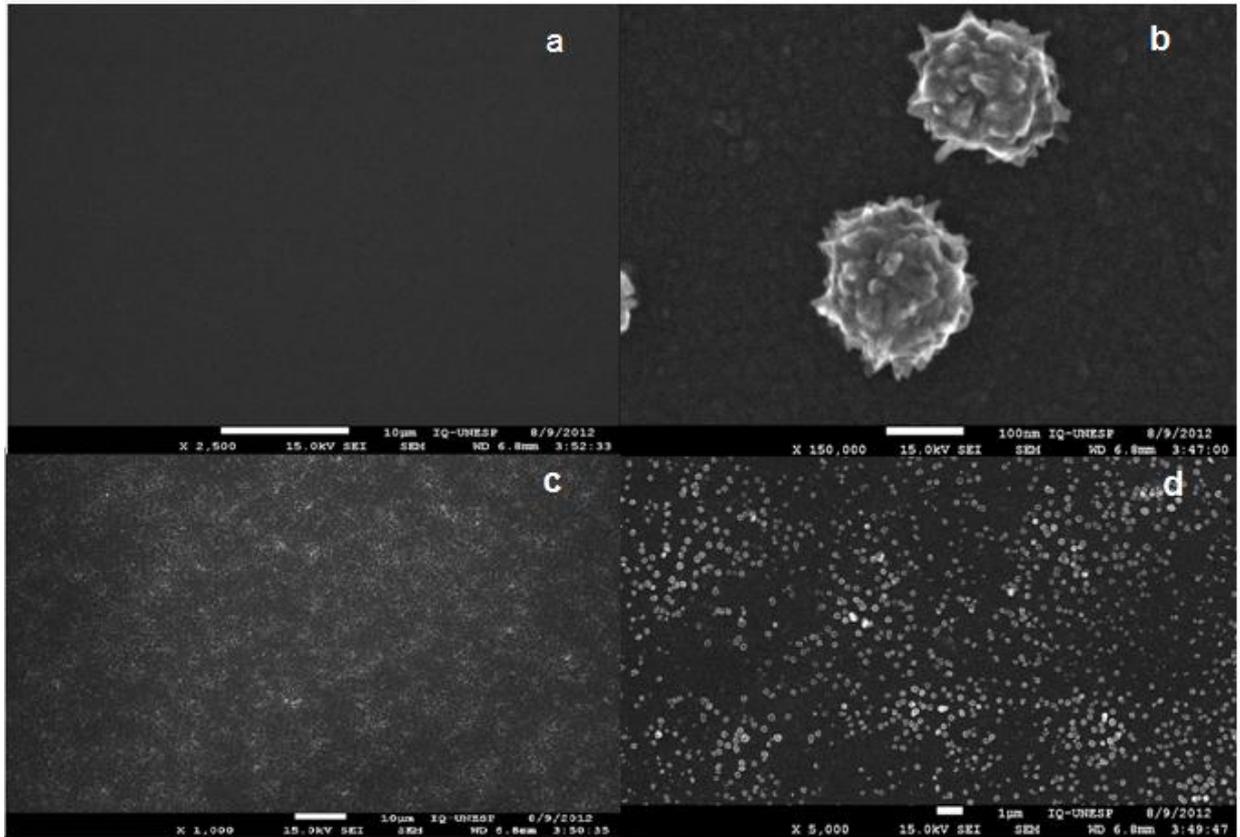
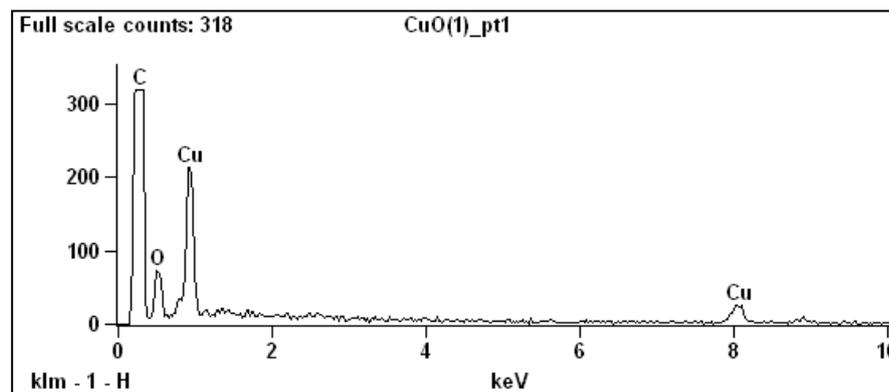


Figura 21 - Respeetivo espectro de EDX das nanopartículas eletrodepositadas sobre carbono vítreo a partir da solução de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CuCl_2 , no potencial de $-0,4 \text{ V}$ por 120s.

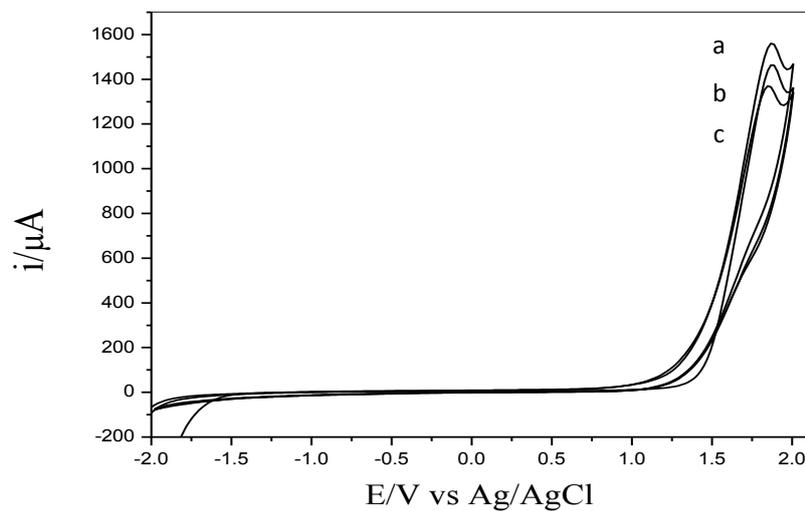


As nanopartículas possuem maior área de contato com o analito o que induz a uma alta atividade de reação em sua superfície. Isso irá ajudar a melhorar a estabilidade e detectabilidade do eletrodo.⁴⁷

4.4 Comportamento eletroquímico dos ácidos urônicos em GC e em CuNP

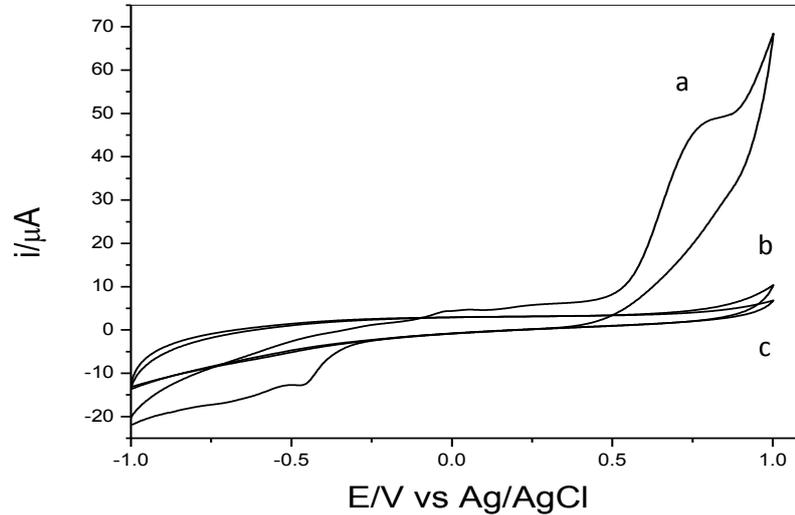
Os ácidos urônicos não apresentam corrente significativa em carbono vítreo não modificado.¹⁴ Na Figura 22 podemos observar a ausência de picos referente à oxidação dos ácidos D-galacturônico e D-glucurônico.

Figura 22 - Voltamograma cíclico de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico (a) e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de D-glucurônico (b) na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH como eletrólito suporte (c), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Quando o eletrodo de GC é modificado com as nanopartículas de cobre podemos observar o pico referente à oxidação dos ácidos. O voltamograma da Figura 23 demonstra a presença do pico de oxidação do ácido D-glucurônico no eletrodo modificado com CuNP.

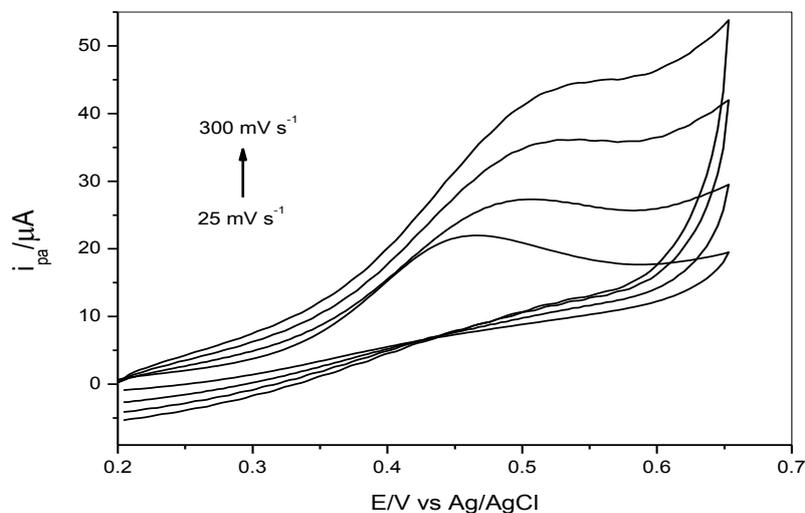
Figura 23 - Voltamograma cíclico de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico na presença (a) e na ausência (b) de eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Em (c), voltamograma somente do eletrólito suporte em eletrodo sem modificação, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Como a voltametria cíclica é uma importante ferramenta para o estudo mecanístico e cinético de reações redox que ocorrem na superfície eletródica, utilizou-se desta técnica para caracterizar eletroquimicamente o eletrodo de CuNP em solução contendo os analitos.

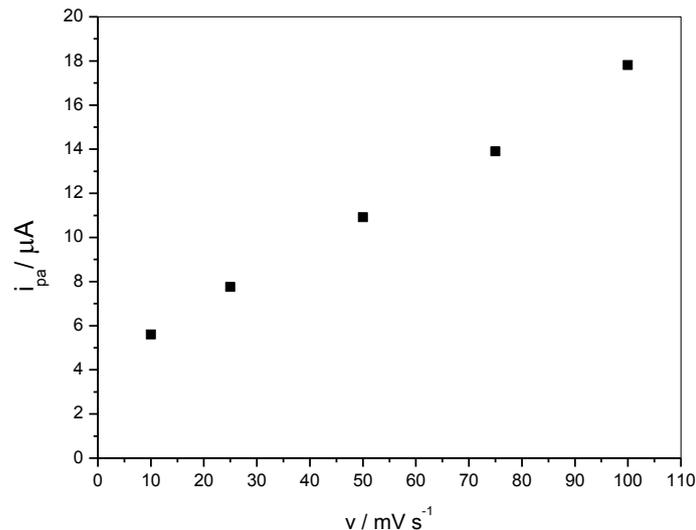
A Figura 24 mostra os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico.

Figura 24 - Voltamograma cíclico em diferentes velocidades de varredura para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH.



A corrente de pico anódica apresentou dependência linear com a velocidade de varredura no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} (Figura 25), este comportamento é indicativo que o processo é controlado pela adsorção.²⁴

Figura 25 - Corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura para $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de ácido D-galacturônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em eletrodo de CuNP.



Para analisar se o sistema tende a irreversibilidade, parâmetros tais como: potencial de pico anódico (E_{pa}) e potencial à metade da corrente de pico ($E_{pa}/2$) foram avaliados (Tabela 02).

Os sistemas irreversíveis são caracterizados por apresentar corrente controlada pela transferência de carga. Nesse tipo de sistema, a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura (v) e não há pico na região inversa do potencial aplicado.

Nessas condições, a equação de Randles-Sevcik descreve como a corrente de pico (Equação 16)²⁴ é afetada pelo coeficiente de transferência (α).

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n)^{1/2} A D_o^{1/2} C_o v^{1/2} \quad (\text{Eq. 16})$$

onde,

n é o número de elétrons transferidos até o passo determinante da velocidade

A é a área do eletrodo (cm^2)

C_o é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3})

D_o é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

v é a velocidade de varredura (V s^{-1})

α é o coeficiente de transferência

Para esses sistemas, temos:

$$|E_p - E_{p/2}| = 47,7/\alpha n \text{ (Eq. 17)}$$

onde,

$E_{p/2}$ é o valor do potencial determinado à metade do valor da corrente de pico (i_p)

Portanto, a partir dos dados da Tabela 2, o valor de αn para o sistema analisado na velocidade 50 mV s^{-1} é de 0,72.

Tabela 2 - Parâmetros ciclovoltagemétricos da oxidação de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-galacturônico em meio alcalino.

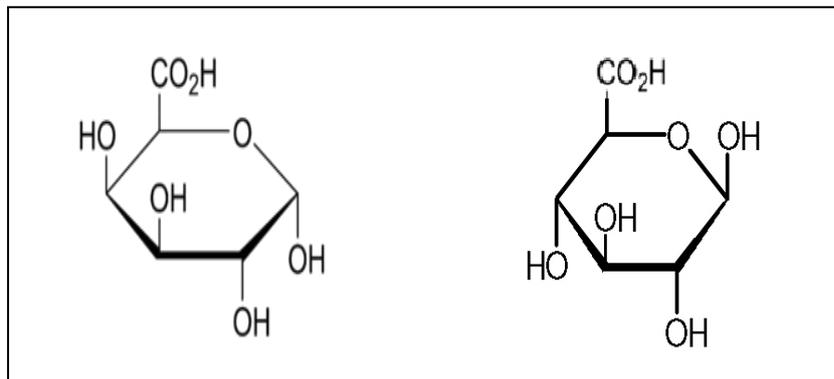
Velocidade/ mV s^{-1}	E_{pa}/V	$E_{pa} - E_{p/2}/\text{V}$
25	4,52	0,0633
50	4,59	0,0662
75	4,76	0,0637
100	4,80	0,0729
125	4,84	0,0708
150	4,85	0,0842
175	4,88	0,0711
200	4,92	0,0693
250	4,93	0,0641
300	4,95	0,0595

Nesses sistemas costuma-se observar apenas o pico anódico, conforme observado na Figura 24. Esse pico tende a deslocar-se com o aumento da velocidade de varredura, como é observado na Tabela 2. É importante ressaltar que ele é afetado pelo o coeficiente de transferência anódica (α) e pela velocidade de transferência de carga (k_s). Assim, o sistema tende a irreversibilidade.

4.5 Eletrooxidação dos ácidos urônicos em eletrodo modificado com CuNP

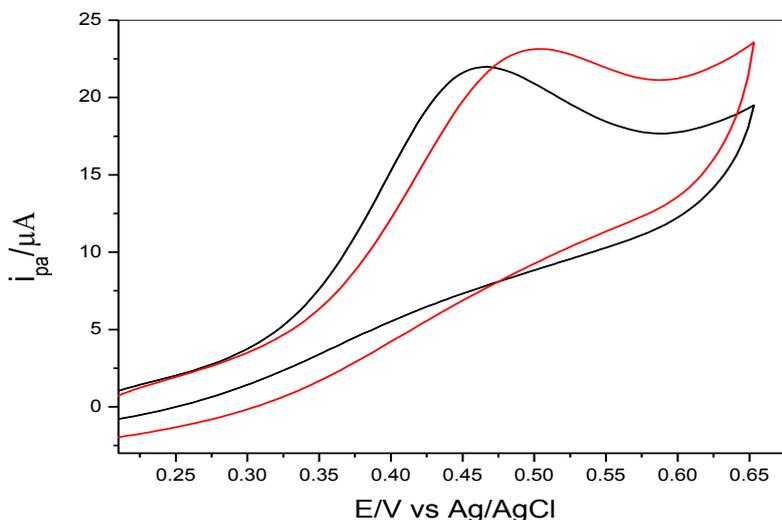
Os ácidos urônicos estudados, D-galacturônico e D-glucurônico, possuem forma estrutural semelhante à glicose, porém no sexto átomo de carbono eles possuem um grupo carboxila e não uma hidroxila.

Figura 26 - Estrutura do ácido D-galacturônico e D-glucurônico, respectivamente.



Como observado na Figura 26, o ácido D-galacturônico e D-glucurônico são estereoisômeros, pois apresentam a mesma conectividade, mas conformidade espacial diferente. Com isso, pode-se esperar um comportamento eletroquímico semelhante. Isto pode ser comprovado ao analisar o potencial de oxidação no eletrodo de CuNP utilizando voltametria cíclica. O ácido D-galacturônico oxida no potencial de 0,45 V e o D-glucurônico no potencial de 0,48 V, na velocidade de 50 mV s⁻¹ (Figura 27)

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos de 0,2 a 0,65 V para $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-galacturônico (●) e ácido D-glucurônico (●) na presença de 0,1 mol L⁻¹ NaOH para CuNP, $\nu = 50$ mV s⁻¹.

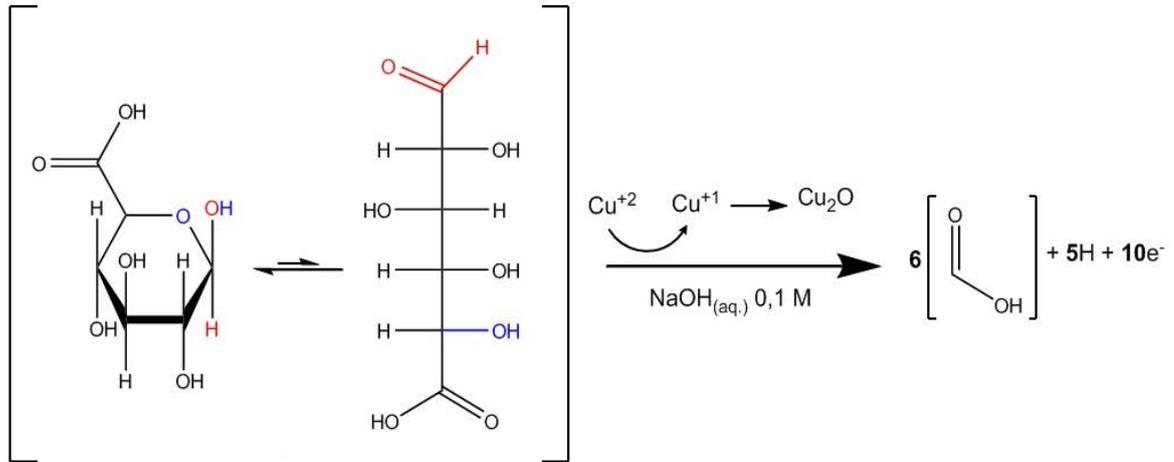


Por apresentarem comportamento eletroquímico semelhante os processos de otimização dos parâmetros voltamétricos foram realizados somente com um analito, no caso escolheu-se o ácido D-glucurônico. Posteriormente, nas melhores condições, ambos foram analisados.

A literatura relata que para a oxidação do ácido D-galacturônico utilizando vanádio (V) há geração de ácido fórmico.⁴⁹ Da mesma forma espera-se que a oxidação eletroquímica tanto do ácido D-galacturônico como do D-glucurônico catalisada pelo óxido de cobre, também ocorra a formação de ácido fórmico.

Na Figura 28 é demonstrado um possível mecanismo para a oxidação dos ácidos urônicos. Devido ao equilíbrio da molécula do ácido D-glucurônico em solução aquosa, no momento em que o anel se encontra aberto as ligações C-C são quebradas gerando cinco moléculas de formaldeído e uma molécula de ácido fórmico. Posteriormente as moléculas de formaldeído são oxidadas para ácido fórmico devido à redução do cobre (II) para cobre (I) em meio alcalino (0,1 mol L⁻¹ NaOH) na superfície do eletrodo. Segundo Baldwin et al¹⁴, o número de elétrons transferidos na completa oxidação do ácido D-glucurônico utilizando eletrodo modificado com cobre (filme de cobre), são de 10 elétrons.

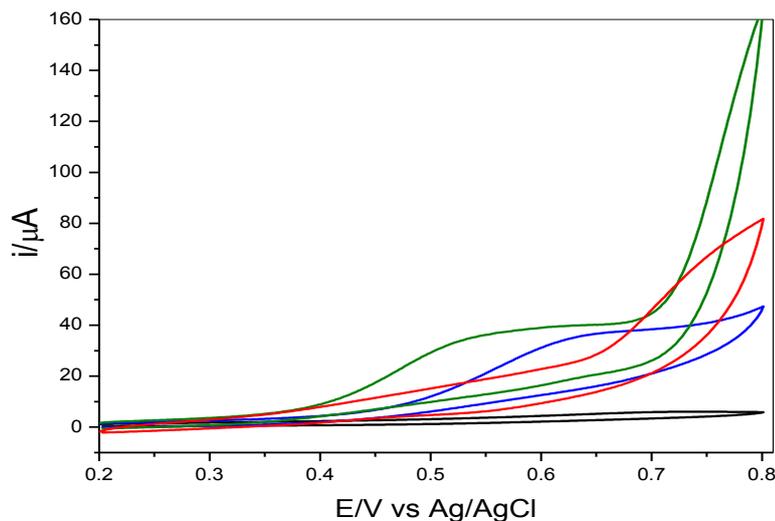
Figura 28 - Mecanismo proposto para a oxidação do ácido D-glucurônico utilizando eletrodo de CuNP.



4.6 Influência da concentração do eletrólito suporte

De modo a otimizar a resposta do eletrodo de CuNP para detecção dos ácidos urônicos, foi investigado o comportamento da oxidação desses ácidos sobre o efeito da variação do pH.

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos de eletrodo de CuNP em diferentes concentrações de solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (●), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (●), $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (●) e $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (●) para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Analisando os voltamogramas cíclicos da Figura 29 é possível observar que a concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH apresentou melhor comportamento

voltamétrico e assim, foi o escolhido como eletrólito suporte utilizado durante o estudo.

4.7 Estabilidade da corrente de pico

A fim de se verificar a estabilidade dos processos eletródicos, foi realizado o estudo de varreduras sucessivas de potencial na faixa de 0,2 a 0,75 V com velocidade de 50 mV s^{-1} para solução de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em eletrólito suporte de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. A Figura 30 mostra os voltamogramas após 100 varreduras. A relação da corrente de pico com o aumento do número de varreduras em três diferentes eletrodos foi estudada e apresentada na Figura 31. Com esses resultados é possível concluir que em média a corrente caiu aproximadamente 25% após os 100 ciclos para cada um dos eletrodos estudados.

Figura 30 - Voltamograma cíclico mostrando a variação da corrente de pico da CuNP em função do número de varreduras sucessivas em solução alcalina de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

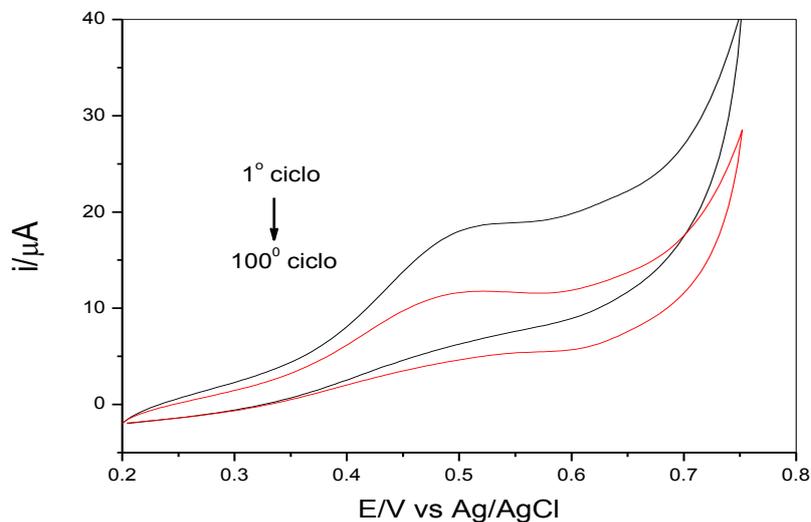
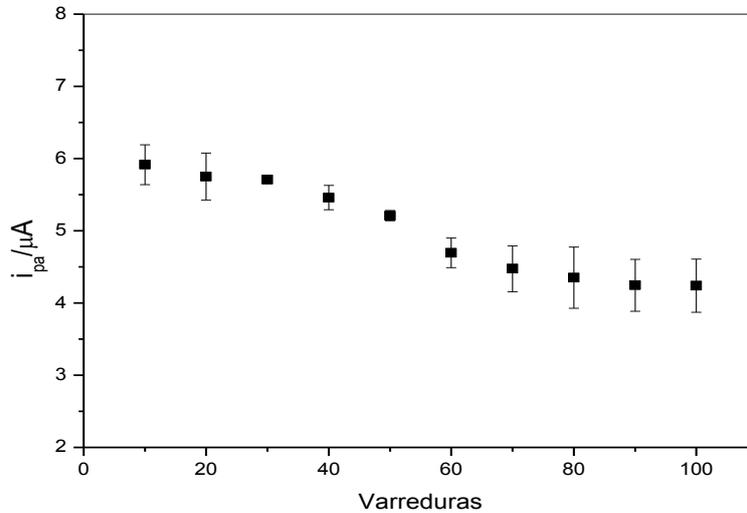


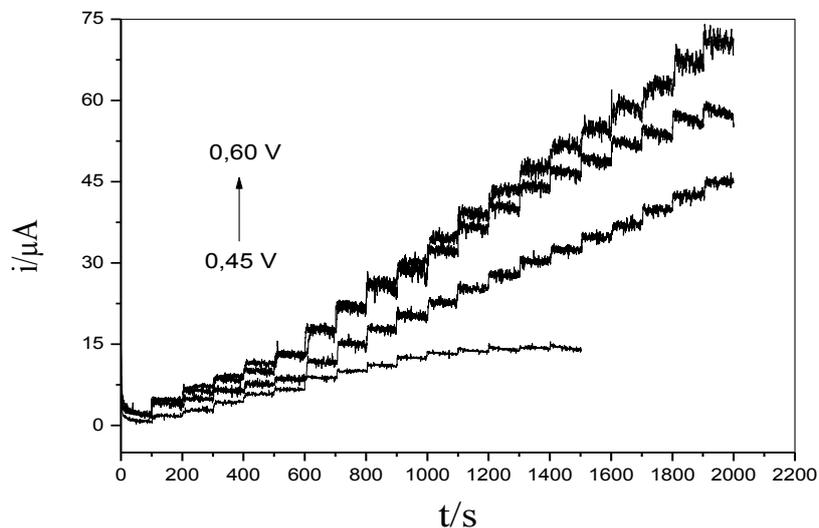
Figura 31 - Variação da corrente de pico anódico em função do número de varreduras sucessivas para três diferentes eletrodos em solução alcalina de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



4.8 Determinação cronamperométrica dos ácidos urônicos em CuNP

Foram realizadas determinações seguindo a variação da corrente com o tempo (cronamperometria) em diferentes potenciais, 0,45, 0,50, 0,55, e 0,60 V em solução de ácido D-glucurônico. A Figura 32 mostra a resposta do eletrodo de CuNP com adições sucessivas de $2 \mu\text{L}$ de solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em eletrólito suporte de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH sob agitação, para cada um dos potenciais analisados. Perfis semelhantes também foram encontrados para o ácido D-galacturônico.

Figura 32 - Resposta cronamperométrica de sucessivas adições de $2,0 \mu\text{L}$ de solução alcalina de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico nos potenciais de 0,45, 0,50, 0,55 e 0,60 V, para o eletrodo de CuNP em diferentes potenciais.



Os parâmetros analíticos apresentados na Tabela 03 e 04 e os demais que serão analisados no decorrer deste trabalho seguem o guia da Comissão Técnica de Laboratórios de Ensaio – Química (CTLE-05) do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial-Inmetro.⁵⁰

A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

A sensibilidade amperométrica (S_a) é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico e pode ser expresso como:

$$S_a = \frac{dx}{dy} \quad (\text{Eq 18})$$

S_a = sensibilidade amperométrica

dx = variação da resposta;

dy = variação da concentração.

O Limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas: É expresso como:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{S_a} \quad (\text{Eq.19})$$

S_b = desvio padrão do branco

S_a = sensibilidade amperométrica

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Expresso como:

$$LOQ = \frac{10 \times S_b}{S_a} \text{ (Eq. 20)}$$

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é usualmente requerido.

Tabela 3 - Parâmetro analisados da resposta cronoamperometrica do ácido D-glucurônico para diferentes potenciais.

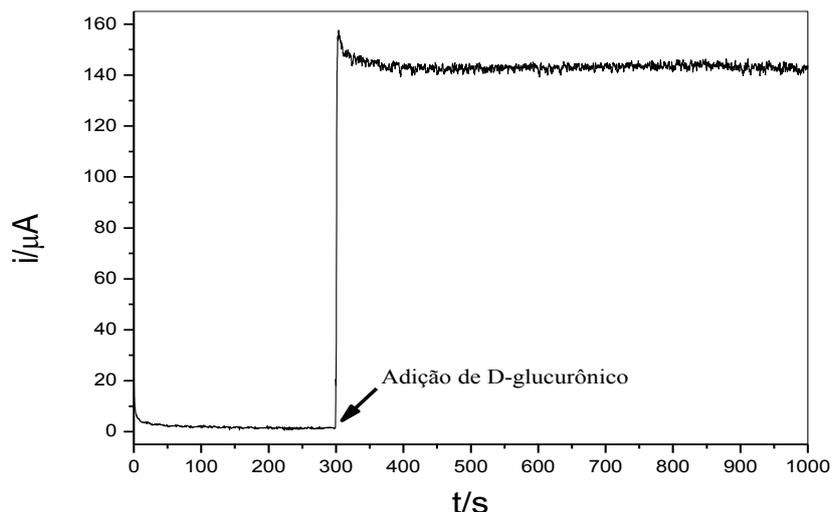
Potencial (V)	Faixa linear/ mol L ⁻¹	LOD/ mol L ⁻¹	LOQ/ mol L ⁻¹	Sa/ μA L mol ⁻¹	r
0,45	2,0x10 ⁻⁵ a 4,5x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁵	6,5 x10 ⁻⁵	2,7x10 ⁴	0,997
0,50	8,0x10 ⁻⁵ a 8,0x10 ⁻⁴	3,2x10 ⁻⁵	1,1 x10 ⁻⁴	5,1x10 ⁴	0,999
0,55	2,0x10 ⁻⁵ a 2,0x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁵	6,0 x10 ⁻⁵	9,6x10 ⁴	0,997
0,60	1,0x10 ⁻⁴ a 8,0x10 ⁻⁴	2,3x10 ⁻⁵	7,8x10 ⁻⁵	8,2x10 ⁴	0,998

Tabela 04 - Parâmetro analisados da resposta cronoamperometrica do ácido D-galacturônico para diferentes potenciais.

Potencial (V)	Faixa linear/ mol L ⁻¹	LOD/ mol L ⁻¹	LOQ/ mol L ⁻¹	Sa/μA L mol ⁻¹	r
0,45	2,0x10 ⁻⁵ a 5,0x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁵	7,0 x10 ⁻⁵	2,8x10 ⁴	0,997
0,50	8,0x10 ⁻⁵ a 8,0x10 ⁻⁴	2,9x10 ⁻⁵	1,2 x10 ⁻⁴	5,8x10 ⁴	0,999
0,55	2,0x10 ⁻⁵ a 2,0x10 ⁻⁴	2,0x10 ⁻⁵	5,3 x10 ⁻⁵	9,3x10 ⁴	0,997
0,60	1,0x10 ⁻⁴ a 8,0x10 ⁻⁴	1,9x10 ⁻⁵	7,9x10 ⁻⁵	8,0x10 ⁴	0,998

O potencial de 0,55 V apresentou o menor limite de detecção e quantificação e maior sensibilidade amperométrica assim, foi o potencial escolhido para o estudo da estabilidade da corrente em CuNP demonstrada na Figura 33.

Figura 33 - Resposta cronoamperometria para $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico em meio alcalino durante o período de 1000 s, potencial de 0,55 V.



Foi esperado um tempo de 300 s para a estabilização da corrente em solução contendo o eletrólito suporte. Após 300 s foi adicionada uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico. O tempo de resposta entre a adição do ácido D-glucurônico e a resposta do eletrodo de CuNP foi de 2,48 s. Após a adição do analito a resposta manteve-se estável durante todo o experimento, indicando que o eletrodo de CuNP apresentou alta estabilidade para medição amperométrica do ácido.

4.9 Otimização dos parâmetros voltamétricos de análise

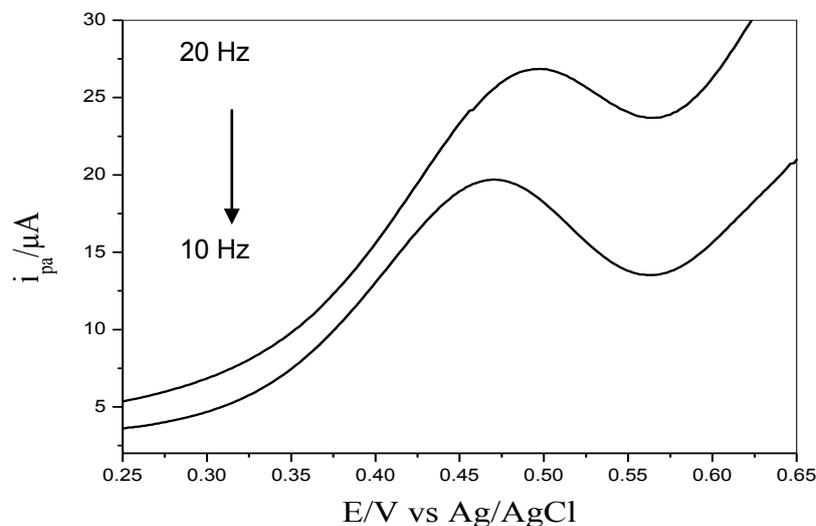
Após o estudo do comportamento eletroquímico dos ácidos urônicos e a estabilidade da corrente anódica em eletrodo modificado com as CuNP, as técnicas voltamétricas de onda quadrada (SWV) e pulso diferencial (DPV) foram estudadas e as figuras de mérito tais como: limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e maior sensibilidade amperométrica (Sa), foram obtidos.

4.9.1 Voltametria de onda quadrada

A primeira etapa para a aplicação da voltametria de onda quadrada foi a otimização dos parâmetros da técnica para obter melhor resolução dos picos de intensidade. Dentre os parâmetros instrumentais que podem influenciar significativamente na resposta voltamétrica os mais relevantes são a frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), a amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (E_{sw}) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s), na faixa de potencial de 0,20 a 0,65 V.

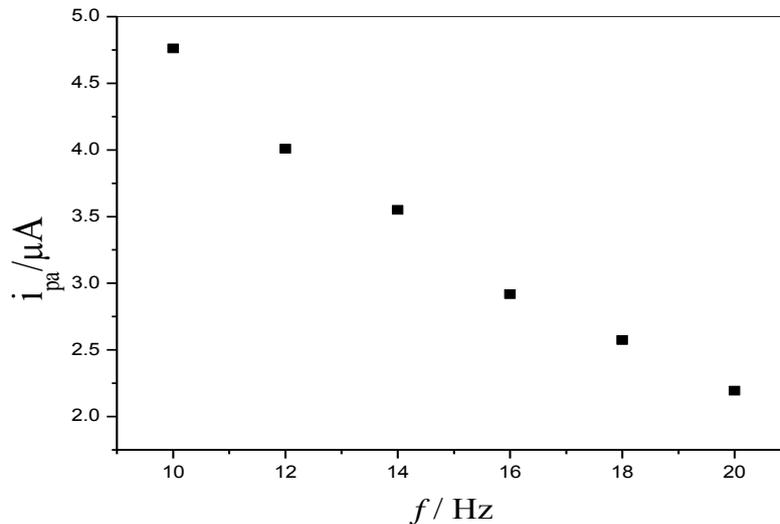
A Figura 34 mostra o perfil do voltamograma de onda quadrada com a variação da frequência de 20,0 Hz a 10,0 Hz, sendo a frequência de 10,0 Hz a que apresentou melhor resolução do pico, sendo então este, o primeiro parâmetro otimizado para a SWV.

Figura 34 - Voltamograma de onda quadrada para diferentes frequências de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$).



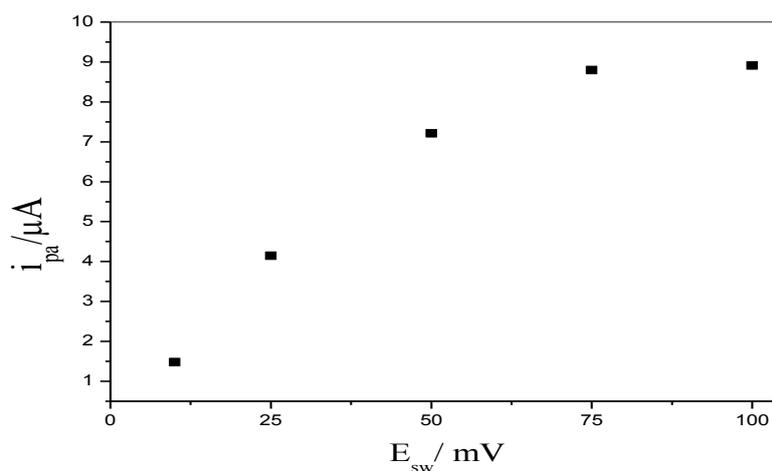
Analisando a resposta da corrente de pico anódico pela frequência (Figura 35), observou-se uma relação linear que de acordo com a literatura é característico de um processo redox irreversível²⁶, conforme já diagnosticado pelo estudo de velocidade de varredura por CV.

Figura 35 - Influência da frequência na corrente de pico anódico de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$).



Outro parâmetro otimizado foi amplitude dos pulsos de potencial (E_{sw}). Variaram-se os valores de E_{sw} de 10 a 100 mV e foi observado um aumento linear na intensidade de corrente decorrente do aumento de E_{sw} , conforme mostra a Figura 36. A amplitude de 25 mV foi escolhida por apresentar melhor resolução do pico.

Figura 36 - Influência do aumento da amplitude dos pulsos com a corrente de pico anódica para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_s = 2,0 \text{ mV}$ e $f = 10 \text{ Hz}$).



O incremento de varredura de potencial (ΔE_s) foi o último parâmetro estudado de 2 a 10 mV. ΔE_s de 2,0 mV apresentou melhor resolução do pico como mostra a Figura 37. A Figura 38 mostra o comportamento da corrente com o aumento de ΔE_s .

Figura 37 - Voltamogramas de onda quadrada de diferentes valores de incremento de potencial, para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($f = 10 \text{ Hz}$ e $E_{sw} = 25 \text{ mV}$).

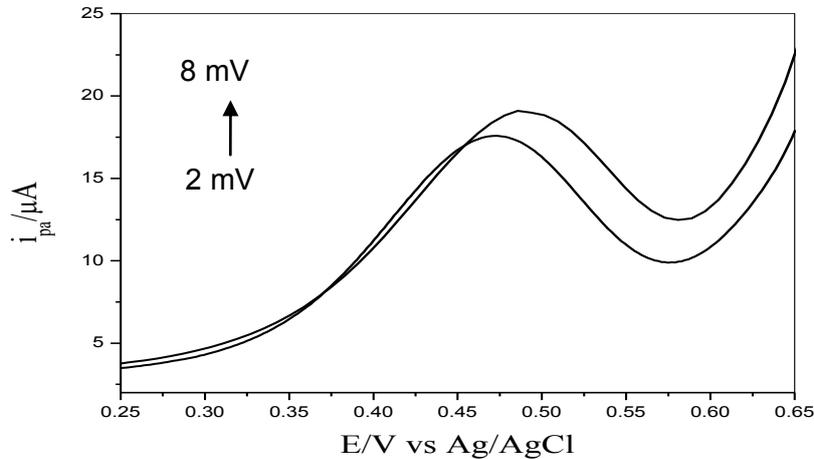
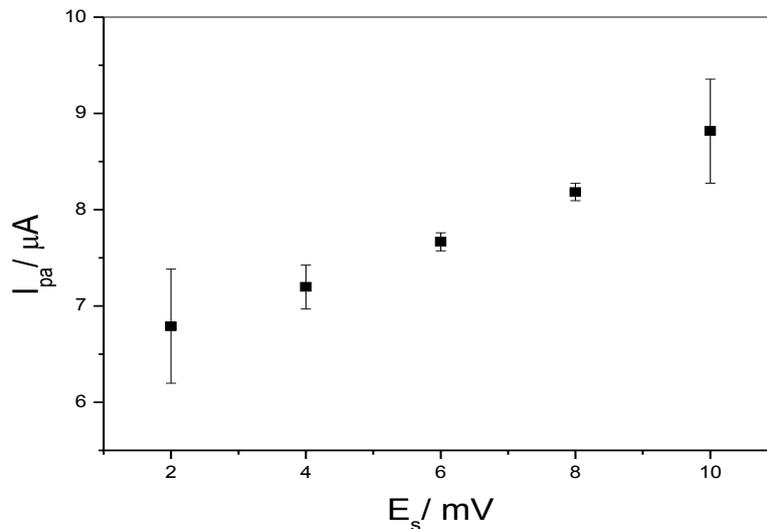


Figura 38 - Influência do aumento do incremento de varredura de potencial com a corrente de pico anódica para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP ($\Delta E_{sw} = 25 \text{ mV}$ e $f = 10 \text{ Hz}$).

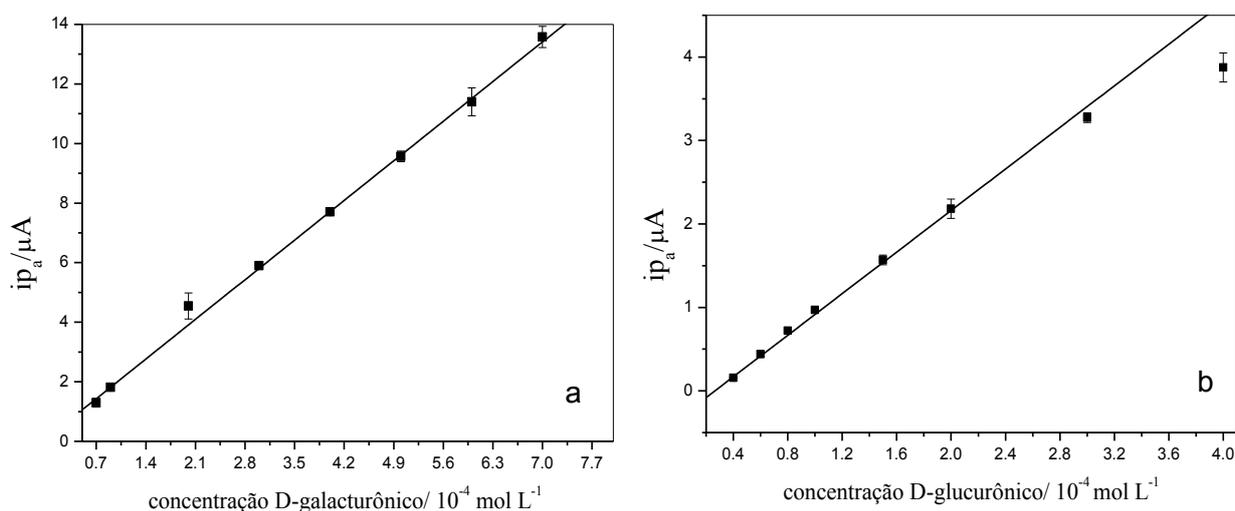


De acordo com os estudos de otimização os valores para f de 10 Hz, E_{sw} de 25 mV e ΔE_s de 2,0 mV foram escolhidos como os parâmetros mais adequados para a continuidade dos estudos em SWV.

Nestas condições, as curvas analíticas para os ácidos D-glucurônico e D-galacturônico foram construídas. Notou-se que em concentrações próximas a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ o sinal não era diferenciado do ruído e a partir de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a

intensidade da corrente aumentou com a concentração. A curva obtida é apresentada na Figura 39.

Figura 39 - Curvas analíticas para solução de ácido galacturônico (a) e ácido glucurônico (b) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH empregando a técnica de voltametria de onda quadrada, $f = 10 \text{ Hz}$; $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

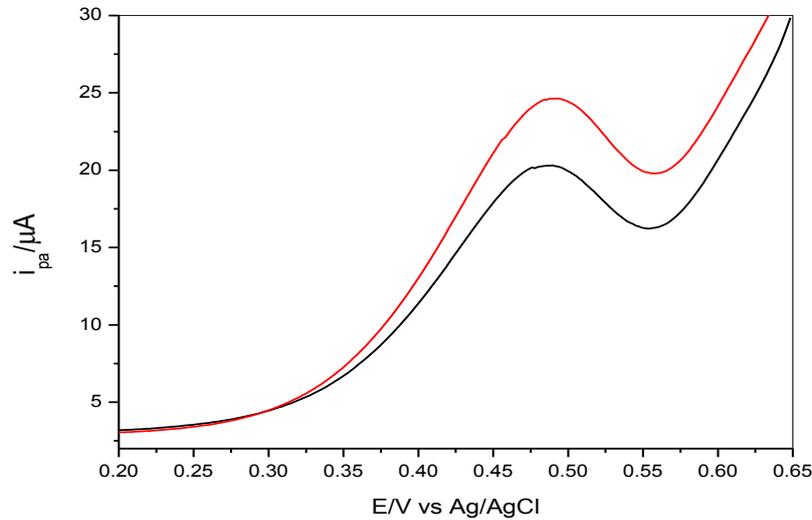


A faixa de concentração estudada foi de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O intervalo linear para o ácido D-galacturônico ficou entre $7,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os parâmetros analisados foram: limite de detecção de $3,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, limite de quantificação de $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sensibilidade amperométrica de $1,9 \times 10^4 \mu\text{A mol L}^{-1}$ e o coeficiente de correlação linear igual a 0,999. Para o ácido D-glucurônico o intervalo linear ficou entre $4,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $3,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, limite de quantificação $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sensibilidade amperométrica de $1,3 \times 10^4 \mu\text{A mol L}^{-1}$ e o coeficiente de correlação linear igual a 0,999.

4.9.2 Voltametria de pulso diferencial

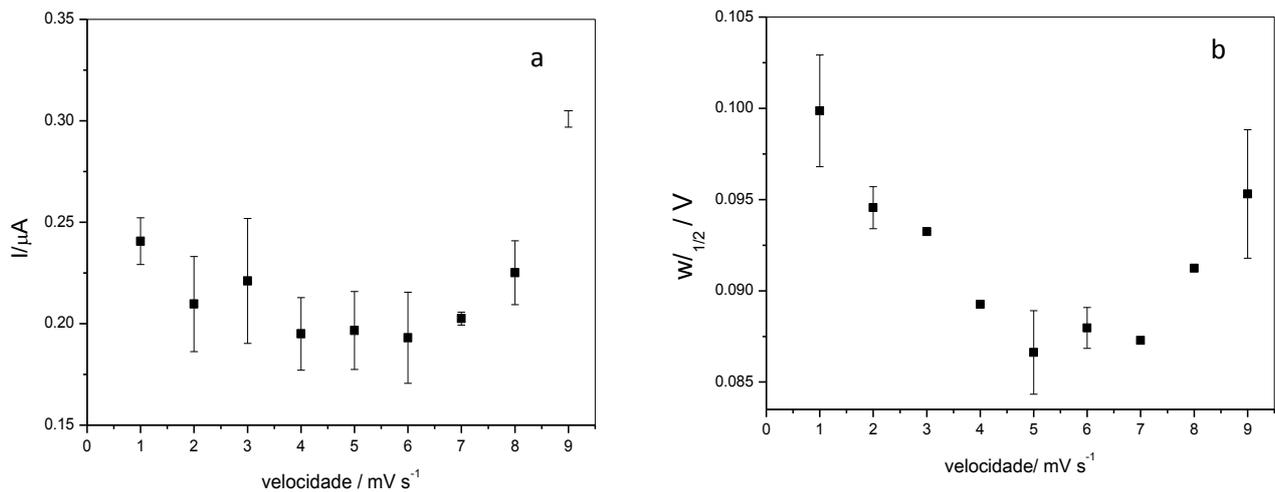
Na voltametria de pulso diferencial o ácido D-glucurônico foi oxidado no potencial de 0,48 V e o ácido D-galacturônico no potencial de 0,47 V como mostra a Figura 40. Inicialmente foram realizados estudos de otimização dos parâmetros operacionais da técnica, como: amplitude de potencial de pulso aplicado (E_p), tempo de duração do pulso (t_p) e velocidade de varredura (v) no intervalo de potencial de 0,2 a 0,65 V.

Figura 40 - Voltamograma de pulso diferencial para $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico (●) e D-galacturônico (●) em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH em CuNP. $E_p = 50,0$ mV, $t_p = 5,0$ ms e $v = 5,0$ mV s⁻¹



O primeiro parâmetro estudado foi da velocidade de varredura. Pelos gráficos da Figura 41 é possível observar que para a velocidade de $5,0$ mV s⁻¹ o pico apresenta menor largura na meia altura ($W_{1/2}$) o que indica melhor resolução.

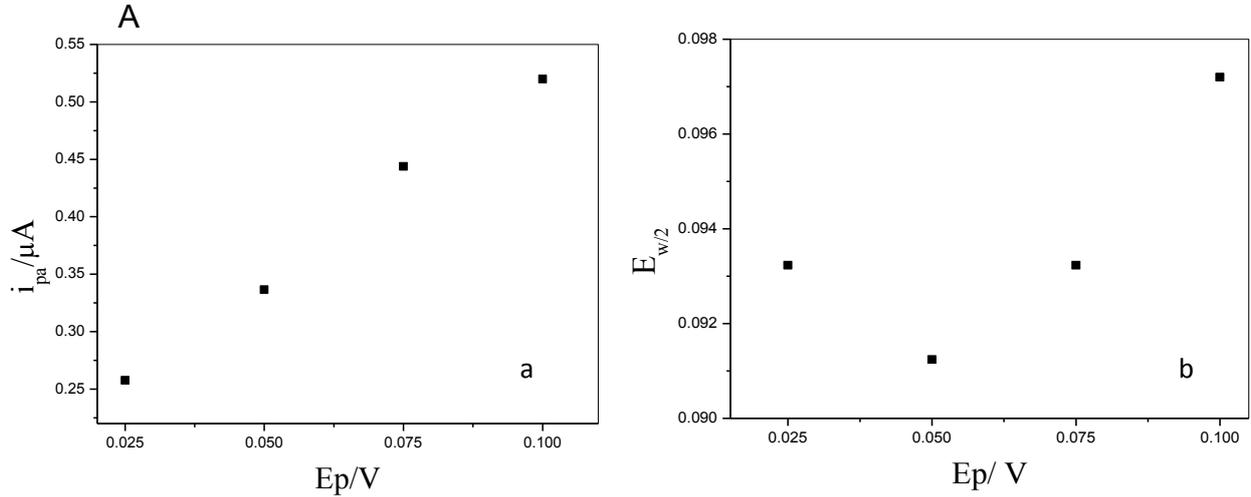
Figura 41 - Influência da velocidade de varredura para $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido D-glucurônico em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (a) e a influência do potencial a meia altura na resolução dos picos. $E_p = 50,0$ mV, $t_p = 5,0$ ms.



Outro parâmetro avaliado foi a amplitude do potencial de pulso, E_p . De acordo com a Figura 42, o aumento da amplitude de pulso aumenta o valor da corrente de pico anódica, aumentando assim, a detectabilidade. Entretanto, um aumento da amplitude provoca alargamento do pico reduzindo a sua resolução. Portanto a

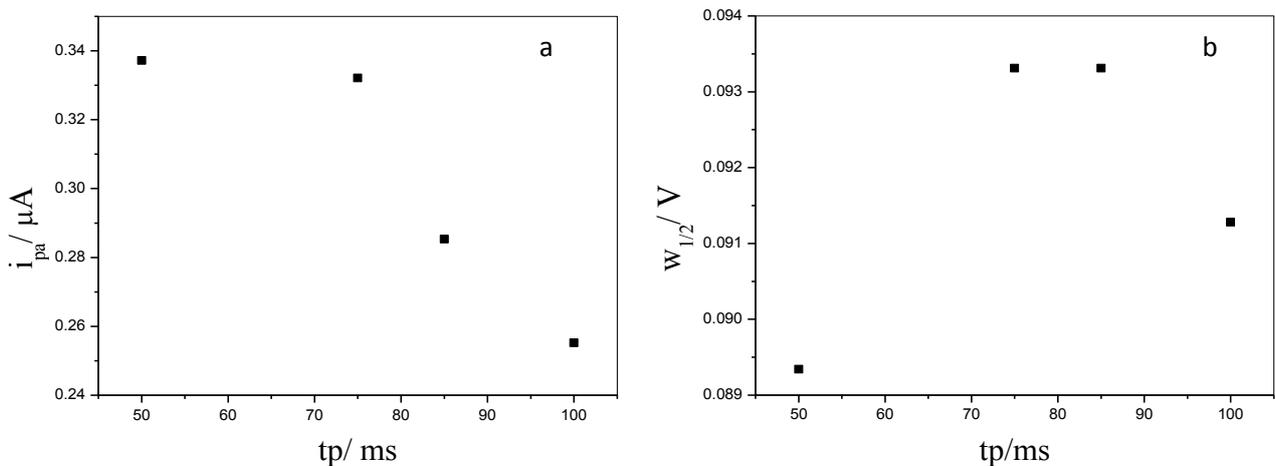
amplitude de 50 mV foi escolhida por apresentar menor largura do pico à meia altura.

Figura 42 - Variação da amplitude do potencial de pulso para $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP, (a) em relação a corrente de pico anódica e (b) em relação a largura do pico a meia altura. $t_p = 5,0 \text{ ms}$, $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$.



A Figura 43 apresenta a otimização para o tempo de pulso (t_p), ou seja, a variação do tempo em que a corrente é medida. O tempo de 50 ms foi o escolhido por apresentar maior corrente e melhor resolução do pico.

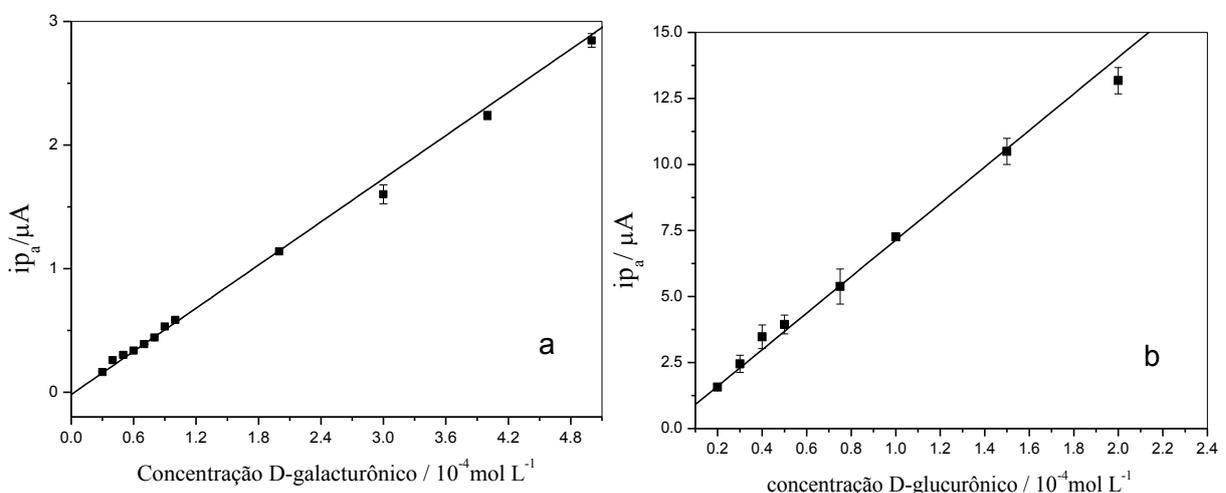
Figura 43 - Variação do tempo de pulso para $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido D-glucurônico em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH em CuNP, (a) em relação a corrente de pico anódica e (b) em relação a largura do pico a meia altura. $E_p = 50,0 \text{ mV}$ e $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$.



As condições ideais obtidas para prosseguir com os estudos analíticos foram: $E_p = 50,0$ mV, $t_p = 5,0$ ms e $\nu = 5,0$ mV s⁻¹.

Após analisar as melhores condições para a DPV foram construídas as curvas analíticas utilizando concentrações de ácido D-galacturônico e D-glucurônico entre $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A concentração de ácido D-galacturônico no intervalo linear foi entre $3,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação linear de 0,997. O limite de detecção obtido foi de $1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, limite de quantificação $5,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e sensibilidade amperométrica equivalente a $5,8 \times 10^3$ μ A/mol L⁻¹. Para o ácido D-glucurônico, a linearidade ficou entre o intervalo de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com coeficiente de correlação linear de 0,998. O limite de detecção obtido foi de $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, limite de quantificação de $3,7 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e sensibilidade amperométrica de $6,9 \times 10^4$ μ A/mol L⁻¹. A curva obtida com esses ensaios é apresentada na Figura 44.

Figura 44 - Curvas analíticas para uma solução de ácido D-galacturônico (a) e D-glucurônico (b) em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial. $\Delta E_p = 50,0$ mV, $t_p = 50,0$ ms, $\nu = 5,0$ mV s⁻¹. Em destaque no canto superior do gráfico (a), a melhor visualização da região de menor concentração.



As Tabelas 05 e 06 demonstram o resumo dos parâmetros avaliados em SWV e DPV. Analisando os valores obtidos, a DPV apresentou menor limite de detecção e quantificação e maior sensibilidade amperométrica.

Tabela 5 - Resumo dos parâmetros voltamétricos para o ácido D-galacturônico.

Técnica	Faixa linear/ mol L ⁻¹	LOD/ mol L ⁻¹	LOQ/ mol L ⁻¹	S _a / L mol ⁻¹	r
SWV	7,0x10 ⁻⁵ a 7,0x10 ⁻⁴	2,8x10 ⁻⁵	1,3 x10 ⁻⁴	1,8x10 ⁴	0,999
DPV	3,0x10 ⁻⁵ a 5,0x10 ⁻⁴	1,6x10 ⁻⁵	5,7 x10 ⁻⁵	5,8x10 ⁴	0,997

Tabela 6 - Resumo dos parâmetros voltamétricos para o ácido D-glucurônico.

Técnica	Faixa linear/ mol L ⁻¹	LOD/ mol L ⁻¹	LOQ/ mol L ⁻¹	S _a / μA L mol ⁻¹	r
SWV	4,0x10 ⁻⁵ a 4,0x10 ⁻⁴	3,9x10 ⁻⁵	1,3 x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁴	0,996
DPV	2,0x10 ⁻⁵ a 5,0x10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻⁵	3,7 x10 ⁻⁵	6,9x10 ⁴	0,998

4.9.3 Testes de recuperação para as técnicas voltamétricas

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.²⁶ As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. São expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz. O teor medido do componente adicionado é dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100, obtendo-se assim a porcentagem de recuperação. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%. O coeficiente de variação (CV) é o desvio padrão expresso como uma porcentagem da média e é considerado pequeno quando foi inferior ou igual a 25%.²⁶

Como a matriz que contém os ácidos urônicos é complexa e não há como determiná-los separadamente pelas técnicas voltamétricas, foi realizado um ensaio de recuperação sem a amostra real. Assim foram adicionadas três concentrações conhecidas dos analitos no intervalo linear das curvas analíticas apresentadas nas seções 4.8.1 e 4.8.2.

As tabelas 07 e 08 apresentam as concentrações adicionadas para cada ácido e a porcentagem recuperada para cada técnica voltametria estudada. Os resultados obtidos se encontram dentro da faixa permitida de recuperação sendo a técnica de DPV a que apresentou menor coeficiente de variação.

Tabela 7 - Ensaio de recuperação em SWV e DPV para o ácido D-galacturônico

Técnica	Conc real (mol L ⁻¹)	R (%)	R _{média} (%)	CV(%)
DPV	4,50x10 ⁻⁵	108,6		
	2,50 x10 ⁻⁴	110,1	110,3	1,6
	4,50 x10 ⁻⁴	112,2		
SWV	9,00 x10 ⁻⁵	104,1		
	2,50 x10 ⁻⁴	88,9	95,4	8,1
	3,00 x10 ⁻⁴	93,2		

Tabela 8 - Ensaio de recuperação em SWV e DPV para o ácido D-glucurônico

Técnica	Conc. real (mol L ⁻¹)	R (%)	R _{média} (%)	CV (%)
DPV	3,50 x10 ⁻⁵	104,6		
	5,00 x10 ⁻⁵	105,2	107,9	1,6
	1,50 x10 ⁻⁴	114,0		
SWV	9,00 x10 ⁻⁵	111,1		
	2,00 x10 ⁻⁴	118,0	107,2	12,3
	3,50 x10 ⁻⁴	92,5		

4.10 Separação cromatográfica dos ácidos urônicos

4.10.1 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Em meio alcalino eletrodos modificados com nanopartículas de cobre demonstraram boa atividade eletroquímica para a oxidação dos ácidos urônicos. Sob tais condições, uma coluna de troca aniônica (CarboPac Pa10) e uma coluna de guarda (CarboPac Pa10) foram utilizadas para a separação dos compostos. A separação foi realizada com eluente isocrático, mais simples e com melhor estabilização da linha base e a detecção por amperometria pulsada. Não foi necessária a derivatização.

Devido a alta afinidade dos ácidos urônicos pela fase estacionária, a separação cromatográfica requer eluentes que interajam mais fortemente com a coluna que o hidróxido de sódio, empregado para a separação somente dos carboidratos, como é o caso do acetato de sódio.⁵¹ A massa molecular e o pKa dos principais componentes encontrado no bagaço de cana-de-açúcar é listada na Tabela 09. Em geral, a sequência de eluição dos componentes da matriz é relativo ao valor do pKa. Os ácidos urônicos apresentam o menor valor de pKa devido ao grupo carboxílico na sua estrutura molecular, portanto interagem mais fortemente na coluna aumentando o tempo de retenção em comparação com os compostos de açúcares.⁵²

Tabela 9 - Fórmula molecular, massa molecular e valor do pKa para seis compostos de açúcares e os dois ácidos urônicos.⁵³

Compostos de açúcares e ácidos urônicos	Fórmula molecular	Massa molecular	pKa*
D-(-)-Arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,10	12,43
D-(+)-Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,20	12,35
D-(+)-Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,20	12,28
D-(+)-Xilose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,10	12,15
D-(+)-Manose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,20	12,08
D-(-)-Frutose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,20	12,03

D-galacturônico	$C_6H_{10}O_7$	194,10	3,48
D-glucurônico	$C_6H_{10}O_7$	194,10	3,20

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

Assim, para diminuir o tempo de retenção dos ácidos urônicos, foi adicionada na fase móvel alcalina concentrações de íons acetato para eluição isocrática dos ácidos urônicos com o objetivo de obter os menores tempos de retenção mantendo satisfatória a resolução das bandas cromatográficas.

A fim de avaliar o efeito da concentração dos íons acetato nos tempos de retenção, uma mistura padrão de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de ácidos urônicos preparada em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH, foi eluída isocraticamente em fase móvel contendo 0,1 mol L⁻¹ de NaOH e concentrações de CH₃COO⁻Na⁺ variando entre 0,08 a 0,28 mol L⁻¹. O fluxo foi mantido no valor máximo de 1,0 mL min⁻¹ e a detecção amperométrica pulsada de 0,45 V vs Pd no potencial de leitura. Os tempos de retenção e a largura do pico a meia altura para cada concentração de CH₃COO⁻Na⁺ foram avaliados para cada pico (D-glucurônico e D-galacturônico) e são demonstrados na Figura 45 e 46.

Figura 45 - Efeito da concentração de íons acetato no tempo de retenção dos ácidos (▪) -D-galacturônico e (●) D-glucurônico. Fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Potencial de detecção 0,45 V vs Pd. Coluna CarboPac PA10.

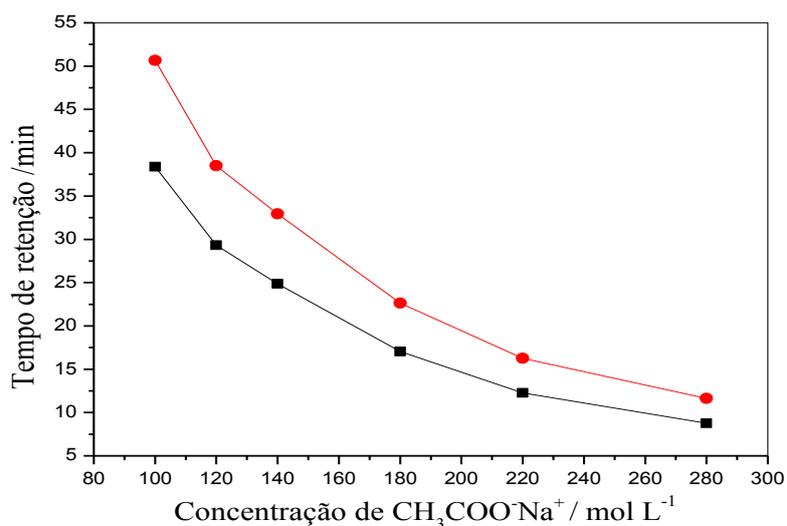
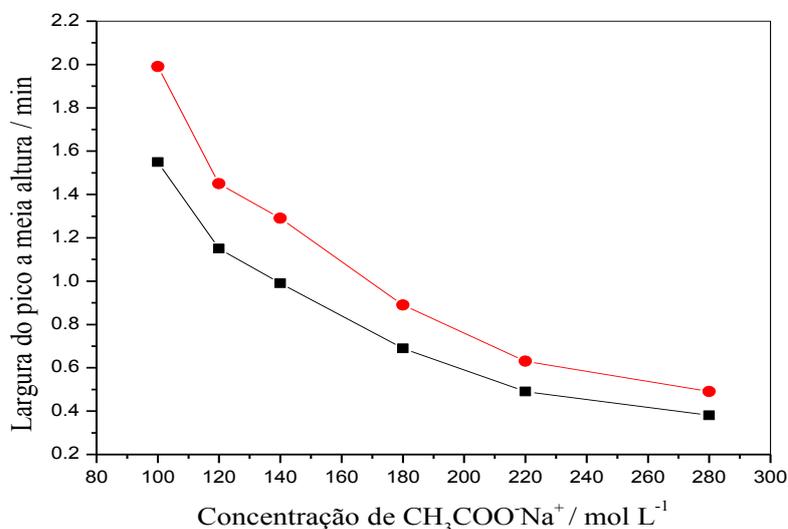


Figura 46 - Efeito da concentração de íons acetato na largura do pico a meia altura dos ácidos α -D-galacturônico e α -D-glucurônico. Fluxo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Potencial de detecção $0,45\text{V}$ vs Pd.Coluna CarboPac PA10.



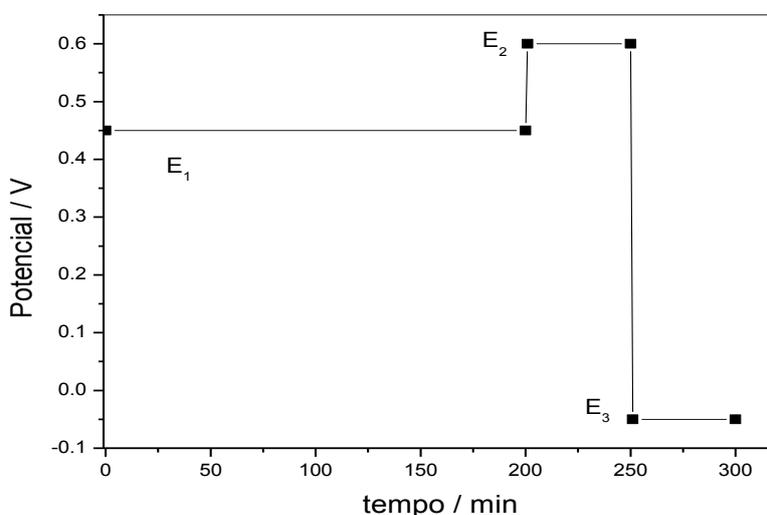
Com o aumento da concentração de íons acetato na fase móvel a ordem de eluição dos analitos investigados manteve-se sempre a mesma. Mas, como esperado, os tempos de retenção foram significativamente reduzidos. Para a concentração de $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ o tempo de retenção foi de 38,38 min para o ácido D-galacturônico e 50,65 min para o ácido D-glucurônico. Já quando a concentração de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ na fase móvel foi para $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ o tempo de retenção passou para 8,73 min para o ácido D-galacturônico e 11,53 min para o D-glucurônico. Além disso, a largura do pico a meia altura, que pode comprometer a eficiência da separação das bandas, também diminuiu com o aumento da concentração de acetato, aumentando a seletividade. Assim, o emprego de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ como fase móvel permitiu a separação isocrática dos ácidos urônico em menos de 15 min, com boa resolução e sensibilidade analítica.

As concentrações de NaOH na fase móvel inferiores a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ não são recomendadas porque os tempos de retenção foram consideravelmente longos. Já as fases móveis com concentrações de NaOH superiores a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ apresentaram menor resolução. Por conseguinte, para as aplicações analíticas do eletrodo modificado com CuNP que é o foco deste trabalho, eluente alcalino com uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH foi escolhido para compor a fase móvel, apresentando tempos adequados de retenção, resolução, magnitude da resposta

amperométrica e mínimo de ruído. Assim, a fase móvel utilizada para dar prosseguimento aos estudos cromatográficos foi de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺.

Para a detecção amperométrica pulsada foram utilizados três potenciais, E₁, E₂ e E₃. O potencial E₁ é onde ocorre a oxidação dos ácidos urônicos e dos carboidratos e foi estudado na faixa entre 0,35, 0,40, 0,45, 0,50 e 0,55 V vs Pd com tempo de duração de 200 ms. O potencial E₂ deve ser suficientemente positivo para oxidar todas as espécies presentes na superfície do eletrodo, o potencial de 0,60 V foi então aplicado por 50 ms. O potencial E₃ deve ser baixo o suficiente para reduzir a superfície oxidada do eletrodo. Como o eletrodo de CuNP é formado por óxidos de cobre, foi aplicado um potencial não muito negativo, de somente -0,05 V, por 50 ms. O gráfico da Figura 47 ilustra o diagrama dos potenciais aplicados.

Figura 47 - Pulso amperométrico para a detecção cromatográfica dos ácidos urônicos em eletrodo de CuNP.



As Figuras 48 e 49 mostram a variação dos potenciais E₁ pela área dos picos cromatográficos. O potencial de 0,45 V vs Pd foi o escolhido para detectar os ácidos urônicos por apresentar maior área, conseqüentemente, maior detectabilidade.

Figura 48 - Variação do potencial aplicado pela área do pico na detecção dos ácidos (▪) D-glucurônico e (●) D-galacturônico em eletrodo de CuNP. Fluxo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$. Coluna CarboPac PA10.

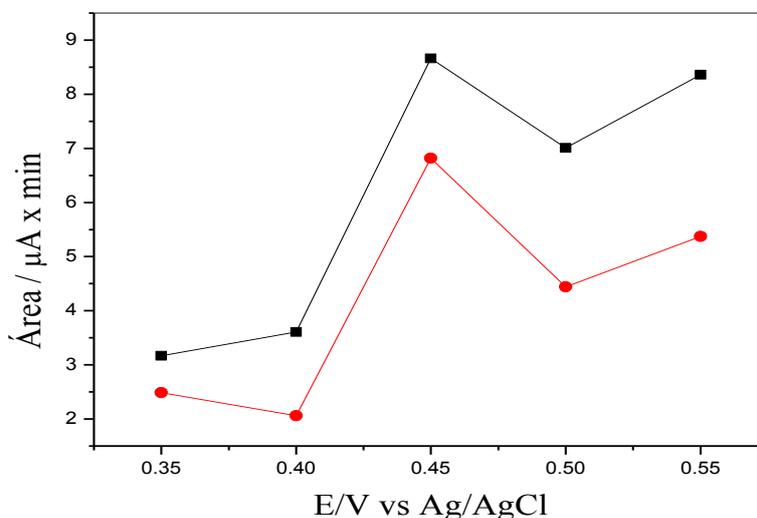
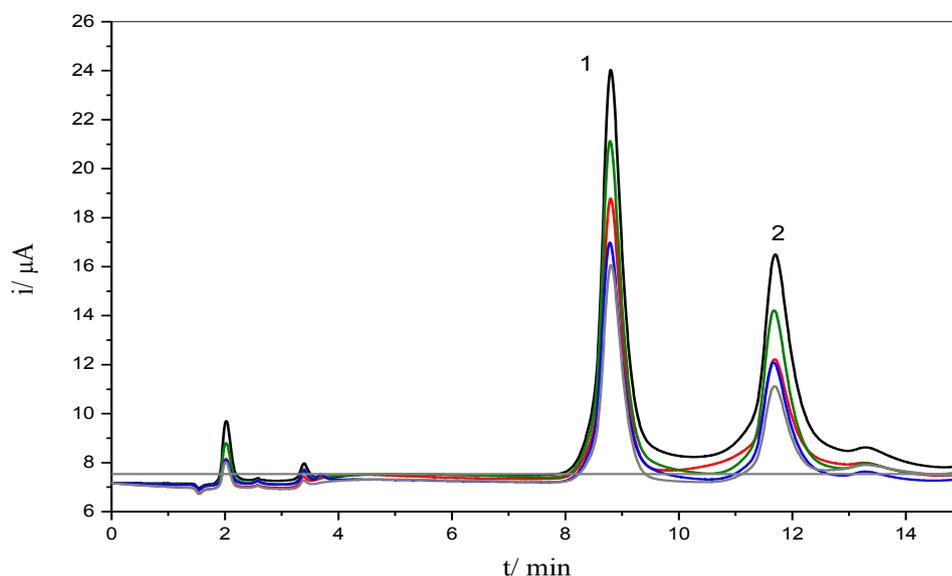


Figura 49 - Perfil cromatográfico em diferentes potenciais E_1 , (●) 0,35 (●) 0,40 (●) 0,45, (●) 0,55 e (●) 0,50 V vs Pd, em detector modificado com CuNP para separação dos ácidos (1) D-galacturônico, 8,76 min e (2) D-glucurônico, 11,55 min. Fluxo: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$. Coluna CarboPac PA10.



Portanto, as melhores condições para a separação dos ácidos urônico foram: solução para eluição isocrática de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ com potencial de detecção de $0,45 \text{ V}$ vs Pd e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Nessas condições a Figura 50 demonstram os cromatogramas para cada ácido urônico e a Figura 51 os cromatogramas para uma mistura contendo os dois ácidos.

Figura 50 - Eluição isocrática para a) ácido D-galacturônico, 8,75 min e b) ácido D-glucurônico, 11,57 min. Fase móvel de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ com potencial de detecção de $0,45 \text{ V vs Pd}$ e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

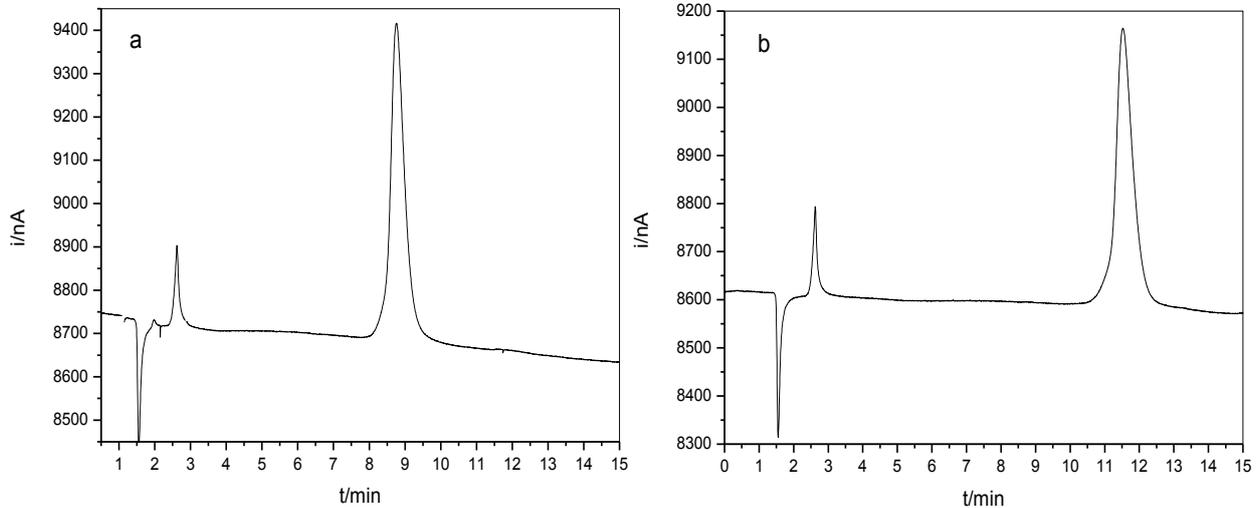
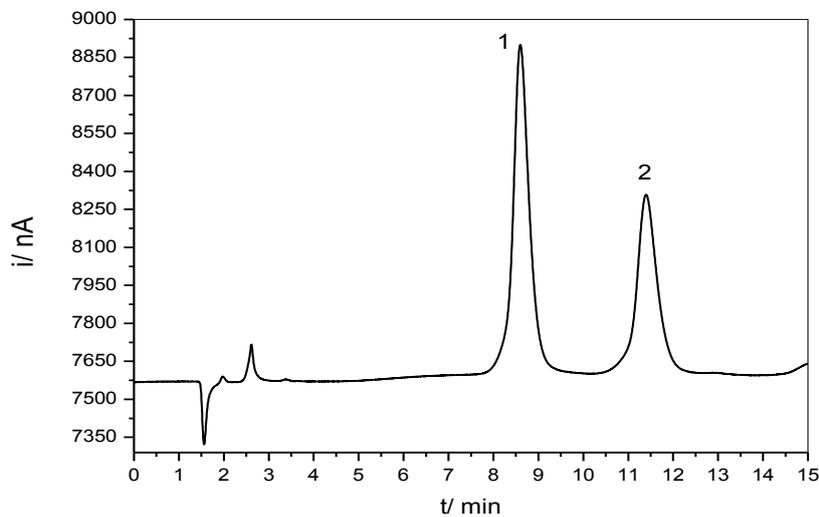


Figura 51 - Cromatograma de separação isocrática para (1) ácido D-galacturônico, 8,75 min e (2) ácido D-glucurônico, 11,56 min. Fase móvel de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ com potencial de detecção de $0,45 \text{ V vs Pd}$ e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.



Os parâmetros cromatográficos como: tempo morto (t_m), tempo de retenção (t_r), tempo de retenção ajustado (t_r'), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N), fator de separação (α) e fator de retenção (k), se encontram dentro dos resultados esperados para o bom desempenho cromatográfico e são mostrados na tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos para a separação dos ácidos D-galacturônico e D-glucurônico.

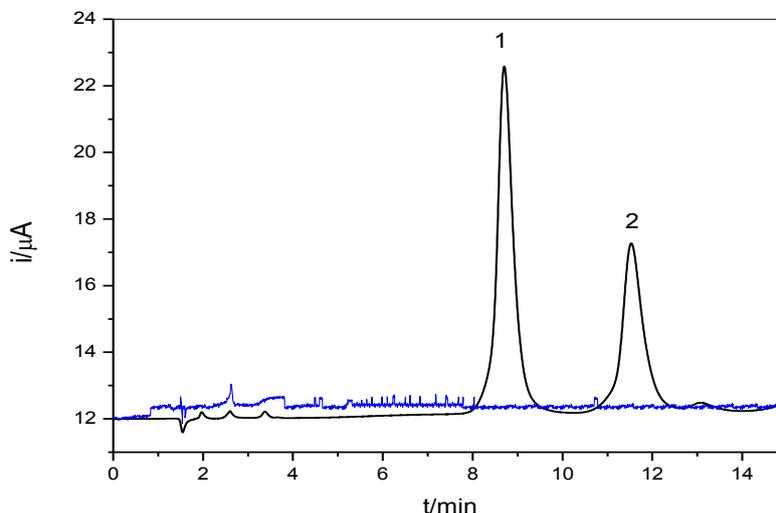
Composto	t_m	t_r	t_r'	R_s	N	α	k
D-galacturônico	1,60	8,72	7,12	4,04	3238	1,40	4,45
D-glucurônico	1,60	11,55	9,95	2,069	3441		6,22

Os tempos de retenção para o ácido D-galacturônico durante as corridas cromatográficas sofreram uma variação de 0,45 % e o ácido D-glucurônico, variação de 0,52 %. A variação desses tempos de retenção, segundo a literatura,³⁶ pode ser de até 3,0% o que mostra que os tempos encontrados apresentam boa reprodutibilidade.

4.10.2 Comportamento cromatográfico dos ácidos urônicos utilizando os eletrodos de GC e CuNP como detectores em PAD

Uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de uma mistura de ácidos urônicos foi injetada no cromatógrafo sob as condições otimizadas. Primeiramente, um eletrodo de GC foi utilizado como detector e após 15 minutos de corrida cromatográfica nenhum pico referente a oxidação dos ácidos urônicos foi observado. Em seguida, o eletrodo foi trocado pelo de CuNP e nos tempos de 8,77 min e 11,56 min é possível observar as bandas 1 e 2 referentes a oxidação dos ácidos D-galacturônico e D-glucurônico. A Figura 52 mostra o perfil cromatográfico quando esses eletrodos foram utilizados como detectores.

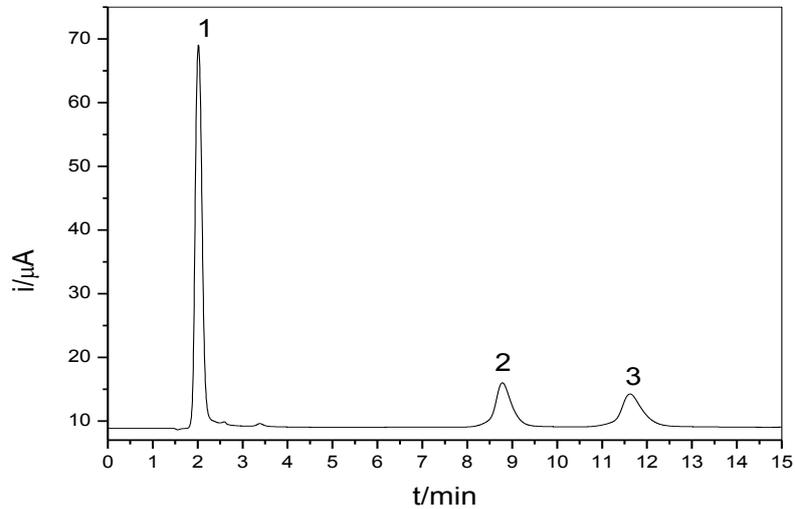
Figura 52 - Cromatogramas de corrida isocrática do (1) ácido D-galacturônico, 8,74 min e (2) ácido D-glucurônico, 11,56 min em detector de CuNP e em detector de GC (●). Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,280 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹.



4.10.3 Estudos dos principais interferentes presentes na amostra

Também foi avaliado o desempenho da separação dos ácidos urônicos frente a diversos interferentes eletroativos presentes na amostra, tais como: D-(+)-glicose, D-(+)-xilose, D-(+)-manose, D(-)-arabinose, entre outros. Primeiramente, uma solução padrão de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com os interferentes citados foi preparada juntamente com os ácidos urônicos e submetida à corrida cromatográfica como demonstra a Figura 53. Os compostos de açúcares foram co-eluídos próximo da frente de solvente, no tempo de 2,02 min. Assim, a presença de uma concentração relativamente elevada desses compostos eletroativos não teve efeito visível nos picos dos ácidos urônicos investigados.

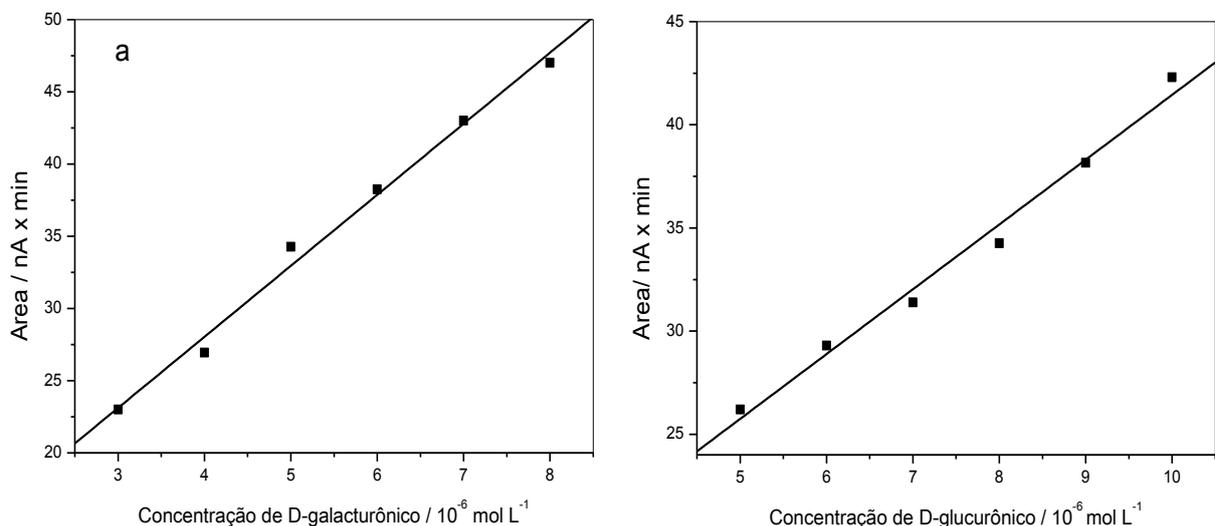
Figura 53 - Cromatograma para separação isocrática (1) D-(+)-glicose, D-(+)-xilose, D-(+)-manose D(-)-arabinose, (2) ácido D-galacturônico e (3) ácido D-glucurônico em detector de CuNP. Fase móvel de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,280 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ com potencial de detecção de $0,45 \text{ V}$ vs Pd e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.



4.10.4 Estudo da Concentração pela Área do Pico Cromatográfico

Após a otimização das condições cromatográficas, curvas analíticas foram construídas para avaliar os parâmetros analíticos da técnica. Para isso foram preparadas soluções nas concentrações de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e avaliou-se a região linear, o limite de detecção, quantificação e a sensibilidade amperométrica. A Figura 54 demonstra as curvas analíticas para os ácidos D-galacturônico e D-glucurônico.

Figura 54 - Curva analítica para (a) ácido D-galacturônico e (b) ácido D-glucurônico na técnica de HPLC. Fase móvel de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,280 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ com potencial de detecção de $0,45 \text{ V}$ vs Pd e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.



A Tabela 11 mostra as figuras de mérito para os dois ácidos urônicos. A faixa foi linear de $3,0 \times 10^{-6}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o ácido D-galacturônico. O limite de detecção foi de $5,8 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e o limite de quantificação de $1,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A sensibilidade amperométrica foi de $4,9 \times 10^6$ μ A L mol⁻¹. Para o ácido D-glucurônico a faixa foi linear de $3,0 \times 10^{-6}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $7,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, limite de quantificação de $2,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e sensibilidade amperométrica de $3,1 \times 10^6$ μ A L mol⁻¹.

A sensibilidade amperométrica foi estudada em três eletrodos de CuNP diferentes afim de se verificar a reprodutibilidade na detecção. Assim a sensibilidade amperométrica para o ácido D-galacturônico foi de $3,6 \pm 1,8 \times 10^6$ nA L mol⁻¹ e para o ácido D-glucurônico a sensibilidade foi de $1,9 \pm 1,0 \times 10^6$ nA L mol⁻¹. Com isso, podemos concluir que os três eletrodos de CuNP utilizados para a detecção amperométrica pulsada apresentaram um desvio padrão que não compromete o método na oxidação dos ácidos urônicos.

Tabela 11. Figuras de mérito para detecção dos ácidos urônicos utilizando a técnica cromatográfica

Ácido	Faixa linear/ mol L ⁻¹	LOD/ mol L ⁻¹	LOQ/ mol L ⁻¹	Sa/ μ A L mol ⁻¹	r
D-galacturônico	$3,0 \times 10^{-6}$ a $8,0 \times 10^{-6}$	$5,8 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-6}$	$4,9 \times 10^6$	0,998
D- glucurônico	$3,0 \times 10^{-6}$ a $8,0 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^6$	0,998

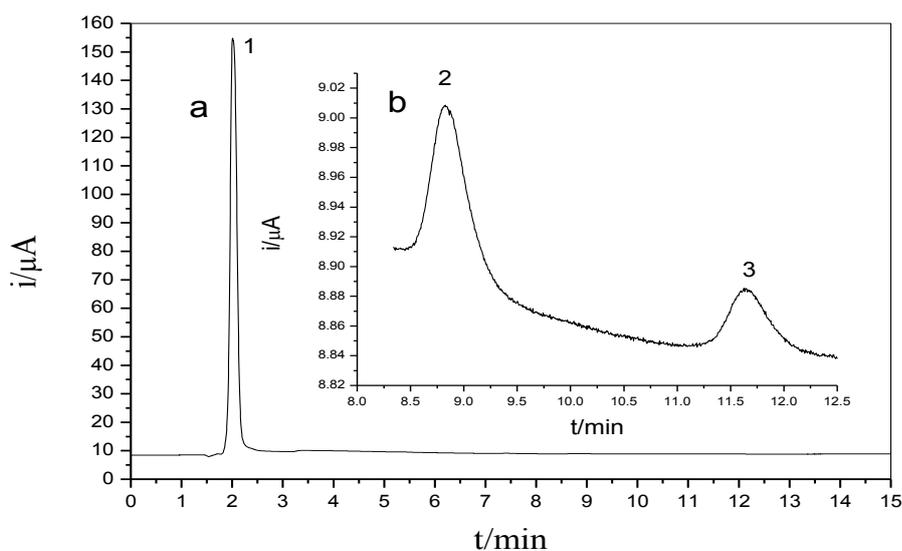
4.10.5 Determinação dos ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar.

Como já visto neste trabalho, a separação e detecção de ácidos urônicos presentes no bagaço de cana-de-açúcar pode ser de grande interesse para as biorrefinarias uma vez que estes compostos podem ser utilizados na indústria de alimentos, bebidas e química.

Nesta parte do trabalho, a fim de demonstrar a utilização fácil e simples do presente método analítico para aplicações práticas, 300 mg de amostras de bagaço

de cana-de-açúcar da região de Araraquara foram submetidas ao processo de hidrólise, neutralização e filtragem como descrito na seção 3.8. As amostras foram injetadas no cromatógrafo nas condições otimizadas e a identificação dos picos cromatográficos foi baseada no tempo de retenção dos analitos específicos e foi confirmada pela adição de solução padrão. A Figura 55 ilustra o cromatograma obtido para a amostra. Devida à alta corrente de oxidação dos componentes que possivelmente co-eluíram no tempo de 2,02 min, como ocorreu no estudo dos interferentes, os sinais dos ácidos urônicos ficaram sem visibilidade, portanto, o cromatograma (b) mostra uma ampliação no tempo de retenção dos ácidos.

Figura 55 - Cromatograma para a amostra hidrolisada do bagaço de cana-de-açúcar. Em (a) o pico (1) referente à oxidação dos componentes da amostra, 2,02 min e em (b) a ampliação nos referidos tempos de retenção para (2) ácido D-galacturônico, 8,82 min e (3) ácidos D-glucurônico, 11,67. Fase móvel de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com 0,28 mol L⁻¹ de CH₃COO⁻Na⁺ com potencial de detecção de 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

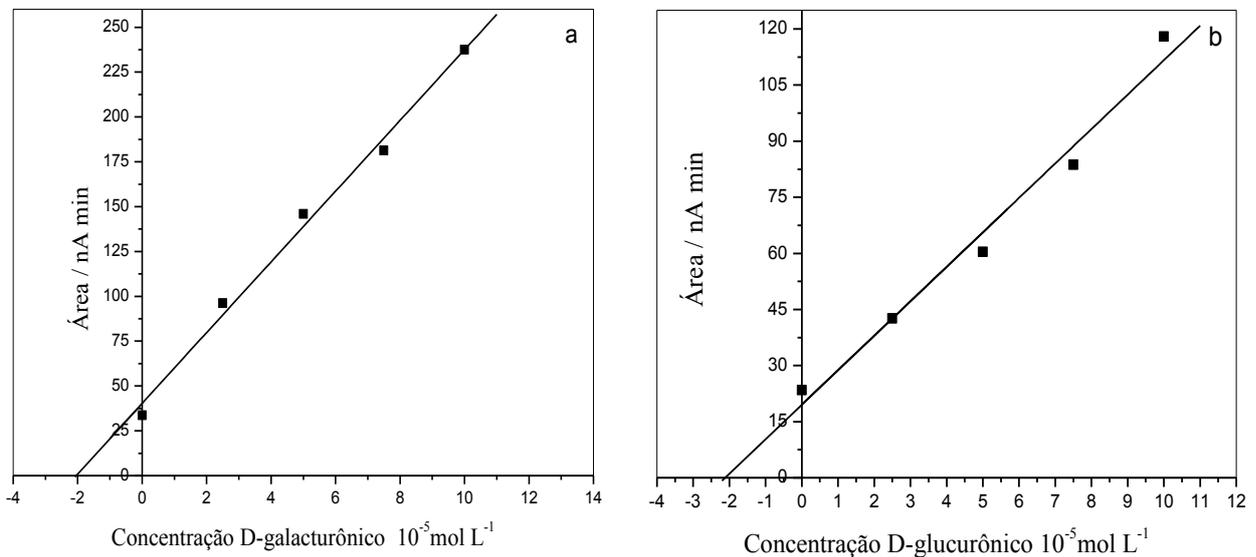


O método utilizado para determinar a concentração dos ácidos urônicos presentes na amostra foi o método de adição de padrão. O método consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse na amostra. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se a curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada a amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corte o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição de padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas a concentração da substância analisada. O método de adição

padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar.

A Figura 56 demonstra as curvas analíticas para o método de adição de padrão feitas para o ácido (a) D-galacturônico e (b) D-glucurônico. Com a extrapolação da reta até o eixo das abscissas foi encontrada a concentração de 14,3 g/kg para o ácido D-galacturônico e 13,6 g/kg para o ácido D-glucurônico.

Figura 56 - Método da adição de padrão para o ácido (a) D-galacturônico e (b) D-glucurônico em eletrodo de CuNP utilizados como detectores amperométricos em HPLC. Eluição isocrática. Fase móvel de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH com $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ com potencial de detecção de $0,45 \text{ V vs Pd}$ e fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.



As adições de padrão foram realizadas em três eletrodos diferentes de CuNP afim de verificar a reprodutibilidade da detecção. Assim, a concentração de ácido D-galacturônico encontrada foi de $15,8 \pm 0,5 \text{ g/kg}$ e para o ácido D-glucurônico de $12,5 \pm 0,5 \text{ g/kg}$.

As quantidades de ácidos urônicos em outros materiais lignocelulósicos detectados por amperometria utilizando eletrodo de ouro e coluna CarboPac PA 20⁵² foram de: $6,5 \pm 0,05 \text{ g/kg}$ e $3,5 \pm 0,04 \text{ g/kg}$ para o D-galacturônico e D-glucurônico, respectivamente na palha de milho e $14,0 \pm 0,1 \text{ g/kg}$ e $12,0 \pm 0,1 \text{ g/kg}$ na palha de arroz. Como pode ser visto as quantidades de ácidos urônicos encontrados em matérias lignocelulósicos dependem da matéria-prima em análise.

Após a realização do método de adição de padrão, avaliou-se a exatidão. Para isto foram realizados ensaios de recuperação para cada ácido urônico. Foram injetadas três diferentes concentrações dos ácidos na amostra como demonstram as Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Porcentagem recuperada na técnica de HPLC para o ácido D-galacturônico.

Conc. adicionada de D-galacturônico/ mol L ⁻¹	Conc. Recuperada/ mol L ⁻¹	R(%)
2,5x10 ⁻⁵	2,1 x10 ⁻⁵	84,8
5,0 x10 ⁻⁵	4,8 x10 ⁻⁵	96,0
1,0 x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁴	101,5

Tabela 13 - Porcentagem recuperada na técnica de HPLC para o ácido D-glucurônico.

Conc. adicionada de D-glucurônico (mol L ⁻¹)	Conc. recuperada (mol L ⁻¹)	R(%)
2,5x10 ⁻⁵	2,5 x10 ⁻⁵	101,9
5,0 x10 ⁻⁵	4,7x10 ⁻⁵	95,5
1,0 x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁴	100,9

A média recuperada para o ácido D-galacturônico foi de 94,1% com um coeficiente de variação (CV) de 9,0% para o ácido D-glucurônico a média recuperada foi de 99,4% com um coeficiente de variação de 3,4%. Esses ensaios mostram que o método pode ser considerado adequado para a detecção dos ácidos.

5 CONCLUSÃO

Os ácidos urônicos presentes no material lignocelulósico de diversas biomassas entre elas o bagaço da cana-de-açúcar podem ser utilizados na indústria química e alimentícia se forem recuperados dentro do conceito de biorrefinarias. Com essas novas tecnologias é possível agregar valor ao que antes era desperdiçado pelas usinas sucroalcooleiras.

Dentro dessa perspectiva, este trabalho explorou o comportamento eletroquímico desses ácidos (D-galacturônico e D-glucurônico) utilizando eletrodos modificados com nanopartículas de cobre. O desenvolvimento desse eletrodo foi realizado por eletrodeposição e as nanopartículas de cobre tiveram diâmetro de aproximadamente 100 nm. Os ácidos urônicos demonstraram oxidação irreversível na superfície das CuNP. Através da cronoamperometria avaliou-se que o tempo de resposta do eletrodo foi de 2,48 s em potencial de 0,50 V e a corrente permaneceu estável durante os 1000 s de análise.

As técnicas voltametria de SWV e DPV foram estudadas e a DPV apresentou menor limite de detecção, quantificação e maior sensibilidade amperométrica para os dois ácidos urônicos.

Para os estudos cromatográficos foi utilizada coluna de troca aniônica, eluição isocrática simples e rápida, detecção em 0,45 V vs Pd e fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Os ácidos foram eluídos em tempo inferior a 15 min e os picos cromatográficos apresentaram boa resolução e fator de separação dentro dos limites desejáveis. O limite de detecção foi na ordem de 10⁻⁷, limite um pouco menor que para as técnicas voltamétricas e com maior sensibilidade amperométrica. A quantidade encontrada no bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado foi de 15,8±0,53 g/kg para o ácido D-galacturônico e para o ácido D-glucurônico de 12,5±0,54 g/kg. As recuperações médias foram de 94,14% para o D-galacturônico e 99,46% para o D-glucurônico. Esses resultados demonstram que o método proposto é vantajoso para a determinação dos ácidos urônicos do que os relatados na literatura, pois é possível quantificá-los separadamente sem necessidade de derivatização. Além disso, ao que tudo indica o método também pode ser aplicado em outras matrizes lignocelósicas.

REFERÊNCIAS

- 1 NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **What is a biorefinery?** Colorado, 2009. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acesso em: 23 ago. 2013.
- 2 PEREIRA, J. R. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocelulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/ UFRJ, 2008. 47 p. (Series on Biotechnology, 2).
- 3 SANTANA, J.; SOUZA, S. O. A. Subprodutos da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, v. 10, p. 22-27, 1984.
- 4 HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- 5 SOUFFRIAU, B. et al. Evidence for rapid uptake of D-galacturonic acid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by a channel-type transport system. **FEBS Letters**, v. 586, n. 16, p. 2494-2499, 2012.
- 6 MOJZITA, D. et al. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D galacturonate to meso-galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169-175, 2010.
- 7 YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213-219, 2007.
- 8 MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.
- 9 POURNAGHI-AZAR, M. H.; NAHALPARVARI, H. Preparation and characterization of electrochemical and electrocatalytic behavior of a zinc pentacyanonitrosylferrate film-modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 583, n. 2, p. 307-317, Sept. 2005.
- 10 SALIMI, A.; ABDI, K.; KHAYATIYAN, G-R. Preparation and electrocatalytic oxidation properties of a nickel pentacyanonitrosylferrate modified carbon composite electrode by two-step sol-gel technique: improvement of the catalytic activity. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 3, p. 413-422, Jan. 2004.
- 11 CATALDI, T. R. I.; GUASCITO, R.; SALVI, A. M. XPS study and electrochemical behavior of the nickel hexacyanoferrate film electrode upon treatment in alkaline solutions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 417, n. 1/2, p. 83-88, Nov. 1996.
- 12 POURNAGHI-AZAR, M. H.; DASTONGO, H. Electrochemical behavior of a novel palladium pentacyanonitrosylferrate modified aluminum electrode. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 13, p. 1797-1805, June 2003.

- 13 PRABHU, S. V.; BALDWIN, R. P. Constant potential amperometric detection of carbohydrates at a copper-based chemically modified electrode. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 852-856, Apr. 1989.
- 14 PRABHU, S. V.; BALDWIN, R. P. Electrocatalysis and detection of amino sugars, alditols, and acidic sugars at a copper-containing chemically modified. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 2258-2263, 1989.
- 15 XIE, Y.; HUBER, C. O. Electrocatalysis and amperometric detection using an electrode made of copper oxide and carbon paste. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 1714-1719, Sept. 1991.
- 16 LUO, M. Z.; BALDWIN, R. P. Characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 387, n. 1/2, p. 87-94, May 1995.
- 17 WU, C. New drugs zap cancer cells with radiation. **Science News**, v. 151, n. 14, p. 117-127, 2002.
- 18 HORNYAK, G. L.; PHANI, K. L. N.; KUNKEL, D. L.; MENON, V. P.; MARTIN, C. R. Fabrication, characterization and optical theory of aluminum nanometal/nanoporous membrane thin film composites. **Nanostructure Materials**, v. 6, n. 5, p. 839-842, 1995.
- 19 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241-259, 2010.
- 20 MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annual Review of Materials Science**, v. 30, p. 545-610, 2000.
- 21 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, p. 279-284, 2010.
- 22 WEN-ZHI, L.; YOU-QIN, L. Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating/potential cycling method and its characterization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 141, n. 1, p. 147-153, 2009.
- 23 BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods and applications**. Oxford: Oxford Science Publications, 1993. 464 p.
- 24 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: Wiley, 2001. 828 p.
- 25 MATSUDA, H.; AYABE, Y. Z. Zur theorie der Randles-Sevčik kathodenstrahl-polarographie. **Zeitschrift für Elektrochemie**, v. 59, p. 494-503, 1955.

26 SOUSA, D.; MACHADO, A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 7, p. 81-89, 2003.

27 BARKER, G. C.; GARDNER, A. W. Introduce pulse polarography. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 179-183, 1958.

28 BOND, A. M. **Modern polarographic methods in analytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1980. v. 4, 518 p.

29 BARBEIRA, P. J. S.; STRADIOTTO, N. R. Critérios para diagnóstico de mecanismo eletródicos utilizando a técnica polarográfica de pulso diferencial. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 192-199, 1993.

30 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006. 1026 p.

31 LINA, L.; PING, Z.; YAQI, C.; SHIFEN, M. High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection for simultaneous determination of monosaccharides and uronic acids. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 34, n. 10, p. 1371-1374, 2006.

32 ZHANG, S. J.; ZHANG, S. Y.; WANG, L.; ZHU, B. Studies on polysaccharide of *Rheum palmatum* L. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v. 18, n. 11, p. 679-681, 1993.

33 MEYER, A.; RABA, C.; FISCHER, K. Ion-pair RP-HPLC determination of sugars, amino sugars, and uronic acids after derivatization with p-aminobenzoic acid. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 11, p. 2377-2382, 2001.

34 SHANG, P.; YANG, T. H.; JIA, M.; MEI, Q. B.; ZHAO, W. M.; CAO, Z. X.; ZHAO, D. H. J. Experimental study of anti-tumor effects of polysaccharides from *Angelica sinensis*. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 9, p. 1963-1967, 2003.

35 GUO, X.; GAO, X.; YANG, X. B. Determination of content glucuronic acid and neutral sugar of acidic polysaccharide. **Chinese Journal of Biochemical Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 100-101, 2004.

36 COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1990. 143 p.

37 VERPOORTE, R.; SVENDSEN, A. B. **Chromatography of alkaloids: Part A: thin layer chromatography**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing, 1983. 503 p.

38 FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T.; POHLAND, C. **Ion chromatography**. Heidelberg: Hüthig, 1982. 203 p.

39 INCZÉDY, J. **Analytical applications of ion exchangers**. Oxford: Pergamon Press, 1966. 443 p.

- 40 SIGVARDSON, K. W.; ELIASON, M. S.; HERBRANSON, D. E. Determination of raffinose and lactobionic acid in ViaSpan by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 2, p. 227-231, 1996.
- 41 YE, J.; BALDWIN, R. P. Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 687, n. 1, p. 141-148, 1994.
- 42 LACOURSE, W. R. Origins of pulsed potential cleaning. In:_____. **Pulsed electrochemical detection in high performance liquid chromatography**. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 6-8.
- 43 JOHNSON, D. C.; LACOURSE, W. R. Pulsed detection of aliphatic compounds for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 589A-597A, 1990.
- 44 JOHNSON, D. C.; LA COURSE, W. R. Pulsed electrochemical detection at noble metal electrodes in liquid chromatography. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p. 367-380, 1992.
- 45 NEUE, U. D. **HPLC Columns: theory, technology and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 416 p.
- 46 KIRKLAND, J. J. **Modern practice of liquid chromatography**. New York: Wiley-Interscience, 1971. 454 p.
- 47 WEN-ZHI, L.; YOU-QIN, L. Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating/potential cycling method and its characterization. **Sensors and Actuators B**, v. 141, p. 147-153. 2009.
- 48 ZANG, X.; LIANG, X.; XU, M. Electrodeposit nano-copper oxide on glassy carbon electrode for simultaneous detection of guanine and adenine. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 42, p. 375-381, 2012.
- 49 ICERA, G.; DEIANA, S.; DESSI, A. Oxidation of D-galacturonic acid by Vanadium (V). **Inorganica Chimica Acta**, v. 120, n. 1, p. 49-51, 1986.
- 50 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, 2011. 20 p. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/sidog/arquivos/Cgcre/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 13 set. 2013.
- 51 CASELLA, I. G.; GATTA, M. Determination of electroactive organic acids by anion-exchange chromatography using a copper modified electrode. **Journal of Chromatography**, v. 912, n. 2, p. 223-233, 2001.

52 HU, Q.; TAN, L.; HENG, Z.; SU, X.; ZHANG, T.; JIANG, Z.; XIONG, X.
Quantification of sugars compounds and uronic acids in enzymatic hydrolysates of
lignocellulose using high-performance anion exchange chromatography with pulsed
amperometric detection. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 1, p. 2942-2947, 2012.