

SENSOR ELETROQUÍMICO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE CeO₂ PARA A ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES FENÓLICOS¹

ELECTROCHEMICAL SENSOR CONTAINING CeO₂ NANOPARTICLES FOR THE ANALYSIS OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS

Elvandi da Silva Júnior², Sergio Roberto Mortari³ e Luis Otavio Souza Bulhões⁴

RESUMO

A Nanociência e sua ampla divulgação no final do século passado, trouxe novas possibilidades para o mundo da ciência. Entre elas, a possibilidade de desenvolver sensores eletroquímicos nanoestruturados, os quais permitem identificar ou quantificar uma gama de substâncias e compostos, nas mais diversas amostras em um curto espaço de tempo. Neste contexto, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um sensor, contendo nanopartículas de CeO₂, imobilizadas em lâmina de vidro condutor, recoberto com ITO (filme de dióxido de estanho dopado com índio), para detecção de substâncias antioxidantes fenólicas, presentes em vinhos. Este sistema foi avaliado e otimizado usando técnicas eletroquímicas, como a voltametria cíclica e polarografia diferencial de pulso. Para a otimização utilizou-se soluções tampão de fosfato, com pH 7,2 e com soluções contendo ácido cafeico ou ácido gálico, a diferentes concentrações. Como resultado comprovou-se que o CeO₂ mimetiza a lacase na detecção de compostos fenólicos. O sensor desenvolvido foi considerado eficiente, com resposta rápida e linear, permitindo identificar e quantificar compostos fenólicos em amostras de vinho.

Palavras-chave: Sensor Nanoestruturado, Compostos Fenólicos, ITO, Lacase.

ABSTRACT

Nanoscience and its wide dissemination at the end of the last century, brought several new possibilities to the world of science. Among them, the possibility of developing nanostructured electrochemical sensors, which allow analyzing an immense range of substances and compounds, obtaining their characteristics, quantities and composition, in a short time. In this context, the present work deals with the development and testing of a sensor containing CeO₂ nanoparticles, immobilized in a conductive glass slide covered with ITO, for the detection of phenolic antioxidant substances present in wines. This system was obtained by chemical and electrochemical techniques, and its performance was evaluated using electrochemical measurements using cyclic voltammetry and differential pulse polarography. The tests were carried out in phosphate buffer solutions with pH 7.2 and solutions containing caffeic acid or gallic acid, at different concentrations. As a result, there was evidence that CeO₂ mimics the laccase for the detection of phenolic compounds, using an electrochemical technique. The developed sensor was considered efficient, linear with fast response, allowing to recognize the different phenolic compounds investigated.

Keywords: Nanostructured Sensor; Phenolic Compounds, ITO, Laccase.

¹ Trabalho de Doutorado - Universidade Franciscana.

² Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Universidade Franciscana. E-mail: elvandi@gmail.com

³ Professor colaborador - Universidade Franciscana. E-mail: mortari@ufn.edu.br

⁴ Orientador - Universidade Franciscana. E-mail: losbulhoes@gmail.com

INTRODUÇÃO

Há um longo tempo, fala-se e são frutos de estudo, as benesses à saúde humana, causadas pela ingestão diária e moderada de vinho, ante a composição da bebida. Os compostos fenólicos presentes no vinho, apresentam efeitos benéficos para a saúde, como ações antimicrobianas, antivirais e, principalmente, antioxidantes, protegendo o organismo contra a ação dos radicais livres, que se formam durante os processos celulares e são responsáveis, por exemplo, pelo envelhecimento precoce e por doenças cardiovasculares (PILAR *et al.*, 2012). As substâncias antioxidantes alteram o metabolismo lipídico, prevenindo e/ou retardando a “oxidação de lipídios, proteínas ou de outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia” (GRANATO; NUNES, 2016). As propriedades antioxidantes, aumentam assim a fração de HDL (*High Density Lipoprotein*, ou lipoproteína de alta densidade), dito colesterol bom, e diminuem o LDL (*Low Density Lipoprotein*, ou lipoproteína de baixa densidade), dito colesterol ruim (ZOECKLEIN *et al.*, 2001, RIZZON; MIELE, 2001).

Para determinar a ocorrência e quantificar os compostos fenólicos, indústrias e instituições de pesquisa utilizam métodos e equipamentos clássicos, como a cromatografia à líquido com detector de massa (LC-MS), biossensores, ensaios espectrofotométricos que empregam reagentes cromóforos específicos, como o Folin-Ciocalteu, (GRANATO; NUNES, 2016). A aquisição e manutenção destes equipamentos apresentam um custo elevado, não são portáteis, devendo permanecer em um local fixo. Além disso, requerem um tempo de resposta médio a moderado, podendo ser de vários minutos, resultando no processamento de poucas amostras/hora (GRANATO; NUNES, 2016).

A pesquisa contínua acerca de novos compostos e interações, principalmente no campo da nanociência, o desenvolvimento de novas técnicas e instrumentos baseados em princípios físicos e químicos, torna possível cada vez mais quantificar analitos em concentrações muito baixas, na ordem de ng.g^{-1} (BARROSO, 2020). Também, permite a obtenção de respostas aos testes em poucos segundos, com equipamentos de tamanhos menores, portáteis, possibilitando a realização de testes em qualquer lugar, a qualquer hora e sem a necessidade de condições controladas de um laboratório (PICÓ, 2015;).

Há um crescente interesse entre a comunidade acadêmica e industrial, nos sensores de detecção nanoestruturados. Isso ocorre pelas vantagens que apresentam, como bom desempenho e processamento, baixos custos de fabricação e miniaturização, arquitetura simples e por possibilitarem o monitoramento químico em tempo real (THAKKAR *et al.*, 2020).

A partir dessa contextualização, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e otimizar um sensor nanoestruturado para a detecção de compostos fenólicos em vinhos, formado por um substrato de ITO (filme de dióxido de estanho dopado com índio) e um filme de CeO_2 . Neste sistema técnicas químicas e eletroquímicas foram empregadas e seu desempenho foi avaliado com o uso de medidas potenciodinâmicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados no desenvolvimento do sensor nanoestruturado, foram produtos já disponíveis na indústria química, de fácil consecução e manipulação. Assim, usou-se como substratos ITO e Nitrato de Cério, sendo deste último obteve-se nanopartículas de CeO_2 .

Para a preparação do substrato, utilizou-se uma lâmina de ITO (Donnelly), com condutividade eletrônica de $20 \Omega \text{ cm}^{-1}$, cortada em peças de 3,0 cm x 1,5 cm, cuidadosamente limpas em um banho ultrassônico com detergente neutro por 20 minutos. O detergente residual das lâminas foi removido em duas etapas: na primeira, foi efetuada a lavagem com água corrente purificada por 10 segundos; na segunda, utilizou-se sonicação, também em água purificada por 20 minutos (PIROVANI, 2019).

As nanopartículas de CeO_2 foram sintetizadas utilizando o método Pechini ou método dos precursores poliméricos (CHEN; CHANG, 2005). Solubilizou-se 2,5 g de Nitrato de Cério Hexa-Hidratado ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em uma mistura de etililenoglicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) e ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) a 80°C com agitação magnética (2000 rpm). Após a dissolução, foi adicionado Hidróxido de Amônio (NH_4OH) e o material resultante foi levado para tratamento térmico a 550°C durante 3h. Aguardou-se o resfriamento do pó resultante até a temperatura ambiente, armazenando-o em uma dispersão de ácido acético (20% m/m).

Para a preparação dos eletrodos de ITO/ CeO_2 , 2% v/v da dispersão das nanopartículas foi diluído em água ultrapura. Em seguida 3 μL dessa mistura foi depositada sobre a superfície do eletrodo e deixada para secar durante 2 dias, à temperatura ambiente. As medidas eletroquímicas foram realizadas em solução tampão fosfato pH 7,2, com o potencial variando no intervalo de 0 a 1 V. O eletrodo de referência utilizado foi de Ag/AgCl (1 mol L^{-1} KCl). Utilizou-se a voltametria de pulso diferencial, com calibração externa, na faixa de concentrações de 20 a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A estrutura do eletrodo de nanopartículas de ITO/ CeO_2 foi analisada por duas técnicas analíticas. A primeira foi a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo DSM 960. E a segunda foi a espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS), onde o equipamento utilizado foi o microscópio Zeiss, modelo Sigma 300, acoplados a um sistema de espectroscopia de energia dispersiva.

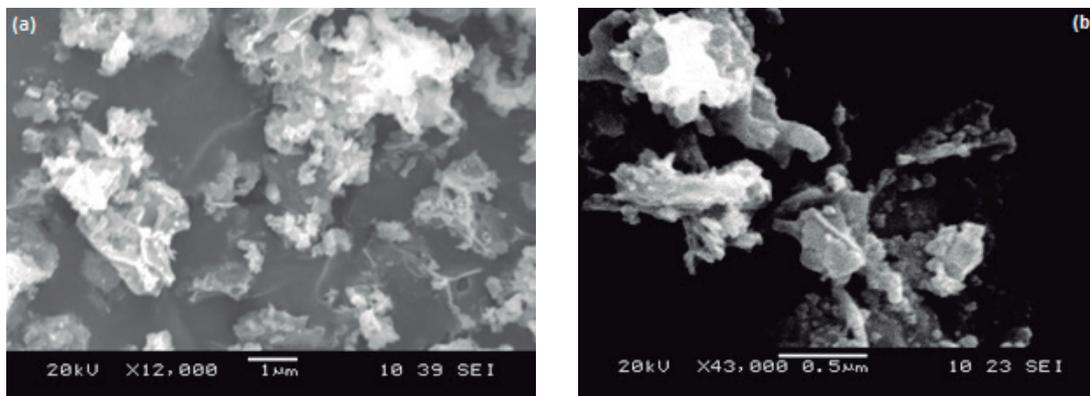
As nanopartículas de CeO_2 foram analisadas por difração de raios X (DRX) e o equipamento utilizado foi o de Difração de raios-X da marca Bruker, modelo D2. O tamanho das nanopartículas foi medido por espalhamento de luz no aparelho Zetasizer®. A estabilidade das nanopartículas, por sua vez, foi analisada por medidas de potencial zeta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises foram divididas em três partes: o pó de CeO_2 , a superfície do substrato ITO e a superfície do eletrodo de ITO/ CeO_2 .

A caracterização do pó de CeO_2 foi realizada por MEV (Figura 1) e EDS (Figura 2). Na Figura 1, foi possível visualizar partículas aglomeradas, com tamanhos menores de 50 nm. Os dados de tamanho de partícula do MEV foram comparados com os dados de DRX, pela equação de Scherrer.

Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura da amostra do pó de CeO_2 (a, b) com diferentes magnitudes



Fonte: Construção do Autor.

Através da técnica de EDS, comprovou-se a presença de Ce proveniente do pó de CeO_2 , conforme mostra a Figura 2. O sinal de ouro (Au) e de Carbono (C) que aparecem na Figura 2, tem origem no preparo da amostra, pela metalização e recobrimento, respectivamente (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A segunda parte avaliada, foi a superfície do substrato ITO, também obtida pelas técnicas de MEV (Figura 3) e EDS (Figura 4). Pela imagem na Figura 3 verifica-se a homogeneidade da superfície do ITO.

Figura 2 - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia da amostra de pó de CeO_2

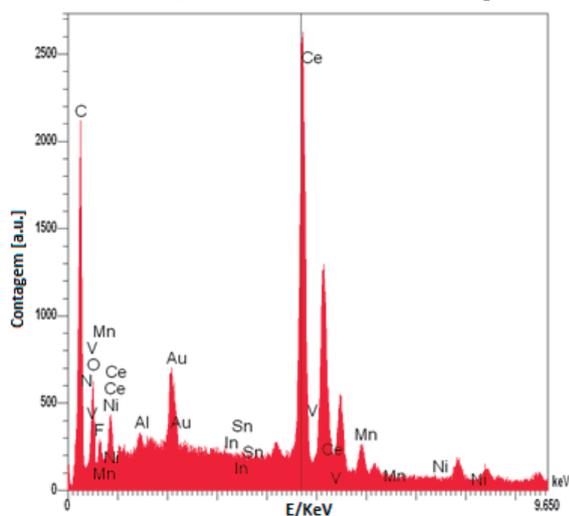
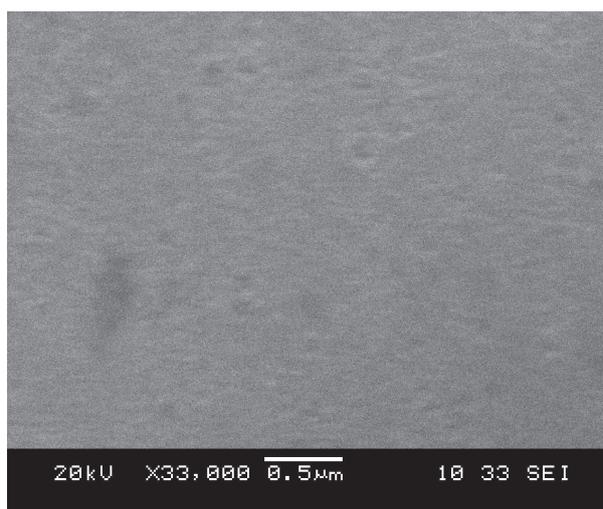


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície do substrato ITO



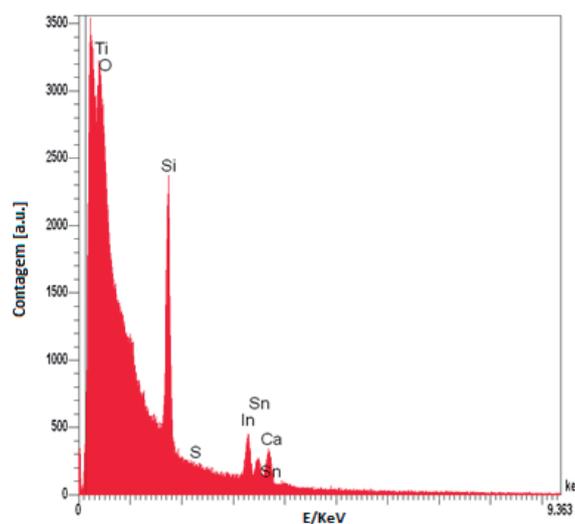
Fonte: Construção do Autor.

O filme de dióxido de estanho dopado com índio - ITO, utilizado como substrato neste trabalho, foi caracterizado pela técnica de EDS, apresentado na Figura 4. Identifica-se os elementos

presentes no ITO, o estanho (Sn) e o índio (In), além dos elementos presentes no vidro, sílica (SiO_2) e o cálcio (CaO).

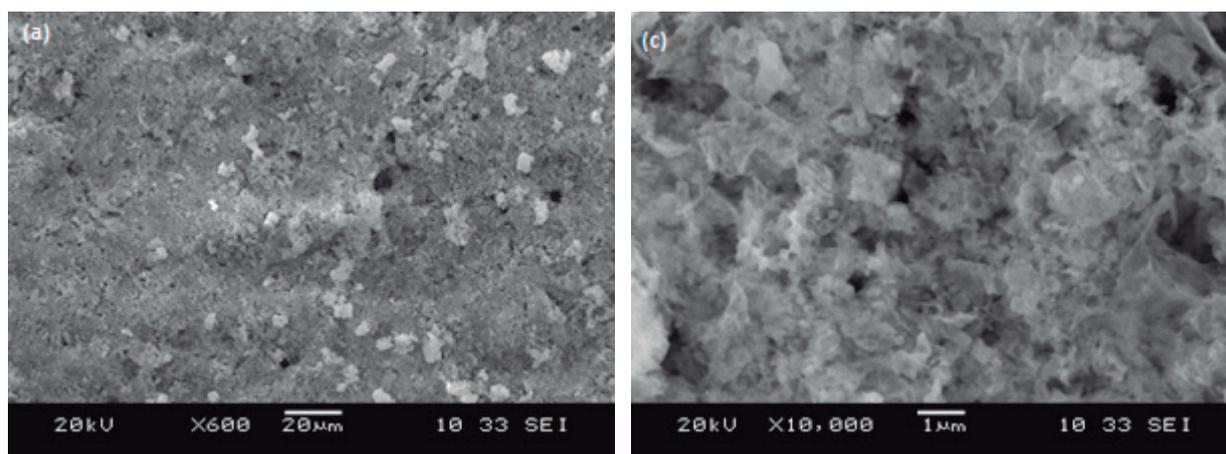
O filme de CeO_2 sobre a superfície do substrato ITO foi caracterizado por MEV e as imagens, com diferentes magnitudes, podem ser visualizadas na Figura 5. Pela imagem verifica-se a porosidade do material assim como rugosidade, características que conferem uma maior sensibilidade ao sensor.

Figura 4 - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia do substrato ITO.



Fonte: Construção do Autor.

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (a, c) da superfície do sensor ITO CeO_2 para detecção substâncias antioxidantes diversas



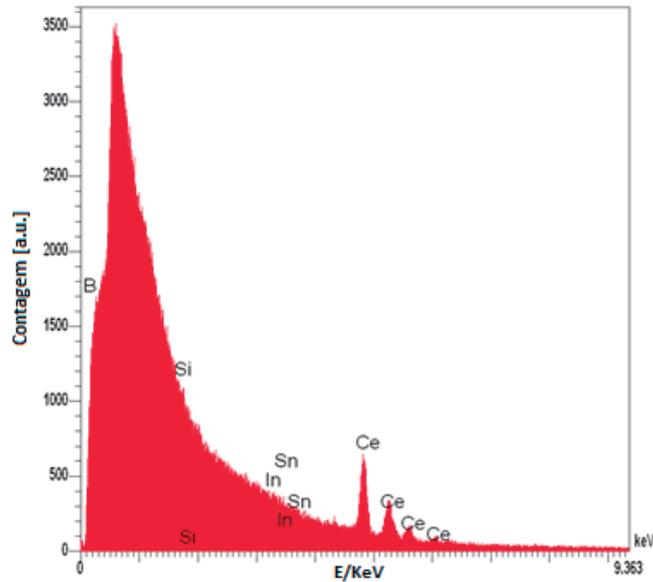
Fonte: Construção do Autor.

Pelo EDS da Figura 6 identifica-se os constituintes presentes na composição do filme (ITO/ CeO_2), depositado na superfície do eletrodo.

O difratograma de raios X do CeO_2 é mostrado na Figura 7. Os picos de difração, em $28,5^\circ$, $33,1^\circ$, $47,5^\circ$, $56,3^\circ$, $59,1^\circ$, $69,4^\circ$, $76,7^\circ$, $79,1^\circ$ e $88,4^\circ$, indexados como os planos 111, 200, 220, 311, 222, 400, 331, 420 e 422, correspondem ao CeO_2 cristalino, segundo os dados da ficha ICDD de nº 00-043-1002 (Cerianita/

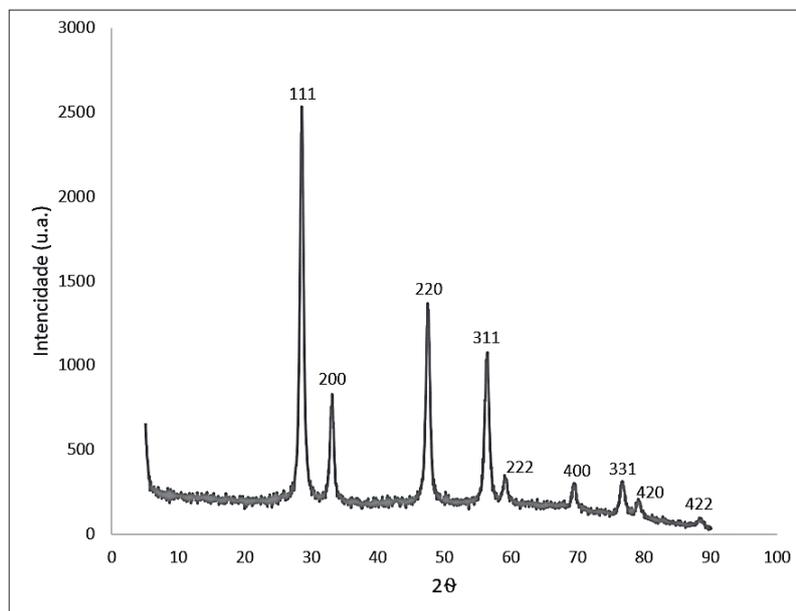
CeO₂), pertencentes ao grupo espacial $Fm\bar{3}m$. Os picos bem agudos e intensos indicam que estes óxidos também possuem elevada cristalinidade.

Figura 6 - Espectroscopia de raios X por dispersão em energia da superfície do eletrodo de ITO/CeO₂ para detecção de substâncias antioxidantes diversas



Fonte: Construção do Autor.

Figura 7 - Difratoograma de raios X do CeO₂



Fonte: Construção do Autor.

Devido as condições utilizadas para a de obtenção da amostra, numa rampa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹, esta apresenta uma menor largura de pico a meia altura, indicando maior aglomeração das partículas e maior cristalinidade. Para o cálculo do tamanho do cristalito, foi utilizada a equação de Scherrer, conforme a Equação (1):

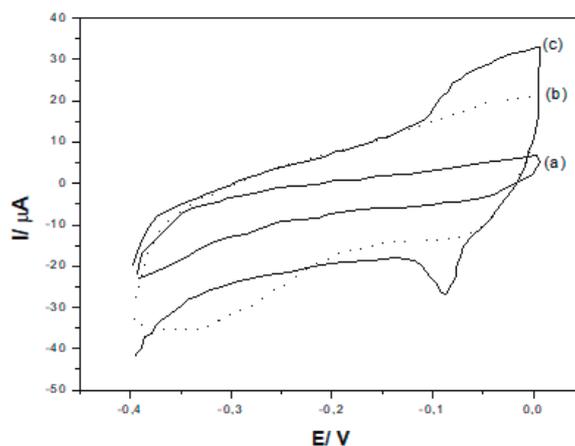
$$d = \frac{0,9\lambda}{FWHM \cos\theta} \quad (1)$$

Onde d (nm) é o tamanho do cristalito, λ (nm) o comprimento de onda incidente (CuK α : 0,15406 nm), 0,9 constante dependente da forma dos cristalitos; FWHM a largura do pico na meia altura e θ o ângulo de Bragg.

A análise do pó de CeO₂ por difração de raios X apresentou os picos característicos do Óxido de Cério (IV), informação que foi confirmada pela ficha ICDD de nº 00-043-1002. A partir da equação de Scherrer, foi possível verificar que a amostra obtida tem um cristalito da ordem de 18 nm. Assim, pode-se afirmar que os Óxidos de Cério (IV) obtidos neste estudo apresentaram tamanhos aproximados de cristalitos semelhantes aos descritos na literatura (CHEN; CHANG, 2005; KETZIAL; NESARAJ, 2011; SHARPE *et al.*, 2013; KUMAR; SELVARAJAN; MUTHURAJ, 2013).

A resposta do eletrodo de ITO, modificado com CeO₂, foi obtido pelo comportamento de substâncias antioxidantes como o ácido gálico e cafeico. Na região de -0,4 a 0,0 V, não há qualquer processo redox, quando o eletrodo foi polarizado em solução com tampão fosfato pH 7,2, conforme a Figura 8.

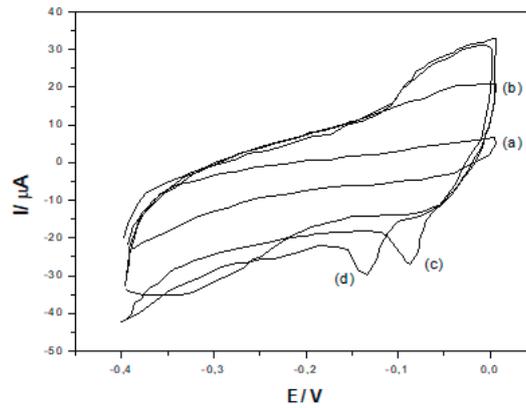
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos a 0,1 Vs⁻¹ em solução tampão fosfato pH 7,2 (a) eletrodo de ITO, (b) eletrodo de ITO/CeO₂, (c) solução 2 mmol L⁻¹ de ácido gálico



Fonte: Próprio autor.

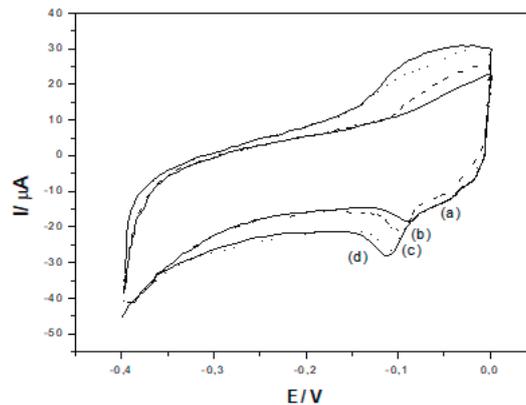
O sistema eletrodo de ITO contendo CeO₂ mostrou um perfil semelhante, sem qualquer atividade eletroquímica na ausência de ácido cafeico ou gálico. A adição de ácido gálico ou cafeico, conforme os voltamogramas representados nas Figuras 9 a 11 mostraram um pico de redução em -0,08 V para o ácido gálico e em -0,13 para o ácido cafeico. Esta resposta foi atribuída a oxidação do ácido gálico e cafeico pelo óxido de cério.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos a $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ em solução tampão fosfato pH 7,2 (a) eletrodo de ITO, (b) eletrodo de ITO/CeO₂, (c) solução 2 mmol L^{-1} de ácido gálico, (d) solução 2 mmol L^{-1} de ácido cafeico



Fonte: Construção do Autor.

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos a $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ em solução tampão fosfato pH 7,2 com eletrodo de ITO/CeO₂ e soluções de ácido gálico (a) $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, (b) $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, (c) $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ e (d) $0,35 \text{ mmol L}^{-1}$



Fonte: Construção do Autor.

A corrente de redução foi proporcional a quantidade dos ácidos presentes em solução, conforme as Figuras 11 a 15. Na Figura 11 observou-se uma dependência da corrente de redução com o pH, sendo a maior corrente obtida em pH 7,2, retratado na Figura 12. Esta foi a condição escolhida para a análise com o tampão fosfato assegurando a estabilidade eletrolítica necessária durante o teste.

Na Figura 13 observou-se a curva de calibração com as correntes de pico dos voltamogramas cíclicos, no melhor pH (7,2) para o sistema (Figuras 11 e 12).

Os voltamogramas de pulso diferenciais indicaram que a redução do ácido cafeico ocorre em $-0,14 \text{ V}$, evidenciando um processo catalítico e se observa nas Figuras 14 e 15, uma linearidade de até $40 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos do ácido gálico 0,10 mmol L⁻¹ a 0,1 V/s com eletrodo de ITO/CeO₂ em soluções tampão fosfato. pH 3,5; 5; 6; 7,2 e 8,0

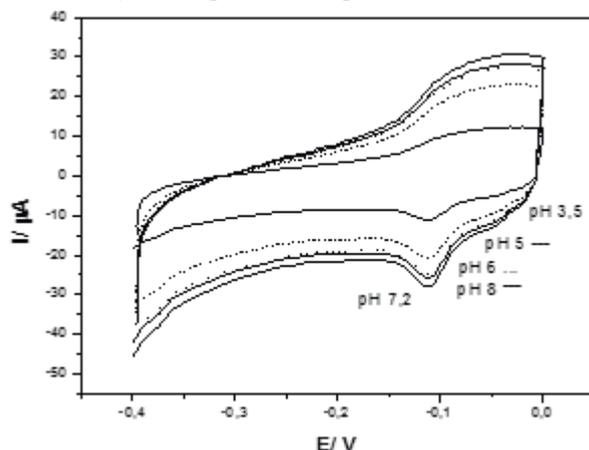
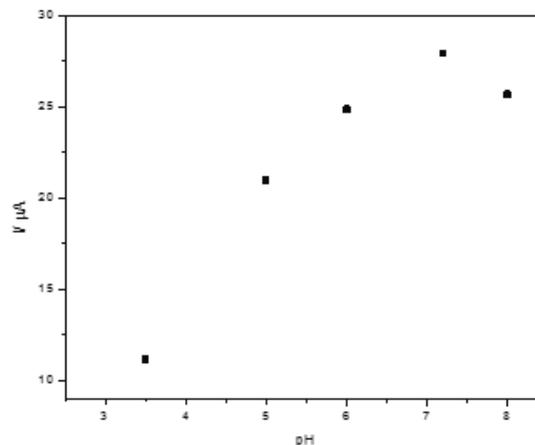


Figura 12 - Corrente de pico catódica do ácido gálico em função do pH



Fonte: Construção do Autor.

Figura 13 - Curva de calibração com as correntes de pico dos voltamogramas cíclicos obtidos a 0,1 V s⁻¹ com o eletrodo de ITO/CeO₂ para soluções de ácido gálico com diferentes concentrações em solução aquosa de tampão fosfato pH 7,2

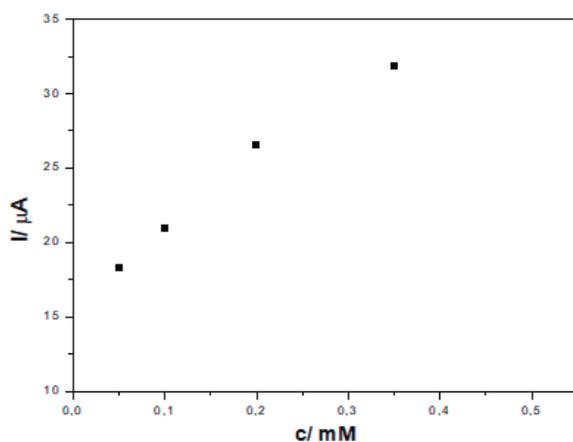
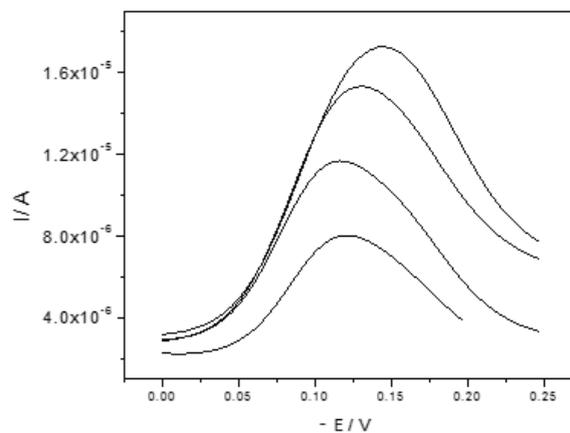
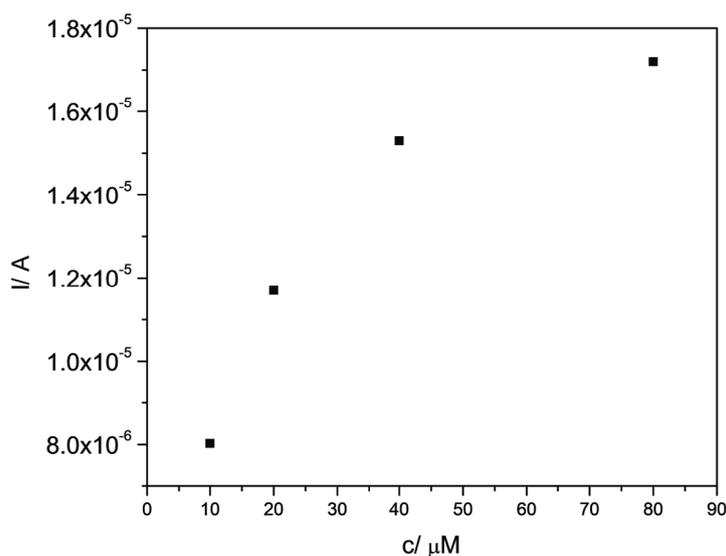


Figura 14 - Eletrodo de ITO/CeO₂, voltamogramas de pulso diferencial para soluções aquosas de ácido cafeico em tampão fosfato pH 7,2 a diferentes concentrações



Fonte: Construção do Autor.

Pelas Figuras 14 e 15, verifica-se que o eletrodo de ITO/CeO₂ foi estável e as medidas têm alta reprodutibilidade. Em um próximo momento, será avaliado o efeito de interferentes e realizadas as medidas com diferentes amostras de vinhos.

Figura 15 - Eletrodo de ITO/CeO₂, curva de calibração da corrente de pico em função da concentração do ácido cafeico.

Fonte: Próprio autor.

Conforme os resultados da voltametria cíclica, o pico de oxidação do ácido cafeico e gálico só aparecem na presença de partículas de CeO₂, evidenciando a característica que é verificada com a lacase (RAJESHKUMAR; NAIK, 2018). As correntes obtidas com o eletrodo ITO/CeO₂ nos voltamogramas, em soluções com ácido cafeico em igual concentração, é de mil vezes maior que a obtida em eletrodos com lacase imobilizada (JAROSZ-WILKOŁAZKA; RUZGAS; GORTON, 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, tem-se que foi possível, a partir de materiais e insumos mais simples já disponíveis na indústria química, desenvolver, caracterizar e calibrar (com os compostos fenólicos presentes em vinhos) um sensor, contendo nanopartículas de CeO₂ depositadas sobre o eletrodo de ITO. Os testes realizados em soluções contendo somente água deionizada, água deionizada com ácido cafeico a diferentes concentrações e água deionizada com ácido gálico a diferentes concentrações, demonstraram uma ótima resposta do eletrodo voltamétricos para a detecção de compostos fenólicos.

Portanto, este sensor apresenta-se como uma nova ferramenta, bastante interessante, principalmente pelo seu baixo custo, tempo de resposta rápido e tamanho portátil.

REFERÊNCIAS

BARROSO, A. F. Á. A. **Nanobiossensores: conceito e aplicações na avaliação de parâmetros bioquímicos e diagnóstico precoce de patologias**. 2014 66 f. Dissertação (Mestrado In-tegrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 2009. Disponível em: <https://bit.ly/2XzyGgp>. Acesso em 30 out. 2020.

CHEN, H.; CHANG, H. Synthesis of nanocrystalline cerium oxide particles by the precipitation method. **Ceramics International**. v. 31, n. 6, p. 795-802, 2005.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Ed. EDIPUCRS, Porto Alegre, 2007.

GRANATO, D.; NUNES, D. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.

JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 238-241, 2004.

KETZIAL, J. J.; NESARAJ, A. S. Synthesis of CeO₂ nanoparticles by chemical precipitation and the effect of a surfactant on the distribution of particles sizes. **Journal of Ceramic Processing Research**. v. 12, n. 1, p. 74-79, 2011.

KUMAR, E.; SELVARAJAN, P.; MUTHURAJ, D. Synthesis and Characterization of CeO₂ Nanocrystals by Solvothermal Route. **Materials Research**. v. 16, n. 2, p. 269-276, 2013.

PICÓ, Y. **Análise química dos alimentos**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2015.

PILAR, M.; NAVAJAS, S.; AVIZCURI, J. M.; FERREIRA, V.; ZURBANO, P. F. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. **Food Chemistry**. v.13, p. 1484-1493, 2012.

PIROVANI, L. L. **Preparação e caracterização de filmes de óxido de estanho dopados com flúor para aplicação como óxido condutor transparente**. 2017. 83 f. Dissertação (Pro-grama de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2017. Disponível em <https://bit.ly/3sxeI4a>. Acesso em 15 abr. 2019.

RAJESHKUMAR, S.; NAIK, P. Synthesis and biomedical applications of Cerium oxide nanoparticles - A Review, **Biotechnology Reports**, v. 17, p. 1-5, 2018.

RIZZON, L.; MIELE, A. **Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha**. *Ciência Rural*, 31, 893, 2001.

SHARPE, E.; FRASCO, T.; ANDREESCU, D.; ANDREESCU, S. Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac). **Analyst**. v. 138, p. 249-262, 2013.

THAKKAR, S., DUMÉE, L. F., GUPTA, M., SINGH, B. R., YANG, W. Nano-enabled sensors for detection of arsenic in water. **Water Research**, v 188, p. 116538, 2020.

ZOECKLEIN, B.; FUGELSANG, K.; GUMP, B.; NURY, F. **Análisis y Producción de Vino**. Acribia. Zaragoza, Espanha, 2001.