

Utilização de Grafite Funcionalizado em Eletrodos de Pasta de Carbono para Detecção Simultânea de Ácido Ascórbico e Ácido Fólico em Amostra de Urina

Érica de Castro Ferro, Ana Caroline da Silva, Gilberto José de Arruda*

Curso de Química Industrial, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Dourados Itahum Km 12, Caixa postal 351, CEP: 79804-970, Dourados, MS.

Article history: Received: 18 November 2015; revised: 14 February 2016; accepted: 05 May 2016. Available online: 30 June 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v8i3.820>

Abstract: This work describes the development of a sensor, using functionalized graphite in basic medium, to simultaneously detect ascorbic acid and folic acid. The graphite was functionalized in solution of NaOH 4 mol L⁻¹, before its use in the preparation of the carbon paste electrode. The electrochemical techniques of cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry were used to characterize the redox process, which occurs in the working electrode's surface. The electrochemical impedance spectroscopy was used to characterize the influence of the functionalization in the electrical properties of the electrode-solution interface. The obtained results showed that the functionalization increases the electrocatalytic activity of the graphite, verified by an increase of about 1.8x in the peak of oxidation current of both ascorbic and folic acid. The increase in the electrocatalytic activity of the functionalized graphite was due to a decrease in the resistance to charge transfer and an increase of the standard rate constant of reaction. The obtained results showed that carbon paste electrodes utilizing functionalized graphite can be used in simultaneous detection of ascorbic and folic acid. The sensor has been used successfully in the simultaneous detection of ascorbic acid and folic acid in human urine samples contaminated artificially. The results showed a recovery of 96-101% and a relative standard deviation less than 3%.

Keywords: ascorbic acid; folic acid; chemical functionalization; carbon paste electrode; detection urine

1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) ou vitamina C, com nome de acordo com a IUPAC: (2R)-2-[(1S)-1,2-dihidroxiethyl]-3,4-dihidroxi-2H-furano-5-ona, fórmula molecular C₆H₈O₆ e é um antioxidante (Figura 1A). O AA apresenta grande importância para sistemas bioquímicos, farmacológicos, eletroquímicos, processamento de alimentos entre outros, sendo suas propriedades redox uma das características químicas de maior interesse. É conhecido como promotor de diversos processos bioquímicos e fisiológicos. Dentre esses processos pode se destacar: formação de colágenos, prevenção do envelhecimento, reparação de tecidos e na imunidade do organismo [1]. As moléculas do AA sofrem oxidação antes que outras moléculas se oxidem, impedindo e protegendo essas outras moléculas de oxidarem. Devido as suas propriedades físico-químicas em relação a facilidade em oxidar a sua conservação é favorecida em maio ácido [2].

O ácido fólico (AF) é uma vitamina

hidrossolúvel do complexo B conhecida como vitamina B₉, pertencente ao grupo dos folatos [3]. É uma vitamina essencial na multiplicação celular de todos os tecidos e indispensável à síntese do DNA e na divisão celular. A carência do AF afeta diretamente todos os tecidos do corpo. Além disso, a deficiência de ácido fólico está associada às doenças crônicas não transmissíveis, complicações na gestação e doenças neurodegenerativas [4]. A elevação de AF no organismo é considerada como fator de risco para a ocorrência de inúmeros casos, como demência, doença de Alzheimer, fratura óssea, câncer e doenças cardiovasculares [5]. O AF é um composto de ácido L-glutâmico que é acoplado por meio de seu grupo α-amino ao grupo carboxila do ácido p-amino benzoico, o qual, por sua vez, está ligado a uma 2-amino-4-hidroxipteridina com nome de acordo com IUPAC: 4-[(pteridina-6-ilmetil)amino]ácido benzoico e fórmula molecular C₁₉H₁₉N₇O₆ (Figura 1B) [6].

Eletrodos de pasta de carbono (EPC) podem ser facilmente preparados, possuem melhor

*Corresponding author. E-mail: arruda@uems.br

reprodutibilidade, estabilidade e custo menor, quando comparados a outros eletrodos e são utilizados para detectar processo redox de compostos eletroativos [7]. Os métodos cromatográficos estão bem estabelecidos sensíveis e apresentam alta especificidade. Entretanto necessitam de equipamento com custo elevado e pode envolver várias etapas em seus procedimentos, incluindo separação e derivatização. Os EPCs com ou sem modificação e associados a várias técnicas voltamétricas de pulso, estão sendo utilizados com frequência em análises quantitativas de várias espécies de compostos, em diferentes áreas: farmacêutica, ambiental e alimentícia, com excelente seletividade e sensibilidade analítica [8, 9].

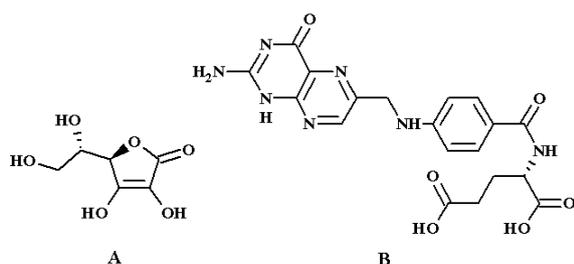


Figura 1. Fórmula estrutural AA (A) e AF (B).

As técnicas voltamétricas e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) tem sido utilizadas para detecção e caracterização da superfície eletrodo-solução, respectivamente. A voltametria cíclica (VC) a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações sobre processos eletroquímicos, que ocorrem na interface eletrodo-solução. A VC fornece informações sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética de reações de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas [10]. Os potenciais e as correntes de pico catódico e anódico, são parâmetros eletroquímicos importantes para a caracterização de um sistema quanto à reversibilidade e a análise da ocorrência de reações químicas [11]. A voltametria de pulso diferencial (VPD) fornece vantagem de simplicidade, alta sensibilidade, baixo custo, análise direta e relativamente mais rápidas quando comparados com as técnicas cromatográficas [12]. A EIE é uma técnica de caracterização elétrica bastante sensível às modificações que ocorrem na interface eletrodo-solução, e permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos, fornecendo informações da constante de velocidade da reação e resistência a transferência de carga entre outros [13].

Neste estudo, foi desenvolvido um novo sensor a

base de grafite funcionalizado quimicamente em meio básico, para detectar simultaneamente o AA e AF. A funcionalização química do grafite foi realizada utilizando uma solução de NaOH 4 mol L⁻¹, antes da incorporação ao eletrodo de trabalho. Para avaliar a influência da funcionalização sobre a corrente e potencial de pico de oxidação de ambos os compostos, foi utilizado a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). A EIE foi utilizada para caracterizar a interface eletrodo-solução.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Soluções

Como eletrólito de suporte foi utilizado o tampão fosfato. O tampão foi preparado pela mistura de soluções de hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄) e dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) com concentrações de 0,02 mol L⁻¹, o pH ajustado para 7,0 com com uma solução de Na₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹. Todas as soluções do tampão foram preparadas com reagentes de grau analítico. As soluções de estoque do AA e AF foram preparadas a partir de um padrão analítico Sigma, com pureza de 99,0% e 97,0%, respectivamente, em água destilada, obtendo-se uma solução na concentração de 28,39 mol L⁻¹ de AA e 1,94 mol L⁻¹ de AF. A partir das soluções de estoque, foram realizadas diluições no próprio tampão para obter as concentrações utilizadas nesse estudo. As medidas de EIE foram realizadas utilizando uma solução de 5 mmol L⁻¹ de K₃[(Fe(CN)₆] em KCl 0,5 mol L⁻¹.

Funcionalização

A funcionalização do grafite (Aldrich) foi realizada utilizando 5g de grafite em pó em 100 mL de uma solução de NaOH 4 mol L⁻¹ (reagente de pureza analítica - VETEC) e em agitação (8 rpm) durante 4h. Lavou-se com água destilada até pH próximo à neutralidade, filtrou-se em membrana politetrafluoroetileno PTFE (Whatman, Inc.) com tamanho de poros de 0,45 µm. O precipitado obtido foi seco em atmosfera ambiente em estufa à 125 °C durante 12 horas.

Preparação do eletrodo de trabalho

Os eletrodos de trabalho de pasta de carbono sem funcionalização (EPC) e funcionalizado (EPC-F) foram preparados utilizando: 75% de grafite e 25% de nujol (massa/massa). A mistura obtida foi homogeneizada

durante 40 minutos em um cadinho de vidro. A pasta obtida para cada eletrodo de trabalho foi inserida em uma seringa de insulina, com área geométrica de 0,054 cm².

Determinação simultânea de AA e AF em amostras de urina humana

A amostra de urina foi coletada de pessoas do próprio laboratório, em seguida a amostra foi filtrada em algodão para remoção de partículas sólidas. A contaminação a amostra foi realizada adicionando 1,25; 2,50 e 3,75 mg de AA e AF para cada mL de urina humana. Após contaminação alíquotas foram adicionadas em 5 mL de tampão PB, para realizar as medidas eletroquímicas.

Equipamentos

As medidas voltamétricas: voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VDP) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em um potenciostato-galvanostato AUTOLAB PGSTAT-128N interfaciado a um computador e gerenciado pelo software NOVA 1.10 para a aquisição e tratamento de dados. Os ajustes de pH de todas as soluções utilizadas foram realizados utilizando um pHmetro HANNA Instruments HI 3221. O eletrodo de referência utilizado foi o Ag/AgCl e como eletrodo auxiliar foi utilizado o de fio de platina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da área reativa

Para reações reversíveis a área reativa do eletrodo de trabalho, pode ser determinada de acordo com a equação de Randles-Sevick [14], $I_p =$

$\pm 2,687 \times 10^5 (n)^{3/2} A(D)^{1/2} C(V)^{1/2}$, onde: I_p = corrente de pico em Amperes (A). A = área reativa do eletrodo em cm². D = coeficiente de difusão de $K_3[Fe(CN)_6]$ = $6,39 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹. C = concentração do reagente na solução em mol cm³: neste caso 5×10^{-3} mol L⁻¹. n = número de elétrons envolvidos na reação, neste caso $n = 1$. v = velocidade de varredura em V s⁻¹. Para determinar a área reativa dos eletrodos de trabalho, obteve voltamogramas cíclicos utilizando uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5×10^{-3} mol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ (Figura 2 e Tabela 1). A área reativa dos eletrodos EPC e EPC-F foram determinadas utilizando o valor M apresentado na Tabela 1. A utilização de grafite funcionalizado na preparação do eletrodo de trabalho provoca aumento na corrente de pico do processo redox Fe^{3+}/Fe^{2+} , aumentando a área reativa do eletrodo EPC-F quando comparado ao EPC (Tabela 1). Esses resultados mostram que a funcionalização do grafite com NaOH, aumenta a atividade eletrocatalítica do grafite.

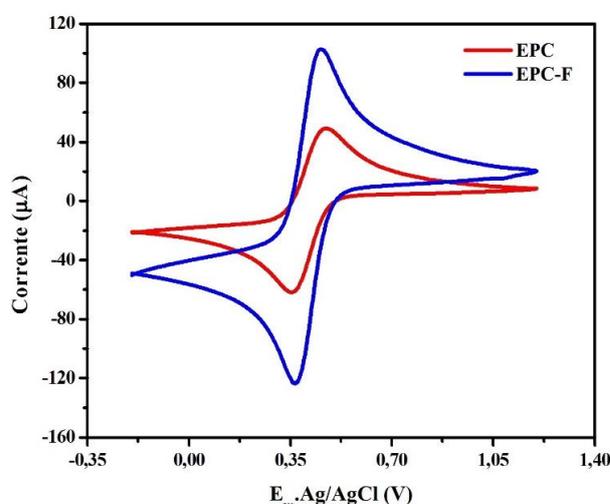


Figura 2. VCs obtidos utilizando EPE e EPC-F em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5×10^{-3} mol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ e $v = 100$ mV s⁻¹.

Tabela 1. Valores de E_p e I_p , média e área reativa dos eletrodos de trabalho.

Eletrodo	E_p (V)		I_p (µA)		M	Área (cm ²)
	E_{pa}	E_{pc}	I_{pa}	I_{pc}		
EPC	0,472	0,355	58,214	-58,668	58,441	0,055
EPC-F	0,452	0,369	121,66	-116,55	119,11	0,110

E_{pa} = potencial de pico anódico. E_{pc} = potencial de pico catódico.

I_{pa} = corrente de pico anódico. I_{pc} = corrente de pico catódico. $M = (I_{pa} + I_{pc})/2$.

Estudos de EIE

Estudos de EIE foram realizados para avaliar a utilização de grafite funcionalizado na preparação de eletrodos de pasta de carbono nas propriedades elétricas

da interface eletrodo-solução. As propriedades elétricas avaliadas foram: resistência da solução (R_s), resistência a transferência de carga (R_{tc}), capacitância de dupla camada (C_{dc}), e a constante de velocidade heterogênea

padrão (k^0 ou k^0_{app}). Os experimentos de EIE foram realizados utilizando uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ com concentração de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e como eletrólito de suporte foi utilizado o KCl com concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas em um potencial de circuito aberto (OCP). Os espectros obtidos de EIE estão apresentados na Figura 3. Os dados foram modelados utilizando o circuito equivalente de Randles modificado, $[R_s(C_{dc}[R_{tc}Z])]$, com uma impedância de Warburg Z_w (que leva em consideração o controle dominado por transporte de massa), resultante da difusão das espécies Fe^{3+}/Fe^{2+} para a superfície do eletrodo [15]. Os valores obtidos, após ajuste estão apresentados na Tabela 2.

Os valores apresentados na Tabela 2 mostraram que a utilização de grafite funcionalizado na preparação dos eletrodos provoca alterações nos parâmetros: R_s , R_{tc} e C_{dc} dos eletrodos EPC e EPC-F, decréscimo em aproximadamente 2x, decréscimo de 5,7x e aumento de 2,5x, respectivamente. É observado um decréscimo em R_s entre os eletrodos EPC e EPC-F, esse decréscimo, provavelmente esteja relacionado ao aumento de mobilidade dos íons presente na solução, uma vez que

na funcionalização ocorre a incorporação de grupos hidroxilas na superfície do grafite [16]. Em relação aos valores obtidos para R_{tc} , observa-se um decréscimo significativo quando grafite funcionalizado é utilizado na preparação do eletrodo (EPC-F). Isso provavelmente esteja relacionado as propriedades condutoras do grafite funcionalizado, que é maior em relação ao grafite sem funcionalização [17]. O aumento observado em C_{dc} pode ser atribuído a aumento na área eletroativa dos eletrodos, onde foi observado um aumento na área reativa.

As constantes de velocidade heterogênea padrão, foram determinadas usando a relação $k^0_{app} = RT/n^2F^2AR_{tc}C$, em que R representa a constante universal dos gases, A área reativa do eletrodo, T a temperatura absoluta, n o número de elétrons envolvidos na reação do eletrodo, F a constante de Faraday, e C a concentração das espécies na solução [18]. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 2. Estes valores mostram que a utilização de grafite funcionalizado na preparação do eletrodo aumenta o valor de k^0_{app} em 2,8x, facilitando a reação do par redox do Fe^{3+}/Fe^{2+} .

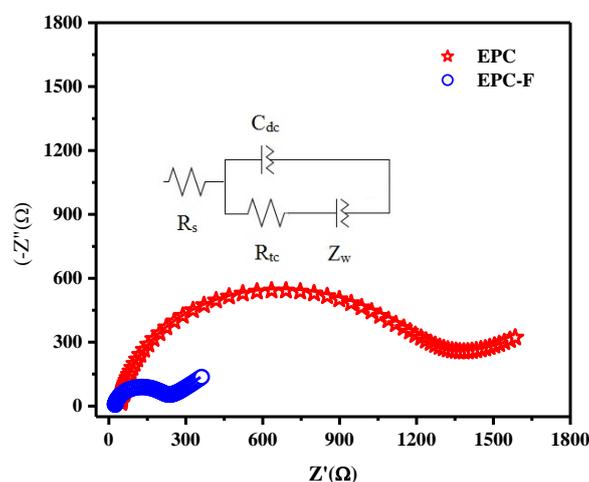


Figura 3. Espectros de EIE em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 2. Dados de ajuste do espectro de EIE.

Eletrodos	R_s (Ω)	C_{dc} ($\mu\text{F cm}^{-2}$)	R_{tc} (Ω)	k^0 ($10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$)
EPC	46,57	0,32	1077,70	0,91
EPC-F	23,27	0,80	190,04	2,53

Comportamento eletroquímico do AA e AF utilizando EPC e EPC-F

O comportamento eletroquímico da AA e AF foram estudados utilizando $9,8 \text{ mg L}^{-1}$ de AA e AF em tampão PB e pH 7, os resultados obtidos estão apresentados na

Figura 4 e na Tabela 3. O VC apresentado pelo AA (Figura 4) apresentou um pico de oxidação em potencial de pico (E_p) em $0,369 \text{ V}$ (Tabela 3). O mecanismo de oxidação do AA tem sido estudado em diferentes superfícies (19-23). De forma geral esse mecanismo de

oxidação envolve a transferência de 2 elétrons e 2 prótons, com formação do ânion radical desidroascórbico, sendo essa transferência eletrônica utilizada para quantificar o AA em diferentes tipos de amostras. A reação de oxidação do AF em superfícies de eletrodos a base de carbono com e sem modificação, ocorre em C9-N10 [24]. Neste trabalho, foram observados 2 picos anódicos distintos, isto indica uma oxidação em duas etapas do AF (Figura 4), envolvendo a transferência de 2 prótons e 2 elétrons em cada etapa [25]. Os resultados mostraram um aumento na corrente de pico (I_p) de aproximadamente 70% para o AA e acima de 200%, para o AF, respectivamente (Tabela 3), quando o grafite funcionalizado é utilizado na preparação do sensor. Em relação ao potencial de pico (E_p) não observou diferenças significativas entre os valores obtidos para os EPC e EPC-F (Tabela 3).

A influência do pH sobre o E_p e o I_p do processo de oxidação do AA e AF, que ocorre na superfície do EPC-F, foram avaliados em intervalo de pH de 5 a 9, utilizando uma solução contendo $4,95 \text{ mg L}^{-1}$ de AA e AF, em tampão PB, de concentração $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5. O E_p , desloca-se para potencial mais negativo, com o aumento do pH (Figura 5C), indicando que a presença de prótons influencia a oxidação para ambas as substâncias estudadas. A diferença entre o potencial de pico do AF em relação ao AA, esta apresentado na Figura 5D. Observa-se, maior diferença (360 mV) em pH 7, mostrando que é possível determinar eletroquimicamente simultaneamente o AA e AF. A Figura 5E, mostra a variação de I_p em relação a variação de pH, observa-se quem em pH 7, mostra a maior intensidade na corrente de pico. Esses mostram que o pH 7 é o indicado para estudos eletroanalíticos.

Estudo de pH

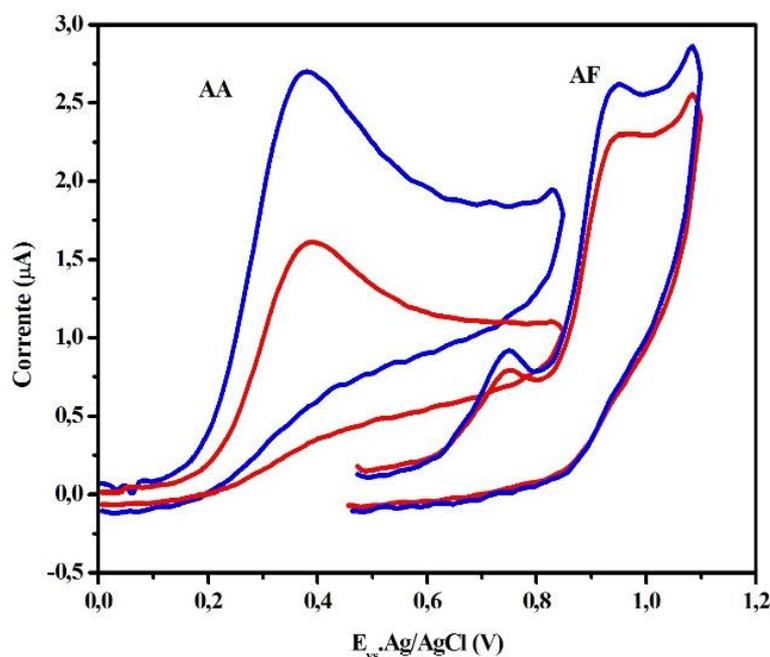


Figura 4: VCs obtidos para uma solução contendo $9,8 \text{ mg L}^{-1}$ de AA e AF, utilizando os eletrodos EPC e EPC-F. Tampão PB pH 7 e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Eletrodo EPC-F.

Tabela 3. E_p e I_p dos voltamogramas apresentados na Figura 4 (Média de 3 réplicas).

Eletrodos	$E_p \pm \text{sd}$ (V)			$I_p \pm \text{sd}$ (μA)		
	AA	AF		AA	AF	
		P1	P2		P1	P2
EPC	$0,369 \pm 0,004$	$0,746 \pm 0,008$	$0,932 \pm 0,004$	$1,142 \pm 0,038$	$0,164 \pm 0,013$	$0,587 \pm 0,091$
EPC-F	$0,388 \pm 0,004$	$0,739 \pm 0,002$	$0,928 \pm 0,002$	$1,936 \pm 0,016$	$0,363 \pm 0,013$	$1,173 \pm 0,019$

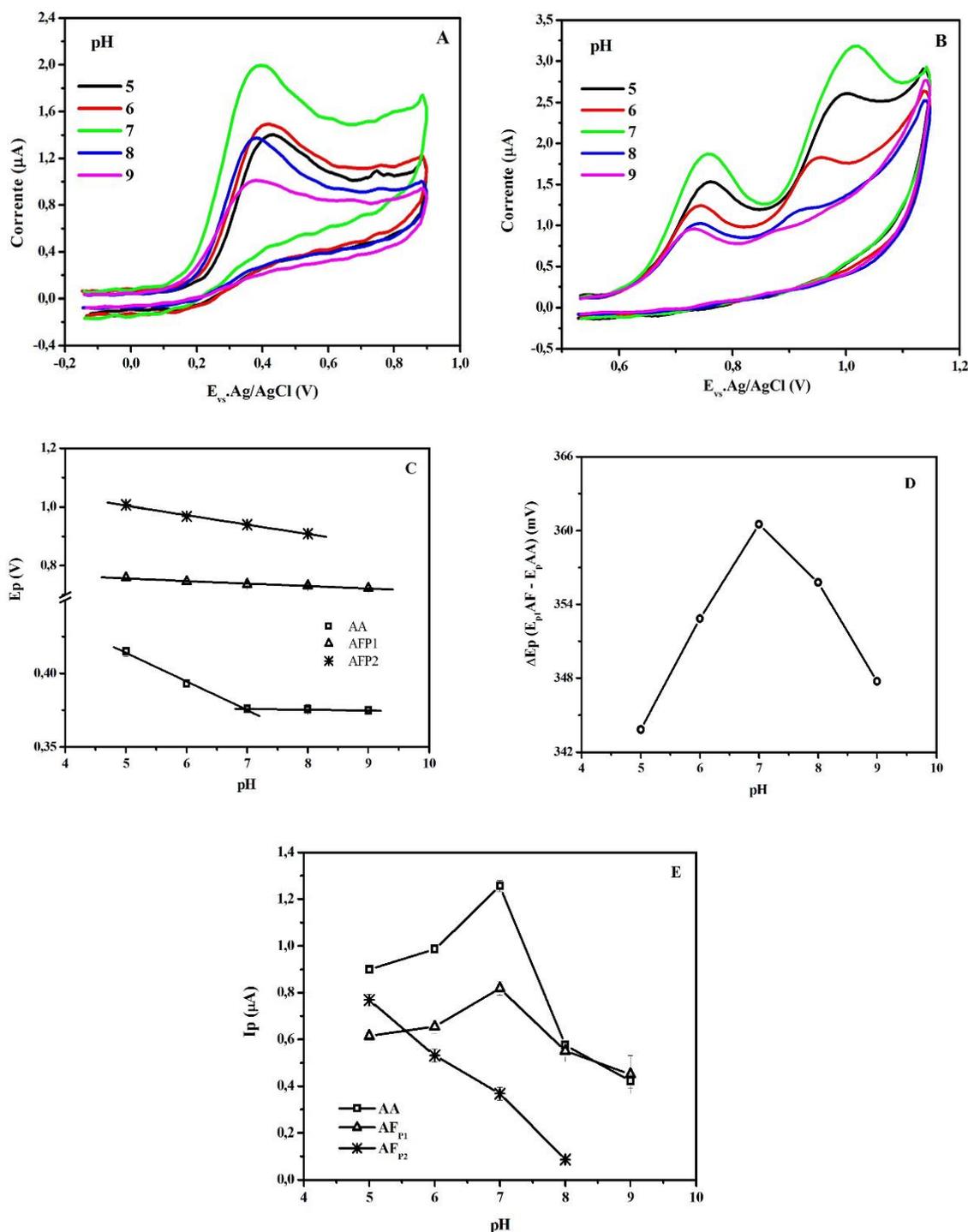


Figura 5. A) e B) VCs de AA e AF. Concentração de $4,95 \text{ mg L}^{-1}$ de AA e AF em tampão PB a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7. C) $E_p \times \text{pH}$. D) Diferença entre E_{p1AF} e $E_p \text{ AA}$. E) $I_p \times \text{pH}$. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Detecção simultânea do AA e AF

O desempenho do sensor utilizando grafite funcionalizado foi utilizado para detecção individual e simultânea do AA e AF utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD). Os voltamogramas de AA e AF realizadas individualmente estão apresentados na

(Figura 6A) e simultaneamente (Figura 6B). Os resultados obtidos mostraram um aumento de I_p em $1,8x$ para o EPC funcionalizado. O aumento em I_p pode ser atribuído ao aumento na área reativa dos eletrodos, decréscimo na resistência a transferência de carga (R_c) e ao aumento na constante heterogênea da velocidade da reação.

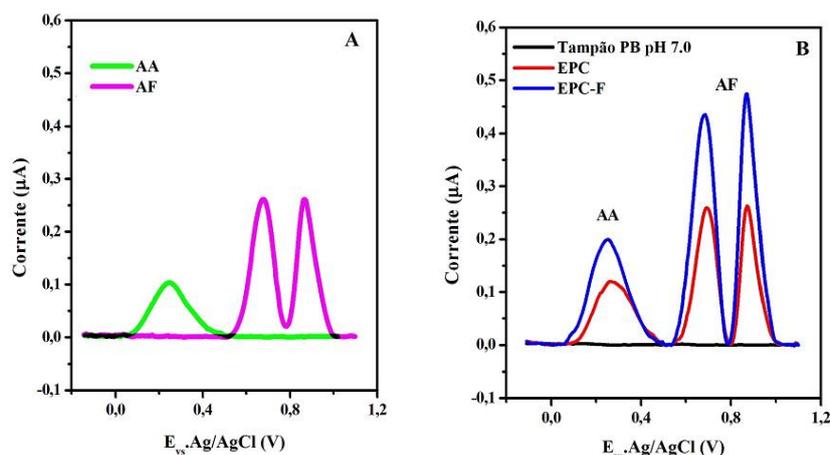


Figura 6. VPDs: [AA]= 8,98 mg L⁻¹, [AF]= 16,77 mg L⁻¹, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso: 25 mV. (A) individualmente, (B) simultaneamente.

Curva analítica

Utilizando o pH que apresentou a maior diferença entre os potenciais de pico do AF em relação ao AA (Figura 5D) e os parâmetros instrumentais descritos na literatura [22], foram realizados estudos da variação de I_p do pico de oxidação do AA e AF em relação a concentração, os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7. A Figura 7A, apresenta os

voltamogramas em diferentes concentrações utilizando a VPD como técnica eletroquímica, observa-se nessa Figura um aumento da corrente de pico em relação ao aumento da concentração. Em seguida foi verificada a correlação entre a intensidade da corrente de pico e a concentração do AA e AF. A Figura 7B apresenta a curva analítica obtida, com os valores médios ($n = 3$) e com os desvios padrão para cada ponto da curva utilizando o EPC-F como eletrodo de trabalho.

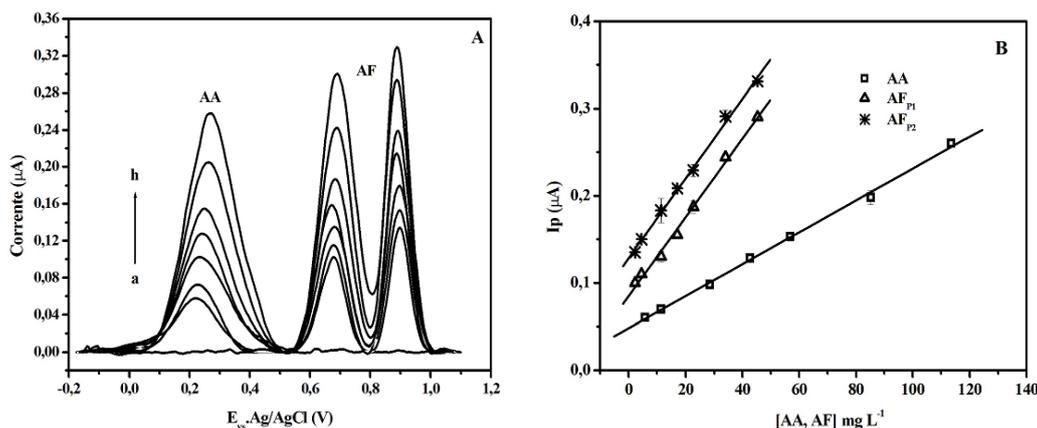


Figura 7. A) VPDs do AA e AF: a) Tampão PB 0,02 mol L⁻¹ em pH 7; b, c, d, e, f, g, e h: 5,68; 11,36; 28,36; 42,58; 56,78; 85,17 e 113,56 mg L⁻¹ de AA e 2,26; 4,53; 11,33; 16,99; 22,65; 33,98 e 45,31 mg L⁻¹ de AF. B) I_p x concentração de AA e AF ($n = 3$). $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso: 25 mV.

A determinação do limite de detecção (LD) foi realizado utilizando a relação $LD = (3 \times Sb) / s$ [26]; onde Sb é a estimativa do desvio padrão da resposta, do coeficiente linear da equação da reta obtida da relação I_p x concentração e s é o coeficiente angular da curva analítica da mesma relação. Os dados obtidos a partir da curva analítica estão apresentados na Tabela 4. A Tabela 5 mostra uma comparação dos parâmetros analíticos obtidos utilizando vários tipos de eletrodos e

métodos eletroquímicos em diferentes amostras. A análise dos resultados apresentados na Tabela 5 mostrou que o LD um pouco superior aos obtidos utilizando nano partículas de metais incorporados na superfície de grafeno e nanotubos de carbono. Entretanto devido a facilidade de preparação, renovação, sensibilidade e especificidade apresentada pelo EPC-F, tornando um excelente sensor para determinação simultânea de AA e AF.

Tabela 4. Parâmetros obtidos a partir da curva analítica utilizando VPD e o EPC-F.

Parâmetros	AA	AF	
		P ₁	P ₂
Intervalo de concentração mg L ⁻¹ (μmol L ⁻¹)	5,68 (32,08) – 113,56 (644,78)	2,26 (5,12) – 45,31 (102,65)	
Coefficiente de correlação (r)	0,999	0,998	0,998
Intercepto (±sd) (μA)	0,048 (±0.002)	0,085 (±0.003)	0,129 (±0.003)
Coefficiente angular (±sd) (μA/mg L ⁻¹)	0,005 (+0.0001)	0,008 (±0.0001)	0,008 (±0.0001)
Limite de detecção mg L ⁻¹ (μmol L ⁻¹)	1,20 (6,81)	1,12 (2,54)	1,12 (2,54)

Tabela 5. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos por diferentes eletrodos utilizando vários métodos eletroquímicos.

Eletrodo	Modificador	Método	linearidade		LD		Amostra	Ref.
			(μmol L ⁻¹)		(μmol L ⁻¹)			
			AA	AF	AA	AF		
EPC	HTP-MWCNT	VPD	29,5–112,0	26,3–100,0	ND	0,036	maça, kiwi, medicamentos e urina humana.	6
ECV	AuNCs/AGR/MWCNT	VOQ	10-150	5-100	0,27	0,08	urina humana	21
CPE	Fe ₃ O ₄	VPD	0,91-4,700	0,06-98	0,251	0,002	medicamentos, sangue e suco de limão.	22
EPC	ZNFs	VPD	0,9-100	0,7-1000	0,013	0,028	urina e sangue	27
EPC-F	NaOH-F	VPD	32,08–644,78	5,12–102,65	6,81	2,54	urina	Neste estudo

Determinação do AA e AF em amostra de urina

Os voltamogramas (Figura 8A) e a curva de adição padrão amostra (Figura 8B) em amostra de urina humana estão apresentados na Figura 8. De acordo com os voltamogramas apresentados, observa-se a presença de 3 picos de oxidação em potencial de pico de aproximadamente 0,265; 0,677 e 0,895 V, os quais foram atribuídos a oxidação de grupos funcionais presentes nas moléculas de AA e AF, respectivamente. Observa-se um aumento na corrente de pico devido a aumentos sucessivos da concentração do padrão de AA

e AF.

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos em triplicata utilizando o método proposto e o EPC-F, como eletrodo de trabalho, em amostra de urina humana. Esses resultados mostram ausência de AA e AF na amostra analisada. Para a amostra contaminada artificialmente, obteve recuperação de 96 a 101 % e desvio padrão relativo abaixo de 3%. O conjunto de resultados obtidos mostrou que o EPC-F, pode ser utilizado para determinação simultânea de AA e AF em amostras de urina.

Tabela 6. Resultados de recuperação para AA e AF em urina obtidos por VPD utilizando EPC-F.

Amostra	Substância	Adicionada (mg mL ⁻¹ de urina)	Encontrada (mg mL ⁻¹ de urina)	RSD (%)	Recuperação (%)	
Urina	AA		1,21	0,68	96,80	
	AF	1,25	P1	1,26	2,78	100,80
			P2	1,31	1,23	104,80

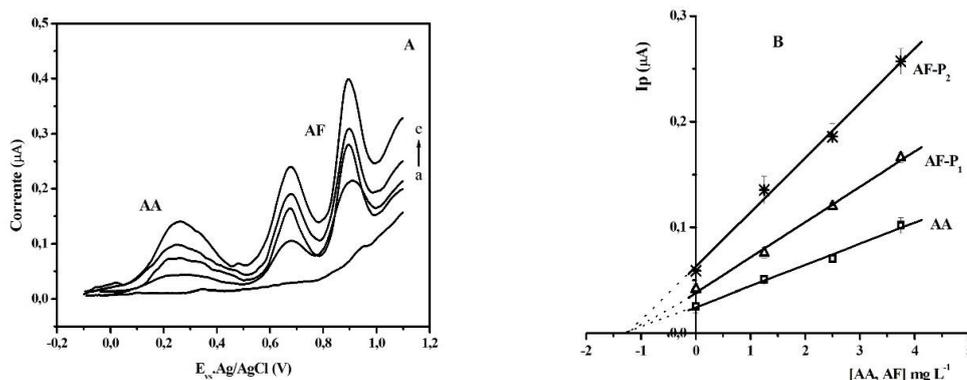


Figura 8: A) VPDs obtidos para o AA e AF em tampão PB 0,02 mol L⁻¹ e pH 7: a: branco de urina humana, b: Concentração desconhecida, c-e: adição de 1,25; 2,5; 3,75 mg L⁻¹ do padrão de AA e AF à amostra. B) Relação entre Ip e concentração do AA e AF. VPDs obtidos da adição e recuperação em urina. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e amplitude de pulso: 25 mV.

4. CONCLUSÃO

A funcionalização do grafite antes da preparação do sensor aumenta a sua atividade eletrocatalítica, apresentando maior sensibilidade. Os resultados obtidos para a oxidação do AF e AA, mostraram um aumento na corrente de pico de 1,8x, quando comparados o grafite funcionalizado com o não funcionalizado. O aumento na atividade eletrocatalítica pode ser atribuído aos seguintes fatores: 1) aumento na área reativa em 2 vezes; 2) aumento na capacitância da dupla camada em 2,5x; 3) decréscimo na resistência a transferência de carga em 5.7 vezes e 4) aumento na constante de velocidade heterogênea padrão da reação em 2,8x. O eletrodo utilizando grafite funcionalizado foi utilizado com sucesso da determinação simultânea do ácido ascórbico e ácido fólico em amostras de urina humana, obtendo taxas de recuperação de 96 a 101 % e desvio padrão relativo menor que 3%, indicando que a funcionalização do grafite antes da sua incorporação em eletrodos pode ser utilizada para melhorar a sensibilidade do método.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da UEMS, CNPq, FUNDECT e FINEP

6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Lopes, P.; Drinkine, J.; Saucier, C. *Anal. Chim. Acta.* **2006**, 555, 42. [\[CrossRef\]](#)
- [2] Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Serban, A. J.; Fafaneata, C. *Electrochim. Acta*, **2014**, 121, 443. [\[CrossRef\]](#)
- [3] Dong, M. W.; Lepore, J.; Tarumoto, T. *J. Chromatogr.* **1988**, 442, 81. [\[CrossRef\]](#)
- [4] Kun, Z.; Ling, Z.; Yi, H.; Ying, C.; Dongmei, T.; Shuliang, Z.; Yuyang, Z. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, 105, 677. [\[CrossRef\]](#)
- [5] Ershad, S.; Dideban, K.; Faraji, F. *Anal. Bioanal. Electrochem.* **2013**, 5(2), 178. [\[CrossRef\]](#)
- [6] Zare, H. R.; Shishehbore, M. R.; Nematollahi, D. *Electrochim. Acta.* **2011**, 58, 654. [\[CrossRef\]](#)
- [7] Lima, F.; Gozzi, F.; Fiorucci, A. R.; Cardoso, C. A. L.; Arruda, G. J.; Ferreira, V. S. *Talanta*, **2011**, 83, 1763. [\[CrossRef\]](#)
- [8] Siara, L. R.; Lima, F.; Cardoso, C. A. L.; Arruda, G. J. *Electrochim. Acta*, **2015**, 151, 609. [\[CrossRef\]](#)
- [9] Ardakani, M. M.; Beitollahi, H.; Amini, M. K.; Mirkhalaf, F.; Alibek, M. A. *Sens. Actuators, B* **2010**, 151, 243. [\[CrossRef\]](#)
- [10] Wang, J. *Analytical electrochemistry*. John Wiley & Sons, 2006.
- [11] Crow, D. R. *Electrochem. Sens.* **1994**, 216.
- [12] Sayin, F.; Kir, J. S. *Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 25, 153. [\[CrossRef\]](#)
- [13] Hitz, C.; Lasia, A. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 500, 213. [\[CrossRef\]](#)
- [14] Bard, A.J., Faulkner, L.R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. New York: Wiley, 1980.
- [15] Cesarino, I.; Moraes, F. C.; Machado, S. A. S. *Electroanalysis*, **2011**, 23, 2586. [\[CrossRef\]](#)
- [16] Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A. *Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações*. Coimbra: Oxford University Press, 1993.
- [17] Moon, J. S.; Kim, H.; Lee, D. C.; Lee, J. T.; Yushin, G. *J. Electrochem. Soc.* **2015**, 162, 5070. [\[CrossRef\]](#)
- [18] Sabatani, E.; Rubinstein, I. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 6663. [\[CrossRef\]](#)
- [19] Wan, Q.; Yang, N. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 527, 131. [\[CrossRef\]](#)
- [20] Vaze, V. D.; Srivastava, A. K. *Electrochim. Acta.* **2007**, 53, 1713. [\[CrossRef\]](#)

- [21] Abdelwahab, A. A.; Shim, Y. B. *Sens. Actuators, B* **2015**, *221*, 659. [[CrossRef](#)]
- [22] Kingsley, M. P.; Desai, P. B.; Srivastava, A. K. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *741*, 71. [[CrossRef](#)]
- [23] Reddy, Y. V. M.; Rao, V. P.; Reddy, A. V. B.; Lavanya, M.; Venu, M.; Madhavi, G. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 378. [[CrossRef](#)]
- [24] Qi, S.; Zhao, B.; Tang, H.; Jiang, X. *Electrochim. Acta.* **2015**, *161*, 395. [[CrossRef](#)]
- [25] Hu, I. F.; Kuwana, T. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 3235. [[CrossRef](#)]
- [26] Analytical Methods Committee. *Analyst* **1987**, *112*, 199. [[CrossRef](#)]
- [27] Arvand, M., Tajyani, S. *RSC Advances.* **2015**, *5*, 7222. [[CrossRef](#)]