

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

LUIZ OTÁVIO ORZARI

**(NANO)PARTÍCULAS METÁLICAS PARA DIFERENTES ARQUITETURAS DE
DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS**

Araras

2024

LUIZ OTÁVIO ORZARI

**(NANO)PARTÍCULAS METÁLICAS PARA DIFERENTES ARQUITETURAS DE
DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Araras

2024

Orzari, Luiz Otávio

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PARA DIFERENTES
ARQUITETURAS DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS
/ Luiz Otávio Orzari -- 2024.
175f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Bruno Campos Janegitz

Banca Examinadora: Juliano Alves Bonacin, Kelly

Roberta Francisco Muruci de Paula, Marco Antonio dos
Santos Farias, Tiago Almeida Silva

Bibliografia

1. Partículas metálicas. 2. Eletroquímica. 3.

Planejamento de Experimentos. I. Orzari, Luiz Otávio. II.
Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Relatório de Defesa de Tese

Candidato: **Luiz Otávio Orzari**

Aos 26/07/2024, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, a defesa de tese de doutorado sob o título: Nanopartículas Metálicas para Diferentes Arquiteturas de Dispositivos Eletroquímicos., apresentada pelo candidato Luiz Otávio Orzari. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca

Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
Profa. Dra. Kelly Roberta Francisco Muruci de Paula
Prof. Dr. Marco Antonio dos Santos Farias
Prof. Dr. Juliano Alves Bonacin
Prof. Dr. Tiago Almeida Silva

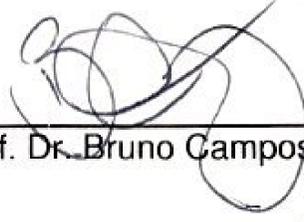
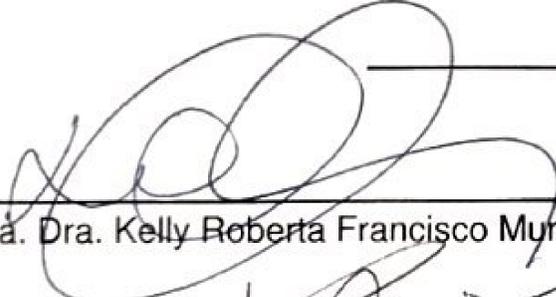
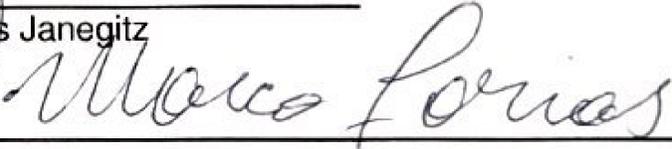
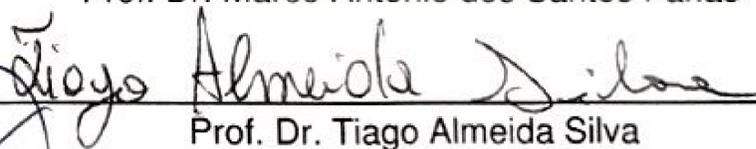
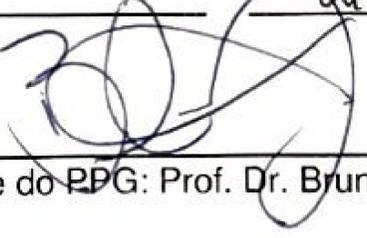
Função	Instituição
Presidente	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	UNICAMP
Titular	UFV

Conceito
APROVADO

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora*:

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz, representante do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

	Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
	Prof. Dr. Kelly Roberta Francisco Muruci de Paula
	Prof. Dr. Marco Antonio dos Santos Farias
	Prof. Dr. Juliano Alves Bonacin
	Prof. Dr. Tiago Almeida Silva
	Representante do PPG: Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz

() Não houve alteração no título (X) Houve alteração no título. O novo título passa a ser:
(Nona)partículas metálicas para diferentes arquiteturas de dispositivos eletroquímicos

Observações:
a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Ciência dos Materiais, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

Dedico este trabalho à todos que lutam para que a educação e os objetivos da ciência sejam públicos e transformadores.

AGRADECIMENTO

À todos aqueles que vieram antes de mim, e que contribuíram para que todos os aspectos da ciência e da educação fossem avançados, analisados, e/ou colocados em pauta, em busca de condições para uma vida melhor e mais justa;

À Universidade Federal de São Carlos, seu corpo docente, seus técnicos e administradores, pela incansável dedicação à formação acadêmica de qualidade ao longo destes 50 anos;

À Fundação de Amparo ao Estado de São Paulo (processos nº 2019/23342-0 e 2022/13157-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e todas as outras instituições que fomentam a ciência no país;

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno C. Janegitz, pela primeira oportunidade de protagonizar minha própria carreira, pela dedicação em ensinar e liderar o laboratório a que fiz parte por nove anos e por me apresentar esta área pela qual me maravilho;

Ao amor de minha vida, Débora Vilela, por me ensinar o que é o amor verdadeiro e escolher caminhar ao meu lado numa floresta enevoada e escura;

À meus pais, Edson e Ana, e meus irmãos, Izabela e Pedro, pela constante luta e dedicação que enfrentamos, sem deixarmos de nos amar e mantermo-nos juntos;

Aos meus amigos João, Marco e Maurício, pela nossa amizade longínqua de muitas jogatinas e risadas, que perdura e se manterá anos e anos a vir;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, que nos ajudaram a fundar a base de pesquisa que hoje temos, e que já partiram dessa jornada: Marcelo, Letícia, Jodar, Tamires, Marina, Matheus, Isabella, Naiara, Gabi, Túlio, Daniel, Giovanni, Júlia, Vinicinho, Cris, Paulão, Stefano, Rodrigo e Ricardo, pelos incontáveis momentos de aprendizados, alegrias e motivações que vocês me promoveram;

Aos amigos da velha guarda que permanecem no LSNano: Jefferson (Gersão), Jéssica, Rafaela, Vinição e Wilson, que compartilharam todos os momentos de vitórias e derrotas, conquistas e perdas, jornadas e destinos;

Aos amigos que fiz na Alemanha, que me acolheram e ajudaram num momento de constantes desafios: Carla, Geovane, João, Walner, Thaís e Daniel;

À nova formação do laboratório, que se propõe a carregar e melhorar nosso legado;

À todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, com todos os processos de ensino-aprendizado de que participei;

Deixo todo meu carinho e meu eterno agradecimento.

Vida antes de Morte.

Força antes de Fraqueza.

Jornada antes de Destino.

Brandon Sanderson, O Caminho dos Reis

RESUMO

ORZARI, Luiz Otávio. Partículas metálicas para diferentes arquiteturas de dispositivos eletroquímicos. 2024. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2024).

Na presente tese de doutorado foram desenvolvidas novas arquiteturas de sistemas eletroquímicos para células à combustível, sensores e biossensores. Para isso, variadas metodologias para a adição de partículas metálicas sobre a superfície do eletrodo de trabalho foram exploradas, dando sequência a caracterizações e investigações sobre seus comportamentos e posteriores aplicações em desempenho energético e/ou determinação de analitos. Primeiramente, um dispositivo de intuito multifuncional foi desenvolvido, explorando-se unir o uso em células a combustível com sensoriamento eletroquímico, num único sistema. Para tanto, composições de eletrocatalisadores suportados em carbono foram investigadas, envolvendo os metais Pd, Ag e Bi. Na reação de oxidação de etanol, o catalisador Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C demonstrou interessante comportamento e custo-benefício, sendo utilizado posteriormente para a determinação de dopamina em amostras de urina sintética. Duas curvas analíticas foram obtidas para o sensor: uma envolvendo a oxidação direta da dopamina de 4,0 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção (LOD) igual a 0,035 $\mu\text{mol L}^{-1}$; e outra, devido à complexação que ocorre entre catecolaminas e superfícies metálicas, de 0,2 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com LOD de 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O segundo dispositivo se trata de um sensor e imunossensor eletroquímico, em que nanopartículas de Pd foram eletrodepositadas à superfície do eletrodo de trabalho. Para tanto, uma nova tinta condutora de negro de fumo e poliacetato de vinila foi desenvolvida para a confecção do sistema de três eletrodos. Com o auxílio de Planejamento de Experimentos, os parâmetros para a deposição do metal foram investigados e o sensor foi aplicado para a determinação de epinefrina em amostras de líquido cerebrospinal sintético. Após, o sensor foi modificado com cisteamina e glutaraldeído para devida imobilização de Anti- α -sinucleína. O biossensor foi então utilizado para a construção de uma curva de calibração de α -sinucleína tampão fosfato, com faixa linear entre 1,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOD = 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e em amostras de soro de sangue humano, numa faixa linear de 6,0 e 100,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOD = 1,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$), por espectroscopia de impedância eletroquímica, demonstrando sua eficiência em ambientes mais complexos. O terceiro sistema envolveu o uso de microfiores de Au eletrodepositadas sobre a superfície da tinta condutora desenvolvida anteriormente, para incrementar a resposta de capacitância do material. Planejamento de Experimentos foi empregado para otimizar as condições das camadas automontadas para a modificação em

biossensor. Definidas as melhores condições de trabalho, espectroscopia de impedância eletroquímica não faradáica foi utilizada para encontrar uma faixa linear entre capacitância e a concentração de PARK7/DJ-1, correspondente à região de 20 a 120 ng mL⁻¹. O LOD obtido para este sistema foi de 0,207 ng mL⁻¹. O dispositivo foi então aplicado em amostra de líquido cerebrospinal sintético fortificado, onde apresentou atrativas respostas pelo método de adição e recuperação. Por fim, um último dispositivo foi desenvolvido para a oxidação de etanol, buscando-se combinar as propriedades de Au e Bi para o desenvolvimento de um dispositivo mais atraente em processos catalíticos. Planejamento fatorial completo e de Doehlert foram empregados para encontrar uma composição ótima entre os metais. Uma extensa caracterização morfológica e eletroquímica foi efetuada, buscando-se entender os comportamentos da tinta condutora modificada com cada um dos metais, bem como com a mistura deles. Tido como um catalisador menos eficiente pela sua alta estabilidade, o Au se torna muito mais eficiente em sinergia com baixas concentrações de Bi, mas o material não possui uma completa regeneração de sua superfície, sendo mais indicado para processos em que a geração de corrente seja alta, em pouco espaço de tempo.

Palavras-chave: partículas metálicas; sensor eletroquímico; biossensor eletroquímico; célula à combustível; Planejamento de Experimentos; eletrodeposição de metais.

ABSTRACT

In this doctoral thesis, new architectures of electrochemical systems for fuel cells, sensors and biosensors were developed. To this end, various methodologies for adding metallic particles to the surface of the working electrode were explored, following characterizations and investigations into their behavior and subsequent applications in energy efficiency and/or determination of analytes. Firstly, a multifunctional device was developed, exploring the combination of fuel cells with electrochemical sensing, in a single system. To this end, compositions of carbon-supported electrocatalysts were investigated, involving the metals Pd, Ag and Bi. In the ethanol oxidation reaction, the Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C catalyst demonstrated interesting behavior and cost-efficiency, being subsequently used for the determination of dopamine in synthetic urine samples. Two analytical curves were obtained for the sensor: one involving the direct oxidation of dopamine from 4.0 to 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a detection limit (LOD) equal to 0.035 $\mu\text{mol L}^{-1}$; and another, due to the complexation that occurs between catecholamines and metal surfaces, from 0.2 to 1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a LOD of 0.14 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The second device is an electrochemical sensor and immunosensor, in which Pd nanoparticles were electrodeposited on the surface of the working electrode. To this end, a new conductive carbon black and polyvinyl acetate ink was developed to manufacture the three-electrode system. With the aid of Design of Experiments, the parameters for metal deposition were investigated and the sensor was applied to determine epinephrine in synthetic cerebrospinal fluid samples. Afterwards, the sensor was modified with cysteamine and glutaraldehyde for proper immobilization of Anti- α -synuclein. The biosensor was then used to construct a calibration curve of α -synuclein phosphate buffer, with a linear range between 1.5 and 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOD = 0.13 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and in samples of human blood serum, in a linear range of 6.0 and 100.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOD = 1.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$), by electrochemical impedance spectroscopy, demonstrating its efficiency in more complex environments. The third system involved the use of Au microflowers electrodeposited on the surface of the previously developed conductive ink, to increase the capacitance response of the material. Design of Experiments was used to optimize the conditions of the self-assembled layers for biosensor modification. Once the best working conditions were defined, non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy was used to find a linear range between capacitance and PARK7/DJ-1 concentration, corresponding to the region of 20 to 120 ng mL^{-1} . The LOD obtained for this system was 0.207 ng mL^{-1} . The device was then applied to a fortified synthetic cerebrospinal fluid sample, where it showed attractive responses using the spike and recovery method. Finally, a last device was developed

for the oxidation of ethanol, seeking to combine the properties of Au and Bi to produce a more attractive device for catalytic processes. Full factorial and Doehlert matrix designs were used to find an optimal composition between the metals. An extensive morphological and electrochemical characterization was carried out, seeking to understand the behavior of the conductive ink modified with each of the metals separately, as well as with their mixture. Considered a less efficient catalyst due to its high chemical stability, Au becomes much more efficient in synergy with low concentrations of Bi, but the material does not have complete regeneration of its surface, being more suitable for processes in which current generation must be high in a short space of time.

Keywords: metallic particles; electrochemical sensor; electrochemical biosensor; fuel cell; Experiment Planning; electroplating of metals.

PUBLICAÇÕES

DE SOUZA, DANIEL C.; **ORZARI, LUIZ O.**; DE OLIVEIRA, PAULO R.; KALINKE, CRISTIANE; BONACIN, JULIANO A.; MALASPINA, OSMAR; NOCELLI, ROBERTA C. F.; JANEGITZ, BRUNO C.. Electrochemical Sensor Based on Beeswax and Carbon Black Thin Biofilms for Determination of Paraquat in Apis mellifera Honey. FOOD ANALYTICAL METHODS, v. 14, p. 606, 2020.

ZAMBIANCO, NAIARA A.; DA SILVA, VINICIUS A.O.P.; **ORZARI, LUIZ O.**; CORAT, EVALDO J.; ZANIN, HUDSON G.; SILVA, TIAGO A.; BULLER, GARY A.; KEEFE, EDMUND M.; BANKS, CRAIG E.; JANEGITZ, BRUNO C.. Determination of tadalafil in pharmaceutical samples by vertically oriented multi-walled carbon nanotube electrochemical sensing device. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, v. 15, p. 114501, 2020.

DE FREITAS, RAFAELA C.; **ORZARI, LUIZ O.**; DE OLIVEIRA, PAULO R.; JANEGITZ, BRUNO C.. Pd and Ag Binary Nanoparticles Supported on Carbon Black and Tapioca for Nitrite Electrochemical Detection. JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY, v. 168, p. 11, 2021

FREITAS, RAFAELA C.; **ORZARI, LUIZ O.**; FERREIRA, LUÍS M. C.; PAIXÃO, THIAGO R. L. C.; COLTRO, WENDELL K. T.; VICENTINI, FERNANDO C.; JANEGITZ, BRUNO C.. Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, v. 897, p. 115550, 2021.

CAMARGO, JÉSSICA R.; **ORZARI, LUIZ O.**; ARAÚJO, DIELE A. G.; DE OLIVEIRA, PAULO R.; KALINKE, CRISTIANE; ROCHA, DIEGO P.; DOS SANTOS, ANDRÉ L.; TAKEUCHI, REGINA M.; MUNOZ, RODRIGO A. A.; BONACIN, JULIANO A.; JANEGITZ, BRUNO C.. Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 164, p. 105998, 2021.

STEFANO, JÉSSICA S.; **ORZARI, LUIZ O.**; SILVA-NETO, HÁBDIAS A.; DE ATAÍDE, VANESSA N.; MENDES, LETÍCIA F.; COLTRO, WENDELL K. T.; PAIXÃO, THIAGO R. L. C.; JANEGITZ, BRUNO C.. Different approaches for fabrication of low-cost electrochemical sensors. CURRENT OPINION IN ELECTROCHEMISTRY, v. 32, p. 100893, 2022.

DANIELE, GIOVANNI G.; DE SOUZA, DANIEL C.; DE OLIVEIRA, PAULO R.; **ORZARI, LUIZ O.**; BLASQUES, RODRIGO V.; GERMSCHIEDT, RAFAEL L.; DA SILVA, EMILLY C.; POCRIFKA, LEANDRO A.; BONACIN, JULIANO A.; JANEGITZ, BRUNO C.. Development of Disposable and Flexible Supercapacitor Based on Carbonaceous and Ecofriendly Materials. C-JOURNAL OF CARBON RESEARCH, v. 8, p. 32, 2022

ORZARI, LUIZ O.; ASSUMPÇÃO, MÔNICA H. M. T.; NANDENHA, JULIO; NETO, ALMIR O.; JUNIOR, LUIZ H. M.; BERGAMINI, M.; JANEGITZ, BRUNO C.. Pd, Ag and Bi carbon-supported electrocatalysts as electrochemical multifunctional materials for ethanol oxidation and dopamine determination. ELECTROCHIMICA ACTA, v. 428, p. 140932, 2022

SILVA, LUIZ R. G.; STEFANO, JÉSSICA S.; **ORZARI, LUIZ O.**; BRAZACA, LAÍS C.; CARRILHO, EMANUEL; MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H.; BERGAMINI, MARCIO F.; MUNOZ, RODRIGO A. A.; JANEGITZ BRUNO C.. Electrochemical Biosensor for SARS-CoV-2 cDNA Detection Using AuPs-Modified 3D-Printed Graphene Electrodes. *BIOSENSORS*, 12(8), 622, 2022

GUIMARÃES, VITÓRIA P.; NANDENHA, JÚLIO; **ORZARI, LUIZ O.**; FATIBELLO-FILHO, ORLANDO; NETO, ALMIR O.; JANEGITZ, BRUNO C.; VICENTINI, FERNANDO C.; ASSUMPÇÃO, MÔNICA H. M. T.. Effect of TiO₂ and Synthesis Strategies on Formate Oxidation: Electrochemical and Fuel Cell Approaches. *Electrocatalysis*, v. 14, p. 221-231, 2023

FERNANDES-JUNIOR, WILSON S.; **ORZARI, LUIZ O.**; KALINKE, CRISTIANE; BONACIN, JULIANO A.; JANEGITZ, BRUNO C.. A miniaturized additive-manufactured carbon black/PLA electrochemical sensor for pharmaceuticals detection. *TALANTA*, v. 275, p. 126154, 2024.

BRIX, ANN C.; **ORZARI, LUIZ O.**; KRYSIAK, OLGA A.; CECHANAVICIUTÈ, IEVA A.; BANKO, LARS; LUDWIG, ALFRED; JANEGITZ, BRUNO C.; SCHUHMANN, WOLFGANG. Design-of-Experiments-Based Optimisation of Vanillin Yield from Kraft Lignin Using Pulse Electrolysis and Thermolysis. *ChemElectroChem*, v. 11(10), e202300853, 2024

ORZARI, LUIZ O.; SILVA, LUIZ R. G.; DE FREITAS, RAFAELA C.; BRAZACA, LAÍS C.; JANEGITZ, BRUNO C.. Lab-made disposable screen-printed electrochemical sensors and immunosensors modified with Pd nanoparticles for Parkinson's disease diagnostics. *MICROCHIMICA ACTA*, v. 191, p. 1, 2024

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representações de classes de nanopartículas. Fonte: Elaboração própria	14
Figura 2. Representação de uma estrutura típica de CB. Fonte: Elaboração própria	20
Figura 3. Representação de um anticorpo com cadeias leves (azul), pesadas (verde) e suas ligações de dissulfeto (vermelho). Fonte: Elaboração própria.....	25
Figura 4. Estrutura tridimensional de α -sinucleína. Fonte: Elaboração própria.....	27
Figura 5. Estrutura da epinefrina. Fonte: Elaboração própria.....	28
Figura 6. Estrutura tridimensional da proteína PARK7/DJ-1. Fonte: Elaboração própria.....	29
Figura 7. Esquema de preparo dos eletrocatalisadores. (I) os reagentes serão aliquotados em balança analítica (II) para sequente adição de HCl. (III) Após agitação constante, o meio será alcalinizado com solução de amônia, e (IV) NaBH_4 será acrescido para completa redução. (V) posteriormente à processos térmicos e de filtração, (VI) os eletrocatalisadores estarão prontos para modificação dos eletrodos. Fonte: Elaboração própria.....	36
Figura 8. Imagens de MEV de (A) Pd/C, (B) Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C, (C) Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C, (D) Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C e (E) Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C; 1-3 representa ampliações crescentes e 4 apresenta a imagem de <i>colorSEM</i>	40
Figura 9. Espectros de difração de raio-X para Pd/C (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C (azul)	41
Figura 10. Imagens MET representativas de Pd/C (A), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C (B) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C (C); 1-3 representam ampliações crescentes no modo de campo claro e 4 apresentam o modo de campo escuro na maior ampliação	42
Figura 11. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com Pd/C (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C (azul), em presença de KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	43
Figura 12. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com (A) Pd/C (preto), (B) Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C (vermelho), (C) Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C (verde), (D) Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C (dourado) ou (E) Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C (azul), em presença de KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	45
Figura 13. Cronoamperogramas obtidos com GCE modificado com Pd/C (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C (azul), em presença equimolar de EtOH/KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; E = -0,20 V, tempo = 1800 s	46
Figura 14. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em meio de PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Dispersão de pontos da relação $ i $ vs. varredura.....	48

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/C/GCE (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C/GCE (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C/GCE (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C/GCE (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE (azul), em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	50
Figura 16. (A) Diagramas de Nyquist para Pd/C/GCE (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C/GCE (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C/GCE (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C/GCE (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE (azul), em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); $E = -472 \text{ mV}$. (B) Circuito equivalente [R([RT]Q)]	51
Figura 17. Diagramas de Bode para Pd/C/GCE (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C/GCE (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C/GCE (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C/GCE (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE (azul), em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1), ω , de 10 ⁵ a 10 ⁻¹ Hz, onda tipo senoidal; amplitude = 10 mV. (A) Correlação do deslocamento de fase da impedância e a frequência; $E = -472 \text{ mV}$. (B) Correlação do módulo da impedância e a frequência; $E = -472 \text{ mV}$	51
Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com Pd/C/GCE (preto), Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C/GCE (vermelho), Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C/GCE (verde), Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C/GCE (dourado) e Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE (azul) em presença equimolar de EtOH/KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	53
Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com (A) Pd/C (preto), (B) Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C (vermelho), (C) Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C (verde), (D) Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C (dourado) ou (E) Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C (azul), em presença equimolar de EtOH/KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$..	55
Figura 20. Curvas de polarização: potencial e densidade de potência vs densidade de corrente, de uma ADEFC de 5,0 cm ² , operando a 50, 60, 70 e 80 °C, utilizando electrocatalisadores anódicos Pd/C, e electrocatalisador catódico Pt/C (BASF). Foram utilizadas cargas de: (1,0 mg _{Pd} cm ⁻² , em massa de metal no ânodo e 1,0 mg _{Pt} cm ⁻² (comercial), em massa de metal no cátodo) com membrana Nafion® 117, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ do combustível (EtOH 2,0 mol L ⁻¹ em KOH 1,0 mol L ⁻¹), vazão mássica de 150 mL min ⁻¹ de O ₂	56
Figura 21. Curvas de polarização: (A) potencial vs. densidade de corrente, (B) densidade de potência vs. densidade de corrente, de uma DEFC de 5,0 cm ² , operando a 70 °C, utilizando electrocatalisadores anódicos Pd/C, Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C, Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C, Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C e Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C, e electrocatalisador catódico Pt/C (BASF). Foram utilizadas cargas de: (1,0 mg _{Pd} cm ⁻² , em massa de metal no ânodo e 1,0 mg _{Pt} cm ⁻² (comercial), em massa de metal no cátodo) com membrana Nafion® 117, fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ do combustível (EtOH 2,0 mol L ⁻¹ em KOH 1,0 mol L ⁻¹), vazão mássica de 150 mL min ⁻¹ de O ₂	57
Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em ausência (preto) e presença (azul) de dopamina 10 µmol L ⁻¹ , em PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	59

Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em presença de dopamina 1,0×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , em meio de PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1) em diferentes parâmetros experimentais	61
Figura 24. (A) Superfície de resposta e (B) curva de nível obtida para a otimização dos parâmetros <i>a</i> e <i>f</i> como uma função da corrente de pico para Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em presença de 10 μmol L ⁻¹ de dopamina. A estrela indica os parâmetros selecionados como ótimo.....	61
Figura 25. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em presença de diferentes concentrações de dopamina, em meio de PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); <i>s</i> = 5,0 mV; <i>a</i> = 100 mV, <i>f</i> = 6,0 Hz; (B) Dispersão de pontos da relação (■) <i>i</i> _{Dir.} vs. C _{Dopamina} e (●) <i>i</i> _{Coord.} vs. C _{Dopamina}	63
Figura 26. (A) Reação de oxidação direta de dopamina. (B) Representação de possíveis estruturas de coordenações (ciano) do grupo catecol com a superfície metálica. Fonte: Elaboração própria.....	64
Figura 27. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em presença de diferentes concentrações de dopamina, em meio de PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); <i>s</i> = 5,0 mV; <i>a</i> = 100 mV, <i>f</i> = 6,0 Hz; (B) Dispersão de pontos da relação <i>i</i> _{Dir.} vs. C _{Dopamina}	64
Figura 28. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C/GCE em presença de diferentes concentrações de dopamina, em meio de PB 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,1); <i>s</i> = 5,0 mV; <i>a</i> = 100 mV, <i>f</i> = 6,0 Hz; (B) Dispersão de pontos da relação (■) <i>i</i> _{Dir.} vs. C _{Dopamina} e (●) <i>i</i> _{Coord.} vs. C _{Dopamina}	65
Figura 29. Produção do sistema de eletrodos descartável CB-PVA. (I) À uma placa de PET é adicionada uma máscara adesiva. (II) Após, a tinta condutora de CB e PVA é espalhada sobre a superfície da placa. (III) O excesso e a máscara adesiva são removidos e (IV) os eletrodos podem ser devidamente separados. (V) Aplicando-se tinta de prata no eletrodo de referência e esmalte incolor para delimitação da área ativa, o sistema está finalizado. Fonte: Elaboração própria.....	71
Figura 30. Preparo do biossensor αsyn/BSA/Ααsyn/Ga-Cys/Pd/CB-PVA. (I) Sobre a superfície de CB-PVA, nanopartículas de Pd são adicionadas. Após, o dispositivo sofre modificações sequenciais de (II) Cys, (III) Ga e (IV) Ααsyn. (V) Ααsyn é então adicionado ao sistema e (VI) a análise pode ser feita. Fonte: Elaboração própria.....	73
Figura 31. Voltamograma cíclico obtido por CB-PVA em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; <i>v</i> = 50 mV s ⁻¹	75
Figura 32. Processo de oxirredução de ferrocenometanol. Fonte: Elaboração própria	75

Figura 33. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , em diferentes v . (B) Dispersão de pontos da relação i vs. $v^{1/2}$	76
Figura 34. Voltamogramas cíclicos de Pd/CB-PVA preparados com diferentes concentrações de Pd em solução e tempos de deposição, em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; $v = 50$ mV s ⁻¹	78
Figura 35. (A) Superfície de resposta e (B) curva de nível obtida para a otimização da C_{Pd} e t como uma função da corrente de pico para Pd/CB-PVA. A elipse indica a região de parâmetros selecionados a ser investigada como ótima	79
Figura 36. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA, em diferentes concentrações de Pd para a eletrodeposição, em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; $v = 50$ mV s ⁻¹	80
Figura 37. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , em diferentes v . (B) Dispersão de pontos da relação i vs. $v^{1/2}$	81
Figura 38. Imagem de MEV de CB-PVA (A e B) e Pd/CB-PVA (C e D), em aumento de 2.000× (A e C) e 10.000× (B e D).....	82
Figura 39. Fotografia de 10 μ L de água sobre a superfície do eletrodo de trabalho de CB-PVA (superior) e Pd/CB-PVA (inferior)	83
Figura 40. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA (laranja) e CB-PVA (preto) em ausência (linha pontilhada) e presença (linha contínua) de 100 μ mol L ⁻¹ de EP, em PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,5); $v = 50$ mV s ⁻¹	84
Figura 41. Processo de oxidação da epinefrina	84
Figura 42. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA em presença de EP 100 μ mol L ⁻¹ , em PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,5), em diferentes v . (B) Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA em presença de EP 100 μ mol L ⁻¹ , em PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 6,5), em diferentes v	85
Figura 43. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos por Pd/CB-PVA, em ausência (preto) e presença (tons de laranja) de diferentes concentrações de EP, em PBS 0,1 ml L ⁻¹ (pH 6,5); $v = 30$ mV s ⁻¹ , $a = 25$ mV, $tm = 50$ ms (B) Dispersão de pontos da relação i vs. C_{EP}	86
Figura 44. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por diferentes modificações de CB-PVA, em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; $v = 25$ mV s ⁻¹ . (B) Diagramas de Nyquist obtidos por diferentes modificações de CB-PVA, em presença de ferrocenometanol	

1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; E _{1/2} de cada VC foi aplicado para a respectiva etapa, dados apresentados estão normalizados em ambos os eixos	89
Figura 45. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por αsyn/BSA/Aαsyn/Ga-Cys/Pd/CB-PVA modificado com diferentes concentrações de αsyn (1,50 a 15,0 μg mL ⁻¹), em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; E = 200 mV. (B) Dispersão de pontos da relação R _{CT} vs. C _{αsyn}	90
Figura 46. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por αsyn/BSA/Aαsyn/Ga-Cys/Pd/CB-PVA modificado com diferentes concentrações de αsyn (6,00 a 100 μg mL ⁻¹), em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; E = 200 mV. (B) Dispersão de pontos da relação R _{CT} vs. C _{αsyn}	91
Figura 47. Preparação do imunossensor eletroquímico: (I) cola de PVA e CB são misturadas para obter a tinta condutora; (II) sobre substrato PET limpo são adicionadas as máscaras e (III) espalhada a tinta. Após a retirada das máscaras, o aparelho é modificado: sobre sua (IV) superfície, (V) microfiores de Au são formadas por eletrodeposição. (VI) 3-MPA liga-se ao Au através da interação enxofre-metal, permitindo que (VII) EDC e NHS sejam adicionados, reticulando e preparando a superfície para o (VIII) antígeno e o bloqueador de superfície BSA. Com a inclusão de (IX) PARK7/DJ-1 a (X) variação da capacitância do sistema pode ser obtida. Fonte: Elaboração própria.....	95
Figura 48. Imagens de MEV de Au/CB-PVA com magnificação de (A) 1600× e (B) 6000×	99
Figura 49. Histograma demonstrando o padrão de distribuição de diâmetro de partícula de Au/CB-PVA.....	99
Figura 50. Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA (preto) e Au/CB-PVA (azul), em presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de hexamin rutênio, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; v = 50 mV s ⁻¹	100
Figura 51. (A) Voltamogramas cíclicos obtido por Au/CB-PVA com v variadas, (B) correlação i vs. v ^{1/2}	101
Figura 52. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por várias configurações de 3-MPA/Au/CB-PVA, em PBS 1,0 mmol L ⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V; (B) Diagramas de Cole-Cole obtidos por várias configurações de 3-MPA/Au/CB-PVA, em PBS 1,0 mmol L ⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V	103
Figura 53. Gráficos de (A) superfície de resposta e (B) contorno da relação concentração vs. tempo de interação de 3-MPA com Au/CB-PVA. Estrela indica valores ótimos escolhidos	104
Figura 54. Diagramas de Cole-Cole obtidos por várias configurações de AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA, em PBS 1,0 mmol L ⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V.....	105

Figura 55. Gráficos de (A) superfície de resposta e (B) contorno da relação concentração vs. tempo de interação de AntiPARK7/DJ-1 com 3-MPA/Au/CB-PVA. Estrela indica valores ótimos escolhidos.....	105
Figura 56. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA (preto), Au/CB-PVA (vermelho), 3-MPA/Au/CB-PVA (azul), EDC-NHS/3-MPA/Au/CB-PVA (rosa), AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (verde), BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (azul marinho) e PARK7/DJ-1/BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (roxo), em PBS 1,0 mmol L ⁻¹ (pH 6,4), de 10 ⁵ a 10 ⁻¹ Hz, onda tipo senoidal; amplitude = 10 mV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, E = 0,4 V; Diagramas de (B) Cole-Cole e (C e D) Bode obtidos por CB-PVA (preto), Au/CB-PVA (vermelho), 3-MPA/Au/CB-PVA (azul), EDC-NHS/3-MPA/Au/CB-PVA (rosa), AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (verde), BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (azul marinho) e PARK7/DJ-1/BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (roxo), em PBS 1,0 mmol L ⁻¹ (pH 6,4), de 10 ⁵ a 10 ⁻¹ Hz, onda tipo senoidal; amplitude = 10 mV; E = 0,4 V	106
Figura 57. (A e B) Diagramas de Bode obtidos por PARK7/DJ-1/BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA, modificado com diferentes concentrações de PARK7/DJ-1, em PBS 1,0 mmol L ⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V; (C) Relação $-C'$ vs. $C_{\text{PARK7/DJ-1}}$	107
Figura 58. Modificação de CB-PVA: (I) Sobre substrato PET limpo, (II) é aplicada a tinta condutora. (III) Após a secagem, é adicionado um delimitador de gota. (IV) A eletrodeposição do procedimento Au e Bi é realizada (V) e o dispositivo está pronto para uso. Fonte: Elaboração própria.....	114
Figura 59. Voltamogramas cíclicos de CB-PVA na ausência (preto) e presença (vermelho) de EtOH 1,0 mol L ⁻¹ , em KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	117
Figura 60. Voltamograma cíclico de Au/CB-PVA na ausência (preto) e presença (laranja) de 1,0 mol L ⁻¹ EtOH, em 1,0 mol L ⁻¹ KOH; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	118
Figura 61. Figura 6. Voltamogramas cíclicos de Bi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH 1,0 mol L ⁻¹ , em KOH 1,0 mol L ⁻¹ ; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	119
Figura 62. Resultados do planejamento fatorial completo 2 ⁴ : A) porcentagem relativa dos efeitos calculados e B) distribuição de probabilidade para as respostas do planejamento fatorial completo	120
Figura 63. (A, C, E) Superfícies de resposta e (B, D, F) gráficos de contorno para o modelo gerado no planejamento Doehlert para cada interação de duas variáveis: (A e B) v_1 vs. v_2 , (C e D) v_1 vs. v_3 e (E e F) v_2 vs. v_3	122

Figura 64. Voltamogramas cíclicos de AuBi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH 1,0 mol L ⁻¹ , em KOH 1,0 mol L ⁻¹ , com diferentes parâmetros de eletrodeposição: v1 = 2,5 mmol L ⁻¹ , v2 = 0,15 mmol L ⁻¹ e v3 = 300 s; v = 50 mV s ⁻¹ . (B) Voltamograma cíclico de AuBi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH 1,0 mol L ⁻¹ , em KOH 1,0 mol L ⁻¹ , com diferentes parâmetros de eletrodeposição: v1 = 2,16 mmol L ⁻¹ , v2 = 0,133 mmol L ⁻¹ e v3 = 254 s; v = 50 mV s ⁻¹ . (C) Voltamograma cíclico de AuBi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH 1,0 mol L ⁻¹ , em KOH 1,0 mol L ⁻¹ , com diferentes parâmetros de eletrodeposição: v1 = 1,83 mmol L ⁻¹ , v2 = 0,117 mmol L ⁻¹ e v3 = 210 s; v = 50 mV s ⁻¹ ...	124
Figura 65. Imagens de MEV de CB-PVA com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A').....	125
Figura 66. Imagens de MEV de Au/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Au 5,0 mmol L ⁻¹ , com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A')	126
Figura 67. Imagens MEV de Au/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Au 2,5 mmol L ⁻¹ , com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A').....	127
Figura 68. Imagens MEV de Bi/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Bi 5,0 mmol L ⁻¹ , com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A').....	128
Figura 69. Imagens SEM de Bi/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Bi 0,15 mmol L ⁻¹ , com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A').....	129
Figura 70. Imagens de MEV de AuBi/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de 2,5 mmol L ⁻¹ Au e 0,15 mmol L ⁻¹ Bi, com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A')	130
Figura 71. Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA (preto) e AuBi/CB-PVA (vermelho) na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; v = 50 mV s ⁻¹	131
Figura 72. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA na presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com diferentes v, de 50 a 250 mV s ⁻¹ . (B) Correlação <i>i</i> vs. v ^{1/2}	132
Figura 73. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por AuBi/CB-PVA na presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , com taxas de varredura variadas, de 50 a 250 mV s ⁻¹ . (B) correlação <i>i</i> vs. v ^{1/2}	133
Figura 74. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por CB-PVA (preto) e AuBi/CB-PVA (dourado) na presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; E _{CB-PVA} = -3,0 mV, E _{AuBi/CB-PVA} = -39 mV. Gráficos de Bode de -fase (B) ou Z (C) vs. frequência, obtidos por CB-PVA (preto) e AuBi/CB-PVA (dourado) na presença de 1,0 mmol L ⁻¹ de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ; E _{CB-PVA} = -3,0 mV, E _{AuBi/CB-PVA} = -39 mV	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com os respectivos resultados obtidos	37
Tabela 2. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos ..	38
Tabela 3. Composição das amostras preparadas.....	38
Tabela 4. Dados extraídos da análise de estabilidade.....	47
Tabela 5. Dados do circuito equivalente [R([RT]Q)].....	52
Tabela 6. Resultado dos efeitos calculados nos planejamentos 2^3	60
Tabela 7. Determinação de dopamina em amostras de urina sintética pelo pico de oxidação direta de dopamina e o pico dos óxidos metálicos.....	66
Tabela 8. Comparação entre este trabalho e outros presentes na literatura para a determinação de dopamina	67
Tabela 9. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos ..	72
Tabela 10. Composição das amostras preparadas	74
Tabela 11. Determinação de EP em amostras de líquido cefalorraquidiano sintético.....	86
Tabela 12. Comparação com outros sensores já publicados para a detecção de EP	87
Tabela 13. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos para as adições de 3-MPA	97
Tabela 14. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos para as adições de AntiPARK7/DJ-1	98
Tabela 15. Determinação de PARK7/DJ1 em líquido cefalorraquidiano sintético.....	108
Tabela 16. Desempenho analítico de diferentes imunossensores para a determinação de PARK7/DJ-1	109
Tabela 17. Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 com os respectivos valores para a oxidação de EOTH.....	114
Tabela 18. Matriz do planejamento Doehlert (valores reais) com respectivas respostas para a oxidação de EtOH.....	115
Tabela 19. Tabela ANOVA para o modelo calculado do planejamento Doehlert	121
Tabela 20. Respostas reais e previstas para os experimentos de validação	125

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(i), (ii), (iii), (iv)	Símbolos usados para diferenciar e separar exemplos e explicações
3-MPA	ácido 3-mercaptopropiônico
a_{linear}	Coefficiente linear da região de baixa frequência do diagrama de Nyquist
a	Amplitude de pulso de potencial
A	Área eletroativa
A α syn	Anti- α -sinucleína (anticorpo)
ADEFEC	Célula à combustível alcalina de etanol direta, do inglês <i>alkaline direct ethanol fuel cell</i>
anod.	Abreviação para processo anódico
α syn	α -sinucleína (antígeno)
$b_{angular}$	Coefficiente angular da região de baixa frequência do diagrama de Nyquist
B	Raiz quadrada do tempo de difusão
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês, <i>bovine serum albumine</i>
C	Elemento de capacitância para circuito equivalente de uma fase
C'	Capacitância real, associada à impedância imaginária
-C''	Negativo da capacitância imaginária, associada à impedância real
catod.	Abreviação para processo catódico

CB	Negro de fumo, do inglês <i>carbon black</i>
CB-PVA	Sistema de três eletrodos produzido por tinta condutora de negro de fumo e Poliacetato de vinila
cfc	Estrutura cúbica de face centrada
<i>ColorSEM</i>	Tecnologia que incorpora análises de espectroscopia de energia dispersiva ao microscópio eletrônico de varredura
CPE, Q	Elemento de fase constante, do inglês <i>constant phase element</i>
C _x	Concentração da espécie X
Cys	Cisteamina
<i>D</i>	Coeficiente de difusão
DAFC	Célula à combustível de ascorbato direta, do inglês <i>direct ascorbate fuel cell</i>
ΔE	Separação de pico-a-pico
DRX	Difração de raio X
E	Potencial
E _{1/2}	Potencial de meia onda
EDC	1-etil-3-carbodiimida
E _{dep}	Potencial aplicado para eletrodeposição
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E _{IR}	Potencial de início de reação
ELISA	ensaio de imun absorção enzimática
EP	Epinefrina

EtOH	Etanol
E_x	Potencial associado ao processo X
f	Frequência de pulso de potencial
F	Constante de Faraday: 96485,3324 s A mol ⁻¹
Ga	Glutaraldeído
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>glassy carbon electrode</i>
i, i_x	Corrente de pico, corrente de pico associada ao processo X
$i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$	Quociente entre as correntes anódica e catódica de um processo redox. O resultado é próximo a 1,0 para um processo reversível
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
k^0	Constante de transferência heterogênea de elétrons
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
$M1_xM2_y.....Mn_z/C$	Nomenclatura para um material condutor em que M representa metais distintos e X, Y e Z são as porcentagens de cada na soma de metais totais. C é a matriz de carbono
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
n	População de um conjunto
N	Exponencial da definição matemática do elemento de fase constante. É próximo a 1,0 para superfícies lisas e menor que isso para superfícies rugosas
v	Velocidade de varredura
NHS	N-hidroxisuccinimida
OCP	Potencial de circuito aberto, do inglês <i>open cell circuit</i>
ox.	Abreviação de oxidação
PB	Solução de tampão fosfato, do inglês <i>phosphate buffer</i>
PBS	Solução de tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffer saline</i>
PEMFC	Célula à combustível de membrana de troca de prótons, do inglês <i>proton-exchange membrane fuel cell</i>
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PVA	Poliacetato de vinila
R	Constante dos gases ideais: 8,3144621 J K ⁻¹ mol ⁻¹
R _{CT}	Resistência de transferência de carga de uma fase, do inglês <i>charge transfer</i>
red.	Abreviação de redução
ROE	Reação de oxidação de etanol
R _s	Resistência da Solução

s	Incremento de pulso de potencial
T	Elemento de Warburg para terminal de circuito aberto
t	Tempo de um processo, geralmente relacionado à deposição ou interação
tm	Tempo de modulação de pulso de potencial
v_1, v_2, v_3 e v_4	Variáveis alteradas pelo analista, estudadas em um planejamento de experimento
$v_1v_2, v_1v_3, v_1v_4, v_2v_3, v_2v_4$ e v_3v_4	Efeitos de interação secundária entre as variáveis, em que os números os pares vn representam as variáveis estudadas em questão
$v_1v_2v_3, v_1v_2v_4, v_1v_3v_4$ e $v_2v_3v_4$	Efeitos de interação ternária entre as variáveis, em que os números os pares vn representam as variáveis estudadas em questão
$v_1v_2v_3v_4$	Efeitos de interação quaternária entre as variáveis, em que os números os pares vn representam as variáveis estudadas em questão
VC	Voltametria cíclica
vn^2	Efeito de interação de uma variável consigo mesma, n representa um número associado à variável
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

W	Elemento de difusão semi-infinita, impedância de Warburg
ω	Frequência angular
Ψ	Parâmetro cinético da equação de Nicholson-Shain aproximada por Lavagnini e colaboradores
Y_0	Parâmetro com informações do coeficiente de difusão
Z	Valor de impedância de um elemento
Z'	Impedância real, associada à resistência
$-Z''$	Negativo da impedância imaginária, associada à capacitância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. MATERIAIS CONDUTORES	13
1.2. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL E ENERGIA	21
1.3. IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	24
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVOS GERAIS	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
CAPÍTULO I	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. EQUIPAMENTOS.....	34
3.2. PREPARO DOS ELETROCATALISADORES	35
3.3. MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS	36
3.4. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS.....	36
3.5. PREPARO DE AMOSTRAS.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA	39
4.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	42
4.3. APLICAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS PARA CATÁLISE DA OXIDAÇÃO DE ETANOL	52
4.4. DETECÇÃO DE DOPAMINA	58
5. CONCLUSÃO	67
CAPÍTULO II	70
6. MATERIAL E MÉTODOS	70
6.1. EQUIPAMENTOS.....	70
6.2. PREPARO DOS ELETRODOS DESCARTÁVEIS.....	71
6.3. ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Pd.....	72
6.4. MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS PARA BIOSSENSORIAMENTO.....	72
6.5. PREPARO DE AMOSTRAS.....	73
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
7.1. PERFIL ELETROQUÍMICO DE CB-PVA	74
7.2. ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Pd.....	76
7.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE Pd/CB-PVA	81
7.4. DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE EP	83
7.5. DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE α -SINUCLÉINA A PARTIR DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO	87
8. CONCLUSÃO	91
CAPÍTULO III	94
9. MATERIAL E MÉTODOS	94
9.1. REAGENTES	94
9.2. EQUIPAMENTOS.....	94
9.3. PREPARO DOS DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS	95

9.4.	MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE	96
9.5.	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	98
10.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
10.1.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ELETROQUÍMICA DE Au/CB-PVA	98
10.2.	DETECÇÃO DE PARK7/DJ-1 A PARTIR DO IMUNOSENSOR PROPOSTO.....	102
11.	CONCLUSÃO	109
CAPÍTULO IV		112
12.	MATERIAL E MÉTODOS.....	112
12.1.	REAGENTES	112
12.2.	EQUIPAMENTOS.....	112
12.3.	PREPARO DOS ELETRODOS DESCARTÁVEIS.....	113
12.4.	MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO SERIGRAFADO.....	113
13.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
14.	CONCLUSÃO	136
15.	CONCLUSÕES GERAIS	137
16.	REFLEXÕES	138
17.	REFERÊNCIAS.....	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. MATERIAIS CONDUTORES

1.1.1. Partículas Metálicas

Devido à suas dimensões nanométricas, as nanopartículas possuem propriedades físicas e físico-químicas diferentes das versões macroscópicas, como incrementadas conduções térmicas e elétricas, bem como diversificada interação com a luz [1-4]. A nanotecnologia vem permitindo a confecção de dispositivos analíticos cada vez mais sensíveis, já que diversos métodos de síntese de nanopartículas permitem o controle de seu tipo [5] e morfologia [6-8]. Dentre as mais utilizadas (Figura 1), destacam-se as nanopartículas poliméricas, frequentemente empregadas em mecanismos de entrega localizada de fármacos e bioativos, especialmente pela possibilidade de biodegradação e absorção do polímero pelo mamífero [5, 9-11]. Além destas, temos as nanopartículas metálicas, onde propriedades intrínsecas aos metais, como altas área específica e energia de superfície podem alterar favoravelmente uma reação [12-15], por exemplo. Na eletroanalítica, algumas dessas funções das nanopartículas metálicas são de considerável interesse. Uma delas é a melhoria da transferência eletrônica, onde a nanopartícula auxilia o centro ativo de enzimas e outros componentes biológicos à transferir elétrons para o eletrodo, devido ao seu tamanho diminuto conseguir interagir mais facilmente com a barreira proteica dessas moléculas [16-18]. Já outra, é a direta imobilização de biomoléculas, onde suas altas área e energia de superfície e a presença de cargas elétricas permitem uma interação com biomoléculas sem a perda de suas propriedades [16-18].

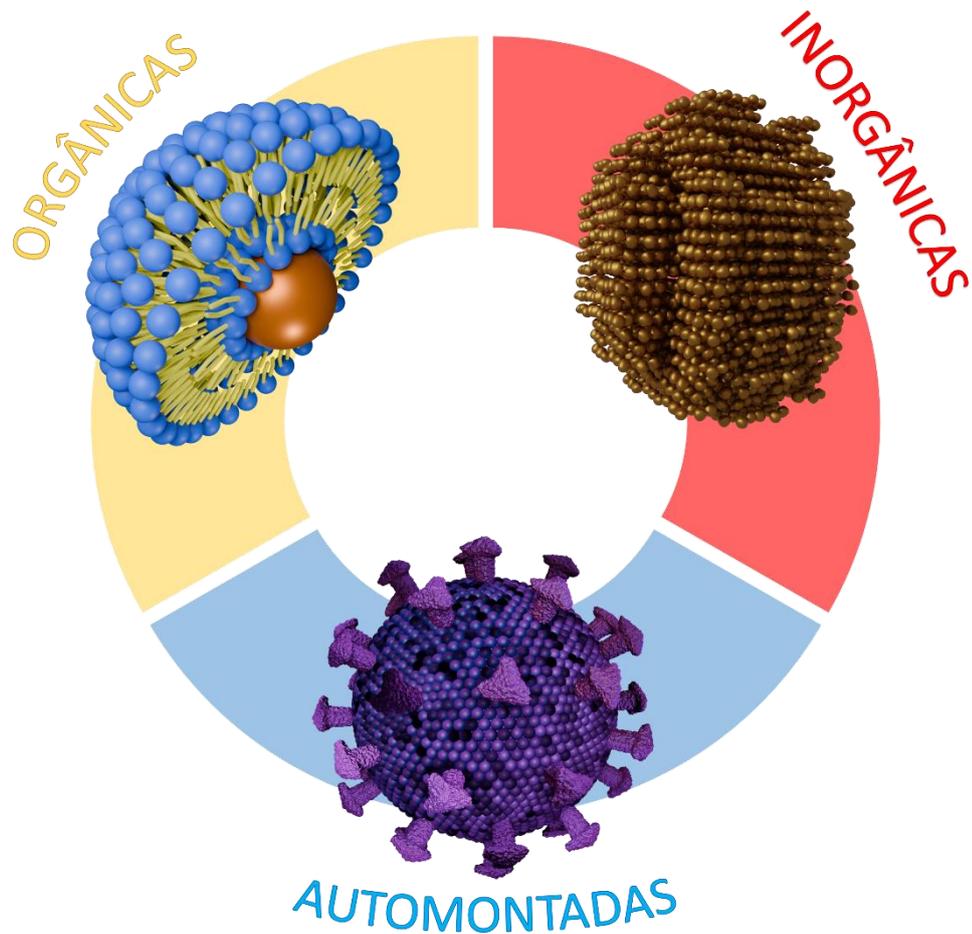


Figura 1. Representações de classes de nanopartículas. Fonte: Elaboração própria

Suprun *et al.* [19, 20] exploraram o uso de nanopartículas de ouro, prata e cobre para a modificação de um eletrodo de grafite. As nanopartículas foram acopladas a anticorpos de mioglobina cardíaca para a detecção do par antígeno. Em comparação aos três metais nesta aplicação, os autores demonstram que a prata teve uma singular diminuição de sinal em comparação ao ouro, e o eletrodo não demonstrou resposta satisfatória com as partículas de cobre. Dando continuidade ao trabalho com nanopartículas de ouro, eles reportam uma faixa linear de 10 a 400 ng mL⁻¹, e um limite de detecção (LOD) de 5,0 ng mL⁻¹. O trabalho de Liu *et al.* [20] demonstra o uso de nanopartículas de óxido de zinco como modificador de eletrodos impressos de carbono, para a detecção de acetilcolinesterase fosforilada em um imunossensor do tipo sanduíche. Os autores destacam mecanismos correlacionados à detecção de pesticidas organofosforados, em uma faixa linear de 0,01 a 4,0 nmol L⁻¹ e LOD de 8,0 pmol L⁻¹.

Talvez o mais comum modificador em biossensores eletroquímicos, nanopartículas de Au ganham esse destaque por manterem a baixa reatividade do Au macroscópico, em termos de alta estabilidade das nanopartículas e baixa toxicidade celular, além de permitirem, sem

interferência a atuação de biomoléculas, enquanto adicionando condução elétrica e carga de superfície ao material, facilitando transferências eletrônicas entre eletrodo e eletrólito [21-23]. Como exemplo, destaca-se o trabalho de Pandiaraj *et al.* [24] que desenvolveram dois imunossensores para citocromo c, um com nanopartículas de Au e outra com nanotubos de carbono. Dentre estes dispositivos, a adição de Au ao sistema se mostrou mais promissora que as partículas carbonáceas, apresentando um LOD de $2,0 \text{ nmol L}^{-1}$, numa faixa linear de $2,0 \times 10^{-9}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, atestando as características do material para biossensores, comparando-o com um excepcional condutor.

A literatura destaca Pd como um dos principais catalisadores metálicos, sendo este o de melhor desempenho em meio alcalino para a reação de oxidação de etanol (ROE) [25-27]. No entanto, quando se tratando de sensores e biossensores eletroquímicos, Pt e Au são consideravelmente mais empregados que Pd, apesar do custo deles ser relativamente maior ou próximo ao de diversos sais de Pd. As nanoestruturas de Pd mais comumente utilizadas são a cúbica, octaédrica e dodecaédrica rômica, correspondendo respectivamente aos planos catalíticos (100), (111) e (110) [28]. Com o planejamento de arquiteturas para sensores que se baseiam em alguma destas três estruturas, a literatura apresenta trabalhos interessantes, como o desenvolvido por Han *et al.* [29]. Neste, nanopartículas esféricas de Pd (111) foram sintetizadas por redução química assistida por amido, e os sensores apresentaram detecções de H_2O_2 em baixos níveis, partindo de $0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Após, os autores imobilizaram glicose oxidase com as nanopartículas de Pd, e o biossensor apresentou uma resposta linear para glicose entre as concentrações de 40 e $22.000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Outro fator em comum dentre alguns dos artigos mencionados acima é o fato de usarem eletrodos impressos por técnica de impressão em tela (serigrafia). Tal método consiste na aplicação de uma tinta condutora sobre uma superfície inerte [30, 31]. Em tecnologia de tintas, o material precisa conter uma partícula condutora, tecnicamente denominada de colorante; estabilizada pela viscosidade de um veículo (corpo) polimérico, e de seus devidos solventes, quando necessário [32, 33]. Em tintas condutoras comerciais, é frequente o uso de nanopartículas de cobre e prata, para incremento da condução elétrica [33-35].

1.1.2. Eletrocatalisadores

Para a devida funcionalização de células a combustível, faz-se necessário o uso de dois componentes: a membrana de permeação eletrônica entre ânodo e cátodo; e os eletrocatalisadores. Comumente, busca-se a aplicação de catalisadores para incrementar a eficiência da reação de oxidação do combustível, em que, dependendo dos componentes,

precisa-se de materiais mais capazes e em condições ideais [36, 37]. Como mencionado anteriormente, Pd é tido como um excelente catalisador e, além dele, Pt também tem o destaque como um dos principais catalisadores metálicos [25-27, 38-40]. Entretanto, devido o mecanismo destes ser por adsorção à superfície destes metais, a utilização puramente deles se torna inviável, pois intermediários altamente adsorptivos inutilizam sítios ativos, e, eventualmente, todo o metal [37, 41, 42]. Para tanto, a literatura traz diferentes investigações acerca de vários compósitos e ligas com o objetivo de tanto otimizar a atividade catalítica destes átomos, quanto de tornar as reações mais viáveis. Dentre estas, o uso de substratos à base de carbono pode ser evidenciado, uma vez que, além da boa condução elétrica, estes fornecem aumento da área superficial às partículas metálicas [36, 37, 41, 43, 44]. Além disso, busca-se o uso de catalisadores binários [45, 46] e, recentemente ternários [47-50], cujas alterações no processo sejam interessantes. Tais materiais podem ser obtidos com a adição de outros átomos, como Au, Fe, Co, Cu, Ni, Bi, Ag, Ir e outros. Com a recente relevância da área, busca-se cada vez mais a melhora de processos sintéticos, uma vez que a eficiência destes materiais está diretamente relacionada com esta etapa. Em especial, o processo deve proporcionar interações favoráveis ao incremento de área superficial ativa entre os elementos, de modo a desfavorecer o envenenamento [36, 48, 51-53].

Como exemplo, Tusi *et al.* [54] propõem o uso de PtBi/C como catalisador em uma célula à combustível para etanol (EtOH), investigando diferentes proporções entre os materiais. Destaca-se a alta eficiência da proposta, em que os autores atribuem o desempenho pela adsorção de OH na Pt próxima ao Bi (em duas fases diferentes, BiPt e Bi₂Pt), o que facilitava a remoção eletro-oxidativa de espécies intermediárias. Em outro trabalho, Jurzinsky *et al.* [55] demonstram a eficiência de um catalisador binário PdAg/C para a eletro-oxidação de metanol. Embora os autores atribuam o benefício do uso de Ag no material como sendo o mesmo do Bi no trabalho anterior, eles também destacam que há remoção oxidativa de CO da superfície, pelo mecanismo de Langmuir-Hinshelwood. Outro fator de interesse na inclusão destes metais em eletrocatalisadores é seu relativo baixo custo em comparação com os catalisadores baseados puramente em Pt e Pd.

1.1.2.1. Ouro

Dentre os metais pesquisados para o desenvolvimento de eletrocatalisadores, o Au é conhecido como um dos metais nobres menos explorados, principalmente devido à sua estabilidade química inerente, o que limita suas atividades catalíticas. No entanto, literaturas interessantes, produzidas nas últimas décadas, indicam que algumas de suas propriedades

podem de fato constituir um eletrocatalisador atraente, desde de que o material seja empregado sob condições específicos [56-59].

Alguns trabalhos extensos [59-62] sugerem que o desempenho catalítico de catalisadores à base de Au é afetado principalmente: (i) pela estrutura da superfície do eletrodo, sendo Au (111) o plano mais desejado para a oxidação catalisada de moléculas; e (ii) o pH do eletrólito suporte de catálise. Ajustando este último parâmetro químico, é possível observar um comportamento nernstiano entre o potencial absoluto da célula e os íons aquosos na solução [62, 63]. Este comportamento sugere uma variação na interação eletrodo-eletrólito, que leva a diferentes intensidades da adsorção de CO na superfície do dispositivo [63]. Este efeito é observado na literatura na forma de altos sobrepotenciais, em meio ácido, para que a oxidação do CO começar, enquanto em meio alcalino, a eficiência das superfícies de Au é ainda maior do que as estruturas de Pt, comumente consideradas como um catalisador mais vantajoso [60, 64].

Esta eficiência das estruturas de Au em meio alcalino é atribuída principalmente à adsorção de OH sobre os planos cristalinos (111), que atraem o CO da solução, melhorando ambos os processos de adsorção, em termos de energia. Como o meio alcalino é mais abundante em OH livre, a cobertura aumenta, melhorando a reação geral. Este tipo de interação também é extremamente importante para a oxidação de álcoois e açúcares com materiais deste metal nobre [65-67]. Em pHs superiores a 11, o equilíbrio favorece a produção de ânions etoxi ($R-O^-$) a partir de álcoois e açúcares adsorvidos, com reações subsequentes e determinantes da taxa, como a produção de aldeídos, culminando na formação de CO_2 , quando em completa eficiência [60].

Como as estruturas de Au são caracteristicamente estáveis, apresentam um comportamento único quando comparados aos catalisadores mais comuns: menor reatividade com eletrólito aquoso e taxa de envenenamento por CO bastante baixa. Isso leva os eletrocatalisadores de Au a atingirem taxas de rotatividade mais altas em altos sobrepotenciais e potenciais de início mais baixos, devido à interação entre CO_{ads} e o mecanismo envolvendo $R-O^-$ para álcoois/açúcares, comentado anteriormente (que ocorre em sinergia da adsorção de $CO-OH$) [63].

Novidades científicas sobre este tema incluem a substituição parcial de Au, em catalisadores à base do metal, para obter vantagens consideráveis: diferentes metais podem apresentar efeitos sinérgicos intensificadores, como aumento da distribuição de elétrons, eliminação de adsorbatos ou mecanismos colaterais que ignoram processos da reação no plano

do metal principal [68, 69]. No que diz respeito à substituição de metais nobres, também é importante destacar a redução do custo total, ao utilizar metais mais baratos e/ou menos nobres para atingir um comportamento ideal, mantendo ou superando a eficiência do metal puro [68, 70].

Como exemplo, o trabalho de Cuevas-Muñiz *et al.* [71] apresenta a comparação entre os eletrocatalisadores Au/C e Au₃₀Ag₇₀/C para a reação de oxidação da glicose, onde o catalisador ligado apresentou uma máxima de densidade de potência de ~1,0 mW mg⁻¹, enquanto Au/C apresentou um máximo de 0,4 mW mg⁻¹, e aumento de 2,5 vezes mais potência por mg de catalisador pela adição de Ag ao compósito. Os autores também destacaram a mudança do potencial de início de reação para valores mais negativos (~150 mV), indicando que menos energia é necessária para iniciar o processo como um todo.

1.1.2.2. Bismuto

A prática de aumentar a eficiência das principais espécies catalíticas com a adição de outros átomos metálicos, é muito difundida não apenas para catalisadores baseados em Au [72, 73]. Apresentando efeitos interessantes, o Bi vem ganhando considerável notoriedade no aprimoramento do desempenho dos catalisadores de Pd em células a combustível de EtOH alcalino direto [74]. Segundo Tusi *et al.* [54] ele tem efeitos eletrônicos potencializados na liga PdBi, o que favorece a reação de oxidação do EtOH, ao mesmo tempo que retarda o envenenamento por CO do metal mais nobre. Nos trabalhos de Ning *et al.* [75] e Neto *et al.* [76], é relatado que embora o Bi não necessariamente forme ligas, a adição do metal facilitou a reação geral pela formação de BiO superficial, limitando a perda de eficiência provocada por espécies intermediárias fortemente adsorvidas em Pd.

Em seu trabalho, Rogozhnikov [77] apresentou um extenso estudo da interação entre as estruturas Au(111) e Bi, revelando um comportamento interessante entre os dois metais. Por exemplo, ambos os metais interagiram na formação de ligações fortes entre os orbitais *s*-, *p*- e *d*-, e a adição de Bi à estrutura de Au não impede a formação de íons BiOH²⁺, mesmo em meio ácido. Ambos os resultados corroboram com o mecanismo atribuído ao metal além dos cristais de Pd: o efeito eletrônico, ao compartilhar elétrons com a estrutura geral; e os efeitos geométricos, evitando possíveis espécies intermediárias que potencialmente inibam a continuação da reação da célula. Porém, é importante ressaltar que, como o raio atômico do Bi é maior que o do Au, sua adição poderia provocar defeitos na superfície, possivelmente prejudicando a eficiência do material, bloqueando sítios ativos ou criando defeitos cinéticos

dificultadores. Portanto, um estudo envolvendo a proporção ideal entre os dois metais é essencial para tal aplicação.

1.1.3. Tintas Condutoras de Carbono e Eletrodos Descartáveis

Tintas condutoras podem ser utilizadas sobre substratos inertes de modo a criar eletrodos descartáveis, com a técnica de serigrafia adaptada. Esta técnica consiste na aplicação da tinta através de uma tela com o formato do eletrodo, desde que regulados o tempo de secagem e de remoção da dita tela [78, 79]. Como uma emergente alternativa, estes eletrodos não possuem a necessidade da regeneração de sua superfície e podem ser produzidos em larga escala, além de possuírem relativo baixo custo e possibilidade de miniaturização [79, 80], reduzindo o volume de amostra [80-82]. Como exemplo, Andreotti *et al.* [83] produziram dispositivos com tintas condutoras de grafite e esmalte para unhas, para a detecção de epinefrina (EP), dopamina e hidroquinona, como prova de conceito. O trabalho demonstra o relativo baixo custo e facilidade da produção do lote de eletrodos.

Possuindo vários alótropos interessantes para a eletroanalítica, materiais de carbono possuem interessantes propriedades de condução e resistência pelo seu relativo baixo custo, sendo comumente empregados na confecção de sensores, variando desde os sólidos e robustos como o carbono vítreo [84-86], até o uso de nanotubos e grafeno em dispositivos descartáveis [87-89]. A estrutura destes materiais, como a amorficidade do negro de fumo (*carbon black*, CB) ou a distribuição sp^2 dos planos estacados do grafite, permitem sua associação à veículos poliméricos na produção de tintas condutoras [90, 91]. Em teoria, a proporção ideal entre os materiais é próxima a uma relação 1:1 ($m:m$), de modo que não haja perdas das propriedades elétricas [33]. No entanto, destaca-se que alguns fatores intrínsecos ao polímero, como viscosidade e espaçamento entre cadeias, podem alterar esta proporção, facilitando ou dificultando o transporte eletrônico entre partículas espalhadas pela dispersão [92].

O CB (Figura 2) possui uma estrutura amorfa que apresenta propriedades interessantes para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, como alta condutividade e área superficial específica, enquanto é relativamente mais barato que outros nanomateriais de carbono, tanto em termos de custo, quanto em sua produção [93-95]. Quando produzido a partir de aquecimentos acima de 700 °C, ocorre um aumento no número de carbonos saturados das sequências sp^2 das estruturas, originando momento de considerável maior condução elétrica, além de sítios com bordas gráficas, que podem ser aproveitadas na imobilização de biomoléculas [93]. Além disso, devido a aglomeração disforme da estrutura, as superfícies desses materiais podem ser favoráveis para a intercalação de partículas metálicas, uma vez que áreas oxigenadas ou porosas alteram o

balanço de cargas superficiais e são consideravelmente mais reativas [93]. A literatura apresenta uma gama de sensores eletroquímicos em que CB foi empregado como modificador de eletrodos [94-98]. Delgado *et al.* [98] produziram dispositivos modificados com partículas esféricas de CB e fécula de batata para a determinação de tetraciclina em amostras de água e leite, com uma resposta linear entre 4,9 e 118 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 1,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O CB apresenta muitas vantagens, como uma alta área superficial específica [99], uma estrutura esférica com muitos defeitos localizados, o que aumenta a cinética de transferência de elétrons [99]; excelente condutividade elétrica [99-101], e a possibilidade de dispersá-lo em muitos solventes [99, 102]. Além disso, é um material de custo extremamente baixo, com margem pouco superior a US\$ 1,00 por kg [102]. Nesse contexto, o CB ganhou espaço na literatura, principalmente como agente modificador de eletrodos [100, 101, 103] tanto para sensores quanto para biossensores.



Figura 2. Representação de uma estrutura típica de CB. Fonte: Elaboração própria

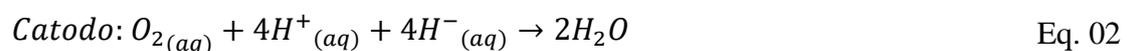
1.1.4. Materiais Multifuncionais

No desenvolvimento de novos materiais, é comum o foco em características específicas, normalmente em busca de uma dada aplicação. No entanto, ao se concentrar as atenções à natureza, nos deparamos com diversos materiais que correspondem à múltiplas

funções para um mesmo organismo ou sistema. Um exemplo clássico são as asas das borboletas, que além de fornecerem funções motoras para o voo, também são responsáveis por parte da absorção de energia na forma de calor e conversão de energia para estabilização da temperatura corporal, além de integrais papéis na sociedade do animal, como eventos de reprodução e camuflagem [104-106]. Seguindo esta ideia, é de se esperar cada vez da comunidade científica o interesse em desenvolver materiais que possibilitem diferentes aplicações, usufruindo de suas características intrínsecas para fornecer um único ou uma gama de mecanismos para cada uma destas operações [107-111]. No desenvolvimento de materiais para sensores voltamétricos, a literatura apresenta o uso de materiais desenvolvidos, em sua maioria, buscando uma maior magnitude em densidade de corrente. Entretanto, muitos dos trabalhos não especificam mecanismos ocorrendo na superfície do dispositivo, uma vez que tais processos podem ser consideravelmente complexos e nem sempre compensam o custo da pesquisa, uma vez que a informação do mecanismo pode não fornecer melhorias para tal estrutura [112-114]. Portanto, tal abordagem parece se distanciar da tida pelos desenvolvimentos de eletrocatalisadores para células à combustível, uma vez que esta necessita puramente do entendimento destes mecanismos de superfície para que se obtenha um material minimamente viável [115-118].

1.2. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL E ENERGIA

A constante emissão de CO₂ na atmosfera a partir do uso de combustíveis majoritariamente fósseis, principalmente pelos meios de locomoção, é atribuída como a principal responsável pelo agravamento do efeito estufa, danificando todo o ecossistema [41, 43]. Em consideração, diversas pesquisas relacionadas à produção de energias renováveis são foco dos atuais avanços tecnológicos e, dentre elas, podemos destacar as células a combustíveis eletroquímicas [36, 41-44]. Estas são alternativas interessantes para a obtenção direta de energia elétrica, além da possibilidade do uso de combustíveis de origem renovável [37, 42]. As Eqs. 01 e 02 representam seu princípio fundamental, onde há a quebra eletroquímica das ligações de um combustível, para geração de água, energia na forma de calor e eletricidade. No caso, refere-se ao transporte dos íons da ligação H-H no anodo para o catodo, produzindo corrente elétrica e os devidos subprodutos da oxirredução.



Para tanto, células baseadas na quebra da ligação entre os átomos de $H_{2(g)}$, foram essenciais para o crescimento e entendimento da área. Trabalhos pioneiros como os de Minh [119] e de Baldwin *et al.* [120] mostram aplicações deste mecanismo. Todavia, sabe-se que o elevado custo e periculosidade do trabalho com o gás, torna viável a investigação de outros materiais combustíveis. Nas últimas décadas, diversos trabalhos vêm propondo a utilização de espécies ricas em hidrogênio como combustíveis. Weber *et al.* [121] e Wang *et al.* [122] propõem o uso de ácido fórmico nestes aspectos, apresentando resultados promissores. Já recentemente, Muneeb *et al.* [123] conseguem aplicar, de modo aceitável, o uso de ascorbato para tal fim. Tais células a combustível são comumente referidas como PEMFC e DAFC, do inglês (*Proton-exchange membrane fuel cell* e *direct ascorbate fuel cell*, respectivamente). Ambas operam de modo similar, com operação de materiais condutores de prótons, como descrito.

Além disso, outras abordagens para células a combustível eletroquímicas são estudadas, como a quebra de ligações altamente energéticas, como a C–C. Nestes casos, o uso de álcoois é altamente difundido, sendo que seu caráter renovável torna a proposta atrativa. Dentre eles, o metanol é regularmente proposto como combustível [44, 124-126]. Todavia, pelas suas altas toxicidade e solubilidade em água, atualmente buscam-se materiais que possam substituí-lo, evitando danos ambientais e à saúde. Sendo largamente obtido pela agricultura, através do plantio de espécies do gênero *Saccharum* e o principal componente obtido da fermentação de biomassas, o EtOH se apresenta como uma fascinante opção para a função proposta. À estas células, atribui-se o nome de células à combustível de EtOH direto alcalina (ADEFC, do inglês *alkaline direct ethanol fuel cell*), e destaca-se que estas vêm ganhando considerável espaço, essencialmente pelo seu uso se dar em temperaturas mais baixas e com rendimento significativo [37, 42].

A utilização de álcoois em células à combustível é comumente referida como possuindo potencial para aplicações móveis, como carros e motocicletas; e para pequenos dispositivos portáteis, como telefones e computadores. Porém, embora o metanol seja uma das mais favoráveis opções, fatores ambientais podem considerá-lo como de alto risco, como discutidos anteriormente. Neste cenário, o EtOH pode ser uma importante opção, uma vez que a literatura [127-130] traz dados que corroboram que sua reatividade eletroquímica na superfície de catalisadores não é significativamente inferior à do metanol, e suas relativa baixa toxicidade e acessível obtenção, fazem dele um importante alvo de estudos. Portanto, este trabalho visou o emprego de eletrocatalisadores no estudo de células com EtOH como

combustível, tanto para demonstrar as funções e características dos materiais sintetizados, quanto para entender suas possíveis eficiências em células reais.

A análise deste tipo de equipamento depende da preparação precisa de uma célula, com eletrodos anódicos e catódicos, uma membrana permeável e os catalisadores adequados. Isto pode ser um processo que consome muitos recursos, uma vez que estes eletrodos são normalmente materiais relativamente caros e é desejável evitar a perda do catalisador durante o fechamento da célula. Além disso, o campo da eletroquímica está frequentemente em busca de novos materiais eletródicos, visando uma melhor reprodução da obtenção de dados com materiais relativamente mais baratos. Portanto, a comunidade científica vem, recentemente, apresentando ao mundo alternativas mais baratas e simples, obtidas pelas mais diferentes metodologias [131-134]. Neste contexto, tintas condutoras fabricadas em laboratório são introduzidas como opções para a fabricação de sistemas eletrônicos serigrafados em diferentes áreas da eletroquímica [135-138].

Esses dispositivos são feitos pela aplicação de tinta condutiva através de uma tela com desenho de eletrodo. Ao remover tal tela, a tinta é deixada secar sobre um substrato apropriado [139, 140]. Este tipo de dispositivo apresenta alta reprodutibilidade com possível produção em massa, custo de material relativamente baixo e possibilidade de miniaturização e modificação. Estas duas últimas propriedades são bastante interessantes para células à combustível, pois a miniaturização pode levar a abordagens com tecnologia *point-of-care*, tornando o equipamento mais próximo de uma célula móvel; e a possibilidade de modificação permitindo a melhoria da própria tinta ou da superfície do eletrodo, para transformar o dispositivo na solução de algum problema específico [141]. Um exemplo é a adição de enzimas ativas sobre a superfície do eletrodo, como as células de biocombustível produzidas por Marković *et al.* [142], onde duas enzimas diferentes foram adicionadas a um sistema de eletrodos serigrafados para criar um regime de transferência de elétrons para a oxidação da glicose, levando a uma máxima densidade de potência de $0,34 \text{ mW cm}^{-2}$ a 250 mV.

A literatura recente demonstra que há interesse em novas formulações de tintas e suas modificações, onde diferentes partículas condutoras são adicionadas na dispersão [143-145], ou no uso de solventes, agentes ligantes e outros aditivos, para melhorar o desempenho do eletrodo [135]. Por exemplo, nosso grupo de pesquisa já publicou uma gama de tintas condutoras para aplicações eletroquímicas, com componentes de custo relativamente baixo, incluindo esmalte [140], verniz automotivo [139], dispersão aquosa de quitosana [146], resina alquídica [147] e goma-laca [148].

Assim, um dos trabalhos aqui descritos teve como objetivo a identificação e desenvolvimento de estruturas catalíticas ótimas com nanopartículas de Au e Bi eletrodepositadas sobre um sistema de eletrodos serigrafados, otimizado por Planejamento de Experimentos em diferentes proporções de Au:Bi, visando à oxidação de EtOH.

1.3. IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Biossensores eletroquímicos são dispositivos que utilizam biorreceptores de elétrons como modificadores para as estruturas sensoriais convencionais [149-152]. Embora existam em diferentes formas, uma das mais estudadas é o uso de anticorpos e antígenos para tal função [149-152]. Anticorpos são componentes produzidos naturalmente por um organismo vivo, que possuem um formato em Y, com duas regiões distintas: a cadeia leve, localizada na parte superior, que contém dois pares de cadeias polipeptídicas; e a cadeia pesada, que é ligada diretamente ao corpo central da macromolécula (Figura 3). A parte mais ao topo de ambas as cadeias possui um sequenciamento próprio para ligar-se covalentemente a um antígeno específico. Tal característica garante alta seletividade aos imunossensores, sendo este seu principal atrativo para a análises químicas [149-152]. Já a parte inferior dos anticorpos, embora muitas vezes não se tratem de portadoras de mecanismos de interesse, podem ser utilizadas para imobilização das moléculas nos sensores [149-152].

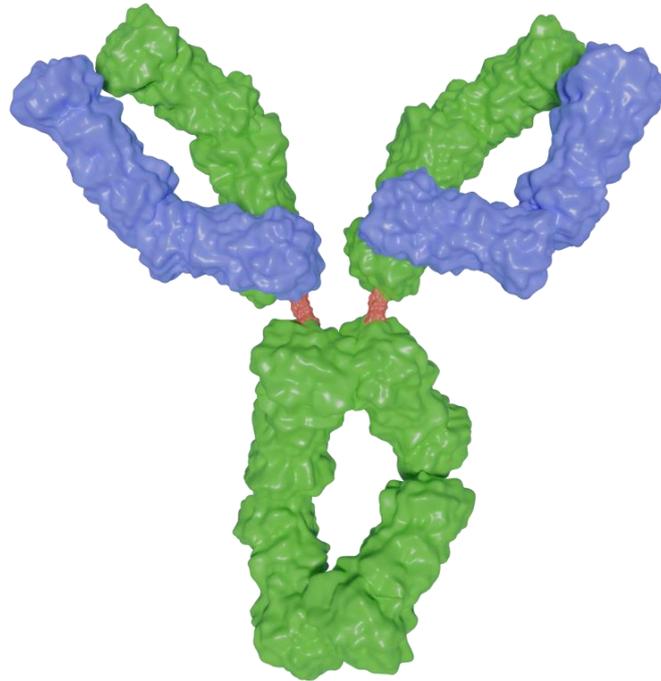


Figura 3. Representação de um anticorpo com cadeias leves (azul), pesadas (verde) e suas ligações de dissulfeto (vermelho). Fonte: Elaboração própria

Diferentes dispositivos podem ser confeccionados a partir da interação entre estas cadeias peptídicas dos anticorpos e os seus respectivos antígenos, a depender da configuração do experimento e/ou da arquitetura do sensor. Um dos testes mais famosos na área da saúde é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), que, em sua forma mais simples, consiste na imobilização de um anticorpo de interesse a um substrato, onde será promovida a interação com seu antígeno. Um segundo anticorpo será ligado a este mesmo antígeno, mas este será marcado com uma enzima. A última etapa consiste na adição de uma solução contendo o substrato da enzima, promovendo seu processo catalítico. Com a reação da enzima, um sinal controlado é detectado, geralmente na forma colorimétrica, e pode-se saber se o diagnóstico do paciente. Este ensaio é denominado como sanduíche, onde o antígeno fica ligado a dois anticorpos em posições opostas [153-156]. Uma variação do teste ELISA também pode exemplificar outro mecanismo de sensores produzidos, aquele baseado em interações competitivas entre diferentes antígenos. O antígeno de interesse é adicionado a um meio que contém o mesmo ou antígenos similares, mas que são marcados com moléculas ou íons de fácil detecção. Este meio contém menor concentração de anticorpos, de modo que os antígenos compitam pela ligação. Como o antígeno marcado produz um sinal detectável, a interação com o antígeno não marcado provoca a queda deste sinal, também de forma controlada [153, 156, 157].

Para a eletroanalítica, temos também outra configuração: a que opera com a adição de camadas, à superfície do eletrodo, que não necessariamente são compostas de exímios condutores elétricos, obtendo-se um sinal relativamente baixo. Assim, faz-se necessário o uso de uma espécie redox bem conhecida para funcionar como mediadora de elétrons. Nestes casos, duas frentes são encontradas em literatura: dispositivos que utilizam de biomoléculas marcadas com espécies de sondas eletroquímicas, em que o sinal destas é monitorado [152, 158, 159], e outros que utilizam a resposta do sistema em relação ao conteúdo da cela eletroquímica, na presença de tais sondas. Esta segunda classe é denominada *label-free*, uma vez que não contém as biomoléculas marcadas [151, 160-162]. Em se tratando do monitoramento do sinal elétrico/eletroquímico, pode-se ainda utilizar do sinal voltamétrico faradáico da sonda ou da resposta em relação à impedância do sistema. Considerando-se que a ligação antígeno-anticorpo pode prejudicar a obtenção do sinal, a resposta de impedância eletroquímica do sistema poderá sofrer alterações, possivelmente de forma controlada [149, 163-165], sendo a investigação deste comportamento também um dos objetivos deste trabalho.

1.3.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson possui seu mecanismo bem elaborado e explicado pela comunidade científica, com avanços consideráveis desde sua primeira publicação, por James Parkinson em 1817 [166]. Dentre suas funções, a doença avaria o sistema motor [167], provoca desordens de sono [168] e está relacionada com depressão [169] e hiposmia [170]. Seu mecanismo está intimamente associado à perda de neurônios pigmentados dopaminérgicos na substância negra e à acumulação/deposição de α -sinucleína (α syn, também conhecida como PARK1, Figura 4) em neurônios. Quando isolados, estes fatores podem ter motivos externos à Parkinson, porém, quando acontecem juntos, são um fator definitivo para o diagnóstico [171, 172]. A perda dos neurônios dopaminérgicos citados começa focalizada em estágios preliminares, mas rapidamente se alastra para várias regiões cerebrais conforme a progressão da enfermidade. Já a concentração de α syn ocorre no citoplasma neuronal de várias regiões cerebrais. Tais acúmulos acarretam na formação de agregados da molécula, tal como os corpos de Lewy, obstruindo vários mecanismos devido ao tamanho descomunal destes agregados [167, 173].

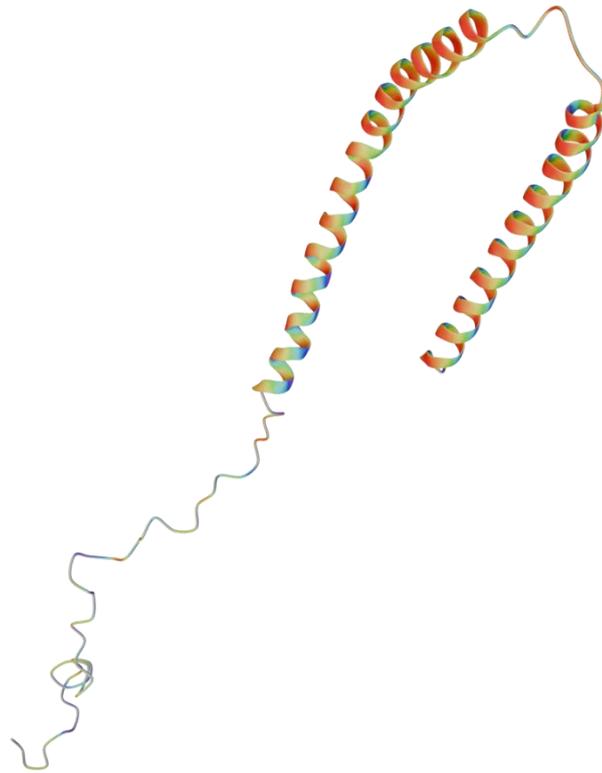


Figura 4. Estrutura tridimensional de α -sinucleína. Fonte: Elaboração própria

Em uma estimativa geral, a doença afeta 20 a cada 100.000 indivíduos, com uma taxa incrementada de 5 a 10 vezes após os 60 anos [167, 174-176] e com um aumento na mortalidade após a primeira década de início dos sintomas [167, 177]. Conforme estudos [167, 178], devido os avanços medicinais e o envelhecimento da população global, estima-se que entre 2005 e 2030 o número de casos de Parkinson dobrará, aumentando o interesse científico de se obter novos e mais robustos métodos de diagnóstico e tratamento. Uma discussão sobre as regiões mais afetadas pela patologia é difícil, uma vez que não existem muitos estudos classificando fatores puramente genéticos ou regionais, e sim uma distribuição de trabalhos que relatam uma influência de ambos [167, 179, 180]. No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [181], a projeção de população idosa, para 2030, com a doença é de cerca de 10.000.000 de habitantes. No entanto, com o aumento do uso de agrotóxicos nos anos recentes, é esperado que exista um aumento deste número. Trabalhos como os de Ascherio *et al.* [182] constataam uma relação entre o uso destes compostos com os problemas neurodegenerativos da doença de Parkinson.

Dentre as espécies biomarcadoras para a Parkinson, a que possui relação mais direta aos diferentes estágios da doença é a própria α syn. Em preocupação com seu monitoramento e diagnóstico precoce, alguns imunossensores podem ser encontrados na literatura. Xu *et al.*

[183] desenvolveram um dispositivo à base de óxido de grafeno, com ligação covalente à molécula, para detecção de seu anticorpo. Eles reportam um LOD de $1,2 \text{ pmol L}^{-1}$. An *et al.* [150] utilizaram da ligação da proteína com uma superfície contendo nanopartículas de ouro que, posteriormente, foi utilizada para acoplar com um anticorpo secundário (imunoglobulina G). Com este acoplamento, a resposta eletroquímica do dispositivo era avariada de maneira controlada, pelo incremento da resistência do sistema. Eles reportaram uma faixa linear de $0,05$ a $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ e um LOD de $14,6 \text{ pg mL}^{-1}$. Vale destacar, também, que o teste ELISA pode ser empregado para a determinação do antígeno em pacientes com Parkinson, onde a concentração média de αsyn no sangue é de $24,8 \text{ mg mL}^{-1}$, como destacado por Barbour *et al.* [184]. Os autores também indicam que mais de 99% da αsyn no corpo humano é encontrada no sangue, indicando que o meio poderia ser mais explorado para o diagnóstico de pacientes com Parkinson, juntamente do líquido cefalorraquidiano, que é a amostra mais utilizada para este fim.

Um segundo efeito do acúmulo de αsyn , como descrito por Gai *et al.* [185] é a severa diminuição de neurônios que contenham feniletanolamina N-metiltransferase, a principal enzima responsável pela síntese de EP, no bulbo rostral ventrolateral e da rafe medular rostral, provocando uma brusca queda na concentração de EP no organismo. A EP (Figura 5) é uma catecolamina de grande importância no sistema nervoso central, agindo primariamente como hormônio e neurotransmissor nos regulamentos da taxa de batimento cardíaco, atividade dos músculos cerebrais e pressão sanguínea [186, 187]. Devido à estas funções, alterações em sua concentração é intimamente relacionada ao surgimento de outras doenças neurológicas e neuropsiquiátricas em pacientes com Parkinson [185, 186, 188, 189], fazendo com que sua determinação seja de interesse clínico.

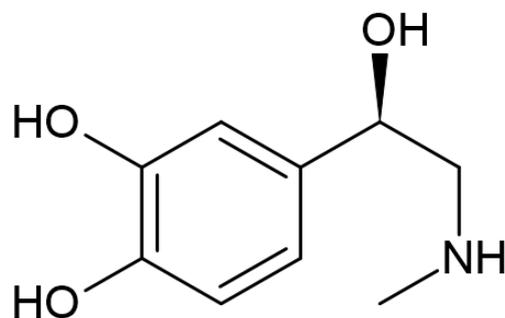


Figura 5. Estrutura da epinefrina. Fonte: Elaboração própria

A faixa comum de EP num humano saudável varia diariamente entre 0 e 764 pmol L^{-1} [190], mas esse valor pode aumentar para os níveis de $\mu\text{mol L}^{-1}$ [191] devido a muitas

doenças, como tumores adrenais, conhecidos como feocromocitoma [191], paraganglioma e hipertensão [192], medula renal disfuncional [193] e doença de Parkinson [194, 195].

EP está correlacionado a muitas doenças diferentes, fazendo com que seja mais comumente usado como analito do que α syn, em química analítica. Como tal, uma variedade de técnicas e dispositivos têm sido usados para detectar o neurotransmissor, como fluorescência [196], tomografia por emissão de pósitrons [197, 198], cromatografias [57, 58, espectrometria de massa [199, 200] e técnicas eletroquímicas [201, 202]. Este último grupo tem a vantagem de fornecer dispositivos de determinação relativamente mais baratos, incluindo o recente aumento de sistemas feitos em laboratório para tal fim [140, 203-205].

Outra interessante proteína que vem sendo considerada um biomarcador emergente para Parkinson é a proteína DJ-1. Esta possui diferentes funções no organismo, e tem atuação fundamental na proteção contra o estresse oxidativo. A proteína é produzida pelo gene PARK7, sendo categorizada inicialmente como um oncogene [206].



Figura 6. Estrutura tridimensional da proteína PARK7/DJ-1. Fonte: Elaboração própria

Pacientes com alto nível de DJ-1 são associados à alta tolerância ao estresse oxidativo, mas este excesso pode estar associado ao desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas, como a Parkinson, mas também à diabetes tipo 2 e cânceres, especialmente

o endometrial [207, 208]. Embora a ciência ainda pouco tenha compreendido seus mecanismos, algumas revisões buscam estudar a relação proteína/doença, encontrando que, em casos de estresse celular, o nível de DJ-1 tende a ser um importante sinalizador, especialmente em pacientes com Parkinson, onde a DJ-1 tem sua sequência de genes oxidada em seus resíduos de cisteína (posição 106) [209-211]. O trabalho de Hong *et al.* [212] indica, através de *Western Blot*, filtração em gel e espectroscopia de massa, que os níveis da proteína variam em torno de 30 a 90 ng mL⁻¹, a depender de idade, alimentação e outros fatores externos, em pacientes diagnosticados com Parkinson e outras doenças neurodegenerativas. Todavia, embora os autores corroborem que a proteína tem função no desenvolver das doenças, eles também indicam que mais estudos são fundamentais para afirmar seu papel no processo. Deste modo, dispositivos adequados à quantificação desta proteína também são de interessante valia para pesquisas na saúde.

Esta tese de doutorado direto apresenta a exploração de conceitos, teorias, práticas, situações e métodos, tanto os comumente empregados, quanto os tidos como não-usuais e complexos. Assim, este documento se propõe a detalhar e explicar diferentes fenômenos e experimentos, numa tentativa de ser um material base para futuras gerações da área da eletroanalítica e adjacentes. Com um extenso foco no entendimento das estruturas dos materiais e em como essa característica se estende para a resposta eletroquímica, seguem-se quatro capítulos explorando abordagens diferentes do uso de partículas metálicas para o desenvolvimento de sensores, biossensores e eletrocatalisadores.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este documento descreve um trabalho de pesquisa que buscou desenvolver diferentes dispositivos, cada um empregando partículas metálicas com propostas distintas, visando aplicações tanto em sensores e biossensores eletroquímicos, quanto em células à combustível.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I

- Propor processo de síntese de eletrocatalisadores ternários de Pd, Ag e Bi que sejam eficientes para a oxidação de etanol;
- Investigar e avaliar a eficiência dos eletrocatalisadores sintetizados, buscando conhecimento sobre suas estruturas morfológicas e como elas afetam o material eletroquimicamente;
- Identificar composições cientificamente atrativas destes compósitos e aplica-las em cenários próximos ao real para células à combustível;
- Construir sensor eletroquímico com o eletrocatalisador ternário que apresentar resultados interessantes no teste com célula, buscando integração entre diferentes áreas da eletroquímica;
- Investigar melhores condições de operação para o sensor eletroquímico e aplicá-lo em testes de validação para a determinação de dopamina.

CAPÍTULO II

- Produzir uma nova tinta condutora, com materiais de relativo baixo custo, buscando a fabricação de sistemas economicamente mais viáveis, sem perda de eficiência;
- Investigar e caracterizar a estrutura e comportamentos pertinentes da nova tinta desenvolvida, buscando correlacionar as informações obtidas com seu perfil eletroquímico;
- Modificar a superfície dos dispositivos com partículas de Pd, e otimizar o processo com auxílio da Planejamento de Experimentos, para aplicar o dispositivo em amostras pertinentes;
- Modificar a superfície dos dispositivos com camadas automontadas de moléculas e proteínas, e otimizar o processo com auxílio da Planejamento de Experimentos, para aplicar o dispositivo em amostras pertinentes;

CAPÍTULO III

- Modificar a superfície da tinta condutora com micropartículas de Au para incremento da contribuição de capacitância eletroquímica do material;
- Modificar a superfície das partículas de Au com camadas automontadas de moléculas e proteínas, fazendo com que o dispositivo possa determinar a concentração de PARK7/DJ-1.
- Otimizar as modificações com Planejamento de Experimentos;
- Aplicar e validar o dispositivo em testes de determinação de PARK7/DJ-1 em amostras complexas e reais.

CAPÍTULO IV

- Investigar a proporção entre Au e Bi para melhorar a eficiência do processo de oxidação do etanol e otimizar todo o processo de eletrodeposição dos metais por meio de Planejamento de Experimentos;
- Validar o procedimento otimizado e o modelo matemático com experimentos;
- Caracterizar morfológica e eletroquimicamente o material, buscando relacionar as informações obtidas.

*Em frente, então! Para a glória e outras bobagens
desse tipo!*

Brandon Sanderson, Palavras de Radiância

CAPÍTULO I

ELETROCATALISADORES DE Pd, Ag E Bi SUPORTADOS EM CARBONO COMO MATERIAIS ELETROQUÍMICOS MULTIFUNCIONAIS PARA OXIDAÇÃO DE ETANOL E DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do grupo Merck (Sigma Aldrich) e/ou Fluka, em grau analítico. Água ultrapura (Millipore™ Synergy®), com resistividade $>18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi usada no preparo de todas as soluções. Para caracterização eletroquímica do dispositivo, soluções $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KOH (pH 13) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (PB) (diferentes valores de pH) foram utilizadas como eletrólito suporte, esta última também usada na determinação de dopamina, em pH 6,1. As Figuras e modelos tridimensionais foram feitos com o *software* Blender 4.2.

3.1. EQUIPAMENTOS

As análises eletroquímicas foram efetuadas por um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm (Eco Chemie), gerenciado pelo *software* Nova 2.1.4, em que o sistema de três eletrodos, composto por eletrodos de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como referência, platina (Pt) como contra-eletrodo e de carbono vítreo (GCE, *glassy carbon electrode*) modificado para trabalho, foi utilizado em todas as análises. Para cada voltametria, houve um tempo de espera de 60 s entre o contato do dispositivo com solução contendo o analito e o início dos experimentos. As análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram obtidas com os seguintes parâmetros experimentais: $E = -472 \text{ mV}$, amplitude de 10 mV, ondas do tipo seno por toda a análise e 10 incrementos de frequência por década, numa faixa de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^{-2} \text{ Hz}$. A caracterização morfológica foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) usando um Microscópio Eletrônico de Varredura Thermo Scientific Prisma E, com tecnologia *ColorSEM* integrada. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas usando um instrumento JEOL JEM 1200 a 200 kV (imagem de campo escuro obtida com mesma configuração a da imagem de campo claro). A difração de raio X (DRX) foi realizada por um Miniflex II difratômetro de raios X (Rigaku), com uma fonte de radiação de CuK α ($\lambda = 0,15406 \text{ nm}$), numa faixa de $3,0$ a 90° angulares, com um incremento de $0,02^\circ$ e $10^\circ \text{ min}^{-1}$ de tempo de análise. Um pHmetro 827 (Metrohm) foi usado para todas as determinações de pH. Para experimentos em células à combustível, conjuntos Eletrodo-

Membrana-Eletrodo foram preparados por prensagem a quente a 125 °C por 7 minutos sob pressão (225 kgf cm⁻²), utilizando membranas de Nafion® 117 pré-tratadas, colocadas entre as membranas anódicas dos eletrocatalisadores (Pd/C, Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₅₀Bi₅₀/C, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C) e eletrocatalisadores catódicos (Pt/C comercial, Basf). Os ânodos binários e ternários preparados, bem como os cátodos foram feitos com uma carga de massa do eletrocatalisador de 1,0 mg_{Pd} cm⁻² [221]. A célula foi operada a uma temperatura de 70 °C. As curvas de polarização foram obtidas em um AutoLab PGSTAT302N, também com o *software* Nova 2.1.4 para coleta de dados.

3.2. PREPARO DOS ELETROCATALISADORES

Todos os eletrocatalisadores neste trabalho apresentam 20% de sua massa como metais e os seguintes foram sintetizados: Pd/C, Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₅₀Bi₅₀/C, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C. Estes materiais foram sintetizados a partir de métodos já encontrados na literatura [43]. Primeiramente, sais dos metais desejados (grau analítico) foram aliqüotados juntamente ao suporte de carbono. Após, foi adicionado HCl 0,4 mol L⁻¹ e a mistura permaneceu em agitação constante por 2 h. Em seguida, uma solução de amônia foi adicionada até que o pH 11 fosse atingido. Posteriormente, uma solução aquosa de NaBH₄, de concentração cuja massa do redutor fosse correspondente a de cinco vezes a massa dos metais totais, foi acrescida ao sistema, e a mistura permaneceu em agitação constante por mais duas horas. O material foi então lavado com água destilada durante filtração à vácuo, para remoção de impurezas, até atingir pH 7,0. Após 4 horas de secagem em estufa (60 °C) os materiais estavam prontos para uso. Finalmente, os eletrocatalisadores foram empregados na modificação de eletrodos de carbono vítreo, como descrito na seção 3.3., para o estudo de seu comportamento. A Figura 7 representa todo o processo.

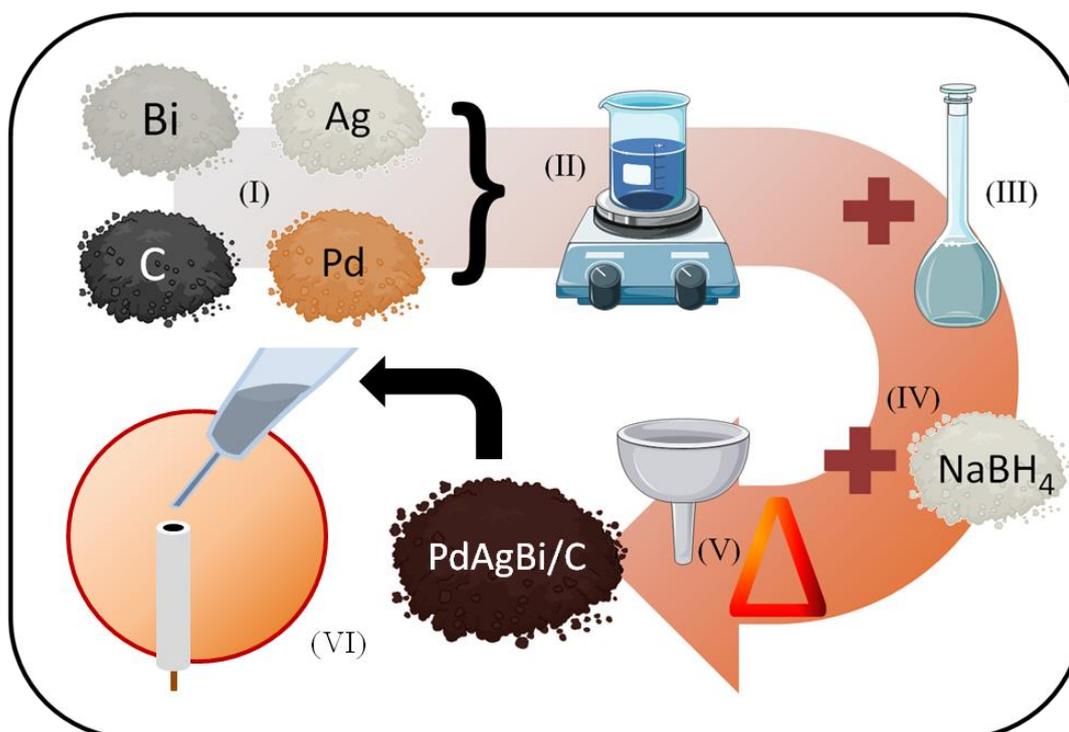


Figura 7. Esquema de preparo dos eletrocatalisadores. (I) os reagentes serão aliquotados em balança analítica (II) para sequente adição de HCl. (III) Após agitação constante, o meio será alcalinizado com solução de amônia, e (IV) NaBH_4 será acrescido para completa redução. (V) posteriormente à processos térmicos e de filtração, (VI) os eletrocatalisadores estarão prontos para modificação dos eletrodos. Fonte: Elaboração própria

3.3. MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS

Primeiramente, uma dispersão de $\sim 2,0$ mL dos eletrocatalisadores foi preparada com água ultra pura ($1600 \mu\text{L}$), álcool isopropílico ($400 \mu\text{L}$) e Náfion ($40 \mu\text{L}$). Posteriormente, um GCE foi devidamente lixado em superfície de veludo embebida em solução concentrada de alumina, para limpeza da superfície. Após, $6,0 \mu\text{L}$ da dispersão foram gotejados em sua superfície, e, com 1,5 h de secagem, o dispositivo, intitulado $\text{Pd}_x\text{Ag}_y\text{Bi}_z/\text{C}/\text{GCE}$ (onde X, Y e Z representam as porcentagens de cada metal, quando presente) estava pronto para uso.

3.4. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS

A otimização dos parâmetros operacionais para a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ): incremento de potencial (s , v_1), amplitude de pulso (a , v_2) e frequência (f , v_3); foram conduzidas com experimentos fatoriais completos 2^3 nos seguintes valores: f : 5,0 e 20 Hz, a : 60 e 100 mV e s : 1,0 e 5,0 mV. Estas análises foram realizadas em presença de 1,0

$\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,1 (definido a partir da literatura). Esta e todas as outras voltametrias realizadas neste trabalho tiveram tempo de adsorção de dopamina de 60 s para cada análise. A Tabela 1 apresenta a matriz experimental dos experimentos (variáveis, valores codificados e respostas). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em ordem aleatória [222, 223].

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) com os respectivos resultados obtidos

Experimento	M	v1	v2	v3	v1v2	v1v3	v2v3	v1v2v3	Resposta (μA)
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	61,8
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	64,9
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	97,6
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	131
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	14,1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	14,0
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	23,2
8	1	1	1	1	1	1	1	1	18,6

Em sequência, as duas variáveis mais significantes (a e f , $v1$ e $v2$, respectivamente) foram otimizadas aplicando-se um arranjo de composto central, nos valores de 60 e 100 mV para a e 2,0 e 10 Hz para f , nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. O incremento de potencial foi definido como 5,0 mV, pelo experimento com maior magnitude de corrente ter ocorrido com este valor. A Tabela 2 apresenta a matriz para este experimento.

Tabela 2. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos

Experimento	M	v1	v2	v1²	v2²	v1v2	Resposta
1	1	-1	-1	1	1	1	85,6
2	1	1	-1	1	1	-1	72,0
3	1	-1	1	1	1	-1	31,9
4	1	1	1	1	1	1	48,3
5	1	-1,4142	0	2	0	0	45,2
6	1	1,4142	0	2	0	0	129
7	1	0	-1,4142	0	2	0	9,61
8	1	0	1,4142	0	2	0	50,9
9	1	0	0	0	0	0	90,2
10	1	0	0	0	0	0	95,4
11	1	0	0	0	0	0	93,1

3.5. PREPARO DE AMOSTRAS

As detecções de dopamina foram realizadas por método de adição e recuperação em urina sintética. Ambas as amostras foram preparadas em meio de PB (0,1 mol L⁻¹, pH 6,1, com equivalente força iônica). A Tabela 3 mostra todos os reagentes utilizados junto de suas concentrações, de acordo com a literatura [224-226].

Tabela 3. Composição das amostras preparadas

Espécie	Urina sintética (g L⁻¹)
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,12
NaCl	2,92
Na ₂ SO ₄	2,24
KH ₂ PO ₄	1,40
KCl	1,60
NH ₄ Cl	1,00
Ureia	25,0
Creatinina	1,10

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA

A superfície do dispositivo modificado com cada um dos diferentes eletrocatalisadores foi caracterizada pelas técnicas de MEV, DRX e MET, com a Figura 8 apresentando as imagens de MEV, a Figura 9 as de DRX e Figura 10 os dados de MET.

Através de todas as imagens de MEV é possível notar pequenos aglomerados metálicos distribuídos, com morfologias estruturais específicas, variando com a identidade do catalisador. As imagens de Pd/C revelam que nas condições preparadas, o filme de catalisador apresentou rupturas em vários locais. No entanto, a adição de outros metais parece diminuir a frequência destas. O eletrocatalisadore Pd₅₀Ag₅₀/C apresentam alta exposição de aglomerações metálicas, ainda mais abundantes que em Pd/C, em toda a camada externa. Por outro lado, a presença de Bi nesses compósitos conferiu fases de caráter ondulatorio e lisas, mesmo com baixas concentrações desse elemento. Ambos os catalisadores ternários mostraram regiões metálicas mais localizadas em relação aos materiais binários, geralmente próximas a essa região em ondular.

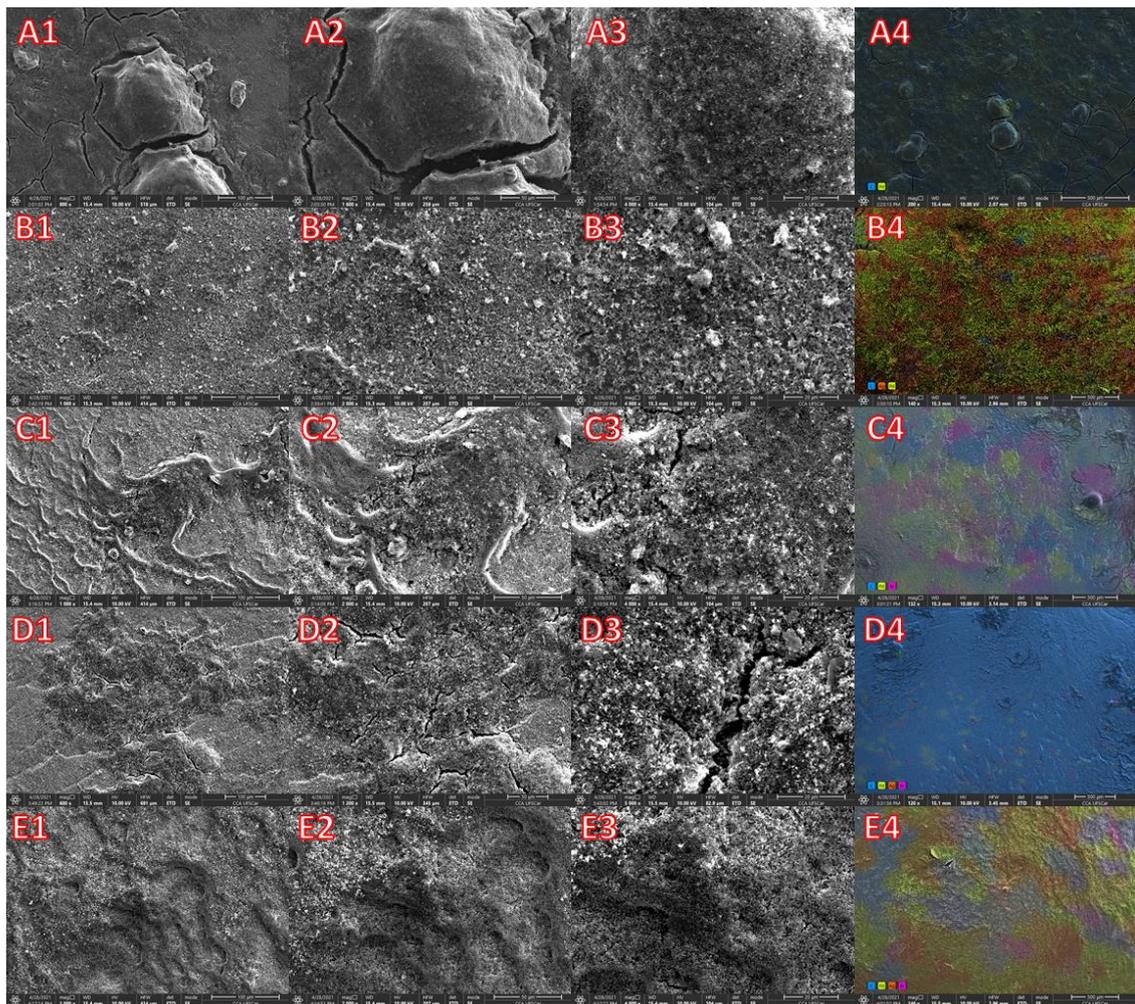


Figura 8. Imagens de MEV de (A) Pd/C, (B) Pd₅₀Ag₅₀/C, (C) Pd₅₀Bi₅₀/C, (D) Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e (E) Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C; 1-3 representa ampliações crescentes e 4 apresenta a imagem de *colorSEM*

Nos difratogramas é possível verificar os padrões para Pd/C, Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₅₀Bi₅₀/C, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C, a fim de analisar a cristalinidade, as interações entre os metais e quais planos estão passíveis de interação no material final. Como pode ser observado em literatura [227], o pico de reflexão em $2\theta = 25^\circ$ é associado à presença de grafite (002) no CB suporte, sendo a única resposta deste no espectro, uma vez que o material é consideravelmente amorfo. Para o Pd/C, observa-se picos em 40, 47, 68, 82 e 86°, referentes aos planos (111), sendo este o principal plano catalítico do material; (200), (220), (311) e (222), associados à estrutura cúbica de face centrada (cfc) do Pd (e suas ligas), respectivamente. A partir da lei de Bragg para o pico do plano (220), pode-se estimar o parâmetro de rede do sistema: 0,373 nm. Este valor está de acordo com outros Pd/C encontrados na literatura [227, 228]. Para esta amostra, o tamanho médio do cristalito é de 6,0 nm, calculado pela equação de Scherrer para todos os picos. Com a adição de Ag e Bi ao catalisador, nota-se um deslocamento

dos picos discutidos anteriormente para ângulos menores, implicando numa expansão de rede e inserção desses metais dentro da estrutura cfc do Pd [229]. Observa-se também uma diminuição do carácter grafítico nos materiais ternários em relação ao Pd/C, pela diminuição da intensidade do pico em 25°. Os tamanhos médios dos cristalitos também foram calculados para os catalisadores secundários e ternários, sendo eles: 4,0 nm para Pd₅₀Ag₅₀/C, 3,5 nm Para Pd₅₀Bi₅₀/C, 3,9 nm para Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C e 4,1 nm para Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C.

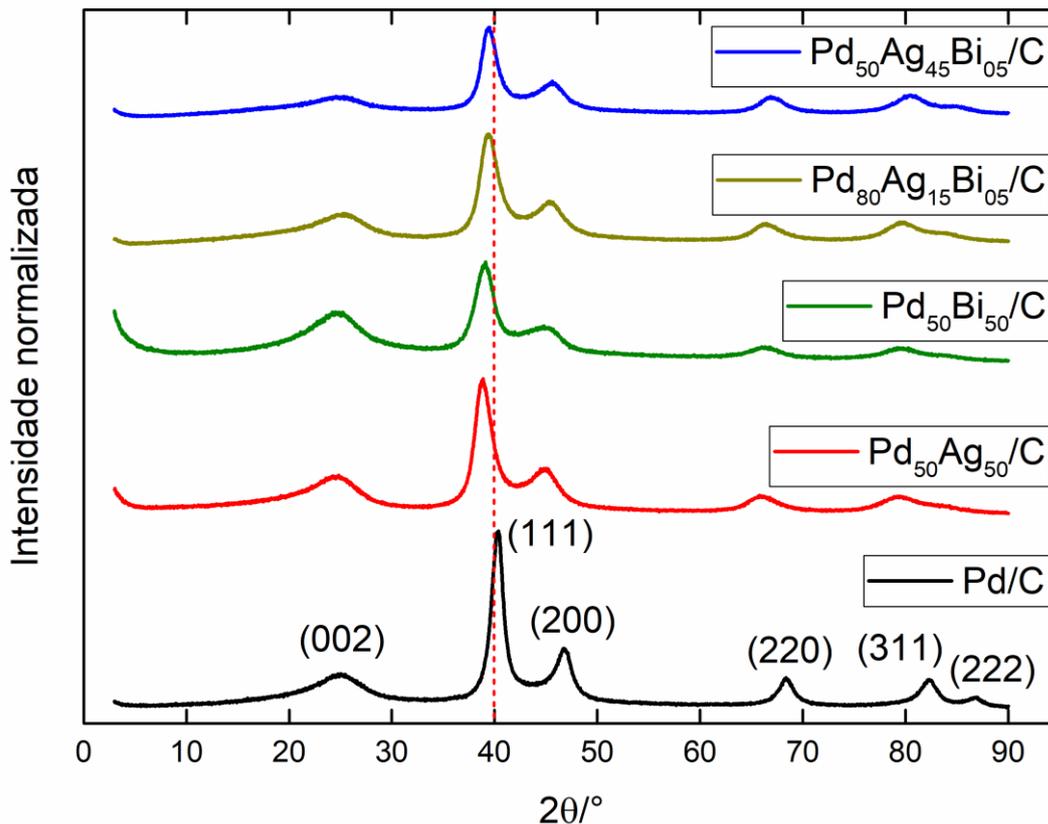


Figura 9. Espectros de difração de raio-X para Pd/C (**preto**), Pd₅₀Ag₅₀/C (**vermelho**), Pd₅₀Bi₅₀/C (**verde**), Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C (**dourado**) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C (**azul**)

O MET é uma importante ferramenta para identificar a distribuição de partículas e diferentes estruturas em uma amostra, potencialmente ajudando a entender os diferentes comportamentos dos sistemas. Como dito anteriormente, as imagens de MET de Pd/C, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C estão apresentadas na Figura 10. É possível observar que, quando comparado ao Pd/C (Figura 10A), o Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C (Figura 10B) tem uma distribuição de metais na forma de aglomerados maiores, além de apresentar pontos de dispersão em regiões de carbono (indicado por imagem de campo escuro, Figura 10B4), sugerindo uma estrutura de carbono mais danificada. A estrutura do Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C (Figura 10C), no entanto, se assemelha muito ao Pd/C, com metais mais homogeneamente distribuídos por toda a amostra. Além disso,

ambas as imagens de campo escuro de Pd/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C indicam pontos de dispersão de elétrons em regiões atribuídas à dispersão de partículas metálicas.

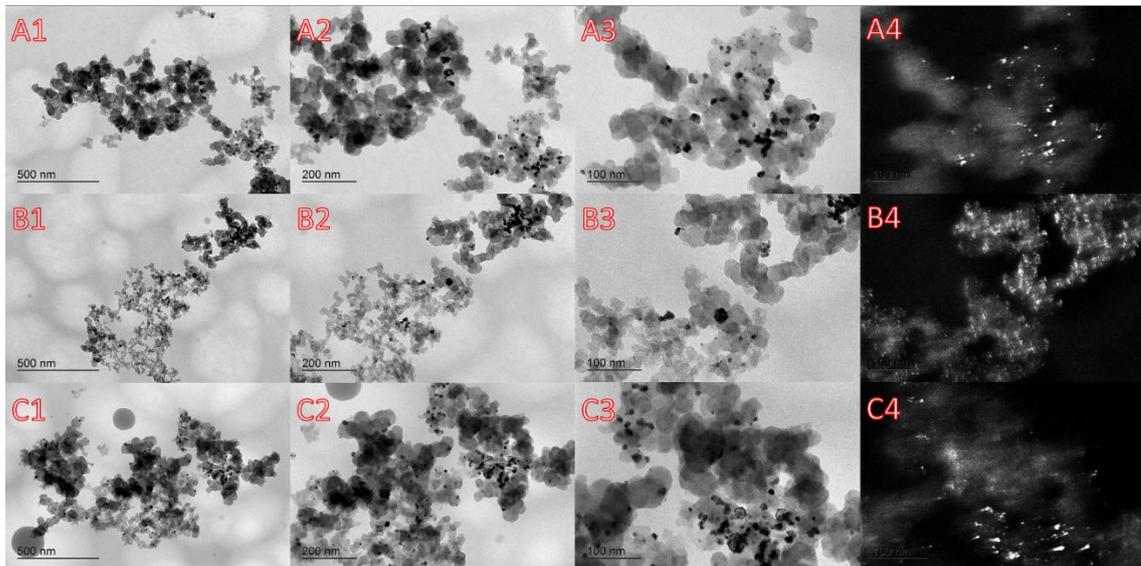


Figura 10. Imagens MET representativas de Pd/C (A), Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C (B) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C (C); 1-3 representam ampliações crescentes no modo de campo claro e 4 apresentam o modo de campo escuro na maior ampliação

4.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

4.2.1. Perfil Eletroquímico para Catálise

Para se entender o comportamento de catálise dos materiais, é necessário compreender seu perfil eletroquímico apenas na presença de um eletrólito. Para tanto, testes em voltametria cíclica (VC) foram realizados em solução de KOH 1,0 mol L⁻¹, uma vez que ADEFCs funcionam em meio alcalino, numa janela de trabalho de -0,85 a 0,5 V, numa velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹. A Figura 11 apresenta todos os dados, porém cada material será discutido separadamente a seguir. Para melhor adequação à literatura, todos os resultados relacionados às células à combustível foram normalizados pela massa de Pd em sua composição.

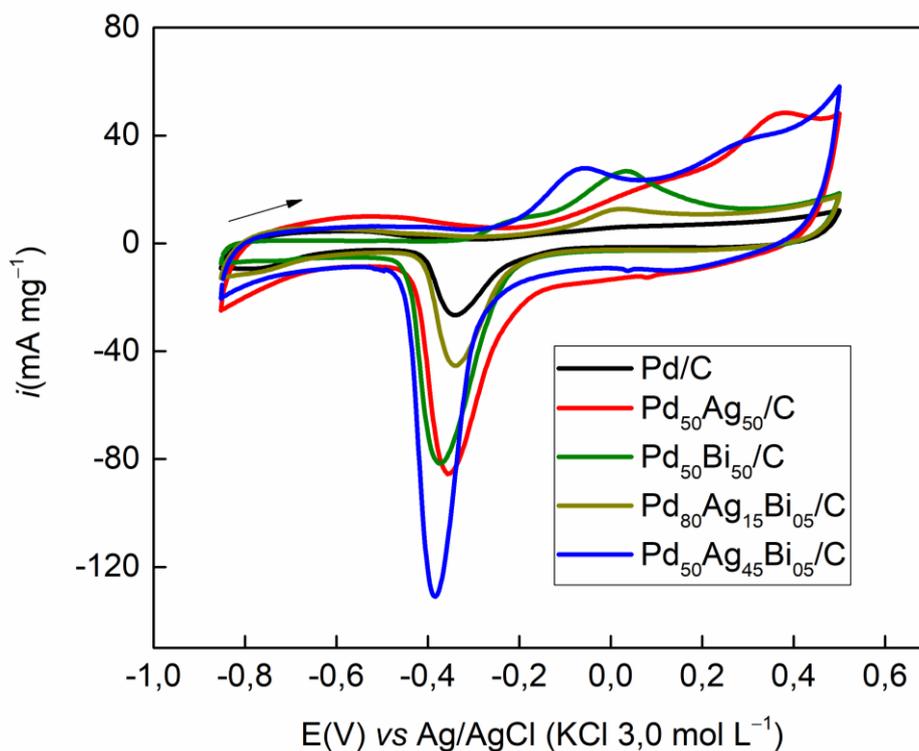


Figura 11. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com Pd/C (**preto**), Pd₅₀Ag₅₀/C (**vermelho**), Pd₅₀Bi₅₀/C (**verde**), Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C (**dourado**) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C (**azul**), em presença de KOH 1,0 mol L⁻¹; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

O comportamento do Pd/C (Figura 11, linha preta e Figura 12A) é semelhante a outros encontrados na literatura [230-232], onde é possível observar picos e regiões de processos redox distintos: embora não seja bem definido em meio alcalino, a região de adsorção de hidrogênio na superfície de Pd pode ser observada entre -800 e -500 mV e os picos de formação de PdO podem ser observados em -161 e $22,0$ mV, que são posteriormente reduzidos, evidenciados pelo pico em -337 mV. O comportamento do Pd₅₀Ag₅₀/C (Figura 11, linha vermelha e Figura 12B), apresenta alterações significativas quando comparado ao Pd/C. De acordo com a literatura [233, 234], a presença de Ag próximo à mesma porcentagem de Pd favorece o processo catalítico em ADEFC. Nesta configuração, a formação de Ag₂O pode ser observada próximo a 370 mV e o pico de redução de óxido metálico é de magnitude aumentada em relação ao Pd/C.

Conforme relatado pela literatura [76], 5,0% de Bi no catalisador é suficiente para promover melhor desempenho na ROE, e aumentar esse percentual pode ser prejudicial a essa atividade. A Figura 11 (linha verde e Figura 12C) apresenta o comportamento eletroquímico do Pd₅₀Bi₅₀/C, nas condições descritas anteriormente, e é possível notar uma mudança significativa

de comportamento quando comparado aos demais materiais. Os picos anódicos de óxidos metálicos apresentaram uma resolução aumentada, sugerindo uma forte interação superfície-oxigênio e sugerindo que o processo catalítico possa ser comprometido por envenenamento intenso. Portanto, considerando esses dados e a literatura, a proporção de Bi em materiais ternários foi fixada em 5,0%.

Dois eletrocatalisadores ternários foram sintetizados e investigados para avaliar a resposta proporcional de Pd para Ag: Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C. Na primeira, buscou-se a lógica de manter uma maior proporção de Pd para avaliar se esta seria responsável por uma melhor catálise, juntamente com um efeito sinérgico entre todos os metais. A presença de pequenas quantidades de Ag e Bi foi suficiente para causar a uma modesta região de adsorção de hidrogênio em potenciais menores que -500 mV, como pode ser visto na Figura 11 (linha dourada e Figura 12D), já divergindo do comportamento de Pd₅₀Bi₅₀/C. O voltamograma também apresenta um único pico anódico, de formação de óxido, próximo em 26 mV; o pico de redução destes é apenas maior em magnitude que Pd/C. No entanto, ao substituir 5,0% de Ag por Bi em Pd₅₀Ag₅₀/C, surgem mudanças consideráveis (Figura 11, linha azul e Figura 12E): o primeiro pico anódico (60 mV) apresentou uma melhor resolução, enquanto o segundo se deslocou para potenciais mais negativos (de 370 para 305 mV); e o pico catódico desses processos teve a maior magnitude de corrente entre todos, quase dobrando os de Pd₅₀Ag₅₀/C e Pd₅₀Bi₅₀/C. Essas características podem implicar uma superfície altamente ativa se o material provar ser resistente ao envenenamento.

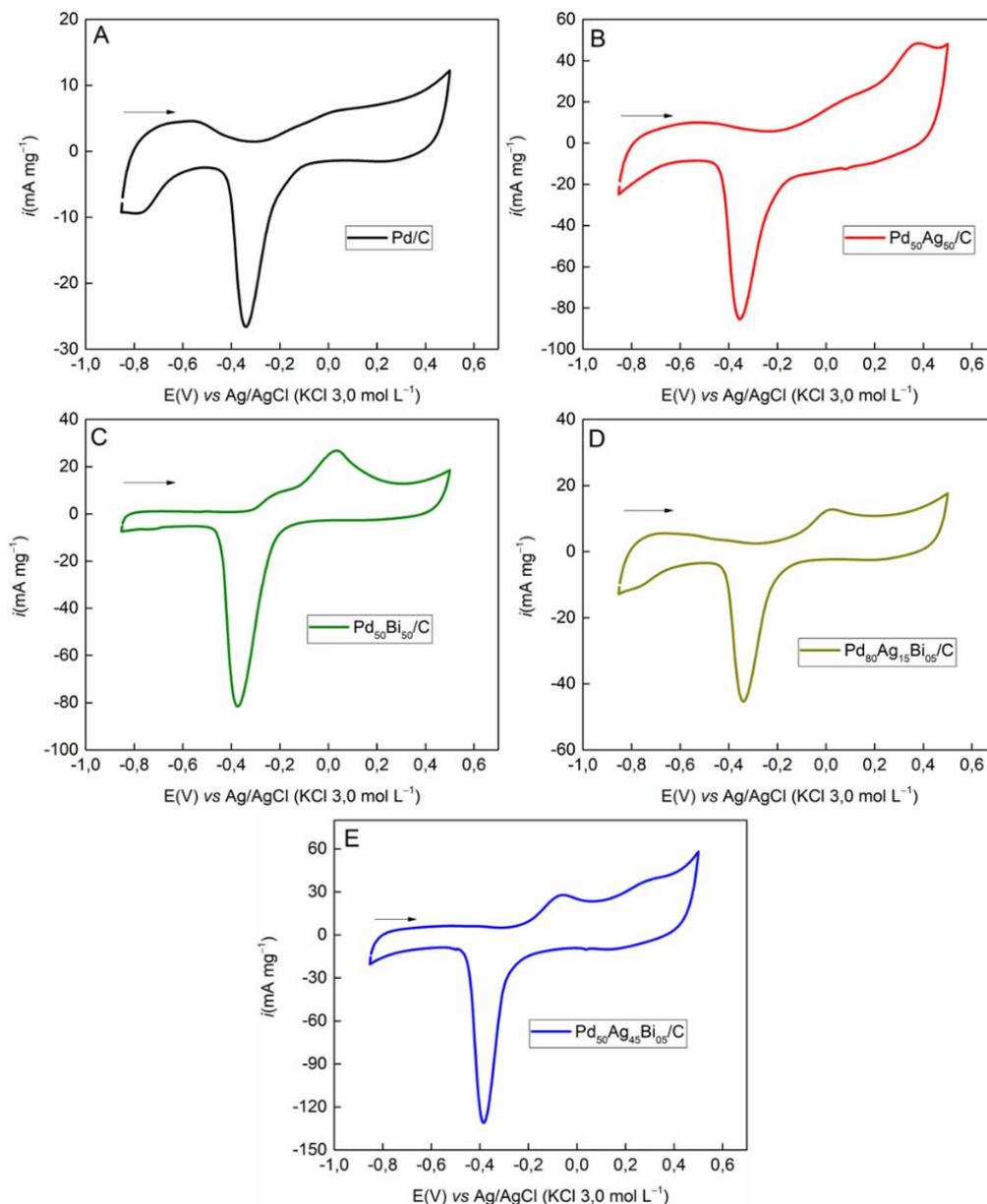


Figura 12. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com (A) Pd/C (**preto**), (B) Pd₅₀Ag₅₀/C (**vermelho**), (C) Pd₅₀Bi₅₀/C (**verde**), (D) Pd₈₀Ag₁₅Bi₅/C (**dourado**) ou (E) Pd₅₀Ag₄₅Bi₅/C (**azul**), em presença de KOH 1,0 mol L⁻¹; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

4.2.2. Análises de Estabilidade dos Eletrocatalisadores

Para um catalisador ser eficiente numa célula à combustível, além de acelerar o processo de oxidação da espécie de interesse, ele deve realizar tal atividade por longos períodos. Portanto, faz-se necessário o teste de estabilidade da corrente gerada, realizado neste trabalho por cronoamperometria. Um potencial de $-0,20 \text{ V}$ foi aplicado em todos os materiais durante 30 minutos. A Figura 13 traz os cronoamperogramas obtidos. A Tabela 4 apresenta os dados significativos, onde pode-se perceber que existe uma considerável queda de corrente após os

primeiros 200 s, associada à contribuição do carregamento da dupla camada, além da ROE. Para tal carregamento, associa-se o distanciamento entre às camadas ao material carbonáceo, por estar em maior exposição na interface. Logo, como a porcentagem deste material é a mesma para todos os catalisadores, pode-se associar a diferença do valor de corrente ao final do experimento à eficiência do compósito para com a ROE [235]. Tal valor de corrente decresce na seguinte ordem: Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C, Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C, Pd/C e Pd₅₀Bi₅₀/C, indicando que o Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C é o material mais ativo para este processo catalítico dentre os estudados. Para este compósito, também são notáveis duas outras propriedades em relação aos demais: (i) o decaimento de corrente ao longo do tempo, onde o material apresenta um decaimento 6,0% menor em relação ao Pd/C, apresentando-se como mais estável dentre todos; e (ii) a mais elevada geração de carga total, calculada pela integral dos cronoamperogramas, sendo esta 16 vezes maior que a do Pd/C. Todos estes dados indicam uma maior eficiência deste material para a ROE, em relação aos demais.

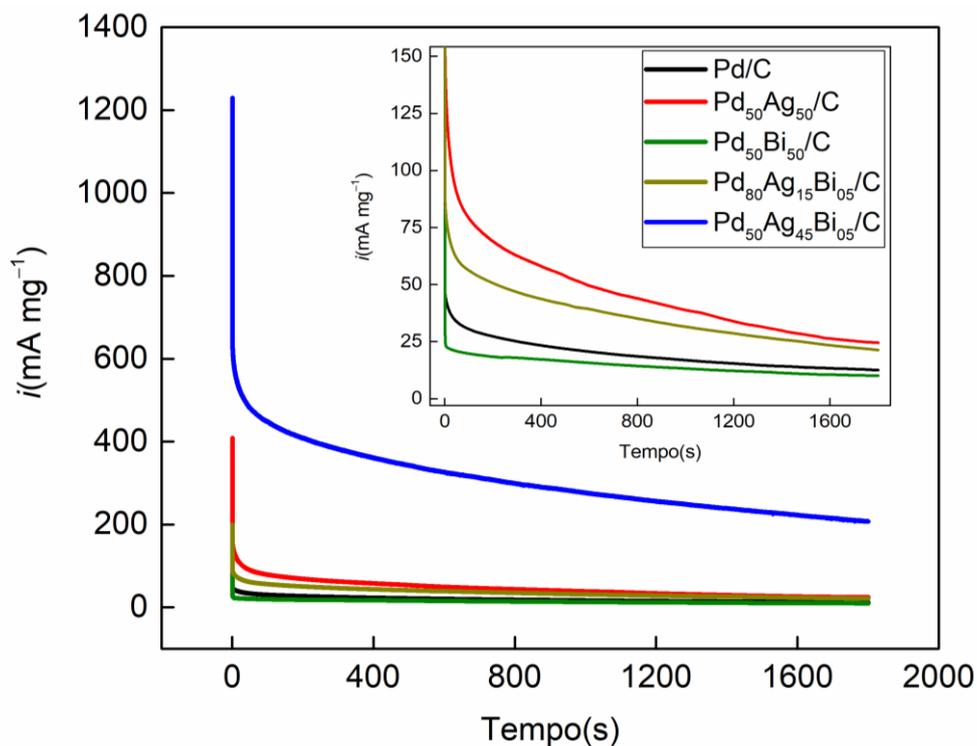


Figura 13. Cronoamperogramas obtidos com GCE modificado com Pd/C (**preto**), Pd₅₀Ag₅₀/C (**vermelho**), Pd₅₀Bi₅₀/C (**verde**), Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C (**dourado**) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C (**azul**), em presença equimolar de EtOH/KOH 1,0 mol L⁻¹; E = -0,20 V, tempo = 1800 s

Tabela 4. Dados extraídos da análise de estabilidade

Eletrocatalisador	Carga (C mg⁻¹)	Corrente ao final do experimento (mA mg⁻¹)
Pd/C	34,8	12,6
Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C	82,2	24,6
Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C	25,8	10,0
Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C	64,3	21,3
Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C	549	208

Para avaliar a eficiência da liga metálica em sua aplicação como um sensor eletroquímico, faz-se necessário entender seu comportamento quanto à estabilidade na superfície do dispositivo, uma vez que, sob constante excitação e em meio rico em oxigênio, pode-se esperar a formação de óxidos metálicos na superfície do dispositivo [236, 237]. Todavia, se tal fase se mostrar de complexa natureza, com constantes variações de composição, o dispositivo pode não funcionar como um sensor eletroquímico, por conta de sua janela ótima de trabalho ser prejudicada pela instabilidade. Para tanto, o Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE foi submetido à 100 voltametrias cíclicas sucessivas em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1), com v de 100 mV s⁻¹, para a observação da variação de seu perfil eletroquímico.

A Figura 14A apresenta os voltamogramas obtidos para a 1^a, 10^a, 25^a, 50^a e 100^a varredura. Nota-se a presença de quatro principais picos associados à presença dos metais neste perfil, além da região de adsorção e dessorção de hidrogênio. Os picos I e II se referem à formação de óxidos metálicos na superfície do dispositivo. Embora em sistema similares Ag₂O e PdO comumente sejam formados em regiões próximas à 500 mV [235, 238] e 800 mV [236, 237], respectivamente, a presença de Bi₂O₃ pode inferir no mascaramento destes picos, uma vez que o mesmo é formado na região intermediária aos dois [76, 239], de modo que seja mais apropriado tratar este perfil como pertencente à liga como um todo. O pico III pode se referir à presença de nitrogênio e oxigênio proveniente da absorção do ar, uma vez que o meio trabalhado não foi tratado para ser inerte. Este pico não é comumente discutido em literatura. Já o pico IV se remete à completa dissociação dos óxidos formados em I e II [76, 235-239]. A Figura 14B apresenta os valores de módulo de corrente para as análises anteriores dos quatro sinais discutidos. Dentre estes, apenas o pico III apresenta uma distorção no perfil e um desvio próximo à 10% ($n = 100$, 5,24% para I, 1,15% para II, 9,73% para III e 2,88% para IV). Apesar de existir uma alteração da corrente durante as 100 varreduras, estes dados sugerem que essa

alteração é insignificante para as análises propostas. Para manter um padrão de perfil, esta análise foi repetida antes de todas as análises eletroquímicas.

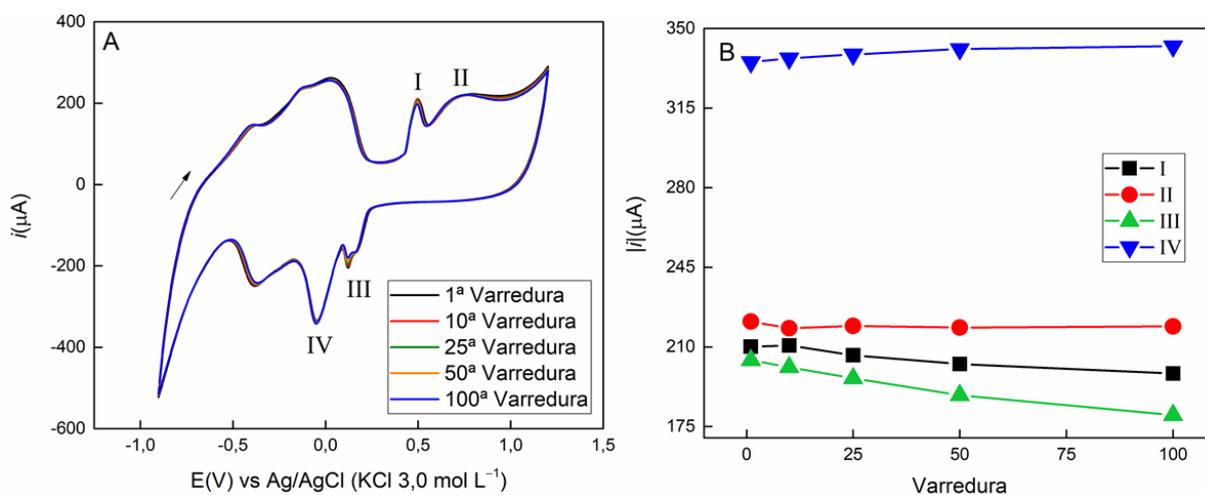


Figura 14. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE em meio de PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1); $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Dispersão de pontos da relação $|i|$ vs. varredura

4.2.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Uma importante análise quanto ao desempenho eletroquímico do sistema é a EIE, uma vez que ela fornece informações que auxiliam na modelagem do dispositivo e diferentes processos que podem ocorrer em sua superfície, característica essa interessante tanto para sua aplicação em células à combustível, quanto para o sensoriamento de diferentes espécies. Para a realização deste estudo, o potencial aplicado (-472 mV) foi selecionado, por representar, em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1), uma região do voltamograma próxima ao início da adsorção de hidrogênio para todos os eletrocatalisadores. A técnica necessita de uma faixa de potencial em que exista transferência eletrônica, e, portanto, estima-se que o potencial mais adequado seja o que apresenta maior geração de corrente por unidade de energia. No entanto, o catalisador Pd₅₀Bi₅₀/C apresenta uma resposta consideravelmente inferior aos demais, limitando o potencial a ser aplicado, em prol de uma comparação entre todos os materiais, como pode ser visto na Figura 15. A Figura 16A e B apresentam, respectivamente, os diagramas de Nyquist e o circuito equivalente para os materiais, sendo este uma modificação do circuito de Randles para adicionar os efeitos da difusão no sistema. A Tabela 5 inclui todos os dados de interesse para o circuito de cada eletrocatalisador: resistência da solução (R_s), resistência de transferência de carga (R_{CT}) e os parâmetros para o elemento de fase constante (CPE, Y_0 e N) e o elemento

de Warburg para terminal de circuito aberto, T (Y_0 e B), sendo Y_0 o parâmetro com informações do coeficiente de difusão, calculado pela Eq. 03:

$$Y_0 = \left| \frac{b_{angular}}{a_{linear}} \right| \quad \text{Eq. 03}$$

em que a e b são o coeficiente linear e angular da região do diagrama de Nyquist que apresenta ângulo de 45° ; N sendo o valor exponencial da definição matemática do CPE, sendo 1,0 para superfícies completamente lisas e diminuindo conforme o aumento da rugosidade; e B sendo definido como a raiz quadrada do tempo da difusão, obtido pela Eq. 04:

$$B = \sqrt{2\pi RC} \quad \text{Eq. 04}$$

de modo que R e C correspondam aos valores do circuito [RC] da região inteiramente capacitiva do diagrama de Nyquist (baixas frequências). O elemento T (terminal de circuito aberto) surge devido à característica absorção de átomos de H pela superfície do Pd ao longo do tempo [237, 240] até a região limite (superfície do GCE), causando distorção da região de difusão, de modo que o elemento de Warburg convencional não compreenda mais tal sistema. Como já discutido, este comportamento é esperado e melhor visualizado para o Pd/C. Portanto, também é uma vantagem para os outros materiais o impedimento deste mecanismo, que pode vir a causar deficiências na superfície do material depois de longos períodos de atividade. Os diagramas de Bode, para todos os materiais, estão presentes nas Figura 17A e B.

Como esperado, os perfis denotam uma menor transferência de carga para o Pd/C, uma vez que o plano (111) é conhecidamente eficiente para tal processo e a ausência de outros metais na composição pode facilitar a estruturação. Destaca-se que os materiais Pd₅₀Ag₅₀/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C apresentam relativas próximas resistências de transferência de carga entre si (771 e 1035 Ω , respectivamente) indicando que esta alteração na estrutura tem um impacto de $\approx 300 \Omega$, sugerindo efeitos provocados pelo maior raio atômico do Bi, como deslocamentos do plano de catálise, uma vez que a Ag possui um raio atômico próximo ao do Pd.

Pelos diagramas de fase e módulo da impedância, nota-se que o perfil de todos os materiais é definido tanto pela sua resistência, quanto pela capacitância, tendo os picos de fase e a diferença de inclinação dos módulos nas regiões de menor frequência. Além disto, os valores máximos de fase se encontram menores que $\pi/2^\circ$, indicando, também, que a impedância do processo sofre mais intensa influência da resistência de cada material do que de sua capacitância. A R_s é crescente de acordo com a ordem Pd₅₀Ag₅₀/C < Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C \approx Pd/C <

$\text{Pd}_{80}\text{Ag}_{15}\text{Bi}_{05}/\text{C} < \text{Pd}_{50}\text{Bi}_{50}/\text{C}$, implicando que o material ternário $\text{Pd}_{50}\text{Ag}_{45}\text{Bi}_{05}/\text{C}$ possivelmente apresenta os mesmos efeitos de transferência de carga que o Pd/C , apesar de sua composição.

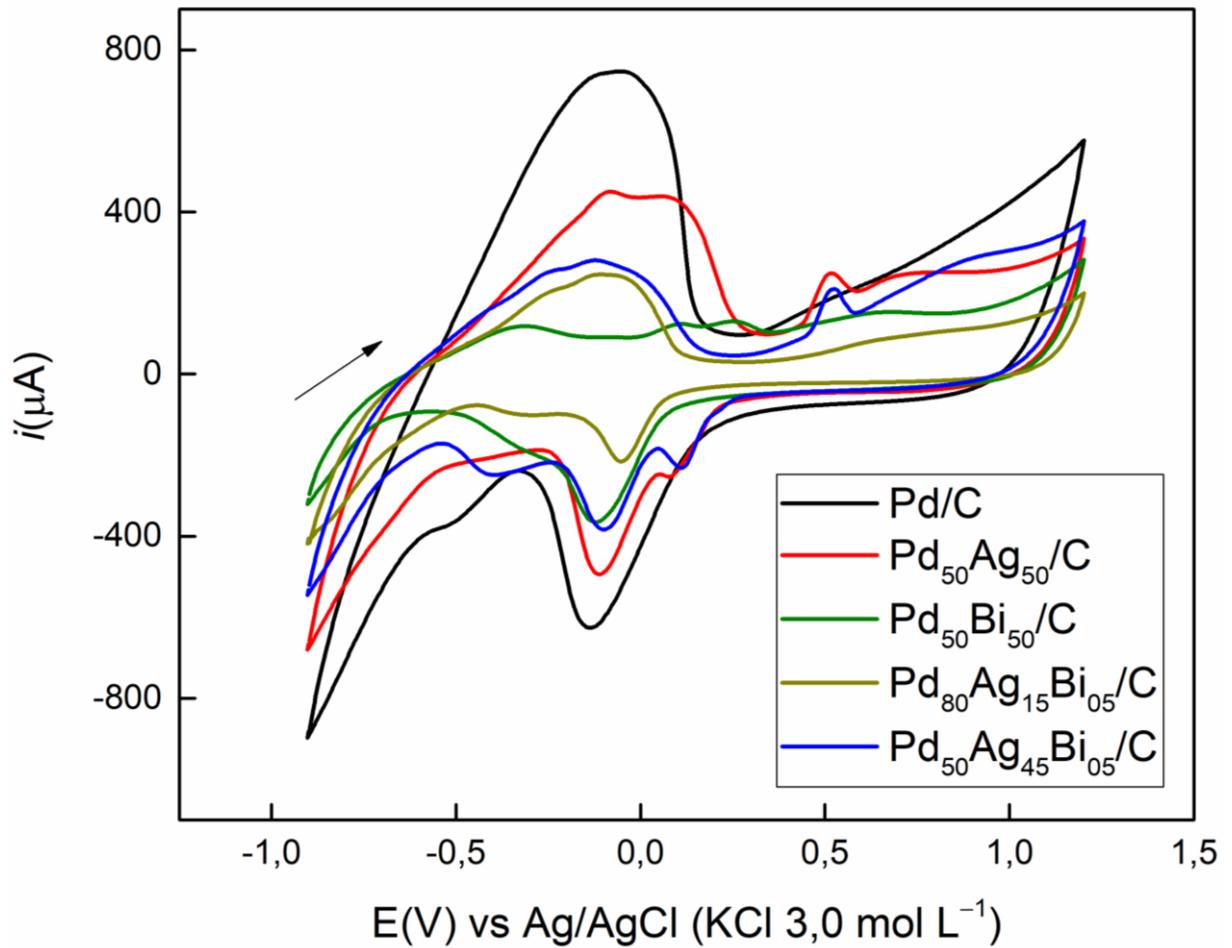


Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos por $\text{Pd}/\text{C}/\text{GCE}$ (preto), $\text{Pd}_{50}\text{Ag}_{50}/\text{C}/\text{GCE}$ (vermelho), $\text{Pd}_{50}\text{Bi}_{50}/\text{C}/\text{GCE}$ (verde), $\text{Pd}_{80}\text{Ag}_{15}\text{Bi}_{05}/\text{C}/\text{GCE}$ (dourado) e $\text{Pd}_{50}\text{Ag}_{45}\text{Bi}_{05}/\text{C}/\text{GCE}$ (azul), em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,1); $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

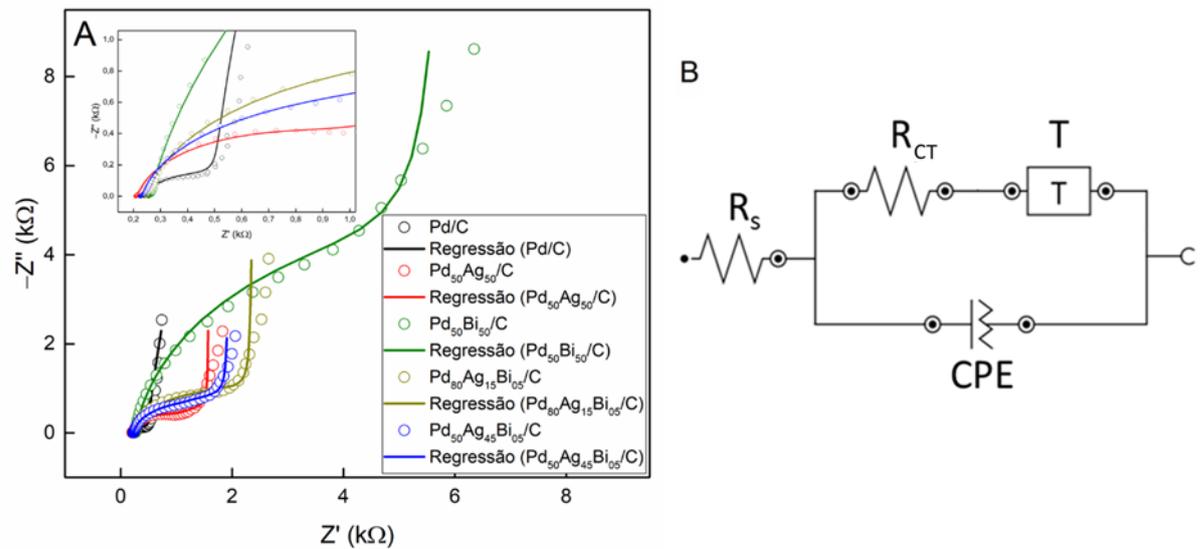


Figura 16. (A) Diagramas de Nyquist para Pd/C/GCE (**preto**), Pd₅₀Ag₅₀/C/GCE (**vermelho**), Pd₅₀Bi₅₀/C/GCE (**verde**), Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C/GCE (**dourado**) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE (**azul**), em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1); E = -472 mV. (B) Circuito equivalente [R([RT]Q)]

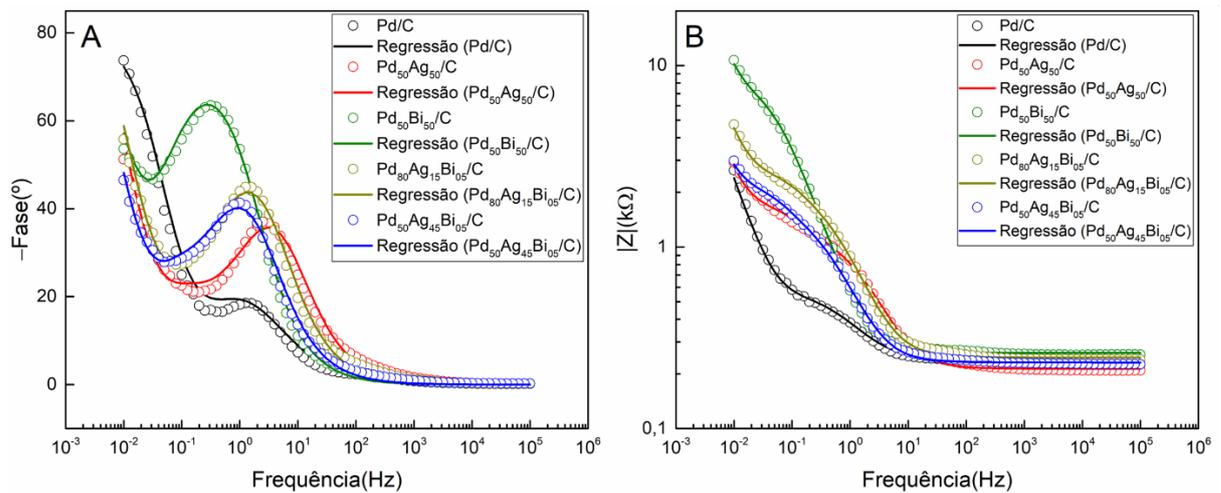


Figura 17. Diagramas de Bode para Pd/C/GCE (**preto**), Pd₅₀Ag₅₀/C/GCE (**vermelho**), Pd₅₀Bi₅₀/C/GCE (**verde**), Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C/GCE (**dourado**) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE (**azul**), em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1), de 10⁵ a 10⁻¹ Hz, onda tipo senoidal; amplitude = 10 mV. (A) Correlação do deslocamento de fase da impedância e a frequência; E = -472 mV. (B) Correlação do módulo da impedância e a frequência; E = -472 mV

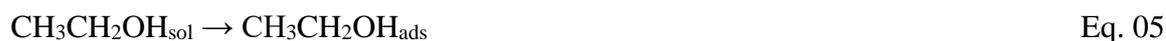
Tabela 5. Dados do circuito equivalente [R([RT]Q)]

Material	R _s (Ω)	R _{CT} (Ω)	CPE	T
Pd/C	228	406,8	$Y_0 = 1,01 \text{ mS s}^N$ $N = 0,733$	$Y_0 = 9,92 \text{ mS } \sqrt{s}$ $B = 0,482 \sqrt{s}$
Pd ₅₀ Ag ₅₀ /C	214	771,0	$Y_0 = 166 \text{ mS s}^N$ $N = 0,884$	$Y_0 = 1,85 \text{ mS } \sqrt{s}$ $B = 3,73 \sqrt{s}$
Pd ₅₀ Bi ₅₀ /C	261	9092	$Y_0 = 390 \text{ mS s}^N$ $N = 0,909$	$Y_0 = 1,64 \text{ mS } \sqrt{s}$ $B = 0,929 \sqrt{s}$
Pd ₈₀ Ag ₁₅ Bi ₀₅ /C	246	1469	$Y_0 = 215 \text{ mS s}^N$ $N = 0,889$	$Y_0 = 1,19 \text{ mS } \sqrt{s}$ $B = 3,28 \sqrt{s}$
Pd ₅₀ Ag ₄₅ Bi ₀₅ /C	231	1035	$Y_0 = 358 \text{ mS s}^N$ $N = 0,891$	$Y_0 = 1,68 \text{ mS } \sqrt{s}$ $B = 4,41 \sqrt{s}$

4.3. APLICAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS PARA CATÁLISE DA OXIDAÇÃO DE ETANOL

Para iniciar o entendimento do funcionamento dos catalisadores, as meia-células foram aplicadas no estudo de perfil catalítico de EtOH. A oxidação do EtOH em meio alcalino pode ser conseguida através de diferentes vias concomitantes. Nesse contexto, a adsorção envolve diferentes espécies sobre a superfície do Pd, levando principalmente a três produtos principais: acetato (Eq. 05 a 09), acetaldeído (Eq. 10 a 12) e dióxido de carbono (Eq. 15). É importante destacar que a rota do acetaldeído também é responsável pela formação dos íons acetato, conforme apresentado na Eq. 13 e 14. A quebra de C–C para produzir CO₂ nesta última via ainda não é bem compreendida na literatura. No entanto, a via é reconhecida como responsável pelo envenenamento do catalisador, devido a reações entre as espécies adsorvidas de CO e OH levando a carbonatos fortemente ligados sobre a superfície do metal [241-243].

Rota de produção de acetato:



Rota de produção de acetaldeído e acetato:**Rota de produção de dióxido de carbono:**

Para tanto, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de EtOH foi adicionado aos sistemas descritos na seção 4.2.1. Voltamogramas cíclicos foram obtidos na mesma janela de trabalho, também em 50 mV s^{-1} . A Figura 18 apresenta todos os voltamogramas cíclicos obtidos, e, como antes, cada caso será discutido individualmente.

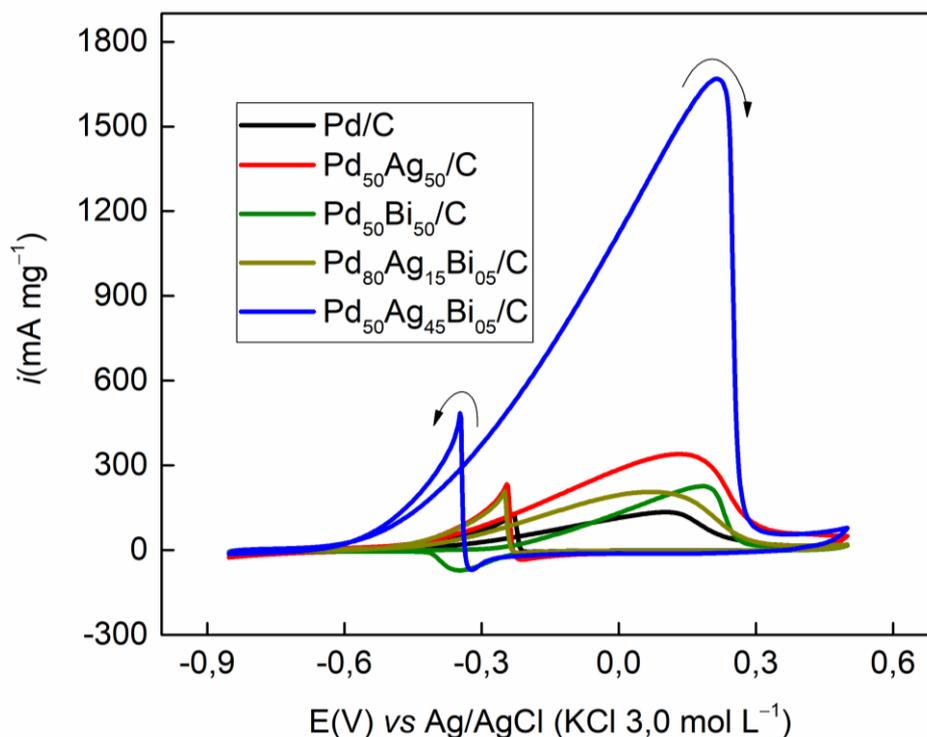


Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com Pd/C/GCE (**preto**), Pd₅₀Ag₅₀/C/GCE (**vermelho**), Pd₅₀Bi₅₀/C/GCE (**verde**), Pd₈₀Ag₁₅Bi₅/C/GCE (**dourado**) e Pd₅₀Ag₄₅Bi₅/C/GCE (**azul**) em presença equimolar de EtOH/KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Assim como antes, o perfil apresentado pelo Pd/C funciona como um padrão para avaliação do desempenho dos materiais. As Figura 18 (linha preta) e Figura 19A mostram esse

perfil, onde é possível observar o pico de oxidação do EtOH em 103 mV, de 135 mA mg⁻¹, com potencial de início de reação (E_{IR}) igual a -391 mV, obtido pela abcissa do ponto de interpolação de tangentes entre regiões não faradaicas e faradaicas. Observa-se também que na direção reversa (catódica), há um processo anódico relacionado à dessorção de espécies produzidas pela adsorção de EtOH na superfície do material.

O perfil para o Pd₅₀Ag₅₀/C (Figura 18, linha vermelha e Figura 19B) obtido demonstra que a adição de Ag, nestas proporções, de fato atribui um considerável incremento para o desempenho do catalisador. Observa-se um pico de oxidação em 131 mV, de corrente de pico igual a 340 mA mg⁻¹, assim como um E_{IR} de -411 mV. Deste modo, ambos os potenciais discutidos sofreram desvio para potenciais opostos, de modo que o processo teve início antecipado e pico mais tardio, ambos indicadores de que o processo foi catalisado. Para a etapa catódica, o desprendimento gerou um pico anódico de magnitude próxima à do processo anódico, tendo um ganho de corrente de 1,5 vezes e uma diferença de 29% de corrente entre estes processos.

Como discutido anteriormente, a quantidade de átomos de Bi no catalisador poderia implicar numa imparidade na catálise, e, como as Figura 18, (linha verde) e Figura 19C mostram, o Pd₅₀Bi₅₀/C não é um material adequado para esta aplicação. O pico de oxidação se apresenta em 185 mV, com uma magnitude de 226 mA mg⁻¹ e um E_{IR} de -225 mV. Já na varredura catódica, o material não apresenta o perfil de dessorção, tendo-se um pico catódico em -347 mV, que pode indicar um severo envenenamento do dispositivo [244]. Embora exista um ganho de corrente de 67% na catálise, estes outros fatores inviabilizam o uso desta proporção de metais no eletrocatalisador.

As Figura 18 (linha dourada) e Figura 19D apresentam o perfil obtido para o primeiro catalisador ternário, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C, onde vemos um pico anódico em 68 mV, com corrente igual a 206 mA mg⁻¹ e E_{op} de -403 mV. O processo anódico em varredura catódica demonstra um pico em que não houve perdas significativas de intensidade, indicando baixa tendência ao envenenamento. Assim como Pd₅₀Ag₅₀/C, este apresenta um valor de E_{IR} deslocado levemente para potenciais mais negativos, além de apresentar um ganho de corrente de 52%. Embora o potencial de pico tenha deslocado para potenciais mais negativos, este material apresenta interessantes resultados, tendo sua eficiência inferior apenas ao Pd₅₀Ag₅₀/C.

O segundo catalisador ternário, Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C, tem seu perfil presente nas Figura 18 e Figura 19E. Nela, observa-se que o material proporcionou um potencial de pico em 219 mV, com magnitude equivalente a 1669 mA mg⁻¹ e E_{op} de -486 mV. O pico proveniente da

varredura catódica demonstra uma perda de 3,5 vezes em corrente. No entanto, o ganho em corrente gerada para a oxidação do EtOH supera os outros materiais, sendo equivalente à 12,4 vezes maior que o gerado por Pd/C. Além disso, ambos os potenciais descritos acima indicam deslocamentos contrários, também prenunciando um processo catalisado em relação ao Pd/C. Deste modo, atribui-se a este material uma promissora aplicação para ADEFCS.

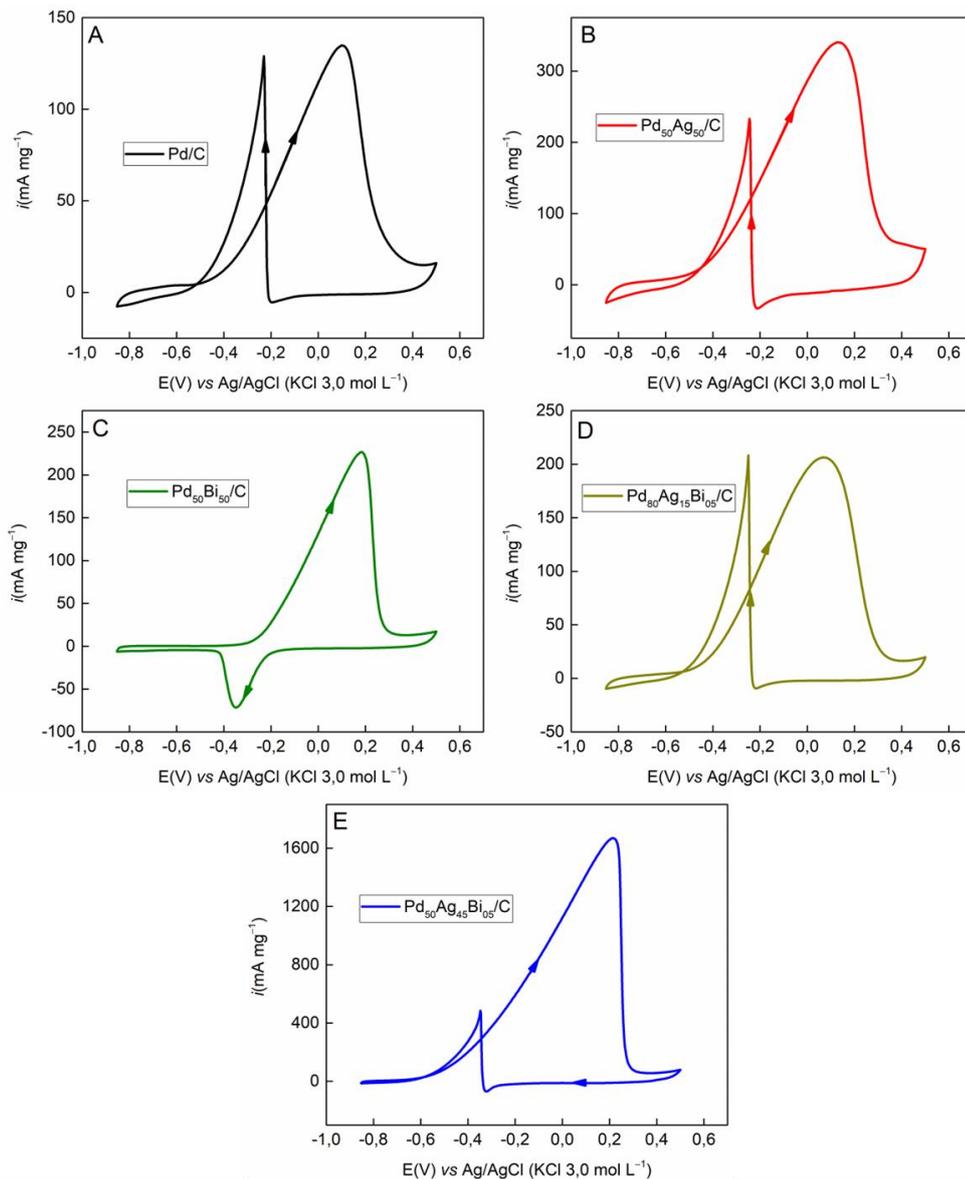


Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE modificado com (A) Pd/C (**preto**), (B) Pd₅₀Ag₅₀/C (**vermelho**), (C) Pd₅₀Bi₅₀/C (**verde**), (D) Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C (**dourado**) ou (E) Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C (**azul**), em presença equimolar de EtOH/KOH 1,0 mol L⁻¹; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Para melhor avaliar a aplicabilidade dos materiais estudados, foram realizados experimentos com ADEFCS, avaliando a potência e densidade de corrente obtidas em condições

mais próximas das reais. A esse respeito, a Figura 20 mostra as curvas de polarização, em diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 80 °C) para a oxidação eletroquímica de EtOH por Pd/C, na presença de EtOH a 2,0 mol L⁻¹, em KOH 1,0 mol L⁻¹. Esta etapa é essencial para garantir a fornecimento ideal do sistema em termos de energia. Como pode ser observado, a temperatura de 70 °C foi a mais eficiente, apresentando a melhor cinética de reação. Por esta razão, esta temperatura foi selecionada para os experimentos de todos os eletrocatalisadores deste estudo.

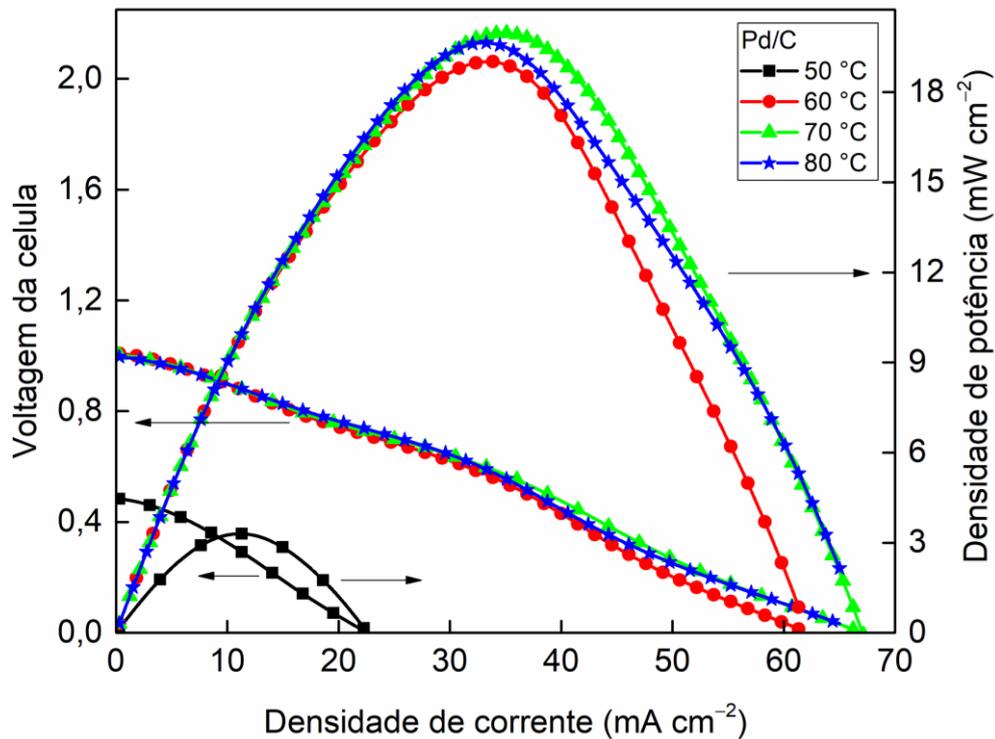


Figura 20. Curvas de polarização: potencial e densidade de potência vs densidade de corrente, de uma ADEFC de 5,0 cm², operando a 50, 60, 70 e 80 °C, utilizando eletrocatalisadores anódicos Pd/C, e eletrocatalisador catódico Pt/C (BASF). Foram utilizadas cargas de: (1,0 mg_{Pd} cm⁻², em massa de metal no ânodo e 1,0 mg_{Pt} cm⁻² (comercial), em massa de metal no cátodo) com membrana Nafion® 117, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ do combustível (EtOH 2,0 mol L⁻¹ em KOH 1,0 mol L⁻¹), vazão mássica de 150 mL min⁻¹ de O₂

As curvas de polarização obtidas em uma ADEFC de 5,0 cm², operando a 70 °C, utilizando os eletrocatalisadores anódicos Pd/C, Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₅₀Bi₅₀/C, Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C são apresentadas na Figura 21A e B. Entre estes, os eletrocatalisadores Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C e Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C mostraram valores de potencial de circuito aberto (OCP) iguais a ~1250, 1161 e 1097 mV, respectivamente. Todos superiores, em comparação, ao eletrocatalisador Pd/C (997 mV). O valor do OCP do eletrocatalisador Pd₅₀Bi₅₀/C foi de 972

mV (Figura 21A). O Pd₅₀Ag₅₀/C apresentou um valor de densidade de potência máxima para a ROE de 25,65 mW cm⁻² a 34,67 mA cm⁻² e superior em comparação com os outros electrocatalisadores: Pd/C e Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C demonstraram eficiência aproximada (19,97 mW cm⁻² ≈ 19,70 mW cm⁻², a 35,53 mA cm⁻² e 30,59 mA cm⁻², respectivamente); A densidade de potência máxima de Pd₅₀Bi₅₀/C é igual a 16,66 mW cm⁻² em 30,05 mA cm⁻² e de Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C corresponde a 17,75 mW cm⁻² em 27,21 mA cm⁻², como visto na Figura 21B.

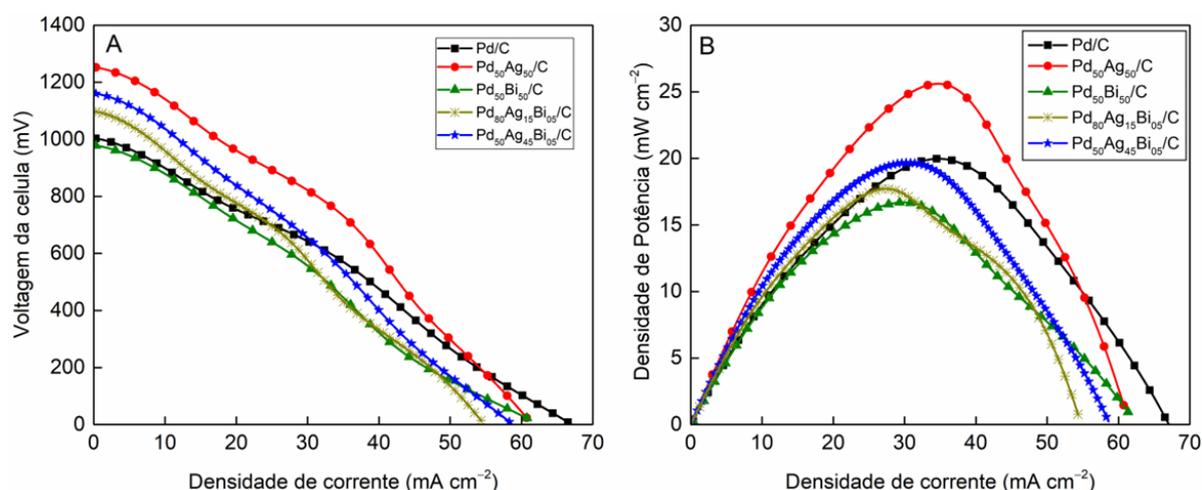


Figura 21. Curvas de polarização: (A) potencial vs. densidade de corrente, (B) densidade de potência vs. densidade de corrente, de uma DEFC de 5,0 cm², operando a 70 °C, utilizando electrocatalisadores anódicos Pd/C, Pd₅₀Ag₅₀/C, Pd₅₀Bi₅₀/C, Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C e Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C, e electrocatalisador catódico Pt/C (BASF). Foram utilizadas cargas de: (1,0 mg_{Pd} cm⁻², em massa de metal no ânodo e 1,0 mg_{Pt} cm⁻² (comercial), em massa de metal no cátodo) com membrana Nafion® 117, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ do combustível (EtOH 2,0 mol L⁻¹ em KOH 1,0 mol L⁻¹), vazão mássica de 150 mL min⁻¹ de O₂

Como já discutido, esses experimentos corroboraram que a adição de 50% de conteúdo de Ag no electrocatalisador Pd/C promoveu a atividade electrocatalítica para a oxidação electroquímica de EtOH em meio alcalino, com o Pd₅₀Ag₅₀/C apresentando uma densidade de potência máxima de 25,65 mW cm⁻² em meio alcalino. Este valor é superior em comparação aos demais electrocatalisadores sintetizados. Como também explorado, espera-se que a adição de Ag aumente a catálise possivelmente devido a uma combinação de área ativa e a presença de espécies oxigenadas. Isto se deve a um efeito sinérgico da presença de óxidos superficiais e alterações estruturais causadas pela dissolução de Ag; enquanto a inclusão de Bi sobre a estrutura de Pd, quando em maiores concentrações, pode cobrir sítios ativos na superfície

principal do metal, evitando a oxidação do EtOH. Esses efeitos estão de acordo com os dados observados por cronoamperometria para ambos os catalisadores bimetálicos.

Para os eletrocatalisadores ternários, a menor densidade de potência máxima do Pd₈₀Ag₁₅Bi₀₅/C demonstra que a remoção desses 20% de Pd, sem a adição de uma contraparte eficiente, prejudica severamente a eficiência do catalisador em condições mais realistas. No entanto, os dados obtidos de Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C também sugerem que a substituição de 5% de Ag por Bi, em Pd₅₀Ag₅₀/C, apresentou um material com comportamento próximo ao do Pd/C puro. Mesmo que a 70 °C este eletrocatalisador ternário não mantenha seu alto desempenho de semi-célula, o experimento levanta a questão do custo-benefício dos eletrocatalisadores. Para produzir 100 mg de Pd/C, deve-se aplicar em sua síntese US\$ 7,62 em sais metálicos precursores (Nitrato de Pd(II) dihidratado, Sigma Aldrich, preço obtido em 07/07/2022). Ao dividir a densidade de potência máxima deste eletrocatalisador pelo seu custo metálico, obtemos o valor de 2,62 mW cm⁻² US\$⁻¹. Submetendo o Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C à mesma análise, este eletrocatalisador nos dá um valor de 5,09 mW cm⁻² US\$⁻¹, uma densidade de potência máxima 1,94 vezes maior por dólar investido na produção do material, para a ROE em meio alcalino. Portanto, todas essas análises endossam que o eletrocatalisador ternário Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C pode ser uma alternativa aos eletrocatalisadores de Pd puro.

4.4. DETECÇÃO DE DOPAMINA

Devido à eficiência demonstrada na catálise de EtOH, o catalisador Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C foi selecionado como o modificador para o sensor eletroquímico. Num primeiro momento, faz-se necessário o conhecimento do perfil eletroquímico do dispositivo em presença do analito desejado. Para tanto, o eletrodo modificado foi aplicado para a detecção de dopamina com a técnica de VC, em solução de PB 0,1 mol L⁻¹, em presença de 10 μmol L⁻¹ do neurotransmissor, numa v de 100 mV s⁻¹, conforme apresenta a Figura 22. O neurotransmissor foi selecionado como analito e prova de conceito pela sua relação direta com a tese, além de sua gama de dados encontrados na literatura e fácil aquisição pelo laboratório. Como pode ser observado, a presença desta molécula acarreta em três principais efeitos: (I) o aumento da corrente na região de adsorção de hidrogênio, que pode estar relacionada à liberação de prótons pelas reações relacionadas à dopamina; (II) a presença de um pico anódico em 122 mV, referente à oxidação direta da dopamina em suas hidroxilas; (III) a diminuição da magnitude dos picos de formação dos óxidos metálicos, em especial, para o pico associado à formação de Ag₂O.

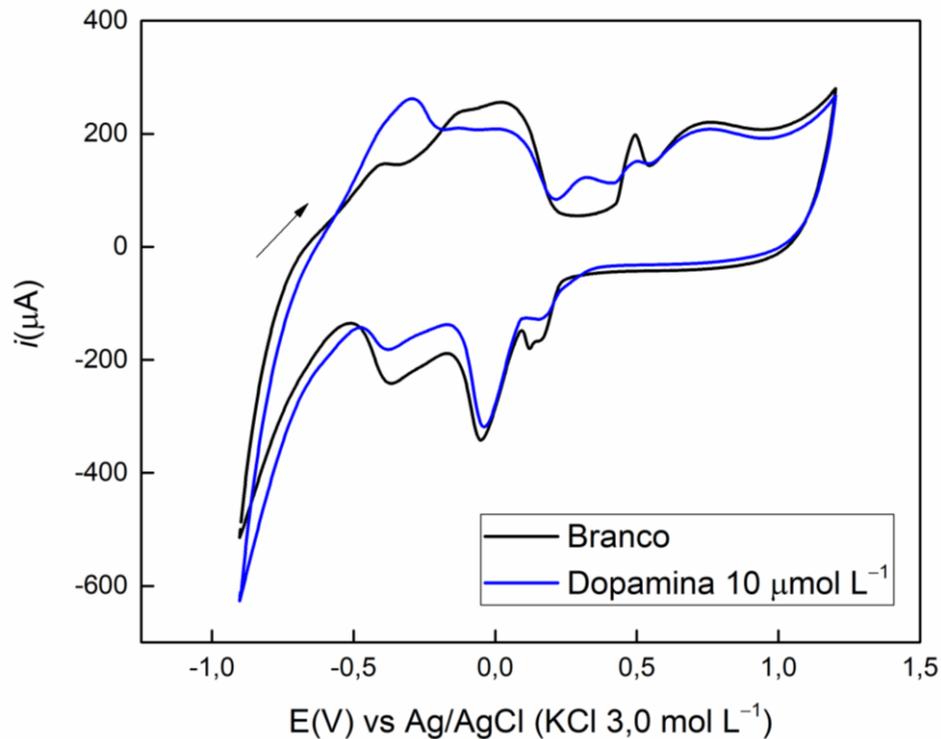


Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE em ausência (**preto**) e presença (**azul**) de dopamina 10 μmol L⁻¹, em PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1); $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$

4.4.1. Otimização dos Parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada

Tendo-se obtido êxito na detecção de uma reação faradáica para com o analito, deve-se escolher qual a técnica mais adequada para a utilização do sistema como um sensor eletroquímico. Deste modo, a VOQ foi selecionada por sua alta sensibilidade e favorecimento na obtenção de dados de processos redox reversíveis e *quasi*-reversíveis. De forma a se obter dados com melhor resolução, faz-se necessária a avaliação dos parâmetros da técnica: f , a e s . Portanto, os dados dos experimentos de triagem descritos na seção 3.4. são apresentados na Tabela 6, bem como os efeitos calculados dentre os parâmetros ($f = \nu_1$, $a = \nu_2$ e $s = \nu_3$) e a resposta obtida.

Tabela 6. Resultado dos efeitos calculados nos planejamentos 2^3

Variáveis e interações	Efeitos	Limites inferior e superior	
v1	-71,34	-66,02	-76,65
v2	28,91	34,22	23,59
v3	7,97	13,29	2,66
v1v2	-22,07	-16,75	-27,38
v1v3	-10,32	-5,01	-15,63
v2v3	6,51	11,82	1,19
v1v2v3	-8,71	-3,40	-14,02

Analisando a tabela, é possível notar que os efeitos proporcionados pela variável v3 (s) são consideravelmente menos significativos que as demais, mesmo que em seu intervalo de confiança essa não ultrapasse valor nulo, a mesma permeia os $\sim 1,0\%$ de influência na soma dos efeitos ao quadrado (soma dos efeitos ao quadrado de cada variável ou interação: $v1 = 76,0\%$, $v2 = 12,5\%$, $v3 = 0,95\%$, $v1v2 = 7,27\%$, $v1v3 = 1,59\%$, $v2v3 = 0,63\%$ e $v1v2v3 = 1,13\%$). Portanto, o valor ótimo para s foi definido como 5,0 mV, sendo este o valor presente quando se obteve maior magnitude de corrente de pico durante os experimentos, como pode ser conferido na Figura 23.

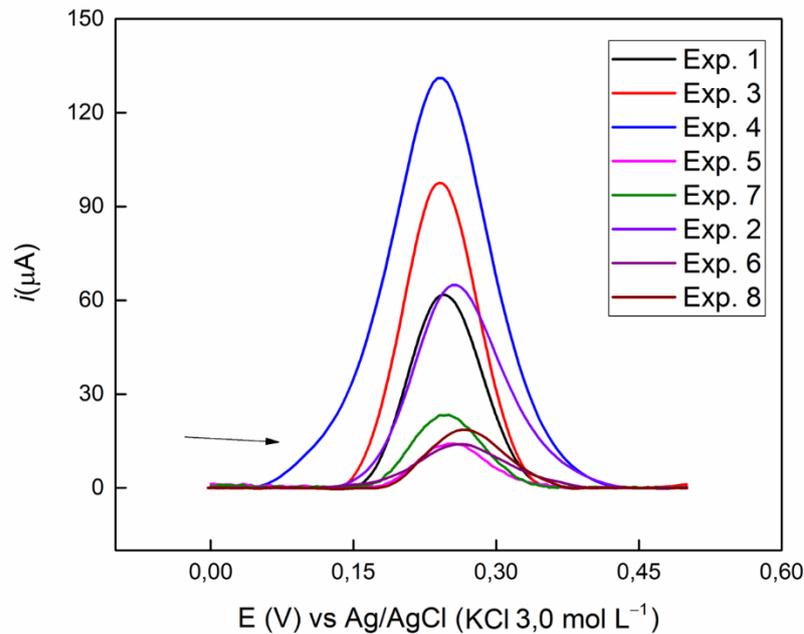


Figura 23. Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE em presença de dopamina $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em meio de PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1) em diferentes parâmetros experimentais

Deste modo, os dois parâmetros restantes foram submetidos à análises de arranjo de composto central. A partir das respostas da Tabela 2 foi possível a geração dos gráficos de resposta de superfície e curva de nível para a e o comportamento da corrente de pico na relação a vs. f , em presença de dopamina (Figura 24).

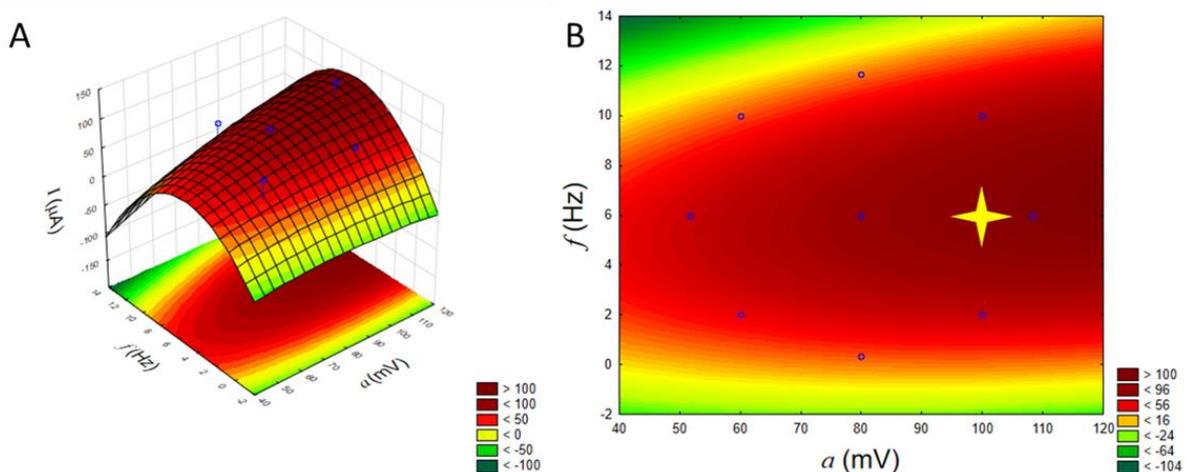


Figura 24. (A) Superfície de resposta e (B) curva de nível obtida para a otimização dos parâmetros a e f como uma função da corrente de pico para Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE em presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina. A estrela indica os parâmetros selecionados como ótimo

Com a análise destes dados, pode-se determinar a região de sobreposição onde se é possível esperar uma maior sensibilidade para a determinação de dopamina, e, portanto, os parâmetros definidos como ótimos são $s = 5,0$ mV, $a = 100$ mV e $f = 6,0$ Hz.

4.4.2. Comportamento do Sistema e Curva Analítica

A partir da obtenção dos parâmetros ótimos, definiu-se o pH do eletrólito como 6,1, correspondente à literatura [245, 246] e pôde-se investigar o comportamento do dispositivo. O experimento foi realizado com a faixa de concentrações de dopamina, variando de 0,1 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, cujos dados estão presentes nas Figura 25, Figura 27 e Figura 28.

Analisando o perfil obtido, presente integralmente na Figura 25, pode-se perceber que o pico anódico correspondente à formação dos óxidos metálicos (487 mV) sofre uma diminuição de magnitude conforme o aumento da concentração de dopamina, antes mesmo do sinal eletroquímico da oxidação da molécula (262 mV) ser visível. A Figura 26A apresenta o mecanismo de oxidação direta da dopamina, envolvendo 2 prótons e 2 elétrons. A literatura trás diversos trabalhos que exploram a formação de complexos estáveis de vários metais com o grupo catecol [247-249]. Portanto, a Figura 26B apresenta uma sugestão de mecanismo envolvendo a superfície do dispositivo e a molécula da dopamina. Este comportamento se mantém linear até que o pico da oxidação direta do analito se torna visível, como mostra a Figura 25B. Tal evento ocorre pela facilidade de coordenação dos oxigênios presentes no grupo catecol com a superfície metálica, podendo ser ambos diretamente ligados à um único átomo ou uma ligação 1:1 (O:M). Este mecanismo ocorre em temperaturas próximas à ambiente, não desestabiliza a ressonância da molécula e é apresentado especialmente com a Ag [250-252] e Pd [253]. A literatura sugere [247] que este complexo pode ser formado com Bi, mas trabalhos envolvendo este elemento não foram encontrados. Como sua porcentagem neste material é consideravelmente mais baixa que a dos demais metais, estima-se que esta ligação não seja prioritariamente efetivada.

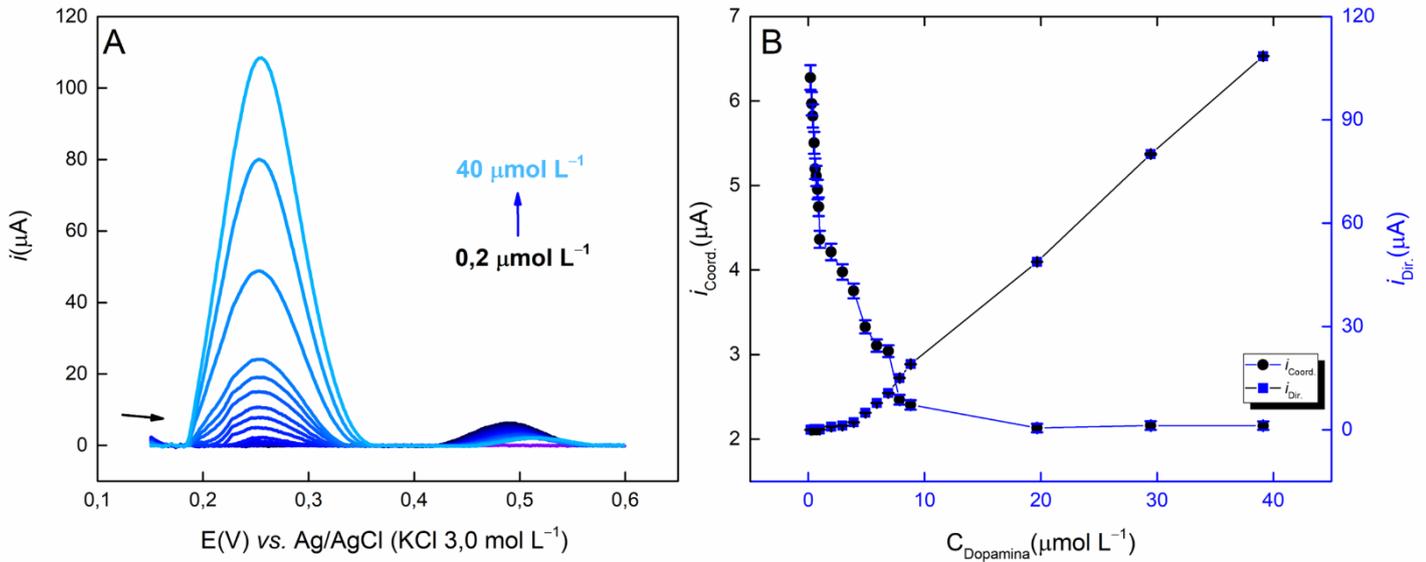


Figura 25. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE em presença de diferentes concentrações de dopamina, em meio de PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1); $s = 5,0$ mV; $a = 100$ mV, $f = 6,0$ Hz; (B) Dispersão de pontos da relação (■) $i_{\text{Dir.}}$ vs. C_{Dopamina} e (●) $i_{\text{Coord.}}$ vs. C_{Dopamina}

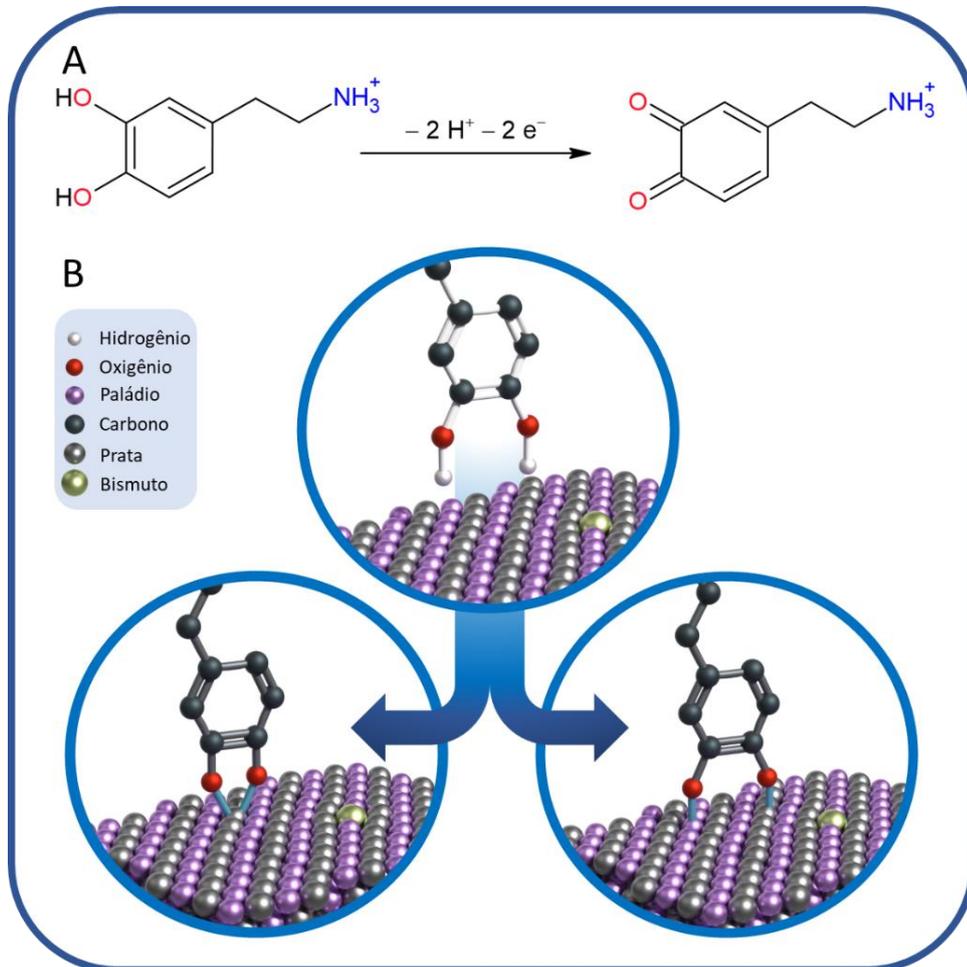


Figura 26. (A) Reação de oxidação direta de dopamina. (B) Representação de possíveis estruturas de coordenações (ciano) do grupo catecol com a superfície metálica. Fonte: Elaboração própria

Com delimitação das regiões lineares, duas curvas analíticas são apresentadas, sendo cada uma para cada mecanismo. Observa-se na Figura 27 a faixa linear para a curva de calibração para o pico de oxidação direta de dopamina, adequada entre $4,0$ e $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, correspondendo a equação linear $i_{\text{Dir.}} (\mu\text{A}) = 3,00 \times C_{\text{Dopamina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 9,85$; com $r^2 = 0,999$.

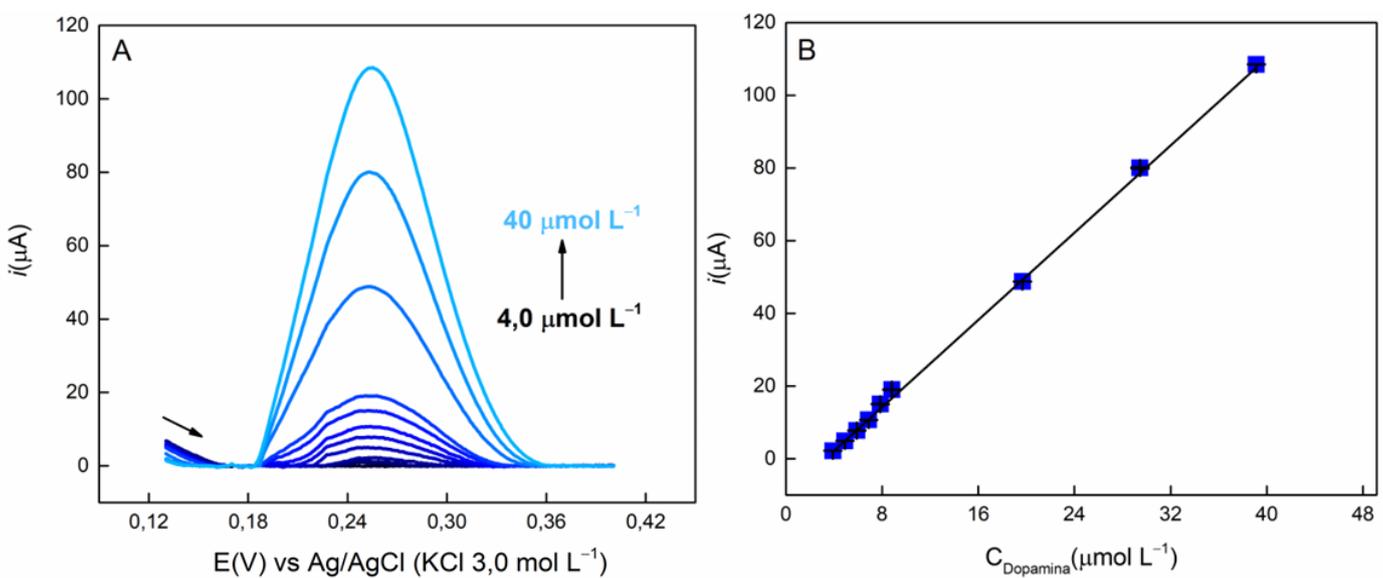


Figura 27. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos por $\text{Pd}_{50}\text{Ag}_{45}\text{Bi}_{05}/\text{C}/\text{GCE}$ em presença de diferentes concentrações de dopamina, em meio de PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,1); $s = 5,0 \text{ mV}$; $a = 100 \text{ mV}$, $f = 6,0 \text{ Hz}$; (B) Dispersão de pontos da relação $i_{\text{Dir.}}$ vs. C_{Dopamina}

A relação entre o sinal dos metais para com a coordenação de dopamina pode ser observada com mais detalhes na Figura 28. Nota-se também um decaimento linear de pico entre $0,2$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, correspondente à equação linear $i_{\text{Coord.}} (\mu\text{A}) = -2,25 \times C_{\text{Dopamina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 6,68$; com $r^2 = 0,990$.

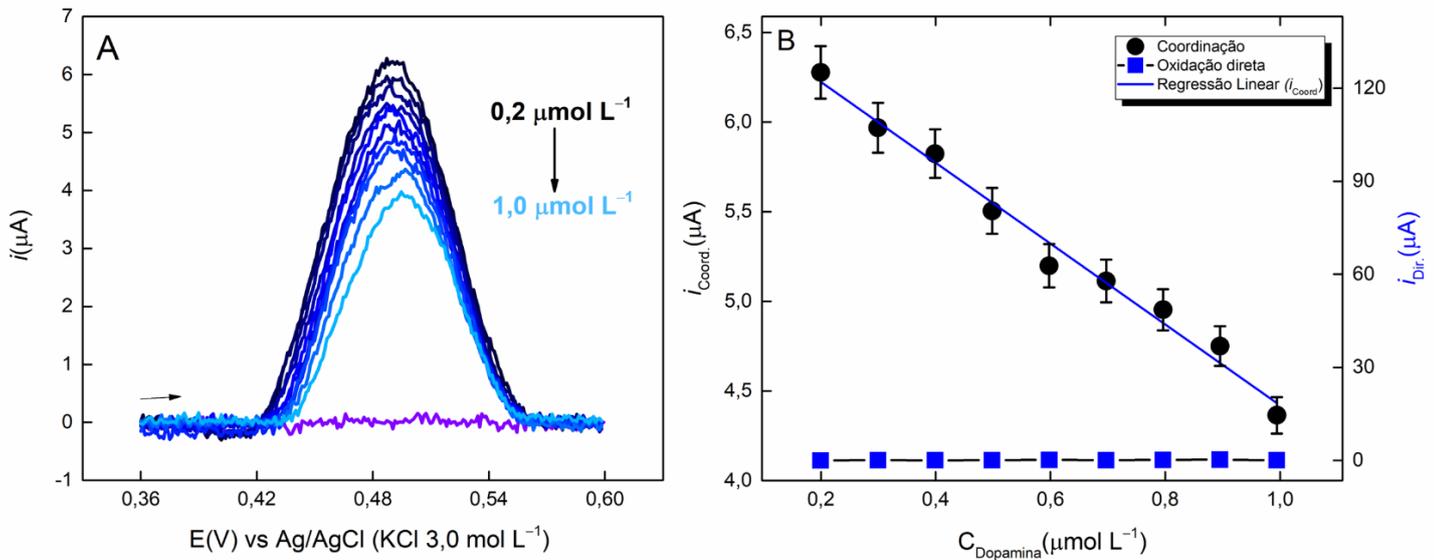


Figura 28. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos por Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE em presença de diferentes concentrações de dopamina, em meio de PB 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,1); $s = 5,0$ mV; $a = 100$ mV, $f = 6,0$ Hz; (B) Dispersão de pontos da relação (■) $i_{\text{Dir.}}$ vs. C_{Dopamina} e (●) $i_{\text{Coord.}}$ vs. C_{Dopamina}

4.4.2.1. ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO EM AMOSTRAS

Em virtude de se avaliar o dispositivo em amostras mais complexas que as estudadas até então, amostras de urina sintética foram sintetizadas com a adição de dopamina em concentrações conhecidas. Os testes foram realizados conforme as condições experimentais da curva analítica e a Tabela 7 apresenta os dados obtidos, que variam de 92,0 a 114% para a relação do pico da oxidação direta de dopamina e de 92,6 a 110% para o pico dos óxidos metálicos.

Tabela 7. Determinação de dopamina em amostras de urina sintética pelo pico de oxidação direta de dopamina e o pico dos óxidos metálicos

Sinal da oxidação direta de dopamina			
Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
A	4,00	4,46 ($\pm 0,1656$)	114 ($\pm 4,141$)
B	8,00	8,17 ($\pm 0,2612$)	102 ($\pm 3,265$)
C	20,0	18,4 ($\pm 0,4280$)	92,0 ($\pm 2,140$)
Sinal dos óxidos metálicos			
Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
A	0,300	0,329 ($\pm 0,02232$)	110 ($\pm 7,440$)
B	1,00	0,926 ($\pm 0,03364$)	92,6 ($\pm 3,364$)
C	0,700	0,757 ($\pm 0,04427$)	109 ($\pm 6,324$)

O desempenho de Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C/GCE para a determinação de dopamina foi comparado à trabalhos similares na literatura, como apresentado na Tabela 8. Pode ser observado que os trabalhos selecionados se dedicaram a estudar materiais e/ou metodologia parecidas com as discutidos até então. Este trabalho se demonstra uma interessante abordagem para os fins propostos, uma vez que ambos seus mecanismos de detecção estão em faixas lineares, LOD e sensibilidade próximas aos outros trabalhos e, portanto, complementares à literatura. Pode ser observado que o valor de LOD encontrado para a oxidação direta da dopamina é maior que o primeiro ponto identificado no processo de complexação. Estes valores são calculados, sendo mais úteis para critérios de comparação entre os valores da literatura em si do que como limiares de detecção do dispositivo em si. Foi experimentalmente comprovado, inclusive, que não se observa alteração de corrente na concentração identificada estatisticamente como LOD para este processo.

Tabela 8. Comparação entre este trabalho e outros presentes na literatura para a determinação de dopamina

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	Referência
CB/GCE	0,600 a 11,8	0,052	0,0244	[254]
CuO/MWNTs/Nafion/GCE	1,00 a 50,0	0,40	3,09	[255]
Cu ₂ O HMS/CB/GCE	0,0990 a 708	0,040	0,0492	[256]
PtNCs-MWCNTs- GNPs/GCE	2,00 a 50,0	0,50	9,88	[257]
RGO-CB-CTS/GCE	3,20 a 32,0	0,20	0,068	[224]
Ni/C/GCE	1,00 a 55,0	0,050	46,7	[258]
Au-GQDs-Nafion/GCE	0,20 a 50,0	0,84	0,0604	[259]
PdAgBi/C/GCE	0,20 a 1,00 4,00 a 40,0	0,14 0,035	2,25 3,00	Este trabalho

CB/GCE: Eletrodo de carbono vítreo modificado com CB; **CuO/MWNTs/Nafion/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de Nafion, nanotubos de carbono de paredes múltiplas e nanopartículas de óxido de cobre; **Cu₂O HMS/CB/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado com microesferas ocas de óxido de cobre e CB; **PtNCs-MWCNTs-GNPs/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de camadas automontadas de nanocorrentes de platina, nanotubos de carbono de paredes múltiplas e compósito nanopartículas de grafeno; **RGO-CB-CTS/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de óxido de grafeno reduzido, CB e quitosana; **Ni/C/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de CB nanopartículas de Ni; **Au-GQDs-Nafion/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de nanopartículas de Au e pontos quânticos de grafeno

5. CONCLUSÃO

O trabalho descrito neste capítulo busca contribuir para a ideia de produção de materiais multifuncionais devido à sua expansiva utilidade, apresentando eletrocatalisadores ternários projetados para tal função, que se mostraram materiais promissores para oxidação de EtOH e sensoriamento eletroquímico de dopamina. A síntese destes eletrocatalisadores é relativamente fácil e com considerável eficiência. A análise de ROE sugere que o material Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C tem potencial para esta aplicação, apresentando uma produção de corrente e

carga de, respectivamente, 12,4 e 16,5 vezes maior que a de Pd/C (observada em cronoamperometria e VC), com uma taxa relativamente baixa de envenenamento, que foi atribuído aos efeitos bifuncionais e eletrônicos, devido à presença de óxidos observada em voltametrias e ao deslocamento distinguido nos picos de DRX, indicativos da formação da liga. As análises em ADEFCS (70 °C) demonstraram que, embora o Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C, não possa competir com o Pd₅₀Ag₅₀/C em densidade de potência máxima, seu comportamento foi semelhante ao do Pd/C, mas com quase metade do custo de material para produção, corroborando suas atraentes capacidades. Embora o perfil de formação de picos associados aos metais pareça, a princípio, limitar a faixa de potencial de trabalho do dispositivo (por sobreposição dos picos), os dados apresentados sugerem uma interação linear da superfície com a dopamina em uma determinada região. Assim, foi possível construir duas curvas de calibração: a primeira, relacionada a esse mecanismo, partindo de 0,2 a 1,0 μmol L⁻¹, resultando em uma recuperação em amostra de urina sintética entre 92,6 e 110%; e o segundo, relacionado ao pico de oxidação da dopamina, abrange a faixa de 4,0 a 40 μmol L⁻¹. O dispositivo apresentou recuperações entre 92,0 e 114% na mesma amostra, para este segundo mecanismo. Com esses dados, sugere-se também a praticidade de preparar materiais para duas frentes de pesquisa diferentes, raramente estudadas em conjunto.

*O passo mais importante que alguém pode dar.
Não é o primeiro, é? É o próximo. Sempre o
próximo.*

Brandon Sanderson, Julgamentadora

CAPÍTULO II

ESTUDO DA ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Pd EM SENSOR E BIOSSENSOR DE TINTA CONDUTORA PARA DETERMINAÇÃO DE EPINEFRINA E α -SINUCLÉINA

6. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do grupo Merck (Sigma Aldrich) e/ou Fluka, em grau analítico. Água ultrapura (Millipore™ Synergy®), com resistividade $>18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi usada no preparo de todas as soluções. Para análises eletroquímicas, soluções de KCl $0,1$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pH 7,4, H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e solução tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 6,5; foram utilizadas em diferentes análises como eletrólito suporte. Soluções a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol foram empregadas como sondas eletroquímicas ao longo do trabalho. As Figuras e modelos tridimensionais foram feitos com o *software* Blender 4.2.

6.1. EQUIPAMENTOS

As análises eletroquímicas foram efetuadas por um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm (Eco Chemie), gerenciado pelo *software* Nova 2.1.5, em que o sistema de três eletrodos, composto por eletrodos de Ag como *pseudo*-referência, e a tinta desenvolvida, CB-PVA, como eletrodos auxiliar e de trabalho. Diferentes modificações do eletrodo de trabalho, incorporando nanopartículas metálicas e biomoléculas, também foram utilizadas. As análises de EIE foram obtidas com os seguintes parâmetros experimentais: potencial aplicado igual ao potencial de meia onda ($E_{1/2}$) do processo de interesse, calculado a partir de voltametrias cíclicas (VC) pertinentes; amplitude de 10 mV , ondas senoides ao longo de toda a análise e com 10 incrementos de frequência por década, numa faixa de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^{-2}$ Hz. Algumas análises de EIE tiveram os eixos normalizados com o primeiro dado coletado, em prol de uma melhor visualização de seu comportamento. Um pHmetro 827 (Metrohm) foi usado para todas as determinações de pH. Uma centrífuga assimétrica dupla (SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K, FlackTec Inc) foi utilizada para o preparo das tintas condutoras, com 3000 rpm , durante 1 min . As máscaras em papel adesivo (Colacril), com molde dos eletrodos descartáveis, foram desenvolvidas pelo *software* Silhouette Studio e a impressora de corte Silhouette Cameo 3 foi utilizada para impressão das mesmas. As imagens de MEV foram obtidas por um

Microscópio Eletrônico de Varredura ThermoFisher Scientific Prisma E, em aceleração de voltagem de 10kV e modo de baixo vácuo de 50 Pa.

6.2. PREPARO DOS ELETRODOS DESCARTÁVEIS

Os eletrodos descartáveis foram confeccionados com o uso de uma tinta condutora, em que uma quantidade de CB, igual a 13% de sua massa total, foi adicionada à uma matriz polimérica com base em cola de poliacetato de vinila (PVA) da marca Acrilex. Esta mistura foi rotacionada centrípeta e centrifugamente com uma centrífuga assimétrica dupla, por 1 min, a 3000 rpm. Após este processo, a tinta estava pronta para uso. Máscaras vazadas, impressas em papel adesivo, foram acopladas a um substrato de poli(tereftalato de etileno) (PET). A tinta foi depositada sobre esta superfície, seguindo da imediata remoção das máscaras, definindo o formato dos eletrodos. Após 40 minutos de cura a temperatura ambiente, esmalte para unhas incolor foi aplicado para delimitar a área do eletrodo e tinta de prata comercial foi usada para pintar o eletrodo de referência, finalizando o sistema descartável, denominados CB-PVA. Todo este processo está representado na Figura 29.

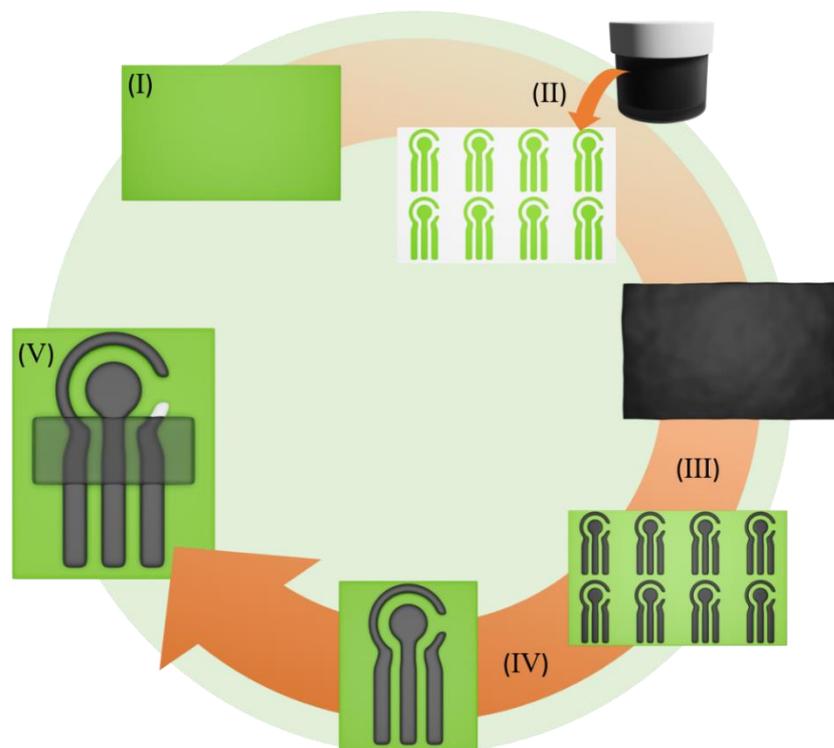


Figura 29. Produção do sistema de eletrodos descartável CB-PVA. (I) À uma placa de PET é adicionada uma máscara adesiva. (II) Após, a tinta condutora de CB e PVA é espalhada sobre a superfície da placa. (III) O excesso e a máscara adesiva são removidos e (IV) os eletrodos

podem ser devidamente separados. (V) Aplicando-se tinta de prata no eletrodo de referência e esmalte incolor para delimitação da área ativa, o sistema está finalizado. Fonte: Elaboração própria

6.3. ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Pd

O processo de eletrodeposição foi realizado com a técnica de cronoamperometria, com um potencial fixo de -700 mV, seguindo a literatura para sistemas semelhantes [260, 261]. A otimização dos parâmetros operacionais para esta técnica (tempo de reação/deposição e concentração de Pd) foi conduzida aplicando-se um arranjo de composto central, nos valores de 10 e 100 s para o tempo de deposição (v_1) e de 0,1 e 1,0 mmol L⁻¹ para a concentração de Pd (v_2), em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. A Tabela 9 apresenta a matriz para este experimento e os dados obtidos, em μ A.

Tabela 9. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos

Experimento	M	v1	v2	v1²	v2²	v1v2	Resposta
1	1	-1	-1	1	1	1	20,5
2	1	1	-1	1	1	-1	18,2
3	1	-1	1	1	1	-1	21,9
4	1	1	1	1	1	1	5,50
5	1	-1,4142	0	2	0	0	18,7
6	1	1,4142	0	2	0	0	20,0
7	1	0	-1,4142	0	2	0	18,8
8	1	0	1,4142	0	2	0	17,2
9	1	0	0	0	0	0	20,5
10	1	0	0	0	0	0	20,5
11	1	0	0	0	0	0	20,5

6.4. MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS PARA BIOSSENSORIAMENTO

A metodologia para a imobilização com componentes biológicos, representado pela Figura 30, envolveu o gotejamento de 10 mL de cisteamina (Cys, 10 mmol L⁻¹) e glutaraldeído (Ga, 5,0 mmol L⁻¹), seguidos de 8,0 mL de Anti- α -sinucleína (A α syn, 1,0 mg mL⁻¹). Após, 10 mL de albumina de soro bovino (BSA, 1,0%) foi gotejado sobre a superfície de trabalho,

buscando eliminar interações não específicas. O tempo de cada etapa foi de 1,0 h, e, após este período e a cada modificação, o eletrodo foi lavado com PB $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 7,0), com o auxílio de uma micropipeta.

A imobilização de αsyn foi feita com 8,0 mL de soluções de diferentes concentrações, também por 1,0 h, garantindo tempo de interação. Após esta etapa, todos os eletrodos foram lavados como descrito anteriormente.

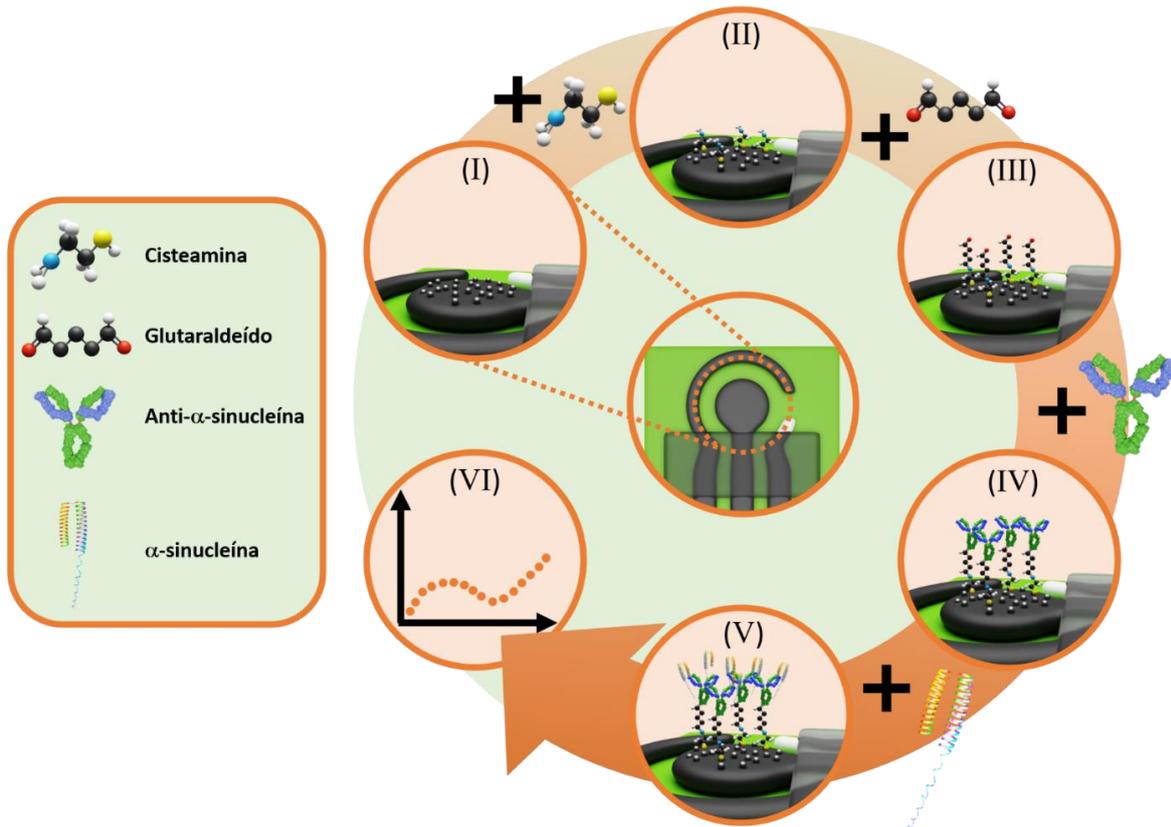


Figura 30. Preparo do biossensor $\alpha\text{syn}/\text{BSA}/\text{A}\alpha\text{syn}/\text{Ga-Cys}/\text{Pd}/\text{CB-PVA}$. (I) Sobre a superfície de CB-PVA, nanopartículas de Pd são adicionadas. Após, o dispositivo sofre modificações sequenciais de (II) Cys, (III) Ga e (IV) A α syn. (V) A αsyn é então adicionado ao sistema e (VI) a análise pode ser feita. Fonte: Elaboração própria

6.5. PREPARO DE AMOSTRAS

As detecções de EP foram realizadas por método de adição e recuperação em líquido cefalorraqueado sintético. Ambas as amostras foram preparadas em meio de PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5; com equivalente força iônica). A Tabela 10 mostra todos os reagentes utilizados junto de suas proporções, de acordo com a literatura [262, 263].

Tabela 10. Composição das amostras preparadas

Espécie	Líquido cerebrospinal sintético (g L⁻¹)
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,32
NaCl	8,4
Ureia	0,0080
KCl	0,28
Glicose	0,80
NaHCO ₃	1,6

A amostra de soro de sangue humano totalmente coagulado (Masculino, AB, origem dos Estados Unidos da América, filtrado e estéril), utilizada para análises de α syn foi preparada seguindo uma modificação da proporção descrita por Freitas *et al.* [264], sendo de 1:10 v/v para soro:PB (1,0 mmol L⁻¹, pH 7,4).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. PERFIL ELETROQUÍMICO DE CB-PVA

Com o desenvolvimento de uma nova tinta, faz-se necessária a caracterização de seu perfil eletroquímico, especialmente quando se visa sua futura modificação, para melhor interpretação dos resultados obtidos. Portanto, os dispositivos CB-PVA foram submetidos a investigações por VC, numa janela de potencial de -0,4 a 0,7 V, a uma v de 50 mV s⁻¹, e com ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹ como sonda eletroquímica, em eletrólito de KCl 0,1 mol L⁻¹. A sonda foi escolhida baseando-se na alta carga (negativa) de superfície do eletrodo, proveniente do uso de CB, evitando interações indesejadas, como fortes adsorções com sondas de cargas positivas ou repulsões com sondas negativas. A Figura 31 apresenta o voltamograma obtido, onde observam-se picos de oxidação ($E_{ox} = 254$ mV, $i_{ox} = 31$ mA) e redução ($E_{red} = 44,4$

mV, $i_{\text{red}} = -26,5 \text{ mA}$), com uma separação de pico-a-pico (ΔE) de 210 mV, seguindo a reação apresentada na Figura 32.

Com este resultado, a tinta obtida se demonstra interessante para a continuidade do trabalho, fornecendo um atraente substrato para a eletrodeposição de nanopartículas metálicas.

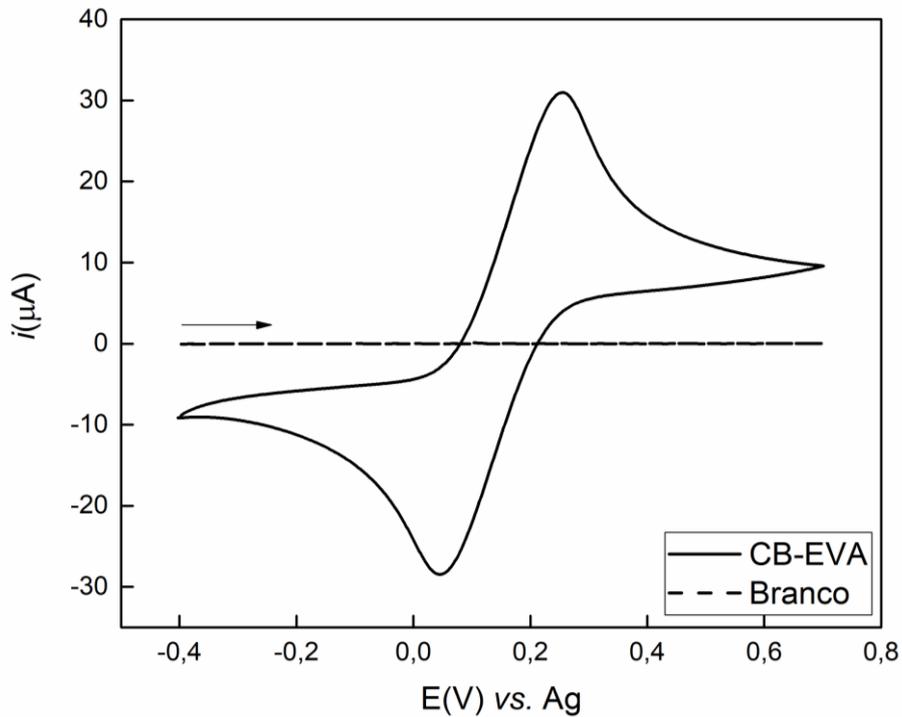


Figura 31. Voltamograma cíclico obtido por CB-PVA em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

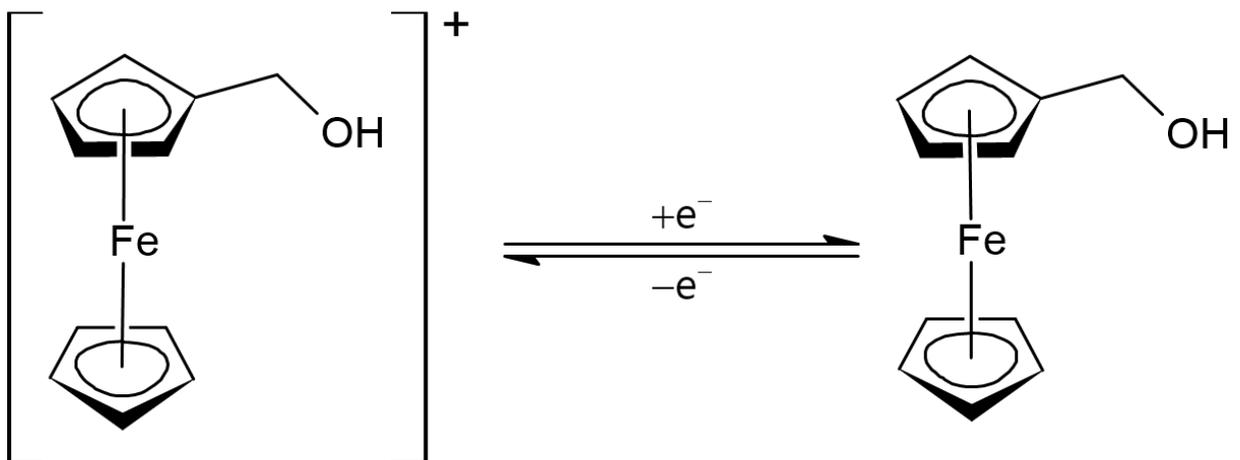


Figura 32. Processo de oxirredução de ferrocenometanol. Fonte: Elaboração própria

Partindo-se destas análises, o estudo do perfil com a variação da v se deu início, estudando-se os valores: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mV s^{-1} , apresentados na Figura

33A. Observa-se um pequeno deslocamento dos potenciais de pico com o incremento da v , sugerindo um efeito de transporte de massa afetado pela adsorção. No entanto, como pode ser observado pela relação linear i vs. $v^{1/2}$ (Figura 33B, $r^2_{\text{anod}} = 0,9996$, $r^2_{\text{catod}} = 0,9991$), o processo ainda é majoritariamente controlado por difusão, de modo que qualquer efeito das cargas possa ser negligenciado neste sistema. Analisando-se todas as velocidades, obtém-se um $\Delta E = 250$ mV e um quociente entre correntes anódica e catódica ($i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$) igual a 1,09; atribuindo ao sistema um comportamento de considerável reversibilidade. Utilizando estes dados na equação de Randles-Ševčík foi possível obter uma estimação da área eletroativa (A) do dispositivo, sendo este valor equivalente a $0,172 \text{ cm}^2$, que é cerca de 5 vezes maior que a área geométrica do eletrodo ($0,033 \text{ cm}^2$).

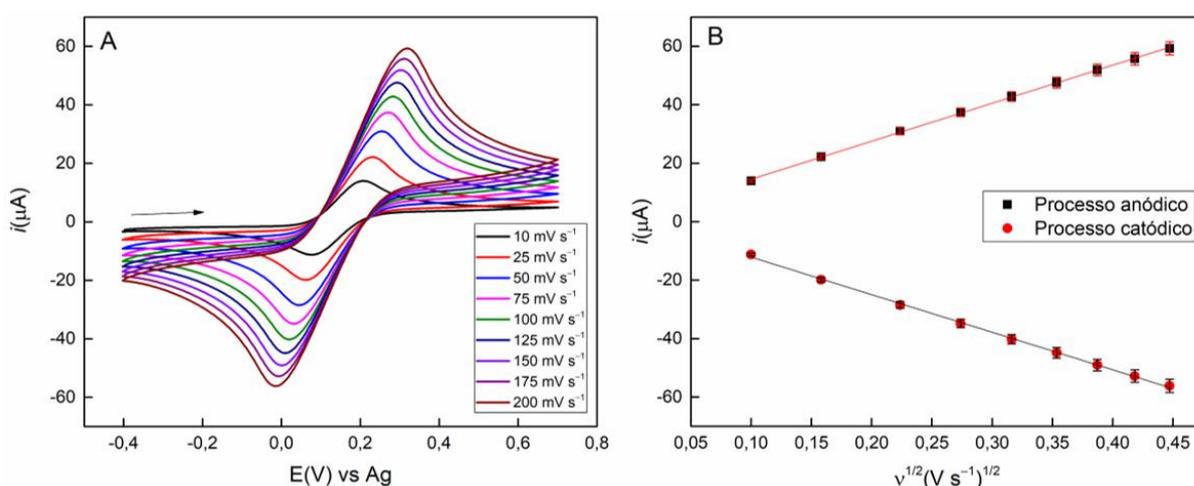


Figura 33. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes v . (B) Dispersão de pontos da relação i vs. $v^{1/2}$

7.2. ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE Pd

A eletrodeposição de nanopartículas se baseia na excitação da superfície do eletrodo, a partir de um estímulo controlado, de modo a promover o transporte de íons metálicos do seio da solução até a deposição dos mesmos na superfície do dispositivo, por redução. Deste modo, alguns fatores afetam consideravelmente a estrutura das nanopartículas formadas, bem como seu comportamento eletroquímico: o potencial aplicado, uma vez que controla diretamente a energia fornecida ao sistema para o desenvolver deste processo; a concentração de íons do metal na solução, afetando principalmente a disponibilidade e conseqüente tamanho de partícula; e o

tempo de deposição (t), pois o incremento do tempo em que o processo pode acontecer leva ao surgimento de estruturas diversas e potencialmente mais complexas.

A literatura apresenta efetivos potenciais de eletrodeposição de Pd numa faixa entre $-0,2$ e $-0,8$ mV, com a região entre $-0,6$ a $-0,8$ mV apresentando estruturas moderadamente mais ativas [260, 261], para sistemas em meios ácidos. Deste modo, o potencial de $-0,7$ V foi selecionado para este experimento. Portanto, a concentração de Pd em solução e o tempo de deposição foram submetidos à análises de arranjo de composto central, para a obtenção do conjunto de parâmetros mais ideal. A partir das respostas da Tabela 9 foi possível a geração dos gráficos de resposta de superfície e curva de nível para o comportamento da corrente de pico para ferrocenometanol (como descrito na seção 6.3.) em voltametrias cíclicas (Figura 34), na relação C_{Pd} vs. t , (Figura 35A e B). Como pode ser observado na Figura 34, algumas destas relações de concentração e tempo afetam drasticamente o perfil eletroquímico do dispositivo. Isto provavelmente se deve à alta concentração de carga de algumas estruturas de Pd, afetando a resolução de pico e o mecanismo geral do equilíbrio de oxirredução das superfícies das nanopartículas de Pd.

Nas Figura 35A e B nota-se que é esperada maior corrente de pico para maiores C_{Pd} em pouco t , ou muito t em baixas C_{Pd} . Todavia, para o primeiro caso, como pode ser observado na Figura 34C (azul), o perfil apresenta considerável deslocamento de potenciais de reação, além do surgimento de um segundo processo com o pico em -358 mV; para o segundo caso, o perfil apresentado pelo voltamograma vermelho da Figura 34A se enquadra, mas não difere muito do voltamograma preto, em que a diferença é o t estudado (máximo e mínimo avaliados).

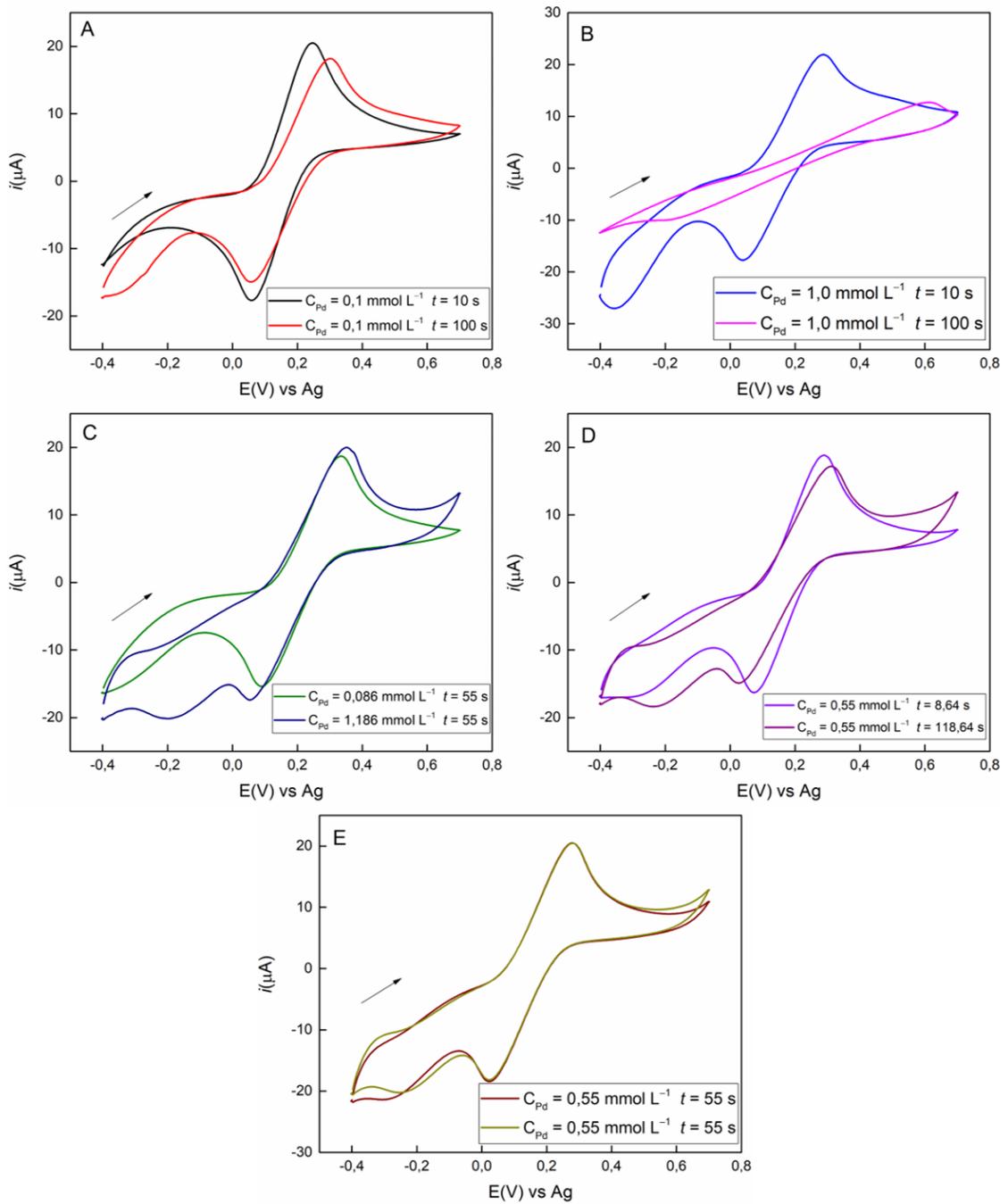


Figura 34. Voltamogramas cíclicos de Pd/CB-PVA preparados com diferentes concentrações de Pd em solução e tempos de deposição, em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

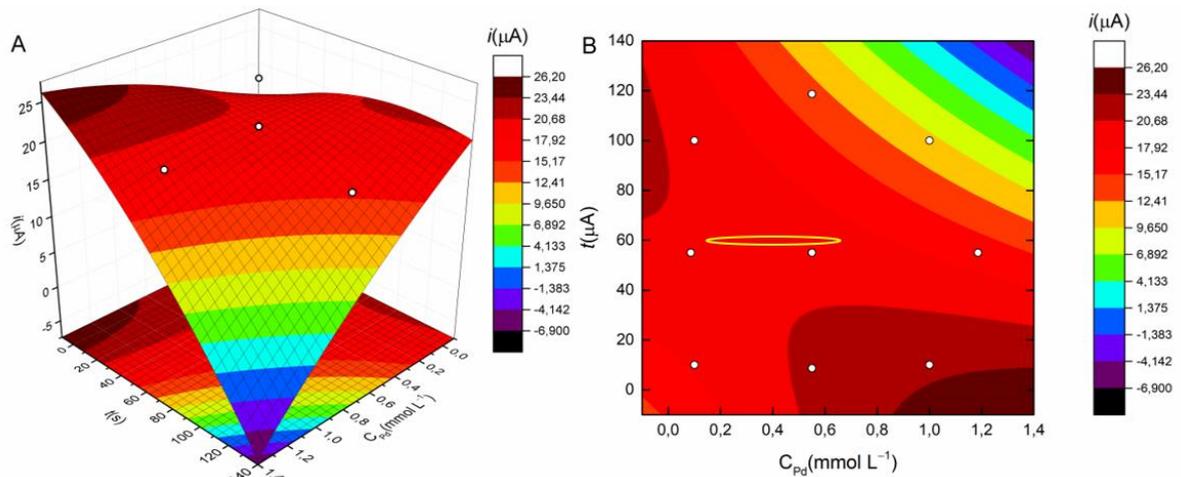


Figura 35. (A) Superfície de resposta e (B) curva de nível obtida para a otimização da C_{Pd} e t como uma função da corrente de pico para Pd/CB-PVA. A elipse indica a região de parâmetros selecionados a ser investigada como ótima

Deste modo, escolheu-se a região destacada de C_{Pd} na Figura 35B (elipse), fixando-se o tempo em 60 s, uma vez que esta região aparentava apresentar alta corrente de pico enquanto mantinha o perfil eletroquímico estável. A Figura 36 apresenta os voltamogramas obtidos para as concentrações de 0,17, 0,34, 0,51 e 0,68 mmol L^{-1} de Pd, em presença de 1,0 mmol L^{-1} de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L^{-1} , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Como pode ser notado, a concentração de 0,34 mmol L^{-1} apresentou aceitável resolução de pico, sugerindo baixo grau de efeitos de lentidão à reação, além de considerável aumento de magnitude de corrente para ambos os processos, sendo de 39,9% para a oxidação e 49,4% para a redução, quando comparado ao eletrodo obtido com a solução de 0,17 mmol L^{-1} de Pd. Em relação à ΔE , o dispositivo obtido em 0,34 mmol L^{-1} fornece um valor de 210 mV, o mesmo do eletrodo sem deposição. Portanto, os parâmetros considerados ótimos para a eletrodeposição de Pd, em H_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}), neste dispositivo, são: $E_{\text{dep}} = -0,7 \text{ V}$, $t = 60 \text{ s}$ e $C_{Pd} = 0,34 \text{ mmol L}^{-1}$.

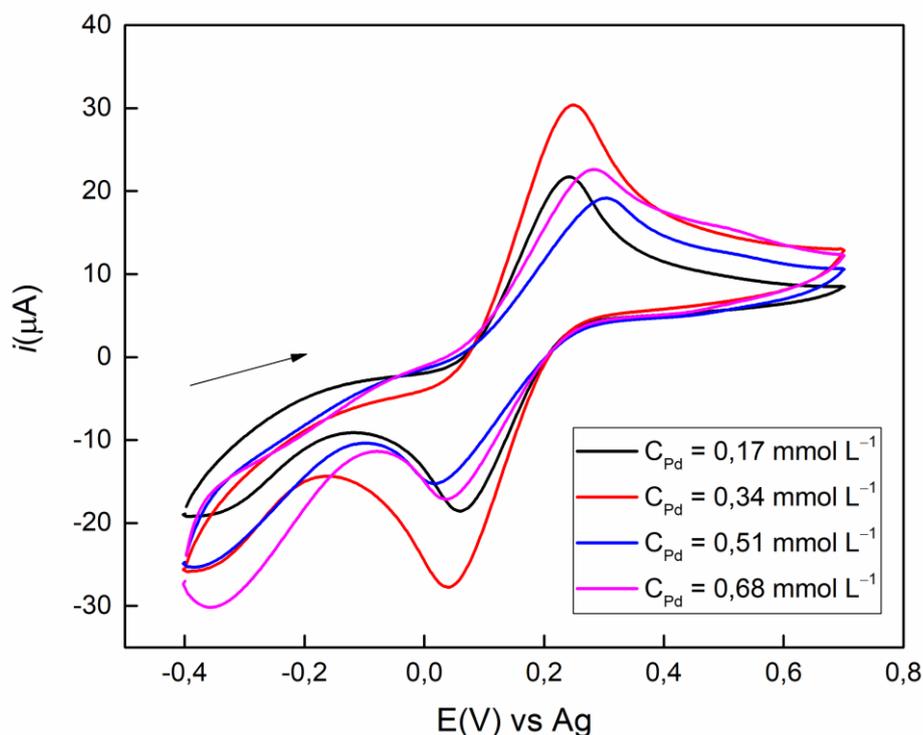


Figura 36. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA, em diferentes concentrações de Pd para a eletrodeposição, em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Tendo-se obtido estes valores, o estudo do comportamento eletroquímico do dispositivo Pd/CB-PVA foi desenvolvido, exatamente como para o eletrodo sem modificação, discutido na seção 6.3. Estes dados estão disponíveis na Figura 37. Utilizando-se de todos os voltamogramas obtidos, a ΔE para este sistema é de 248 mV , sendo similar à encontrada para CB-PVA. Igualmente, o $i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$ deste sistema é de $1,10$; e o r^2 dos processos ($0,9964$ para oxidação e $0,9953$ para redução) sugerem que ele também é controlado por difusão, mas efeitos de carga são mais prevalentes que no CB-PVA, o que é esperado pelas propriedades inerentes de nanopartículas metálicas. Embora estes dados isolados possam sugerir que a presença de Pd não afeta a cinética do processo redox da sonda, a A calculada para estes dispositivos é inferior ao CB-PVA, sendo de $0,150 \text{ cm}^2$. Esses dados podem sugerir que, embora algumas das estruturas metálicas formadas possam ter uma condução inferior ao CB bruto, a adição do metal foi benéfica para o sistema, uma vez que este manteve seu comportamento estável.

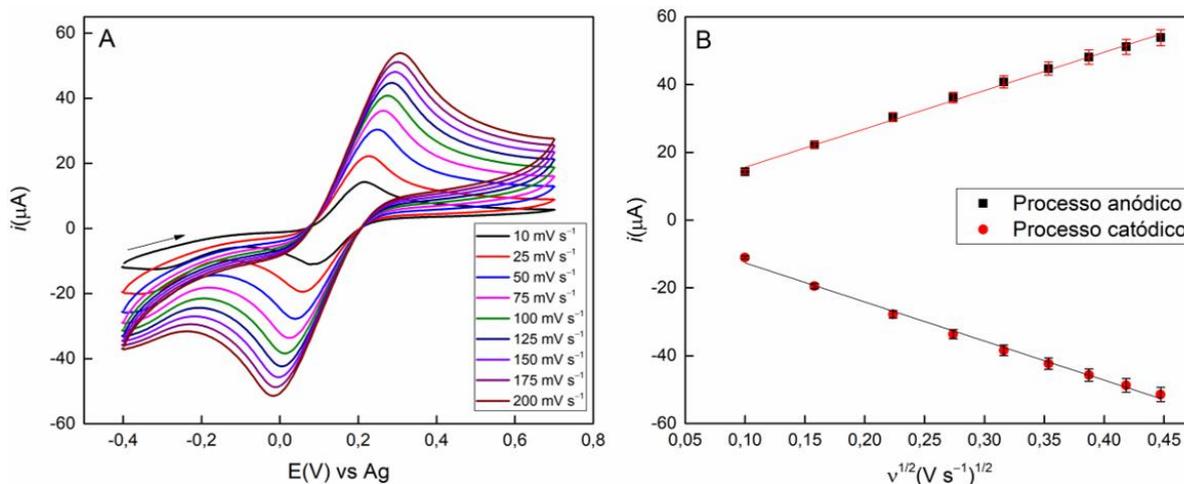


Figura 37. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes v . (B) Dispersão de pontos da relação i vs. $v^{1/2}$

7.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE Pd/CB-PVA

O estudo de propriedades da superfície do material empregado para a eletroanalítica é de suma importância, uma vez que estruturas de partículas e cargas de superfície podem ser determinantes quando se busca uma aplicação específica para tal material. Além disso, com a modificação por deposição de Pd na superfície de CB-PVA, microscopias são essenciais para uma melhor discussão, aproximando as estruturas observadas com os dados eletroquímicos. Deste modo, dois procedimentos de caracterização foram executados: MEV e análise de ângulo de contato com a superfície do eletrodo. Como observa-se na Figura 38A e B, a tinta contendo CB possui uma superfície rugosa, de aspecto carbonáceo, remetendo a uma boa dispersão do nanomaterial no veículo de PVA. Com a eletrodeposição de Pd (Figura 38C e D), não se nota alteração na estrutura geral, com exceção da adição de esferas do metal, distribuídas por toda a superfície. Estas esferas aparentam ter tamanho uniforme (aproximadamente 100 nm), com poucas aglomerações maiores, além de estarem distribuídas aleatoriamente, em sua maioria.

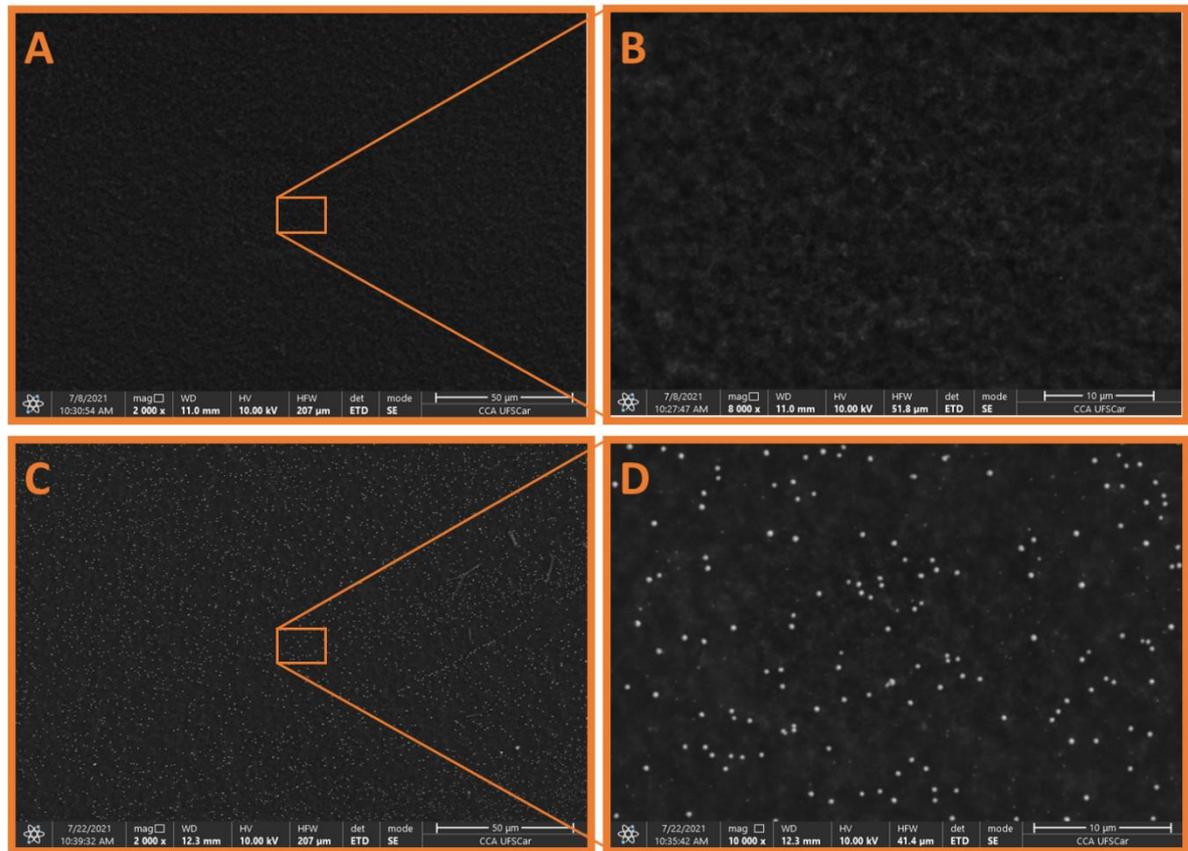


Figura 38. Imagem de MEV de CB-PVA (A e B) e Pd/CB-PVA (C e D), em aumento de 2.000× (A e C) e 10.000× (B e D)

Uma interessante técnica para a avaliação de propriedades de superfície é a investigação do ângulo de contato de uma gota de água com o material de interesse. Como pode ser visto na Figura 39, o contato da água com o CB-PVA resulta num ângulo de 80° , enquanto que após a adição de partículas de Pd, o mesmo muda para 65° . Essa alteração pode ser explicada pela adição de momentos de carga (partículas metálicas) diferentes da tinta condutora, aumentando-se a interação do material com a água. Quanto maior o ângulo de contato, maiores as forças de coesão em comparação com as de adesão, de modo que a água tenda a interagir mais com ela própria. Deste modo, pode ser esperado uma melhor interação dos eletrodos modificados com amostras de base aquosa, especialmente considerando processos difusionais e/ou envolvendo eletrostática de superfície.

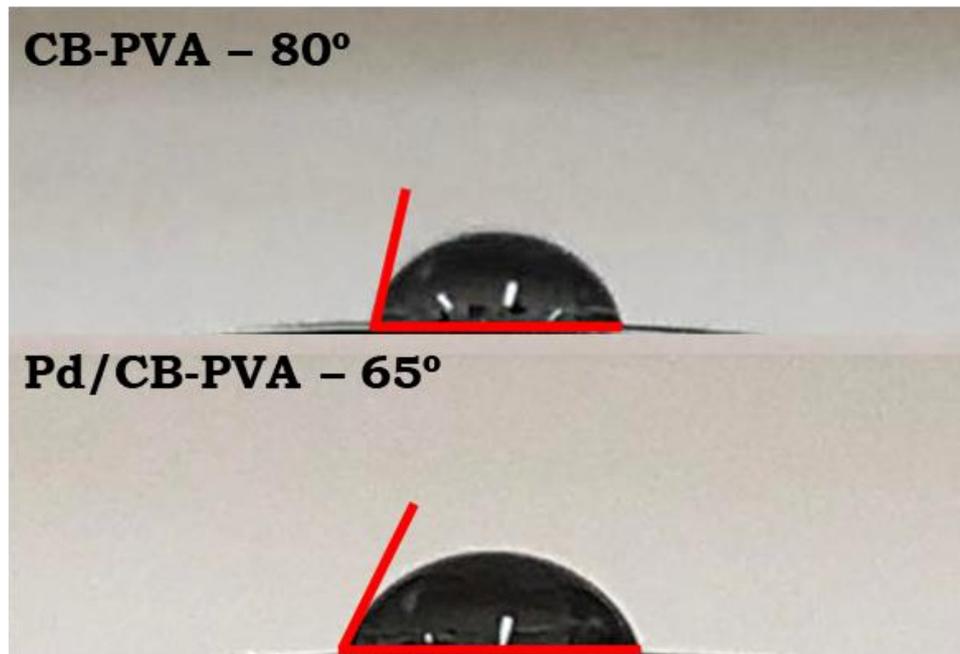


Figura 39. Fotografia de 10 μL de água sobre a superfície do eletrodo de trabalho de CB-PVA (superior) e Pd/CB-PVA (inferior)

7.4. DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE EP

Como discutido anteriormente, a EP é um hormônio de interesse analítico pela sua influência em neurônios, com sua baixa produção levando a doenças neurodegenerativas durante o avanço da doença de Parkinson [185]. Deste modo, a investigação da variação de sua concentração por processos eletroanalíticos é vantajosa, promovendo um rápido diagnóstico. Voltametrias cíclicas foram realizadas com CB-PVA e Pd/CB-PVA, em presença de EP 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 6,5) e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, com os gráficos resultantes apresentados na Figura 40. Ambos os eletrodos apresentam um pico anódico e irreversível (Figura 41, onde ocorre a perda de dois prótons e elétrons, produzindo uma quinona) para o sistema, em $\sim 800 \text{ mV}$, com o eletrodo com nanopartículas apresentando um ganho em magnitude de corrente de $\sim 25\%$.

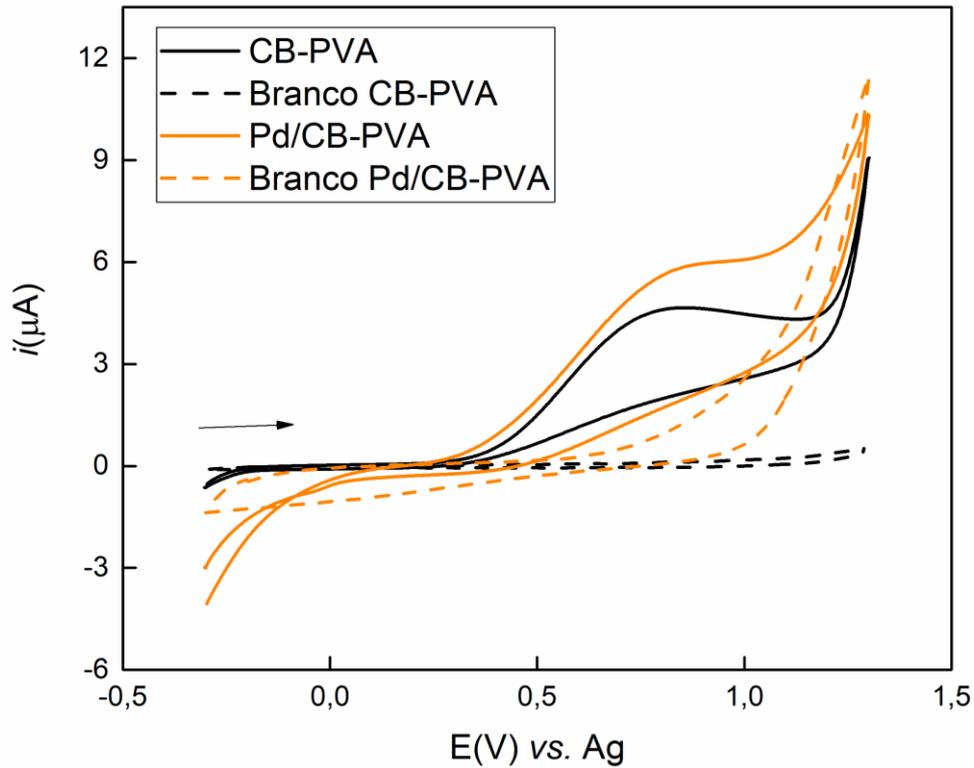


Figura 40. Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA (**laranja**) e CB-PVA (**preto**) em ausência (linha pontilhada) e presença (linha contínua) de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de EP, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5); $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

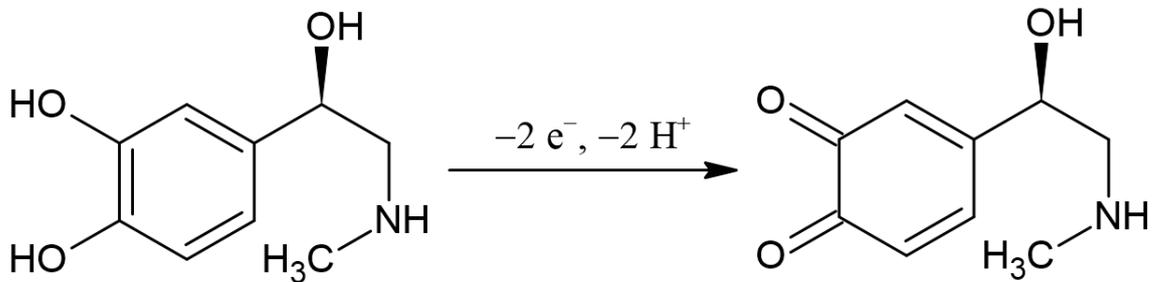


Figura 41. Processo de oxidação da epinefrina

Além disso, ao se variar a ν (valores estudados: 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mV s^{-1}) para ambos estes sistemas, obtém-se uma interessante discrepância, visível na Figura 42: A corrente de pico obtida com CB-PVA não aumenta com o incremento da ν , até a de 200 mV s^{-1} , que apresenta um considerável salto de magnitude (Figura 42A). Em contrapartida, a resposta obtida por Pd/CB-PVA é de comportamento linear em relação a i vs. ν (Figura 42B), de modo que estes dados puderam ser utilizados na equação de Laviron, como discutida por Freitas *et al.* [264], resultando numa constante de transferência heterogênea de elétrons de $0,0122 \text{ s}^{-1}$. Esta constante cinética está associada à eficiência da reação de oxidação direta da

molécula na superfície do dispositivo enquanto influenciada por efeitos de lentidão, como interação entre cargas iguais ou eficiência de transporte eletrônico. Estes dados também sugerem uma influência benéfica das nanopartículas de Pd sobre o eletrodo para o decorrer deste trabalho, embora apontem que v baixas sejam mais benéficas para a reação.

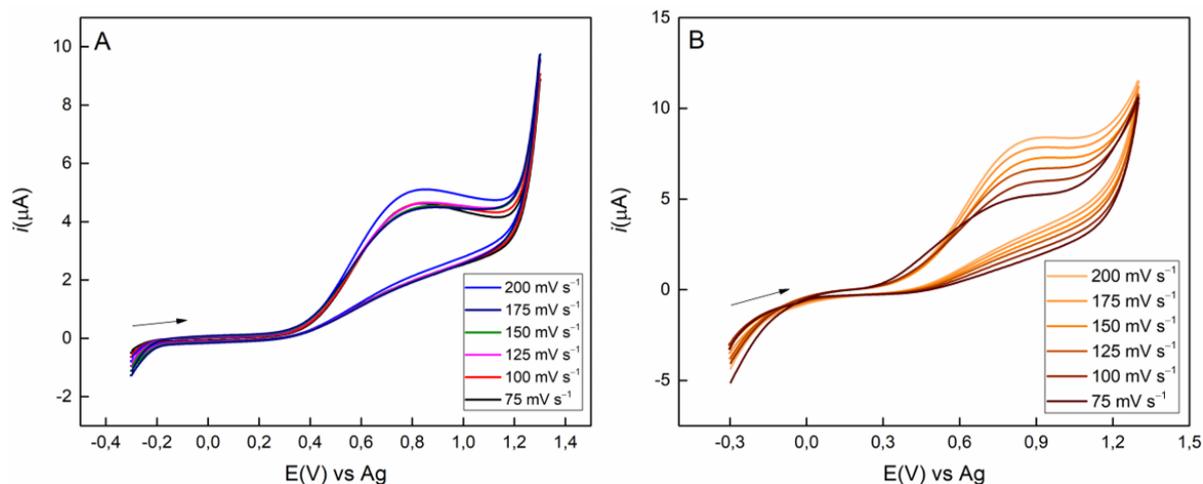


Figura 42. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA em presença de EP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5), em diferentes v . (B) Voltamogramas cíclicos obtidos por Pd/CB-PVA em presença de EP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5), em diferentes v

Confirmando-se a detecção de EP pelo dispositivo, é interessante o uso de técnicas voltamétricas pulsadas, uma vez que estas se mostram mais sensíveis para aplicações deste tipo. Em decorrência da irreversibilidade do sistema, além de que os dados até então sugerem que velocidade de reação é um ponto chave do processo, os autores optaram pelo uso da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). Araújo *et al.* [140] apresenta dispositivos similares, que também se empenharam na otimização desta técnica e, com base neste trabalho, os seguintes parâmetros foram selecionados para a construção da curva de calibração: $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$, tempo de modulação de pulso (tm) = 50 ms e pH = 6,5. Tal curva (Figura 43) representa um comportamento linear do sistema entre $0,75$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, correspondendo a equação linear $i (\mu\text{A}) = 0,00548 \times C_{\text{EP}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 1,19 \times 10^{-8}$, com $r^2 = 0,9990$, LOD = $0,051 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação (LOQ) = $0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$, calculados por $(n \times \text{desvio de } 10 \text{ brancos})/\text{coeficiente angular da curva analítica}$, onde n é 3 para o LOD e 10 para o LOQ.

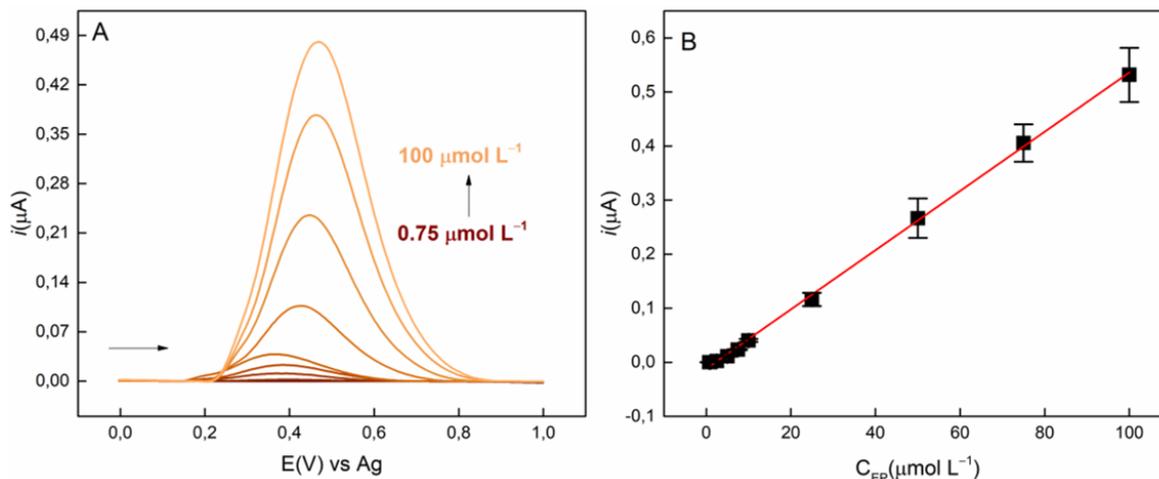


Figura 43. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos por Pd/CB-PVA, em ausência (preto) e presença (tons de laranja) de diferentes concentrações de EP, em PBS 0,1 ml L⁻¹ (pH 6,5); $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 25 \text{ mV}$, $tm = 50 \text{ ms}$ (B) Dispersão de pontos da relação i vs. C_{EP}

Em ordem de se avaliar o dispositivo em situações mais próximas às reais, o mesmo foi utilizado na investigação da variação de concentração de EP em amostras de líquido cerebrospinal sintéticas, através de adição e recuperação, com os valores obtidos apresentados na Tabela 11, que variam entre 91,0 e 115%.

Tabela 11. Determinação de EP em amostras de líquido cerebrospinal sintético

Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
A	2,50	2,27 ($\pm 0,02764$)	91,0 ($\pm 1,112$)
B	5,00	5,17 ($\pm 0,09141$)	103 ($\pm 1,830$)
C	7,50	8,63 ($\pm 0,2187$)	115 ($\pm 2,916$)
D	50,0	51,9 ($\pm 0,3342$)	104 ($\pm 0,6685$)

O presente dispositivo foi comparado com outros artigos da literatura em relação à determinação de EP, buscando-se o enquadramento e relevância do trabalho no meio. A seleção de artigos buscou especialmente os trabalhos que envolveram tintas para eletrodos descartáveis, bem como o uso de nanopartículas de carbono e/ou metálicas. Como pode ser observado na Tabela 12, o presente trabalho apresenta similaridades em termos de faixa linear e LOD com

estes trabalhos já publicados, especialmente próximo aos trabalhos de Mattioli *et al.* [265] e Salimi *et al.* [266], que também se tratam de eletrodos serigrafados, com tintas condutoras de carbono e modificados com partículas metálicas. A tinta condutora deste primeiro trabalho se trata, inclusive, de uma tinta *lab-made*, como a discutida neste documento. Destaca-se, ainda, que não foram encontradas tintas similares contendo CB, nem com menores quantidades de material de carbono, sem a adição de um solvente próprio.

Tabela 12. Comparação com outros sensores já publicados para a detecção de EP

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
MNP-SPE	0,10 a 0,80	0,0249	[265]
CHMNP-SPE	0,10 a 0,60	0,0135	[265]
GP-NP/PET	5,0 a 100	0,310	[140]
CNF-SPE	1,0 a 60	1,10	[267]
SPE Modificado	0,5 a 40	0,0300	[266]
Pd/CB-PVA	0,75 a 100	0,0510	Este trabalho

MNP-SPE: Eletrodo serigrafado de grafite e poliuretana modificado com nanopartículas magnéticas de magnetita; **CHMNP-SPE:** Eletrodo serigrafado de grafite e poliuretana modificado com nanopartículas magnéticas de magnetita recobertas por quitosana; **GP-NP/PET:** Eletrodo serigrafado obtido pela deposição de tinta de grafite e esmalte para unhas; **CNF-SPE:** Eletrodos serigrafados modificados com nanofibras de carbono; **SPE Modificado:** Eletrodos serigrafados obtidos com uma fina camada de óxido de irídio

7.5. DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE α -SINUCLEÍNA A PARTIR DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO

A α syn é uma proteína que, assim como a EP, está relacionada diretamente ao mecanismo principal da doença de Parkinson, devido a séria interferência causada pelas superestruturas originadas do acúmulo da mesma, como os corpos de Lewy. Portanto, a avaliação de alterações de sua concentração no sistema também é de suma importância. Como descrito na introdução, imunossensores eletroquímicos são dispositivos que se baseiam na alteração controlada de propriedades elétricas e/ou eletroquímicas do sistema, como resistências, capacitâncias e/ou impedâncias, com o desenvolver da interação antígeno-

anticorpo. Logo, estes podem ser excelentes candidatos para a determinação de αsyn . No entanto, para que seja possível imobilizar o anticorpo da proteína ($A\alpha\text{syn}$) na superfície do eletrodo de trabalho, modificações desta precisam ser feitas. A literatura apresenta algumas arquiteturas de biossensores viáveis [268, 269] para este intento. Destas, a que envolve Cys e Ga foi escolhida, visando uma interação entre Cys-Ga e Pd similar as que o par de moléculas tem com Au.

O procedimento de modificação foi desenvolvido como descrito na seção 6.4. e VCs e EIEs foram executadas, a fim de se entender o comportamento do sistema com as várias alterações. Os experimentos foram realizados em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com os seguintes parâmetros: $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ para VC e potencial aplicado correspondendo ao $E_{1/2}$ de cada processo para a EIE. As Figura 44A e B apresentam estes dados, de modo complementar.

A adição de Pd à superfície diminui consideravelmente a impedância do sistema, aumentando a corrente elétrica obtida. Já na adição de Cys, Ga e $A\alpha\text{syn}$, ocorre um esperado aumento da impedância, uma vez que nenhuma dessas estruturas apresenta boa condução elétrica, intensificando a resistência e o acúmulo de carga nesta fase. O aumento de corrente elétrica com a adição de $A\alpha\text{syn}$ pode estar relacionado a estruturação das camadas expondo regiões mais interativas da proteína e, especialmente, das nanopartículas metálicas.

A adição de BSA é essencial para este processo, uma vez que ela se liga à grupos ligantes do anticorpo que não são específicos. Neste momento, é comum partir do suposto de que por se tratar de uma molécula extensa e não condutora, sua adição ao sistema provocará aumento da resistência de transferência eletrônica da fase [270]. No entanto, nota-se considerável diminuição da impedância e conseqüente incremento da corrente obtida. Apesar de ser um comportamento incomum, a literatura apresenta algumas possibilidades para este efeito: o trabalho de Ozoemena *et al.* [271] investigou o efeito da adição de BSA à uma superfície polimérica e outra com nanopartículas metálicas. Nestas análises, os autores observam que a interação entre ftalocianina de Fe e BSA pode provocar um efeito catalítico na atividade redox da sonda, incrementando a cinética de transferência de carga. Os autores também fazem um interessante levantamento da literatura, em que destacam que este comportamento tende a acontecer entre BSA e materiais com tendências catalíticas, especialmente aqueles que possuem metais de transição, espécies aromáticas e/ou porosos.

De um modo geral, os autores atribuem este efeito catalítico pela facilidade de adsorção de BSA à superfície do material, alterando a distribuição de carga e energia livre do

sistema facilitando a transferência de elétrons. Além disso, Munõz e Pumera [272] atribuíram este efeito à mudança de molhabilidade da superfície após a modificação com BSA, incrementando a corrente gerada pelo maior momento de interação entre a solução e o eletrodo. Ambos trabalhos sugerem mecanismos que podem justificar a diminuição da impedância do sistema observada nesta etapa, uma vez que todas as condições atribuídas por estes autores estão presentes neste trabalho.

Com a adição do antígeno alvo, α syn, é esperada uma interação seletiva com os grupos específicos do anticorpo, de modo que toda a passagem de corrente pelo corpo da modificação seja severamente impactada. Portanto, como esperado, observa-se um considerável incremento da impedância deste sistema. O circuito que melhor representa o sistema discutido, em todas as etapas, é uma modificação do circuito de Randles, para comportar o termo de difusão semi-infinita de Warburg (W), $[R([RW]Q)]$. Estes dados sugerem que a imobilização do anticorpo sobre a superfície do dispositivo descartável foi eficiente, uma vez que houve considerável aumento da resistência de transferência de carga em presença do antígeno, indicando interação entre o par imuno.

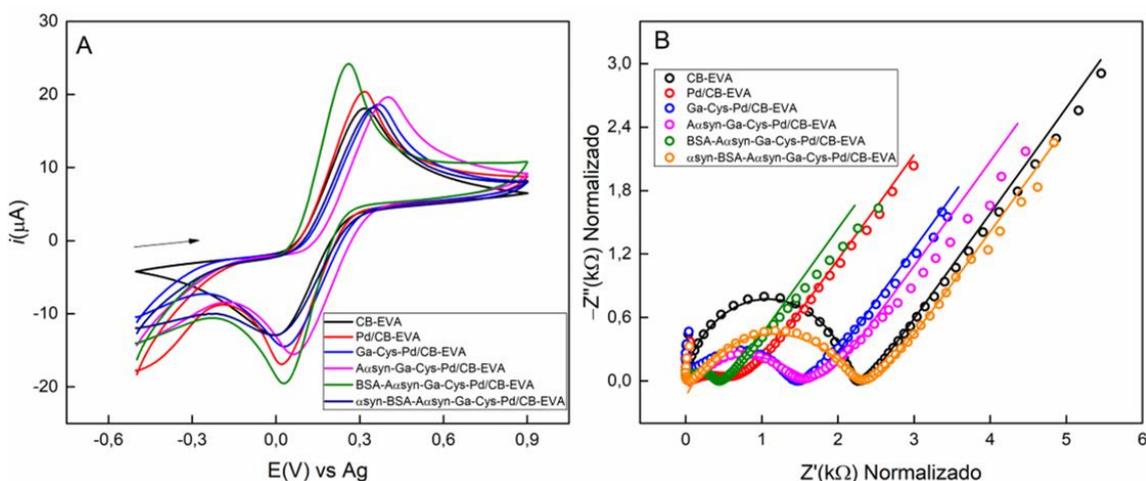


Figura 44. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por diferentes modificações de CB-PVA, em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Diagramas de Nyquist obtidos por diferentes modificações de CB-PVA, em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E_{1/2}$ de cada VC foi aplicado para a respectiva etapa, dados apresentados estão normalizados em ambos os eixos

Para avaliar a eficiência do imunossensor em quantificar o antígeno de interesse, duas curvas de calibração foram obtidas. A primeira, foi desenvolvida com as biomoléculas dispersadas em meio de PB $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 7,4), buscando-se o comportamento do

dispositivo num procedimento mais generalizado. Para tanto, EIEs foram realizadas como anteriormente, com aplicação de potencial de 200 mV, correspondendo ao $E_{1/2}$ do eletrodo em adição de αsyn . Observou-se um comportamento linear (Figura 45) envolvendo o incremento da resistência de transferência de carga (R_{CT}) com o aumento da concentração de αsyn , numa faixa de concentração de 1,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, representada pela equação $R_p(\Omega) = 3,08 \times 10^7 \times C_{\alpha\text{syn}} (\text{g mL}^{-1}) + 415$, com $r^2 = 0,9841$, LOD = 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOQ = 0,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, calculados por $(n \times \text{desvio de 10 brancos})/\text{coeficiente angular da curva analítica}$, onde n é 3 para o LOD e 10 para o LOQ.

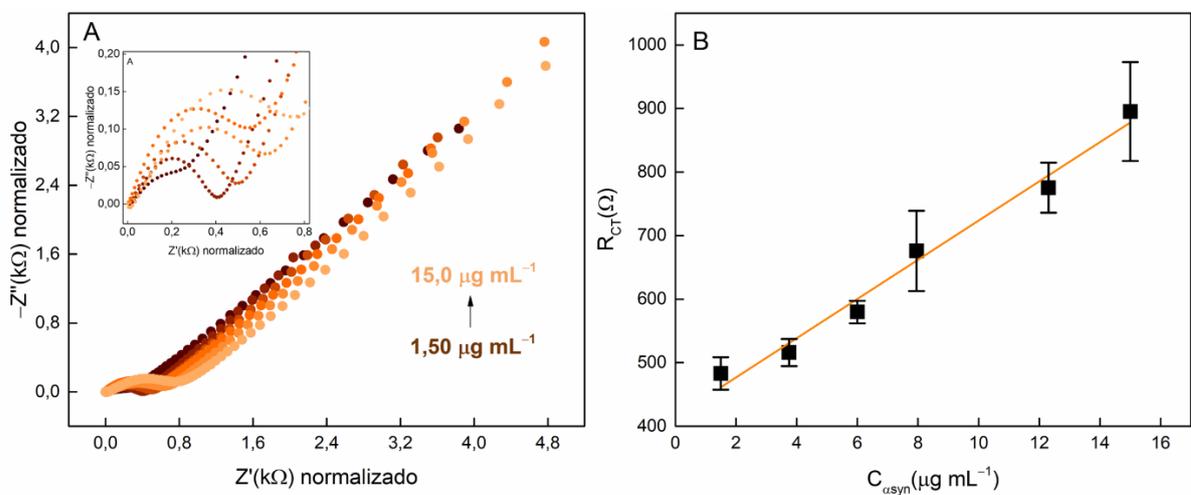


Figura 45. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por $\alpha\text{syn}/\text{BSA}/\text{A}\alpha\text{syn}/\text{Ga-Cys}/\text{Pd}/\text{CB-PVA}$ modificado com diferentes concentrações de αsyn (1,50 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L^{-1} , em KCl 0,1 mol L^{-1} ; $E = 200 \text{ mV}$. (B) Dispersão de pontos da relação R_{CT} vs. $C_{\alpha\text{syn}}$

A segunda abordagem foi executada visando uma aplicação mais próxima do real com o dispositivo. Portanto, um meio complexo, soro de sangue humano, foi escolhido como amostra para esta etapa e funcionou como meio dispersante para $\text{A}\alpha\text{syn}$ e αsyn . A curva de calibração foi construída com diferentes concentrações de αsyn adicionadas a esta dispersão. O dispositivo mostrou resposta linear para a relação R_{CT} vs. $C_{\alpha\text{syn}}$ entre 6,0 e 100,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com o comportamento descrito pela equação $R_{CT} (\text{k}\Omega) = 0,00649 \times C_{\alpha\text{syn}} (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0,514$, com $r^2 = 0,9879$, LOD = 1,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOQ = 4,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$, calculados como anteriormente. Todos os dados estão presentes na Figura 46.

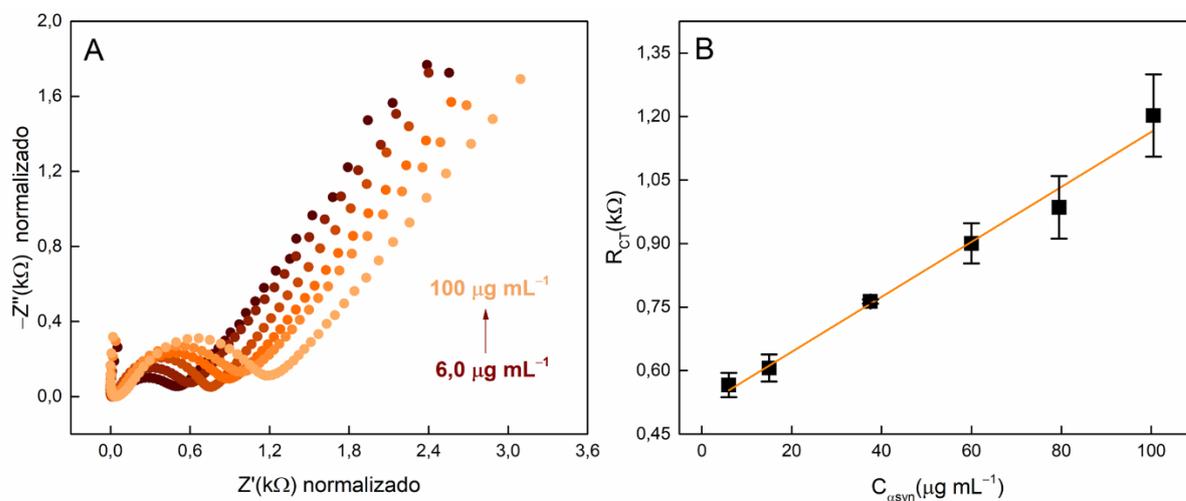


Figura 46. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por $\alpha\text{syn}/\text{BSA}/\text{A}\alpha\text{syn}/\text{Ga-Cys}/\text{Pd}/\text{CB-PVA}$ modificado com diferentes concentrações de αsyn ($6,00$ a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), em presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E = 200 \text{ mV}$. (B) Dispersão de pontos da relação R_{CT} vs. $C_{\alpha\text{syn}}$

8. CONCLUSÃO

Uma nova tinta condutora, de fácil e rápido preparo, foi desenvolvida com CB e PVA para funcionar como substrato das modificações posteriores. A tinta em si apresenta ótimo perfil eletroquímico em presença de ferrocenometanol, indicando, possivelmente, que a estrutura do CB fornece relativa alta carga negativa para a superfície de trabalho, facilitando a interação com esta sonda. Após, optou-se pela eletrodeposição de nanopartículas de Pd sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Através de buscas na literatura e um arranjo de composto central, os parâmetros dados como ótimo para esta deposição por cronoamperometria são $E = -700 \text{ mV}$, $t = 60 \text{ s}$ e $C_{\text{Pd}} = 0,34 \text{ mmol L}^{-1}$, uma vez que, nestas configurações, as estruturas de Pd não afetaram o acúmulo de carga na superfície do dispositivo, enquanto auxiliaram-no em sua condução e propriedades cinéticas, na detecção de EP. Para a determinação deste neurotransmissor, uma curva de calibração foi obtida por VPD, com comportamento linear entre as concentrações de $0,750$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, cuja equação linear é descrita por $i (\mu\text{A}) = 0,00548 \times C_{\text{EP}}(\mu\text{mol L}^{-1}) - 1,19 \times 10^{-8}$, com $r^2 = 0,9990$, $\text{LOD} = 0,051 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$. Amostras de líquido cerebrospinal sintéticas foram reforçadas com concentrações conhecidas de EP, e o dispositivo proposto apresentou recuperações entre $91,0$ e 115% para estas análises. Estes dispositivos foram subsequentemente modificados, em ordem de imobilizarem o par $\text{A}\alpha\text{syn}-\alpha\text{syn}$, e, pela técnica de EIE, duas curvas de calibração foram

desenvolvidas: a primeira, com a imobilização ocorrendo em PB $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,4, resultando num comportamento linear equivalente a expressão $R_{CT} (\Omega) = 3,08 \times 10^7 \times C_{\alpha_{syn}} (\text{g mL}^{-1}) + 415$, com $r^2 = 0,9841$, para a faixa de $1,5$ a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, com $\text{LOD} = 0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 0,42 \mu\text{g mL}^{-1}$; e a segunda, obtida pela imobilização em amostras diluídas de soro de sangue humano, buscando uma resposta mais próxima à uma aplicação real. Esta curva de calibração foi obtida entre as concentrações de $6,0$ a $100,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e corresponde a expressão linear $R_p (\text{k}\Omega) = 0,00649 \times C_{\alpha_{syn}} (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0,514$, com $r^2 = 0,9879$, com $\text{LOD} = 1,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 4,37 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com todos estes dados, estima-se que tanto a plataforma proposta, como suas modificações para sensores e biossensores sejam de considerável interesse para a literatura, considerando que se tratam de dispositivos descartáveis, de relativo baixo custo, enquanto facilmente produzidos e operados.

*Você falhou, principalmente. Esta é a vida.
Quanto mais você vive, mais você falha. O
fracasso é a marca de uma vida bem vivida.*

Brandon Sanderson, Julgamentadora

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DO BIOMARCADOR DE PARKINSON COM UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO APRIMORADO POR MICROFLORES DE Au USANDO CAPACITÂNCIA ELETROQUÍMICA NÃO FARADAICA

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do grupo Merck (Sigma Aldrich) e/ou Fluka, em grau analítico. Água ultrapura (Millipore™ Synergy®), com resistividade $>18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi utilizada para preparar todas as soluções. Para análise eletroquímica foram utilizadas soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e PB (pH 7,4), H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e PBS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,4), foram utilizados em diferentes análises como eletrólito de suporte. Uma solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de hexamin rutênio foi utilizada como sonda eletroquímica para a caracterização eletroquímica do dispositivo.

9.2. EQUIPAMENTOS

As análises eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm, gerenciado pelo *software* Nova 2.1.5, no qual o sistema de três eletrodos foi composto por eletrodos de Ag como *pseudo*-referência e a tinta desenvolvida, CB-PVA, como eletrodos de trabalho e auxiliar. Também foram utilizadas diferentes modificações do eletrodo de trabalho, incorporando nanopartículas metálicas e biomoléculas. As análises de EIE foram obtidas com os seguintes parâmetros experimentais: amplitude de 10 mV, ondas senoidais ao longo de toda a análise e com 10 incrementos de frequência por década, na faixa de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^{-2}$ Hz. Algumas análises de EIE tiveram os eixos normalizados, para melhor visualizar seu comportamento. O potencial utilizado foi de 0,4 V, pois não foi encontrado nenhum processo faradaico nesta região. Um medidor de pH 827 (Metrohm) foi utilizado para todas as determinações de pH. Uma centrífuga dupla assimétrica (SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K, FlackTec Inc) foi usada para preparar as tintas condutoras a 3000 rpm por 1 min. As máscaras confeccionadas em papel adesivo (Colacril), aplicadas para produção de eletrodos descartáveis, foram desenvolvidas utilizando o *software* Silhouette Studio, sendo usada a impressora de corte Silhouette Cameo 3 para produzi-las. As imagens de MEV foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura ThermoFisher Scientific

Prisma E, com tensão de aceleração de 10kV e modo de baixo vácuo de 50 Pa. As Figuras e modelos tridimensionais foram feitos com o *software* Blender 4.2.

9.3. PREPARO DOS DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS

Os eletrodos descartáveis foram confeccionados com tinta condutora, preparada como detalhado na seção 6.2. Também como descrito anteriormente, com o auxílio de máscaras vazadas de papel adesivo produzidas por uma impressora de corte, a tinta foi espalhada sobre um substrato de PET. Deixado secar, em temperatura ambiente, por 40 minutos, utilizou-se esmalte incolor para delimitar a área do eletrodo e aplicou-se tinta Ag sobre o eletrodo de referência. O eletrodo foi denominado CB-PVA e a Figura 47I-III ilustra seu processo de produção.

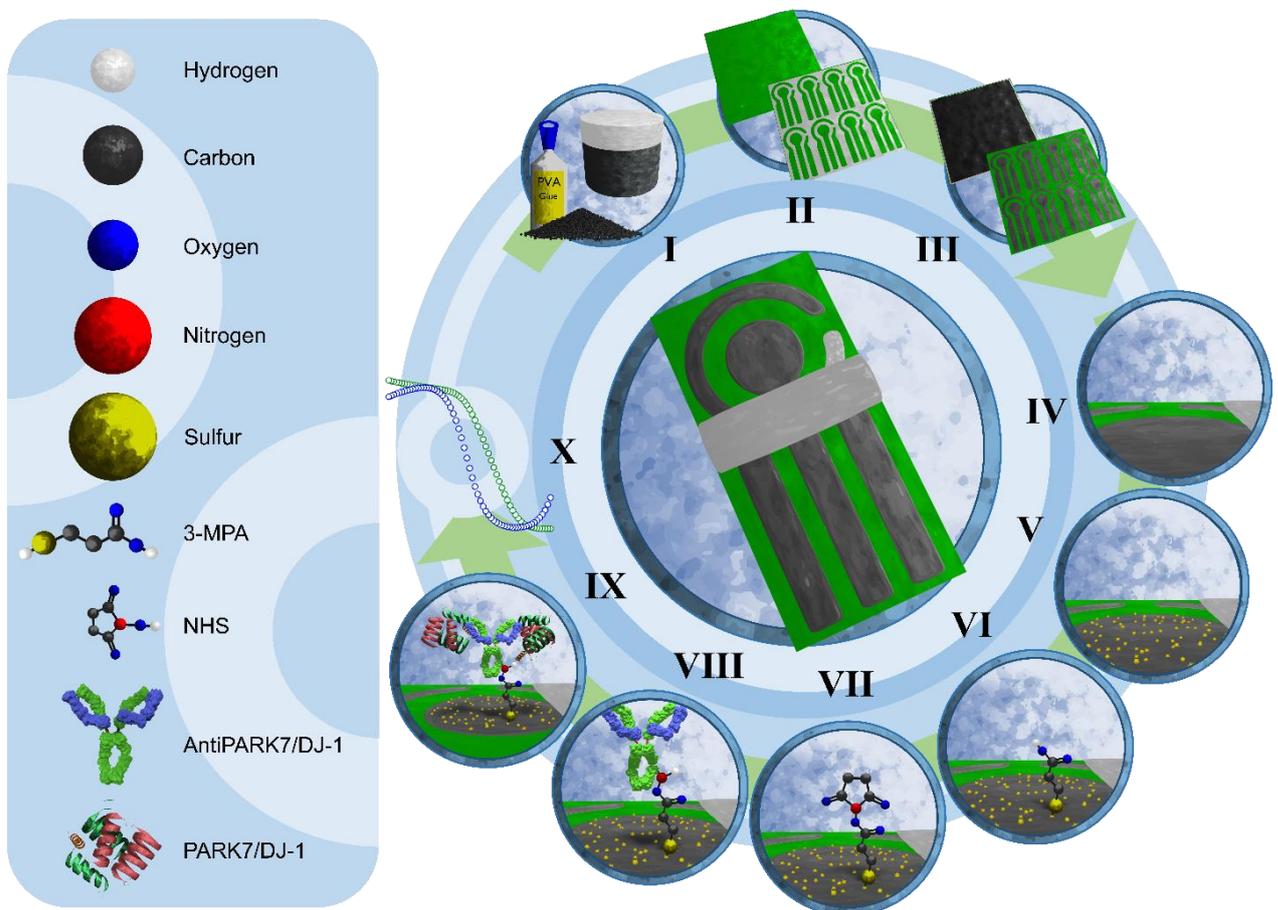


Figura 47. Preparação do imunossensor eletroquímico: (I) cola de PVA e CB são misturadas para obter a tinta condutora; (II) sobre substrato PET limpo são adicionadas as máscaras e (III) espalhada a tinta. Após a retirada das máscaras, o aparelho é modificado: sobre sua (IV) superfície, (V) microfiores de Au são formadas por eletrodeposição. (VI) 3-MPA liga-se ao Au através da interação enxofre-metal, permitindo que (VII) EDC e NHS sejam adicionados, (VIII) a proteína AntiPARK7/DJ-1 seja ligada e (IX) a proteína PARK7/DJ-1 seja ligada, permitindo a detecção do alvo.

reticulando e preparando a superfície para o (VIII) antígeno e o bloqueador de superfície BSA. Com a inclusão de (IX) PARK7/DJ-1 a (X) variação da capacitância do sistema pode ser obtida.

Fonte: Elaboração própria

9.4. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE

A eletrodeposição das microfiores de Au foi realizada pela técnica de cronoamperometria, com potencial fixo de -600 mV (*vs. pseudo-referência* de Ag), aplicado por 30 s, e solução de HAuCl_4 com concentração igual a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 47IV-V). Esses valores estão de acordo com a literatura para sistemas similares [273]. Depois disso, o eletrodo foi modificado para promover ligações covalentes com o anticorpo Anti-PARK7/DJ-1. Primeiramente, $8,0 \mu\text{L}$ de solução de ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) foram gotejados no eletrodo de trabalho por um certo tempo (Figura 47VI, concentração e otimização de tempo discutidas na seção 10.2). Após esta e a cada etapa seguinte, o eletrodo foi lavado com PBS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,4), com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, $8,0 \mu\text{L}$ de solução de 1-etil-3-carbodiimida (EDC, $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e N-hidroxisuccinimida (NHS, $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram gotejados no mesmo eletrodo, esperando-se por 1,0 h para prosseguimento da modificação (Figura 47VII). Posteriormente, o mesmo processo foi realizado para imobilizar o anticorpo na superfície de trabalho, com $8,0 \mu\text{L}$ de uma solução de AntiPARK7/DJ-1 (Figura 47VIII, otimização de concentração e tempo discutida na seção 10.2). A concentração e o tempo de interação do 3-MPA e do anticorpo AntiPARK7/DJ-1 foram investigados por Planejamento de Experimentos, com um desenho composto central. Após a formação da monocamada de anticorpos, $8,0 \mu\text{L}$ de uma solução de BSA a 0,1%, foram lançados sobre o eletrodo de trabalho. A interação foi mantida por 10 minutos, para garantir a eliminação de interações não específicas no local. As análises na presença de PARK7/DJ-1 foram realizadas com soluções de diferentes concentrações, com gotejamento de $8,0 \mu\text{L}$ sobre a superfície modificada pelo anticorpo, por 1,0 h.

Para otimizar a concentração de 3-MPA e o tempo de interação, soluções de diferentes concentrações de 3-MPA (v_1) foram gotejadas no eletrodo de trabalho, na faixa de $0,250$ a $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, com tempos de interação variáveis (v_2): 0,5 a 2 horas. Posteriormente, os dados de capacitância do sistema foram coletados com EIE não faradáica, para criar uma superfície de resposta e gráficos de contorno. A Tabela 13 apresenta a matriz utilizada, bem como os dados obtidos, em μF .

Tabela 13. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos para as adições de 3-MPA

Experimento	M	v1	v2	v1²	v2²	v1v2	Resposta (μF)
1	1	-1	-1	1	1	1	3,40
2	1	1	-1	1	1	-1	5,86
3	1	-1	1	1	1	-1	5,72
4	1	1	1	1	1	1	6,48
5	1	-1,4142	0	2	0	0	3,74
6	1	1,4142	0	2	0	0	3,17
7	1	0	-1,4142	0	2	0	3,44
8	1	0	1,4142	0	2	0	4,68
9	1	0	0	0	0	0	4,05
10	1	0	0	0	0	0	4,05
11	1	0	0	0	0	0	4,05

Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado para otimizar a imobilização do anticorpo AntiPARK7/DJ-1, nos valores de 0,5 e 2,0 mmol L⁻¹ para concentração (v1) e 0,5 e 2,0 h para tempo de interação (v2). A Tabela 14 apresenta os dados obtidos, além da matriz deste desenho experimental.

Tabela 14. Matriz do planejamento de composto central e os respectivos resultados obtidos para as adições de AntiPARK7/DJ-1

Experimento	M	v1	v2	v1²	v2²	v1v2	Resposta (μF)
1	1	-1	-1	1	1	1	0,71
2	1	1	-1	1	1	-1	0,56
3	1	-1	1	1	1	-1	0,71
4	1	1	1	1	1	1	0,60
5	1	-1,4142	0	2	0	0	0,62
6	1	1,4142	0	2	0	0	0,93
7	1	0	-1,4142	0	2	0	0,53
8	1	0	1,4142	0	2	0	0,54
9	1	0	0	0	0	0	0,84
10	1	0	0	0	0	0	0,87
11	1	0	0	0	0	0	0,85

9.5. PREPARO DAS AMOSTRAS

A determinação de PARK7/DJ-1 foi realizada pelo método de adição e recuperação em líquido cefalorraquidiano sintético. Soluções de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,4), com equivalente força iônica) foram utilizadas como eletrólitos de suporte para essas amostras. Os reagentes utilizados podem ser encontrados na Tabela 10.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ELETROQUÍMICA DE Au/CB-PVA

Para compreender a potencialidade das estruturas de Au em modificar a contribuição da capacitância do CB, tais estruturas devem ser adicionadas ao sistema, e o conhecimento das propriedades dessas partículas deve ser obtido. Para tanto, cronoamperometria foi novamente utilizada para a eletrodeposição do metal, com uma solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, contendo 5,0 mmol L⁻¹ de HAuCl₄, com um potencial de -0,6 V, seguindo protocolo já investigado pelo grupo de pesquisa [273]. Para um melhor entendimento desta etapa, buscou-se a caracterização morfológica da mesma, por MEV, apresentada na Figura 48. A Figura 49 mostra que a distribuição do diâmetro das partículas não é homogênea, e a probabilidade maior é encontrar uma partícula de cerca de 882 nm² (24%). No entanto, não há variação entre os dispositivos,

tornando o método reproduzível o suficiente para que todos os dados sejam replicados. Estas flores se apresentam bem distribuídas ao longo de toda a estrutura.

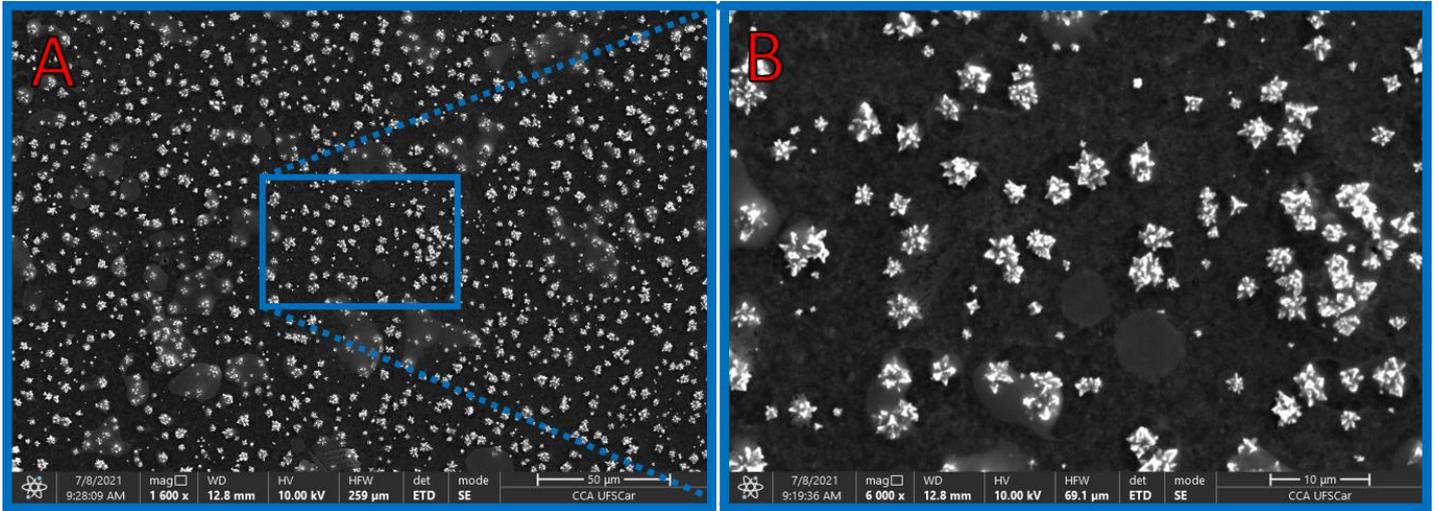


Figura 48. Imagens de MEV de Au/CB-PVA com magnificação de (A) 1600× e (B) 6000×

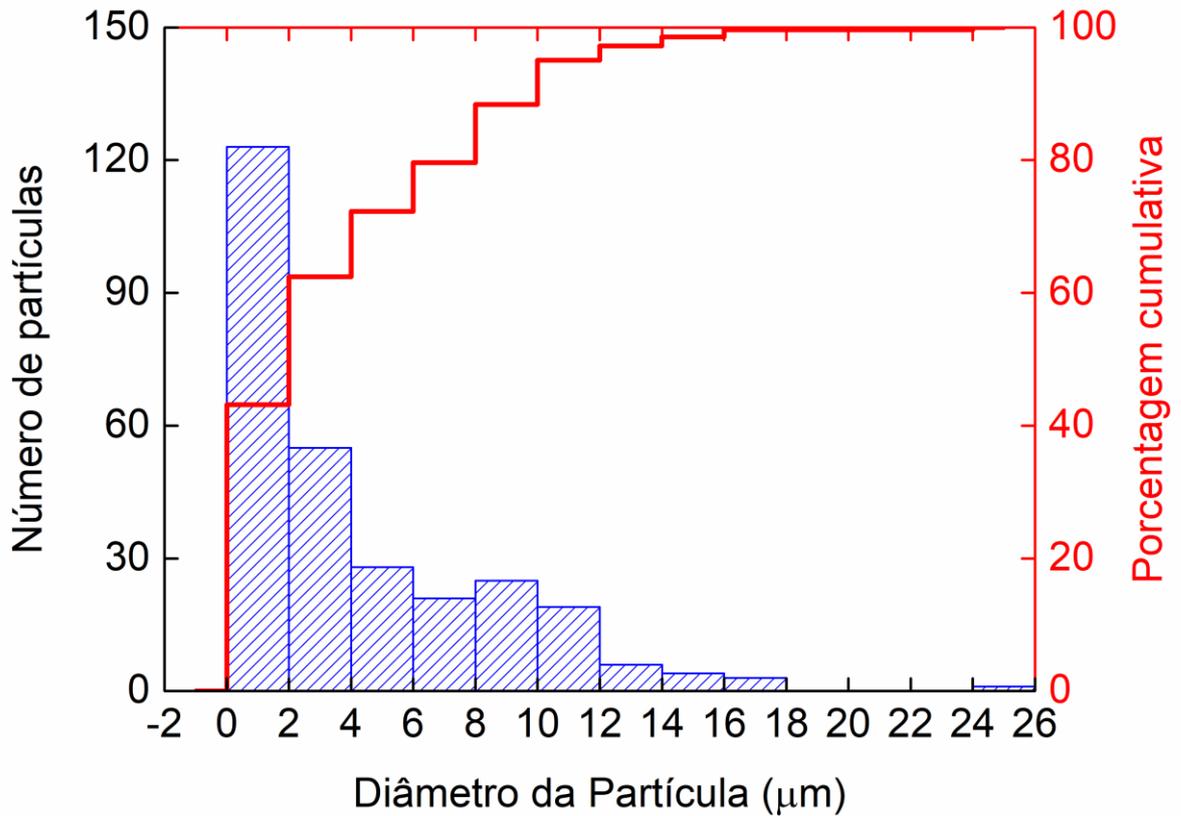


Figura 49. Histograma demonstrando o padrão de distribuição de diâmetro de partícula de Au/CB-PVA

Uma extensa caracterização eletroquímica deste dispositivo simples pode ser lida em no capítulo anterior (II), mas esforços adicionais foram aplicados para melhor compreender os efeitos das microfiores de Au no sistema proposto. Portanto, uma VC foi realizada por CB-PVA modificado com Au na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de hexamin rutênio, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, em $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (Figura 50). O CB-PVA apresentou picos de pares redox em 45 ($5,19 \mu\text{A}$) e -373 mV ($-12,6 \mu\text{A}$), com separação pico a pico (ΔE) de 378 mV e ($i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$) igualando $0,412$. Devido à sua carga superficial altamente negativa, é compreensível que o processo de redução seja mais favorecido pelo dispositivo, pois as espécies mais positivas (Ru^{3+}) são altamente atraídas pela superfície. Como pode ser notado, após a eletrodeposição de Au, o pico de oxidação, de magnitude igual a $8,62 \mu\text{A}$, deslocou-se fortemente para potenciais mais negativos, estando presente em -180 mV . O pico de redução é pouco alterado, perceptível em -361 mV , com uma corrente de pico de $-13,5 \mu\text{A}$. Isto indica uma mudança na reversibilidade do sistema, com 167 mV como ΔE , e um $i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$ de $0,638$. Esses valores indicam que o sistema de eletrodos modificado está mais próximo da *quasi*-reversibilidade e ainda apresenta mais sensibilidade para o processo de redução.

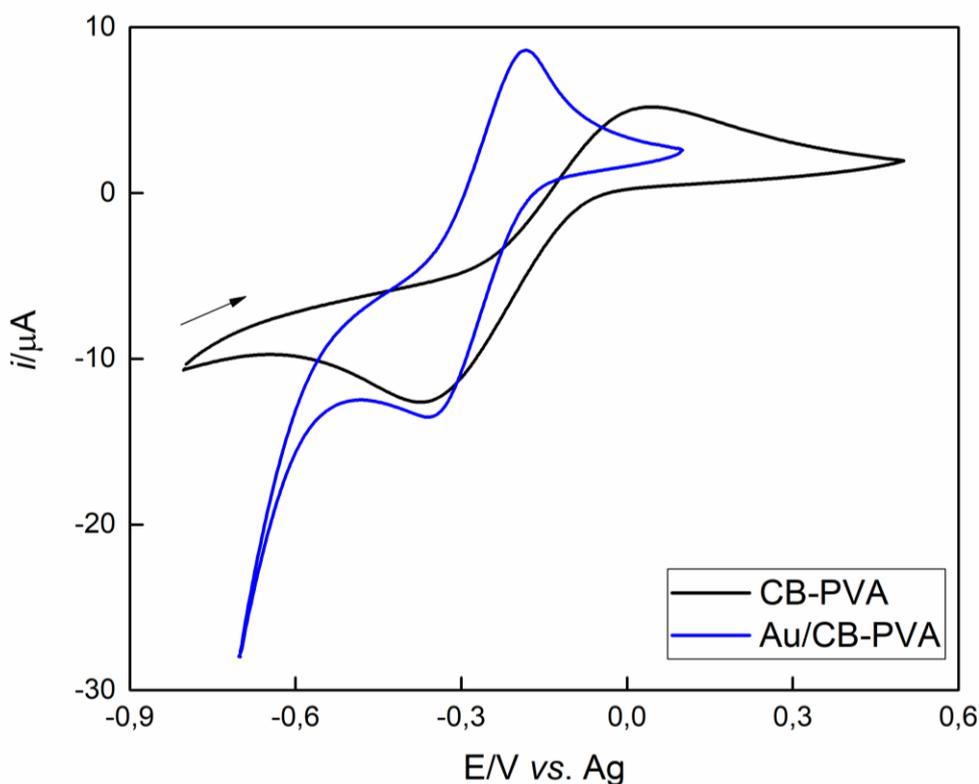


Figura 50. Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA (preto) e Au/CB-PVA (azul), em presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de hexamin rutênio, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

A v foi então variada para avaliar como o sistema Au/CB-PVA responderia. As Figura 51A e B mostram que existe uma correlação linear entre a v e a magnitude da corrente, indicando que, apesar da *quasi*-reversibilidade, a difusão ainda é o efeito de transporte de massa predominante nesta faixa de v , convencionalmente investigada. Ao considerar todas as v e correntes de pico, o ΔE muda para 197 mV, o que significa que a mudança de potencial não é severamente aumentada com a variação de v , mas pode ser o resultado do aumento da predominância de um processo de adsorção. O $i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$ aumenta para 0,883, fortalecendo ainda mais esta hipótese, uma vez que o valor está mais próximo de 1,0, sugerindo que as espécies reduzidas podem interagir mais com o sistema com valores de v mais altos, um comportamento incomum para sistemas totalmente controlados por difusão.

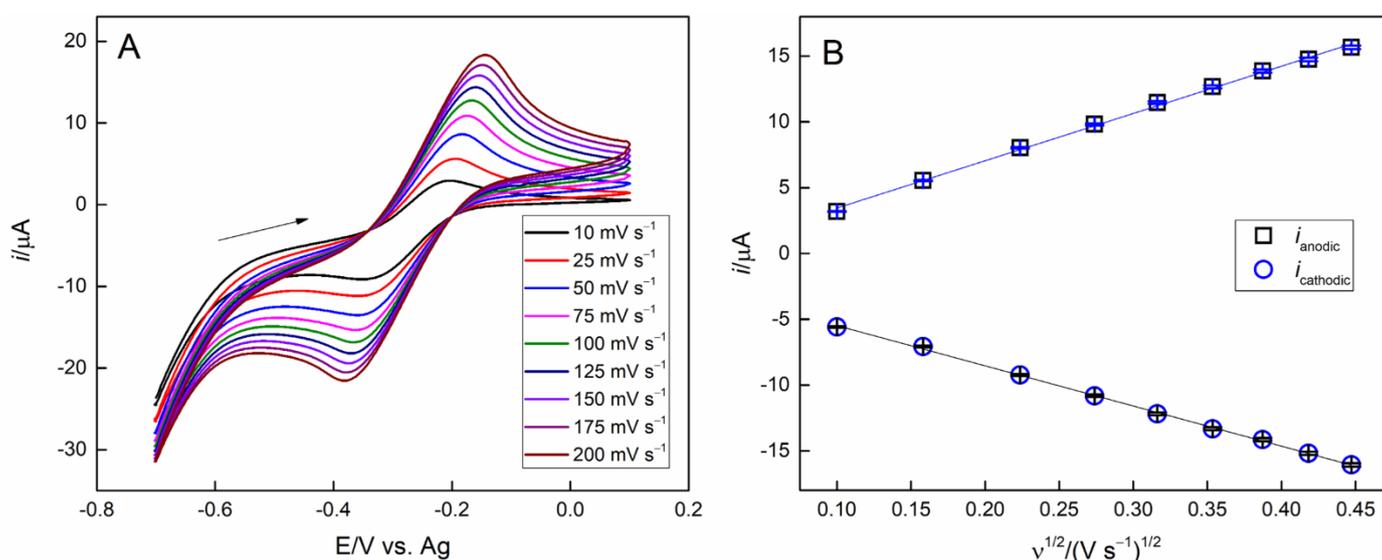


Figura 51. (A) Voltamogramas cíclicos obtido por Au/CB-PVA com v variadas, (B) correlação i vs. $v^{1/2}$

Esses dados foram utilizados para estimar a A do sistema eletroquímico pela equação de Randles-Ševčík (Eq. 16), corrigida para sistemas *quasi*-reversíveis [274]:

$$i = \pm 0.436 n F A C \sqrt{\frac{n F D v}{R T}} \quad \text{Eq. 16}$$

onde v é o número de elétrons da reação eletroquímica, i é a corrente voltamétrica (A), A é a área eletroativa (cm²), C é a concentração da sonda redox (mol mL⁻¹), D é o coeficiente de difusão da sonda neste eletrólito: $9,1 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ [274], v é a velocidade de varredura (V s⁻¹) e F , R e T são as constantes de Faraday, dos gases ideais e a temperatura, respectivamente. O valor encontrado para A é $0,042 (\pm 0,0047)$ cm², o que representa um aumento de 40% quando

comparado à área geométrica (0,033 cm²) do eletrodo de trabalho. Isto provavelmente está associado ao aumento da rugosidade do dispositivo, influenciado tanto por CB quanto pelas microfiores de Au.

10.2. DETECÇÃO DE PARK7/DJ-1 A PARTIR DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO

Imunossensores são dispositivos que se baseiam numa alteração sensível e controlada de algum parâmetro do sistema após a interação espontânea entre um antígeno e um anticorpo pareado. Buscando melhorar o ganho de sinal com o processo de imobilização escolhido, as etapas da construção de camadas automontadas para 3-MPA e Anti-PARK7/DJ-1 foram investigadas com Planejamento de Experimentos (planejamentos de composto central), em relação ao tempo de interação e concentração da molécula.

Comumente vê-se na literatura o uso de EIE para avaliação deste mecanismo, uma vez que se espera que partículas não-condutoras acarretem num aumento significativo da resistência elétrica do sistema. Todavia, o gráfico resultante, os diagramas de Nyquist e/ou Bode, mostram interações para além de apenas a resistência do sistema, compreendendo também as mudanças nas cargas de superfície e capacitância, e até disparidades entre potencial aplicado e corrente gerada, por exemplo [275-277]. Deste modo, em dispositivos com efeitos de carga mais significativos que os de resistência, diagramas de impedância eletroquímica convencionais podem não ser os mais indicados. Para investigar apenas alterações da capacitância do sistema num processo de impedância eletroquímica, pode-se converter os termos de impedância real (resistência, Z') e imaginária (capacitância, $-Z''$) para termos de capacitâncias, imaginária ($-C''$) e real (C'), respectivamente, com as Eq. 17 e 18:

$$Z' = -C''\omega|Z|^2 \quad \text{Eq. 17}$$

$$-Z'' = C'\omega|Z|^2 \quad \text{Eq. 18}$$

onde $|Z|$ é o módulo da impedância total do sistema e ω é a frequência angular, calculada por $2\pi f$ (f = frequência coletada na análise), efetivamente transformando o diagrama de Nyquist em diagrama de Cole-Cole [278-280]. Uma vez que a adição de uma sonda eletroquímica a este sistema pode fornecer alterações da informação de carga do dispositivo, neste trabalho optou-se por trabalhar com EIE não-faradáica, observando-se o comportamento da capacitância da superfície do eletrodo de trabalho, especialmente em relação à dupla camada elétrica e suas alterações devido à interação do par imuno [278-280].

A Figura 52A apresenta os diagramas de Nyquist obtidos com o experimento planejado para a otimização da automontagem de 3-MPA, realizado em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4), com E = 0,4 V, correspondendo a uma região sem processos faradáicos. Os dispositivos foram modificados com 3-MPA numa faixa de concentração de 0,250 a 1,5 mmol L⁻¹ e com tempo de interação variando de 0,5 a 2,0 h (Tabela 13). Como é possível observar, o diagrama de Nyquist não traz muitas informações pertinentes, uma vez que um arco de impedância não é formado. No entanto, após a conversão (Figura 52B), o diagrama de Cole-Cole apresenta um semicírculo de discussão análoga à Nyquist, onde o diâmetro do arco representa a capacitância do sistema. Nota-se, portanto, uma fácil distinção dos dados obtidos. Através dos gráficos de superfície de resposta e contorno (Figura 53), associados à matriz *Capacitância* (μF) = $2.987 + 1.153 \times C_{3\text{-MPA}} (\text{mmol L}^{-1}) + 0,267 \times C_{3\text{-MPA}}^2 (\text{mmol L}^{-1})^2 - 0,227 \times \text{tempo} (\text{h}) + 0,723 \times \text{tempo}^2 (\text{h})^2 - 0,911 \times C_{3\text{-MPA}} (\text{mmol L}^{-1}) \times \text{tempo} (\text{h})$; pode-se inferir que existe uma resposta de efeito linear e quadrático entre concentração de tempo de interação. Escolheu-se como ótimos os valores de 1,5 mmol L⁻¹ e 1,5 h, considerando a maior concentração estudada com um tempo relativamente longo, mas não longo o suficiente para tornar a análise inviável num teste real.

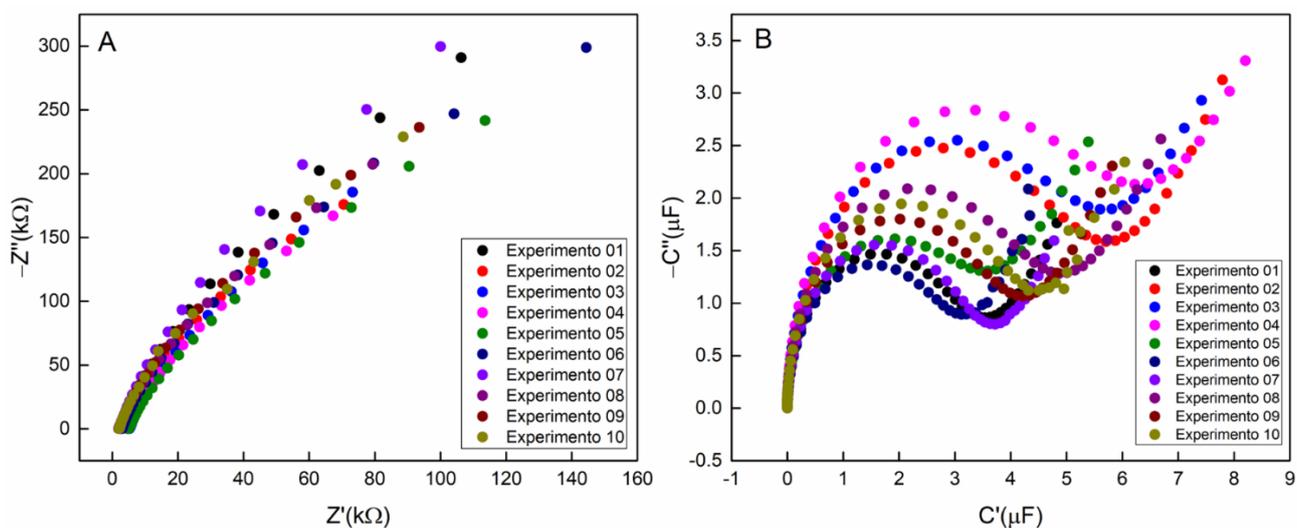


Figura 52. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por várias configurações de 3-MPA/Au/CB-PVA, em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V; (B) Diagramas de Cole-Cole obtidos por várias configurações de 3-MPA/Au/CB-PVA, em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V

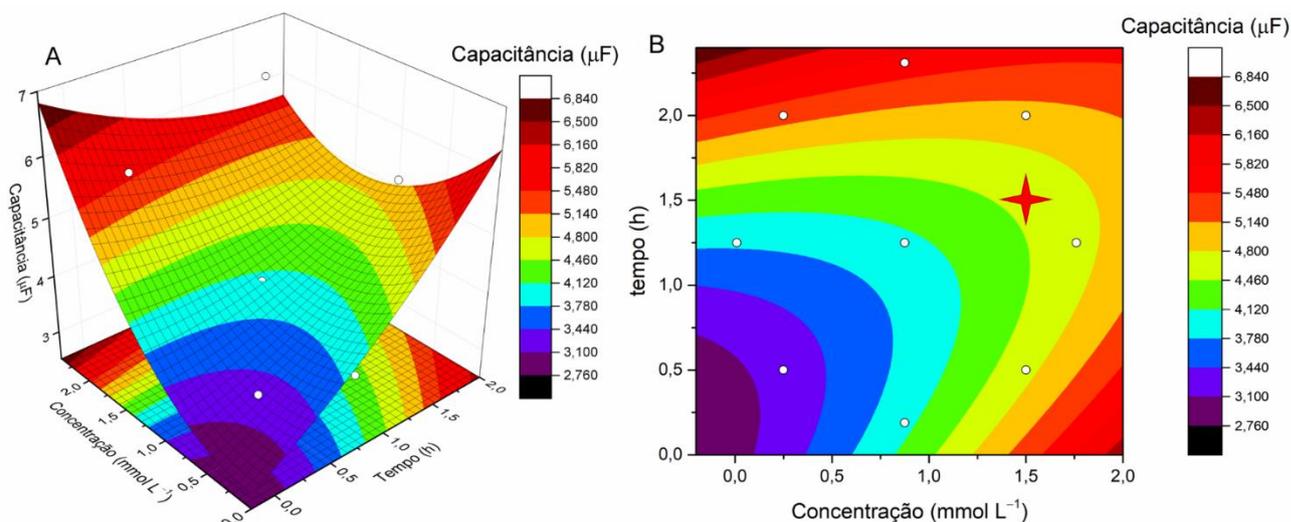


Figura 53. Gráficos de (A) superfície de resposta e (B) contorno da relação concentração vs. tempo de interação de 3-MPA com Au/CB-PVA. Estrela indica valores ótimos escolhidos

Após esta etapa, o mesmo método foi aplicado pra investigar os parâmetros ótimos para a imobilização do anticorpo. Para tanto, modificações foram realizadas numa faixa de concentração entre 0,5 e 2 mg mL⁻¹, com o tempo de imobilização também variando entre 0,5 e 2 h (Tabela 14). Os diagramas de Cole-Cole resultantes para cada experimento estão presentes na Figura 54 e estes dados foram utilizados para gerar os gráficos de superfície de resposta e contorno, correspondentes à matriz $Capacitância (\mu F) = 0,260 + 0,203 \times C_{AntiPark7/DJ-1} (\mu g mL^{-1}) - 0,0790 \times C_{AntiPark7/DJ-1}^2 ((\mu g mL^{-1})^2) + 0,715 \times tempo (h) - 0,291 \times tempo^2 ((h)^2) + 0,0200 \times C_{AntiPark7/DJ-1} (\mu g mL^{-1}) \times tempo (h)$, apresentados nas Figura 55A e B, respectivamente. Como pode ser observado, a relação para os parâmetros nesta etapa é majoritariamente quadrática.

Neste processo, algumas relações são importantes para a determinação dos parâmetros ótimos: (i) com capacitância muito elevada, corre-se o risco de perder a definição do semicírculo no diagrama; (ii) tanto anticorpo, quanto antígeno, apresentam relativo elevado custo; e (iii) quanto maior o tempo de interação, espera-se que o sistema apresente maior extensão e melhor distribuição das camadas automontadas. Assim, optamos por selecionar como ótimos os seguintes parâmetros: concentração de anticorpo igual a 1,0 µg mL⁻¹ e tempo de interação de 2 h. Deste modo, a quantidade de reagente é a suficiente para realizar a modificação em atraentes condições e o tempo de interação garante capacitância suficiente para notar as alterações provocadas pela adição de PARK7/DJ-1, sem distorções nos diagramas.

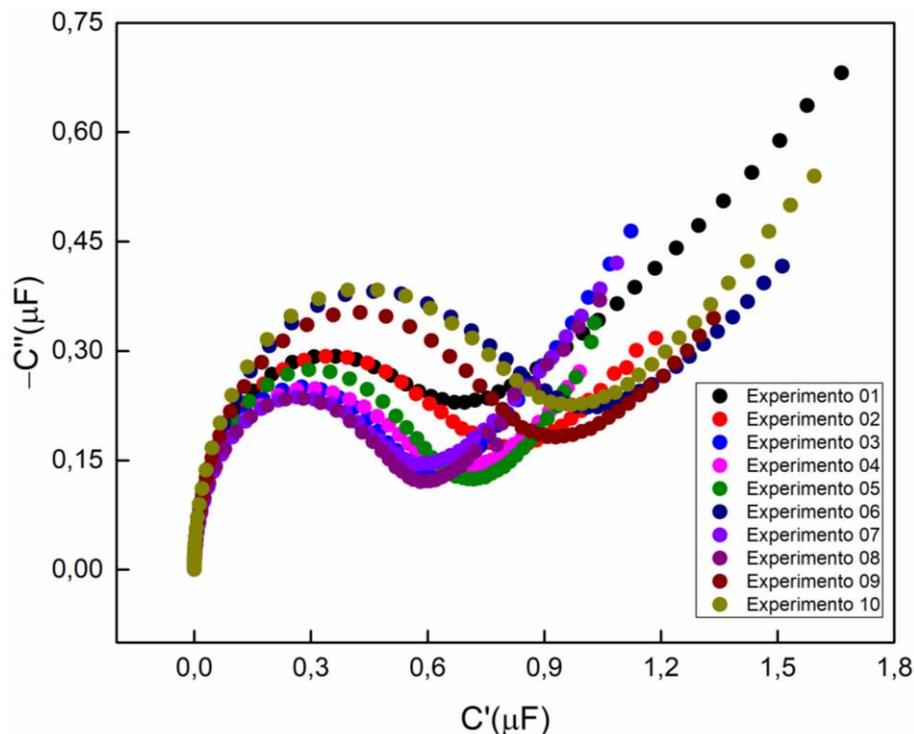


Figura 54. Diagramas de Cole-Cole obtidos por várias configurações de AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA, em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4); E = 0,4 V

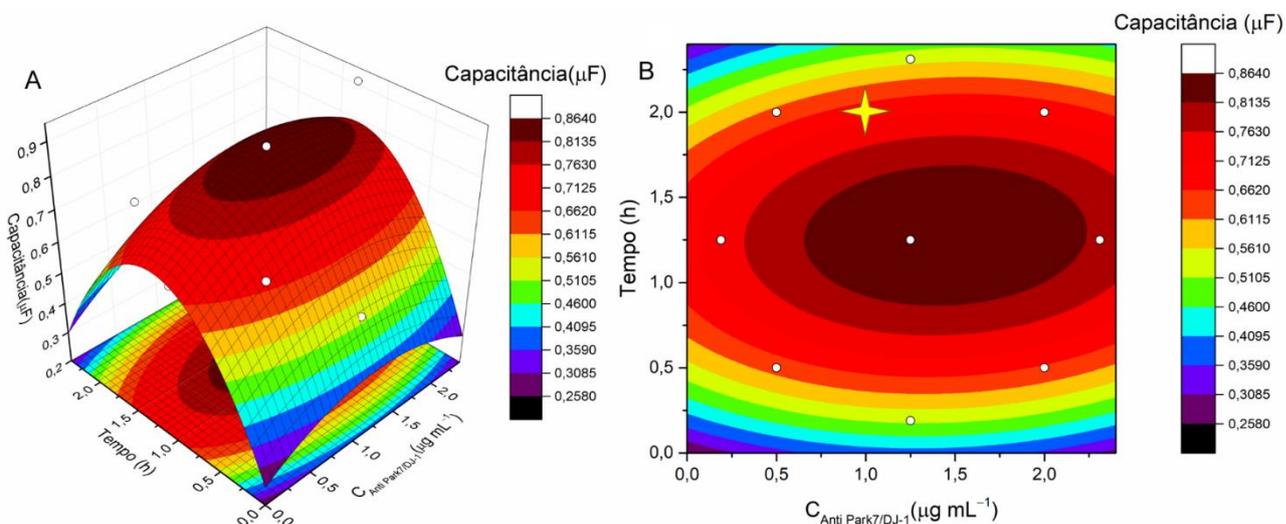


Figura 55. Gráficos de (A) superfície de resposta e (B) contorno da relação concentração vs. tempo de interação de AntiPARK7/DJ-1 com 3-MPA/Au/CB-PVA. Estrela indica valores ótimos escolhidos

Com a otimização destes parâmetros, todo o processo de modificação foi realizado, buscando estudar e comprovar a alteração da capacitância do sistema com cada modificador. A Figura 56A apresenta voltamogramas cíclicos realizados em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, onde observa-se aumento da corrente capacitiva com a adição de Au à superfície,

seguida de uma sequencial redução da mesma a cada camada adicionada. Nos diagramas de Cole-Cole e Bode, presentes na Figura 56B, C e D, observa-se o exato mesmo comportamento em relação à capacitância do sistema por camada, corroborando com o mecanismo.

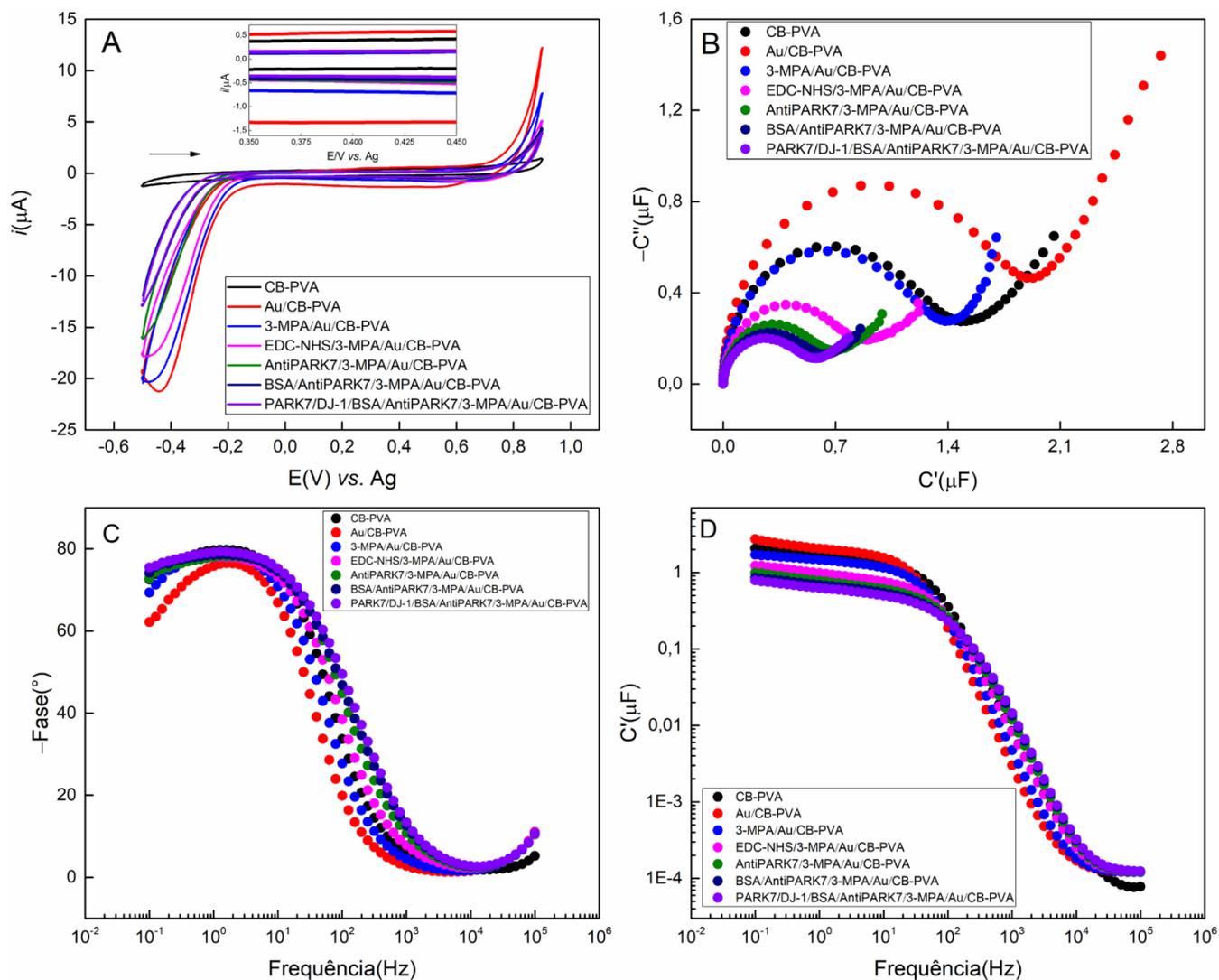


Figura 56. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA (preto), Au/CB-PVA (vermelho), 3-MPA/Au/CB-PVA (azul), EDC-NHS/3-MPA/Au/CB-PVA (rosa), AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (verde), BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (azul marinho) e PARK7/DJ-1/BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (roxo), em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4), de 10⁵ a 10⁻¹ Hz, onda tipo senoidal; amplitude = 10 mV, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, E = 0,4 V; Diagramas de (B) Cole-Cole e (C e D) Bode obtidos por CB-PVA (preto), Au/CB-PVA (vermelho), 3-MPA/Au/CB-PVA (azul), EDC-NHS/3-MPA/Au/CB-PVA (rosa), AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (verde), BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (azul marinho) e PARK7/DJ-1/BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA (roxo), em PBS 1,0 mmol L⁻¹ (pH 6,4), de 10⁵ a 10⁻¹ Hz, onda tipo senoidal; amplitude = 10 mV; E = 0,4 V

Após, testes foram realizados para a obtenção de uma curva de calibração. Um comportamento linear inversamente proporcional foi identificado entre a capacitância do sistema (C') e a concentração de PARK7/DJ-1 adicionada (Figura 57), entre 20 e 120 ng mL^{-1} , correspondendo à equação linear $C' (\mu\text{F}) = 0,00175 C_{\text{PARK7/DJ-1}} (\text{ng mL}^{-1}) - 0,65928$, com $r^2 = 0,98138$. Os LOD e LOQ foram calculados como apresentados anteriormente, e correspondem a, respectivamente, 0,207 e 0,689 ng mL^{-1} . Os dados estão presentes na Figura 57. Esta curva foi obtida coletando C' em um ponto fixo (frequência = 2,5119 Hz) correspondendo ao ápice de $-$ fase do dispositivo sem modificações.

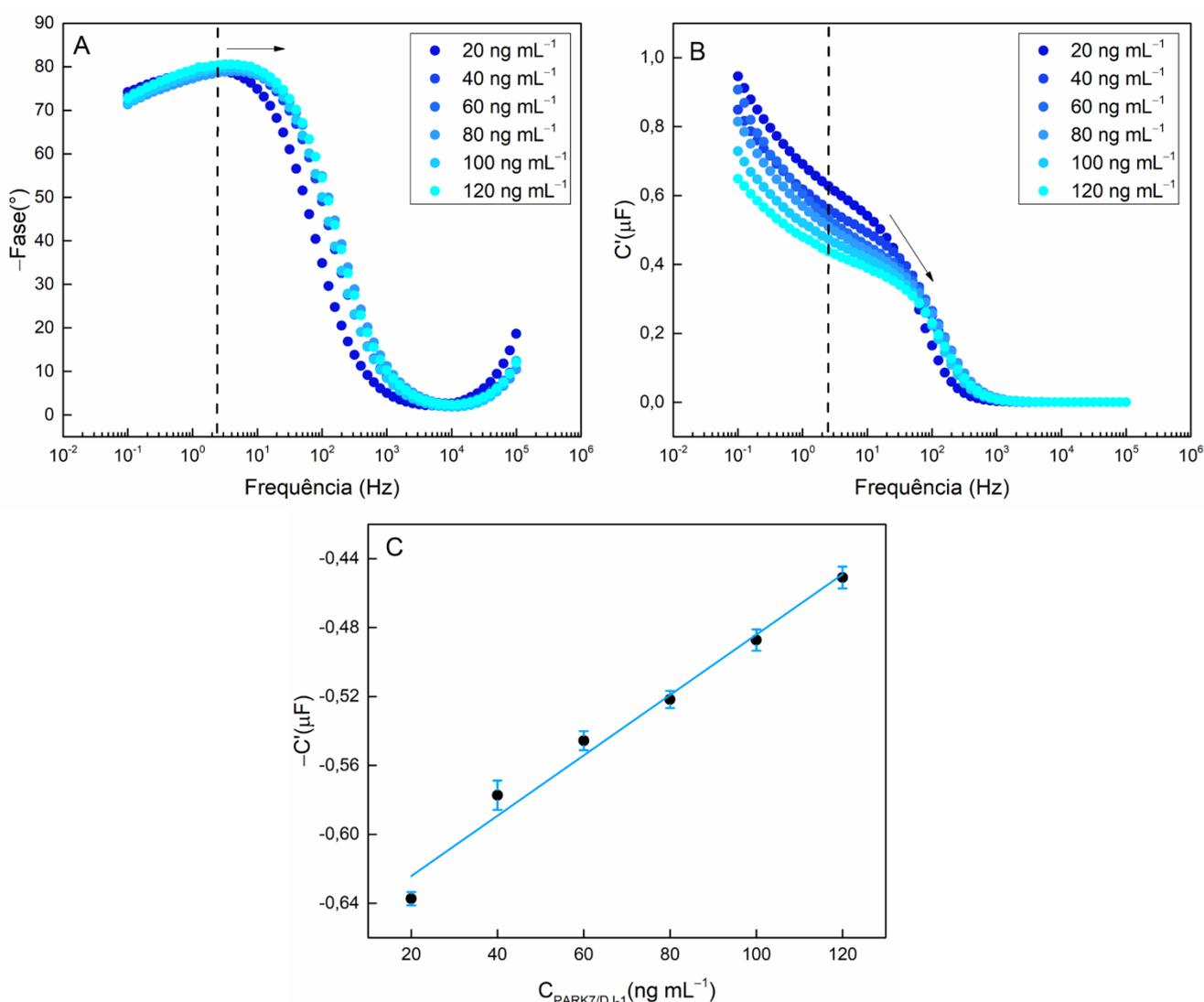


Figura 57. (A e B) Diagramas de Bode obtidos por PARK7/DJ-1/BSA/AntiPARK7/DJ-1/3-MPA/Au/CB-PVA, modificado com diferentes concentrações de PARK7/DJ-1, em PBS 1,0 mmol L^{-1} (pH 6,4); $E = 0,4 \text{ V}$; (C) Relação $-C'$ vs. $C_{\text{PARK7/DJ-1}}$

Para validar o dispositivo, líquido cerebrospinal sintético foi preparado com concentrações conhecidas de PARK7/DJ-1, e o imunossensor descartável totalmente modificado foi empregado na determinação do analito nesta amostra. Em líquido cerebrospinal, uma concentração de 90 ng mL^{-1} pode ser encontrada em indivíduos saudáveis, com esse valor diminuindo para menos de 60 ng mL^{-1} em pacientes parkinsonianos [268]. Os experimentos foram realizados com a mesma configuração da curva de calibração e a Tabela 15 apresenta os resultados. Como é possível notar, o sistema obteve recuperações variando de 98,4 a 111% para a determinação do analito, apresentando desempenho adequado.

Tabela 15. Determinação de PARK7/DJ1 em líquido cerebrospinal sintético

Amostra	Adicionado (ng mL^{-1})	Encontrado (ng mL^{-1})	Recuperação %
A	20,0	22,1 ($\pm 0,6589$)	111 ($\pm 0,5935$)
B	40,0	41,6 ($\pm 1,069$)	104 ($\pm 1,028$)
C	80,0	78,7 ($\pm 0,7910$)	98,4 ($\pm 0,8038$)

O desempenho analítico deste e de outros dispositivos é apresentado na Tabela 16. Esta tabela tem como objetivo comparar este trabalho com imunossensores eletroquímicos semelhantes, que também visaram a detecção de PARK7/DJ-1. Embora nenhum outro sistema tenha sido proposto para determinar o biomarcador com sinais de capacitância eletroquímica, o EIE foi empregado em todos eles para atingir o objetivo. É possível notar que a abordagem aqui descrita obteve resultados analíticos semelhantes a outros trabalhos, especialmente os de Oliveira *et al.* [268] e Kalinke *et al.* [281]. Porém, é importante destacar que neste trabalho isso foi obtido com dados de impedância não faradáica: nenhuma sonda redox foi empregada. Com um tempo de preparação um pouco mais curto e uma execução fácil dos procedimentos, as abordagens não faradáica podem ser mais rápidas de executar, ao mesmo tempo que requerem menos consumo de recursos.

Tabela 16. Desempenho analítico de diferentes imunossensores para a determinação de PARK7/DJ-1

Imunossensor	Imobilização	Sonda redox	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	Tempo de preparo (h)	Referência
Eletrodo de Pt flexível	Cys-Ga	[Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	40 a 150	1,13	~9,0	[268]
Eletrodo ITO modificado	Monocamadas automontadas	[Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	4,7×10 ⁻⁵ a 4,7×10 ⁻³	5,0×10 ⁻⁶	~7,25	[282]
Dispositivo serigrafado modificado com PMI	Monocamadas automontadas	[Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	20 a 10 ⁵	5.0	~31	[283]
Imunossensor impresso em 3D	EDC/NHS	FcMeOH	5,0 a 500	1,01	~7,0	[281]
Dispositivo serigrafado modificado com microfiores de Au	3-MPA, EDC/NHS	Nenhuma	20 a 120	0,207	6,25	Este trabalho

ITO: eletrodo de In e Sn modificado com nanopartículas de Au e nanotubo de carbono de paredes múltiplas; **PMI**: polímero molecularmente impresso; **FcMeOH**: ferrocenemethanol, C₁₁H₁₂FeO

11. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a tinta condutora de CB e PVA, desenvolvida no Capítulo II, foi utilizada para construir um dispositivo analítico de capacitância. Para incrementar a contribuição de capacitância pelo dispositivo, o mesmo foi modificado com microfiores de Au. Com as análises de MEV, foi observada a presença de estruturas florais, com diâmetro médio de 413 nm. Esses dispositivos descartáveis foram posteriormente modificados com 3-MPA, EDC–NHS, anticorpo AntiPARK7/DJ-1 e BSA para prepará-los para a determinação de PARK7/DJ-1. Ao otimizar os parâmetros de modificação para os anticorpos 3-MPA e AntiPARK7/DJ-1, foi possível obter uma curva de calibração da relação inversamente linear entre a concentração de PARK7/DJ-1 imobilizado e a capacitância do sistema, correspondendo à faixa de 20 a 120 ng mL⁻¹, com r^2 de 0,9814 e LOD e LOQ de 0,207 e 0,689 ng mL⁻¹, respectivamente. O dispositivo foi então aplicado na detecção do antígeno em amostras sintéticas de líquido cefalorraquidiano fortificadas, obtendo recuperações variando de 98,4 a 111%. Todos os dados indicam que a adição de microfiores de Au foi eficaz para melhorar o desempenho do material para um sensor de capacitância. Portanto, espera-se que mesmo

plataformas modificadas com estruturas complexas, como flores de Au, possam ser eficazes para o diagnóstico da doença de Parkinson.

Kaladin disse: “Você me disse que vai piorar”

“Vai”, disse Wit, “mas depois vai melhorar. Depois vai piorar de novo. Depois vai melhorar. Esta é a vida, e não vou mentir dizendo que todos os dias haverá sol. Mas haverá sol novamente, e isso é uma coisa diferente de se dizer. Isso é verdade. Eu prometo a você, Kaladin: você se sentirá aquecido novamente”

Brandon Sanderson, Ritmo de Guerra

CAPÍTULO IV

ELETRODOS SERIGRAFADOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE AuBi PARA A OXIDAÇÃO DIRETA DE ÁLCOOIS EM CÉLULAS À COMBUSTÍVEL DIRETO ALCALINAS

12. MATERIAL E MÉTODOS

Esta tese também retrata a cronologia do autor em descobrir, estudar e explorar o Planejamento de Experimentos aplicado à eletroquímica e eletroanalítica. Deste modo, o trabalho apresentado neste capítulo é o mais avançado neste quesito, podendo ser usado como guia para curiosos e novos estudantes do tópico. Os outros capítulos, apesar de conterem os conceitos corretos, revisados após anos de estudo, foram feitos sob as óticas deste autor em desenvolvimento, e, portanto, não os mais recomendados para estudo.

12.1. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do grupo Merck (Sigma Aldrich), de grau analítico. Água ultrapura (Millipore™ Synergy®), com resistividade $>18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi utilizada no preparo de todas as soluções. A tinta condutora foi preparada misturando CB (Vulcan XC72, Cabot Corporation) e uma cola de poli(acetato de vinila) (PVA, Acrilex). Para análises eletroquímicas, soluções de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas em diferentes análises como eletrólitos de suporte. Uma solução de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi empregada como sonda eletroquímica para investigar o comportamento eletroquímico dos dispositivos desenvolvidos. EtOH/KOH equimolar $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregado para avaliar o desempenho do dispositivo para oxidação de EtOH. Partículas de Au e Bi foram eletrodepositadas sobre a superfície do eletrodo de trabalho usando soluções de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ e $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ dissolvidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$.

12.2. EQUIPAMENTOS

As análises eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm (Eco Chemie), gerenciado pelo *software* Nova 2.1.5. Foi aplicado um sistema de três eletrodos, sendo a tinta condutora desenvolvida utilizada como eletrodo de *pseudo*-referência, auxiliar e de trabalho. Também foram realizadas diversas modificações no eletrodo de trabalho, incluindo a incorporação de nanopartículas metálicas. As análises de EIE foram obtidas com os seguintes parâmetros experimentais: potencial aplicado igual ao OCP de

cada dispositivo, medido por 5 min para confirmar a estabilidade; com amplitude de 10 mV, ondas senoidais ao longo da análise e com 10 incrementos de frequência por década, na faixa de $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^{-1}$ Hz. Uma centrífuga dupla assimétrica (SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K, FlackTec Inc) foi usada para misturar as tintas condutoras a 3000 rpm por 1 min. As máscaras em papel adesivo (Colacril), utilizadas como moldes para produção dos eletrodos descartáveis, foram desenvolvidas com o *software* Silhouette Studio e cortadas com a impressora de corte Silhouette Cameo 3. As imagens de MEV foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura Quanta 3D FEG (FEI), usando uma aceleração de tensão de 10kV e modo de baixo vácuo de 50 Pa, e cada amostra foi depositada sobre pinos de alumínio. O *software* ImageJ foi utilizado para calcular o diâmetro médio de todas as amostras. As Figuras e modelos tridimensionais foram feitos com o *software* Blender 4.2. Todas as otimizações por Planejamento de Experimentos foram calculadas com o *software* Octave.

12.3. PREPARO DOS ELETRODOS DESCARTÁVEIS

Os dispositivos descartáveis foram fabricados com a nova tinta condutora apresentada no Capítulo II: foi preparada pela adição de CB (13% da massa total da tinta) a uma matriz polimérica à base de PVA. Tinta de Ag comercial também foi utilizada para pintar o eletrodo de referência, finalizando o sistema descartável.

12.4. MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO SERIGRAFADO

A eletrodeposição de Au e Bi foi realizada utilizando cronoamperometria com potencial variado e otimizado. A otimização dos parâmetros operacionais desta técnica: concentrações de Au (v1) e Bi (v2) e do tempo de eletrodeposição (v3) e do potencial de deposição (v4); foi realizado por um planejamento fatorial completo 2^4 , com os seguintes valores máximos e mínimos: 0,1 e 1,0 mmol L⁻¹ de cada metal separadamente, 30 e 300 s para o tempo de deposição, limitado pelo tempo em que a gota começou a secar na superfície; e -0,8 e -0,6 V para o potencial de deposição, sendo estes escolhidos seguindo a literatura para sistemas similares [260, 261]. As eletrodeposições foram realizadas em solução 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄ como eletrólito suporte e a Figura 58 ilustra todo o processo. A Tabela 17 apresenta a matriz destes experimentos e os dados obtidos, em μ A. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória e os eletrodos modificados foram nomeados de acordo com os metais adicionados às suas superfícies, sendo AuBi/CB-PVA aquele com configuração ideal de eletrodeposição.

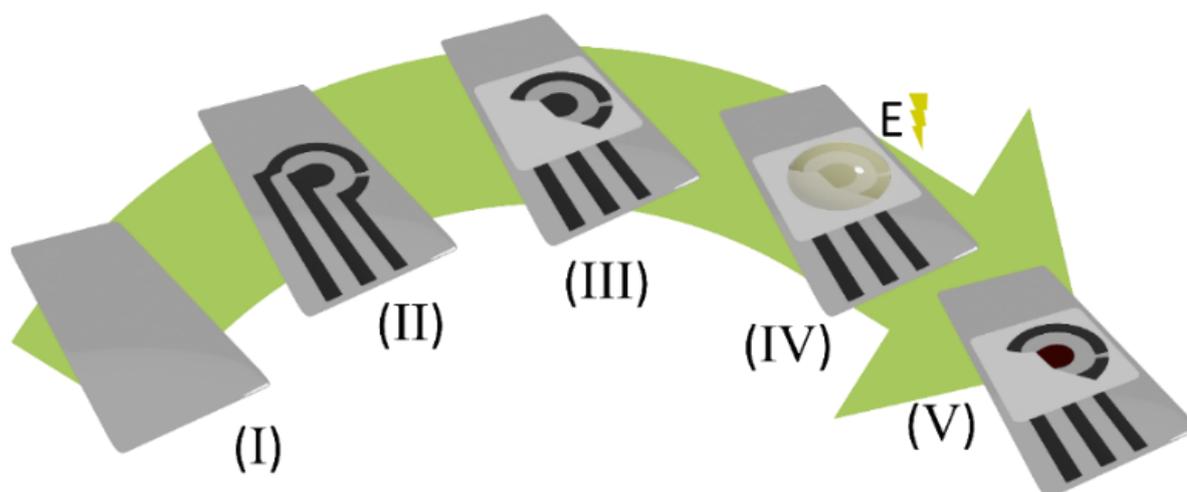


Figura 58. Modificação de CB-PVA: (I) Sobre substrato PET limpo, (II) é aplicada a tinta condutora. (III) Após a secagem, é adicionado um delimitador de gota. (IV) A eletrodeposição do procedimento Au e Bi é realizada (V) e o dispositivo está pronto para uso. Fonte: Elaboração própria

Tabela 17. Matriz do planejamento fatorial completo 2^4 com os respectivos valores para a oxidação de EOTH

Experimento	M	v1	v2	v3	v4	Resposta (μA)
1	1	-1	-1	-1	-1	3,29
2	1	1	-1	-1	-1	10,1
3	1	-1	1	-1	-1	4,98
4	1	1	1	-1	-1	23,8
5	1	-1	-1	1	-1	10,0
6	1	1	-1	1	-1	120
7	1	-1	1	1	-1	6,85
8	1	1	1	1	-1	58,0
9	1	-1	-1	-1	1	3,24
10	1	1	-1	-1	1	10,0

11	1	-1	1	-1	1	34,5
12	1	1	1	-1	1	22,2
13	1	-1	-1	1	1	7,34
14	1	1	-1	1	1	142
15	1	-1	1	1	1	0,710
16	1	1	1	1	1	76,7
C1	1	0	0	0	0	33,3
C2	1	0	0	0	0	49,5
C3	1	0	0	0	0	22,7

Após este estudo, um planejamento Doehlert foi empregado para finalmente otimizar as três variáveis restantes (v_1 = concentração de Au, v_2 = concentração de Bi e v_3 = tempo de eletrodeposição) em novos intervalos, em relação ao encontrado no planejamento anterior, conforme mostrado na Tabela 18. Todas as respostas também são dadas, em μA .

Tabela 18. Matriz do planejamento Doehlert (valores reais) com respectivas respostas para a oxidação de EtOH

Experimento	M	v1 (mmol L⁻¹)	v2 (mmol L⁻¹)	v3 (s)	Response (μA)
1	1	1.500	0.100	165	0.06
2	1	1.500	0.100	300	0.20
3	1	2.366	0.100	233	0.24
4	1	1.789	0.141	233	0.20
5	1	1.500	0.100	30	0.03
6	1	0.634	0.100	97.5	0.03
7	1	1.211	0.059	97.5	0.03
8	1	0.634	0.100	233	0.05
9	1	1.211	0.059	233	0.18
10	1	2.366	0.100	97.5	0.10
11	1	2.077	0.059	165	0.04

12	1	1.789	0.141	97.5	0.04
13	1	0.923	0.141	165	0.06
14	1	1.500	0.100	165	0.15
15	1	1.500	0.100	165	0.06

13. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nome da compreensão das interações e efeitos causados pelas nanopartículas de Au e Bi sobre a superfície da tinta, muitos experimentos foram realizados. Para iniciar, a resposta eletroquímica, obtida por VC, na janela de potencial de trabalho de $-1,0$ a $1,0$ V, na ausência e presença de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de EtOH, em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} , foi avaliado com o eletrodo CB-PVA, bem como sua modificação com alta concentração ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) de cada nanopartícula metálica, separadamente. Os metais foram eletrodepositados com aplicação de $-0,6$ V por 300 s, para garantir ótima cobertura superficial. H_2SO_4 foi empregado como eletrólito suporte para esta etapa. A Figura 59 mostra a resposta da tinta CB-PVA e, como esperado, não há alteração significativa da corrente quando se comparada a resposta na presença e ausência de EtOH. Isto indica que a superfície de CB do dispositivo não pode, por si só, promover qualquer tipo de catálise na reação de quebra de EtOH.

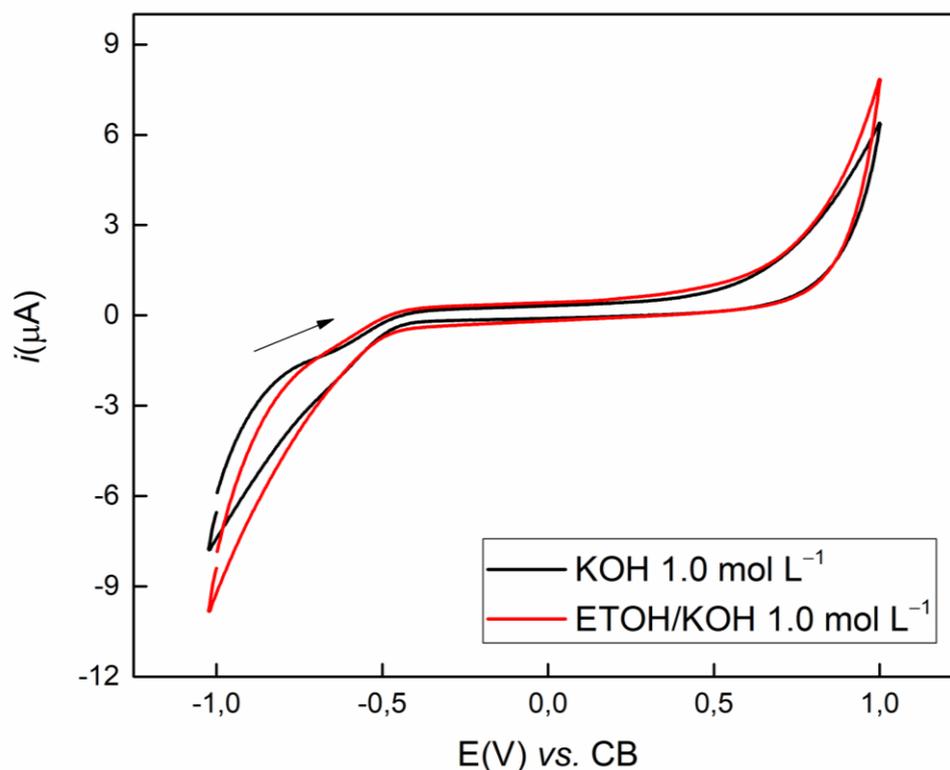


Figura 59. Voltamogramas cíclicos de CB-PVA na ausência (preto) e presença (vermelho) de EtOH 1,0 mol L⁻¹, em KOH 1,0 mol L⁻¹; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Com a adição de nanopartículas de Au (Figura 60), pode-se verificar picos associados à formação e dessorção de óxidos de Au [284], respectivamente em -216 e -763 mV. Na presença de EtOH, um pico de maior magnitude ($29 \mu\text{A}$) é observado em -182 mV. Também não há alteração significativa no comportamento do pico de redução do óxido metálico, sugerindo que a formação dele ainda ocorre na presença de EtOH.

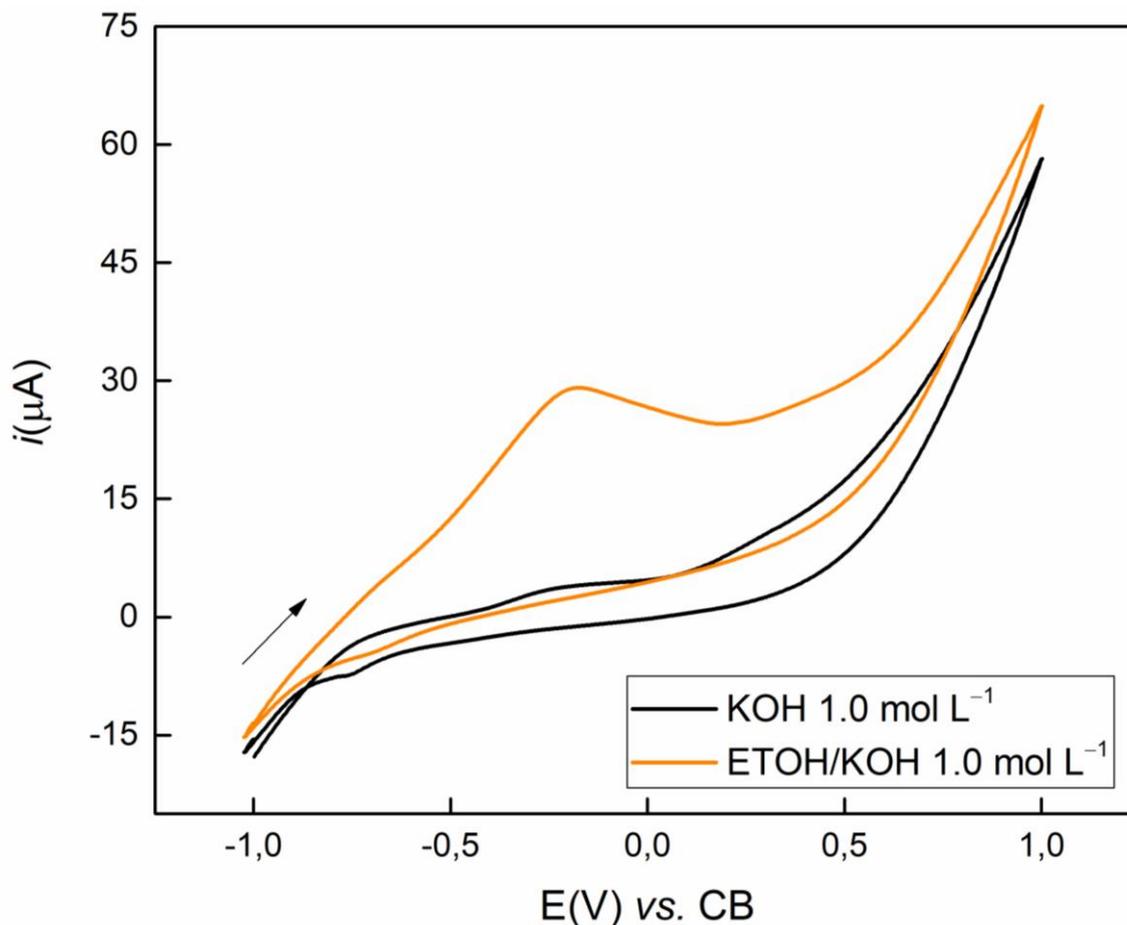


Figura 60. Voltamograma cíclico de Au/CB-PVA na ausência (preto) e presença (laranja) de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ EtOH, em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ KOH; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

A presença de nanopartículas de Bi na superfície de CB-PVA, no entanto, tem comportamento diferente, conforme apresentado na Figura 61. Dois característicos [54, 76] picos redox de óxido de Bi podem ser observados em -119 (pico anódico, $8,56 \mu\text{A}$) e -448 mV (pico catódico, $-2,86 \mu\text{A}$), na presença de KOH. Curiosamente, a adição de EtOH provoca a extinção destes picos, o que implica forte adsorção do combustível nas nanopartículas, tornando o dispositivo inutilizável para tal aplicação. Como discutido no Capítulo I, entretanto, espera-se que Bi seja eficaz para a oxidação do EtOH quando em concentrações extremamente baixas, ajudando outros metais em seus mecanismos de catálise.

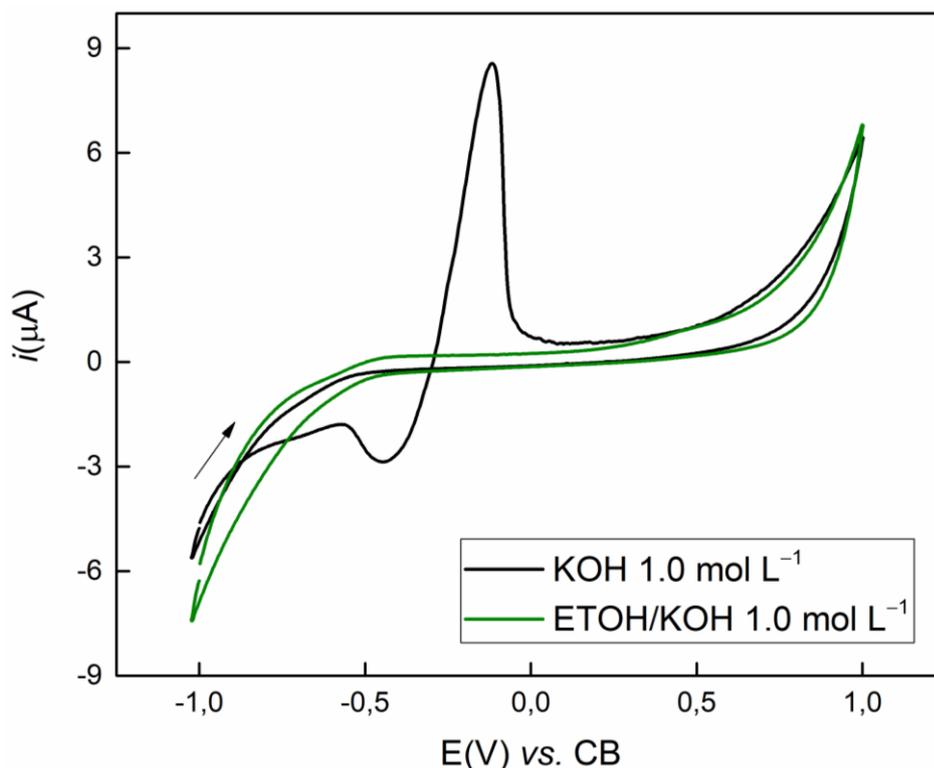


Figura 61. Figura 6. Voltamogramas cíclicos de Bi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Portanto, as proporções e concentração dos metais, junto dos outros parâmetros de eletrodeposição (tempo de deposição e potencial) devem ser estudados para melhorar a eficiência do dispositivo, se possível. Nesse sentido, o Planejamento de Experimentos foi aplicado para encontrar os valores ideais para cada uma das seguintes variáveis: v_1 = concentração de Au, v_2 = concentração de Bi, v_3 = tempo de eletrodeposição e v_4 = potencial de eletrodeposição. Para adquirir conhecimento do comportamento do sistema, foi desenvolvido um planejamento fatorial completo 2^4 e os experimentos, apresentados na Tabela 17, foram realizados por VC, na faixa de potencial de trabalho de $-0,8$ a $1,0 \text{ V}$, a 50 mV s^{-1} , em a presença de uma solução equimolar de EtOH e KOH. Os valores estudados para cada variável são os seguintes: v_1 e v_2 foram estudados em $0,1$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, v_3 foi investigado em 30 e 300 s , enquanto v_4 foi usado como $-0,6$ e $-0,8 \text{ V}$. O pico de oxidação de EtOH foi utilizado como a resposta desejada e os dados também são apresentados na Tabela 17. A Figura 5A mostra a influência percentual relativa de cada efeito variável e é possível observar que v_1 e v_3 , concentração de Au e tempo de deposição, respectivamente, são consideravelmente mais importantes que as demais. Além disso, a interação secundária entre ambos é bastante significativa para a resposta global. Esta relação é mais significativa, inclusive, do que a v_3

sozinha. A concentração de Bi, v2, tem muito pouco impacto no sistema por si só, mas, quando junto de v3, ambas são responsáveis pela quarta contribuição mais significativa para a resposta global e deve, portanto, ser considerada. v4, por outro lado, tanto por si só, quanto em suas interações, não contribui significativamente para a resposta do dispositivo. Como o experimento com a maior corrente obtida foi alcançado com v4 em $-0,8$ V, este valor foi escolhido para dar continuidade aos experimentos. A Figura 62B apresenta a distribuição de probabilidade das magnitudes dos efeitos, e, dentre os efeitos importantes (fora das barras de erro vermelhas) v1, v3, e sua interação, 13, possuem efeitos positivos, o que significa que os maiores valores estudados devem ser favorecidos. A interação 23 é o único efeito significativo com resultado negativo, indicando que v2 e v3 devem estar em níveis diferentes. Como é indicado que v3 deveria estar em níveis altos, v2 foi definido para estar em níveis mais baixos, alcançando a configuração proposta de v1: +1, v2: -1, v3: +1 e v4: +1.

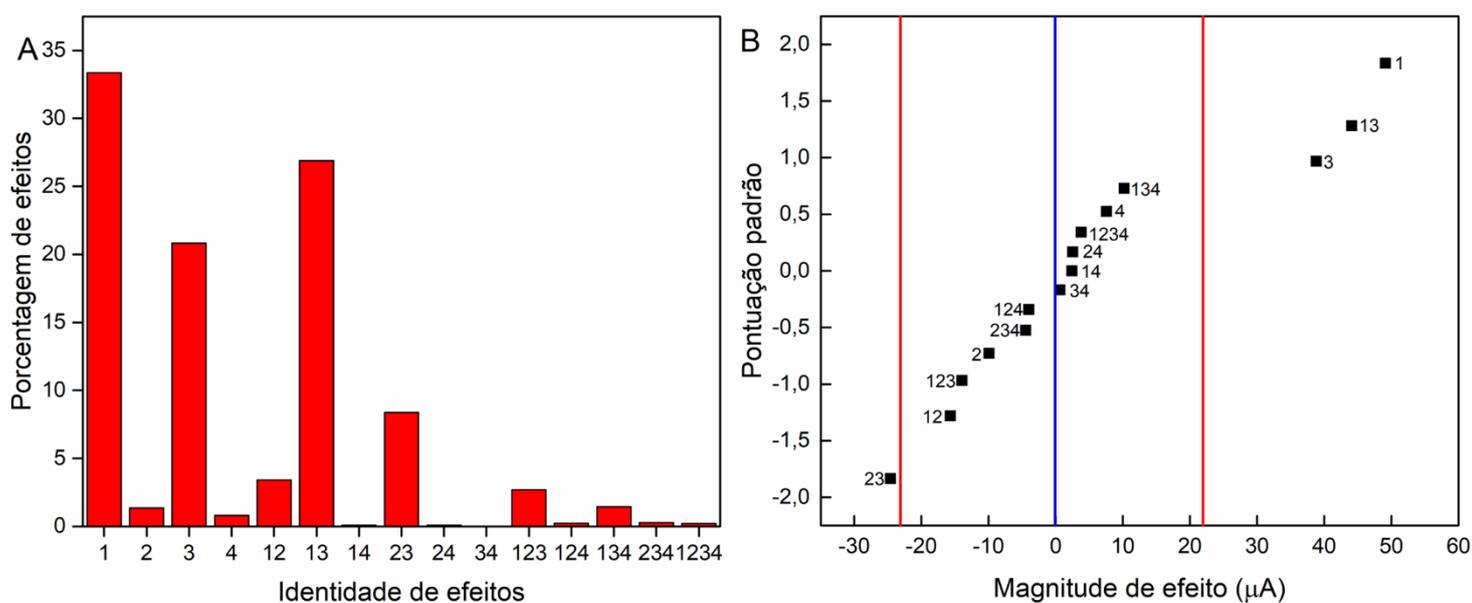


Figura 62. Resultados do planejamento fatorial completo 2^4 : A) porcentagem relativa dos efeitos calculados e B) distribuição de probabilidade para as respostas do planejamento fatorial completo

Para continuar a otimização, um planejamento Doehlert [285, 286] foi empregado com 3 variáveis, mantendo a mesma identidade de variáveis e configuração experimental de antes. Desta vez, seguindo os resultados do planejamento fatorial completo, cada variável foi estudada em torno da faixa indicada: v1, concentração de Au, foi estudada em torno de seus valores superiores: 0,5 e 2,5 mmol L^{-1} , em 7 níveis, por ser a variável mais importante; v2 foi estudada em torno de seus valores mais baixos: 0,05 e 0,15 mmol L^{-1} , em 3 níveis; e por fim, v3 foi mantido na mesma região, sendo 30 e 300 s os valores empregados, pois tempos de

deposição maiores provocavam o ressecamento da gota de solução. Como a v_3 também é bastante significativa para o sistema, ela foi estudada em 5 níveis. A Tabela 18 apresenta a matriz Doehlert utilizada, bem como os resultados obtidos.

Com os dados obtidos foi proposta a seguinte equação (Eq. 19):

$$i(\text{mA}) = 9.28 \times 10^{-5} + 5.64 \times 10^{-5}v_1 + 1.00 \times 10^{-4}v_3 + 8.45 \times 10^{-5}v_1v_2 + 6.74 \times 10^{-5}v_1v_3 \quad \text{Eq. 19}$$

que corrobora com os dados obtidos pelo planejamento fatorial completo. A tabela ANOVA para este sistema é apresentada na Tabela 19, na qual é possível inferir que mesmo que o modelo não apresente uma regressão significativa, não há falta de ajuste no conjunto de dados. Algumas discrepâncias entre os resultados previstos e reais são esperadas, no entanto, uma vez que os quadrados médios da regressão não são significativamente maiores do que os quadrados médios dos resíduos (teste F de ajuste).

Tabela 19. Tabela ANOVA para o modelo calculado do planejamento Doehlert

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	$6,46 \times 10^{-8}$	9	$7,18 \times 10^{-9}$	2,72
Resíduos	$7,93 \times 10^{-9}$	3	$2,64 \times 10^{-9}$	0
Soma total dos quadrados	$7,26 \times 10^{-8}$	12	$6,05 \times 10^{-9}$	0
Erro puro	$5,64 \times 10^{-9}$	2	$2,82 \times 10^{-9}$	0,81
Falta de ajuste	$2,29 \times 10^{-9}$	1	$2,29 \times 10^{-9}$	0

$$r^2 = 0,89069$$

$$r = 0,94376$$

$$r^2_{\max} = 0,92229$$

$$r_{\max} = 0,96036$$

A partir deste modelo matemático, três conjuntos de gráficos de superfície de resposta e contorno puderam ser gerados, indicando os parâmetros sugeridos para cada variável. A interação entre cada par de variáveis é apresentada na Figura 63.

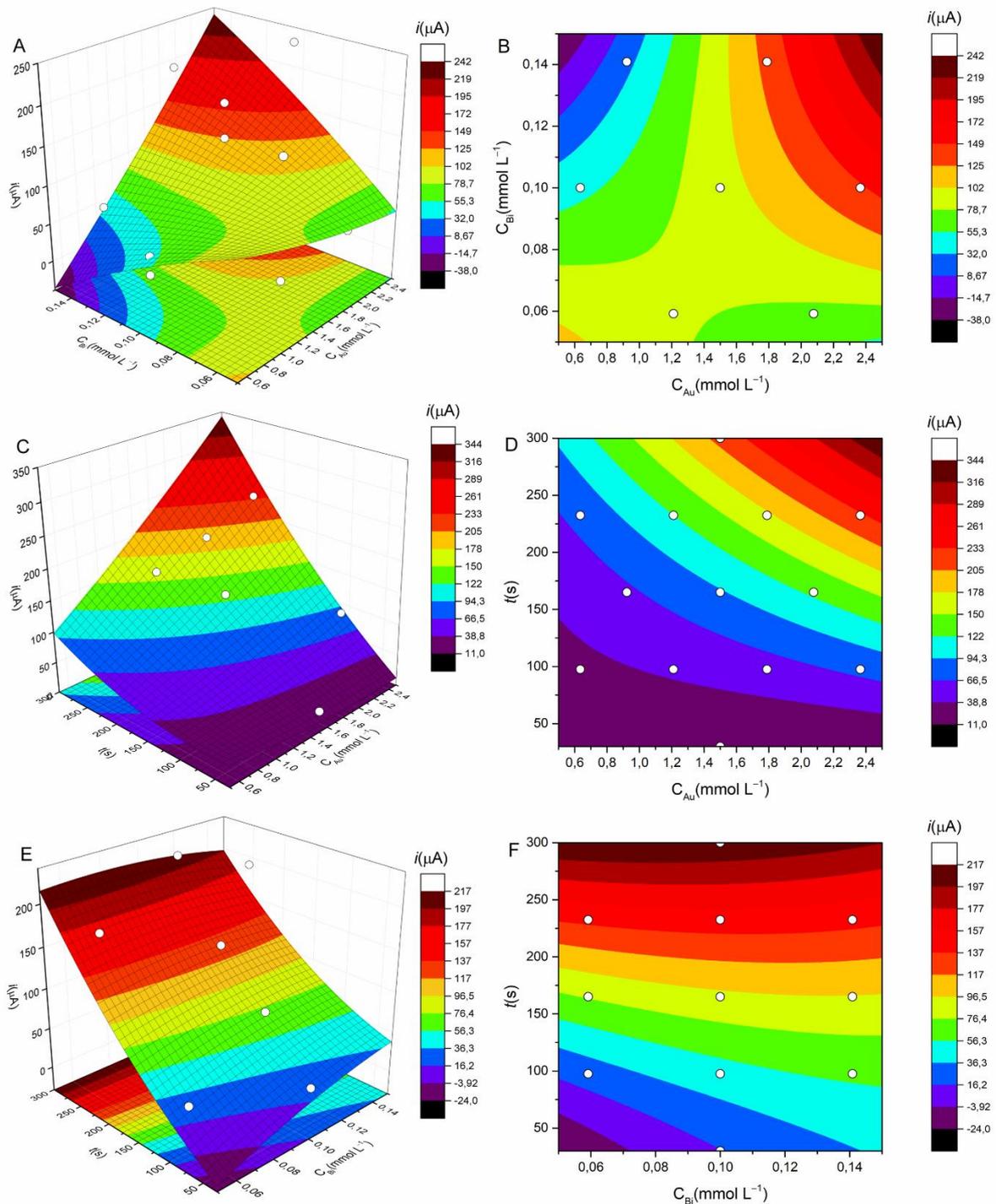


Figura 63. (A, C, E) Superfícies de resposta e (B, D, F) gráficos de contorno para o modelo gerado no planejamento Doehlert para cada interação de duas variáveis: (A e B) v_1 vs. v_2 , (C e D) v_1 vs. v_3 e (E e F) v_2 vs. v_3

As interações entre v_1 e v_2 e entre v_1 e v_3 mostram um comportamento mais quadrático do que linear, sugerindo que quanto maiores as concentrações de metais e o tempo de deposição, maior a corrente obtida; por outro lado, a interação entre v_2 e v_3 apresenta um comportamento mais linear, com ganho de sinal quase constante após ~ 150 s, independente da concentração de

Bi. Portanto, os parâmetros ótimos foram definidos como 2,5 e 0,15 mmol L⁻¹, respectivamente, para as concentrações de Au e Bi, com potencial de deposição de -0,8 V, por 300 s.

Ao aplicar esses valores ao modelo matemático obtido (Eq. 19), a resposta prevista é de 402 mA, que é 1391 vezes maior que a corrente obtida pelo Au/CB-PVA. Para certificar o modelo matemático é necessário realizar experimentos de validação e confirmar a correlação entre as correntes previstas e reais obtidas. Portanto, três experimentos foram planejados para esse fim. O primeiro (I) estando na configuração ótima proposta, $v_1 = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $v_2 = 0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ e $v_3 = 300 \text{ s}$. o segundo (II) equivale a 66% desses valores, ou seja, v_1 a 2,16 mmol L⁻¹, v_2 a 0,133 mmol L⁻¹ e v_3 a 254 s; finalmente, o terceiro experimento (III) foi organizado para estar em 33% dos valores ótimos: v_1 sendo igual a 1,83 mmol L⁻¹, v_2 sendo 0,117 mmol L⁻¹ e v_3 sendo 210 s. A Figura 64 apresenta os voltamogramas e a Tabela 20 mostra a resposta prevista e real, bem como seu % de desvio. Conforme discutido anteriormente, existe algum nível de discrepância entre os valores, mas os resultados são próximos o suficiente para comprovar a viabilidade do modelo. Portanto, o trabalho foi continuado com os parâmetros ótimos sugeridos, visando a resposta de 0,336 mA, o que corresponde a um aumento de 1154 vezes a corrente gerada pelo Au/CB-PVA nesse processo.

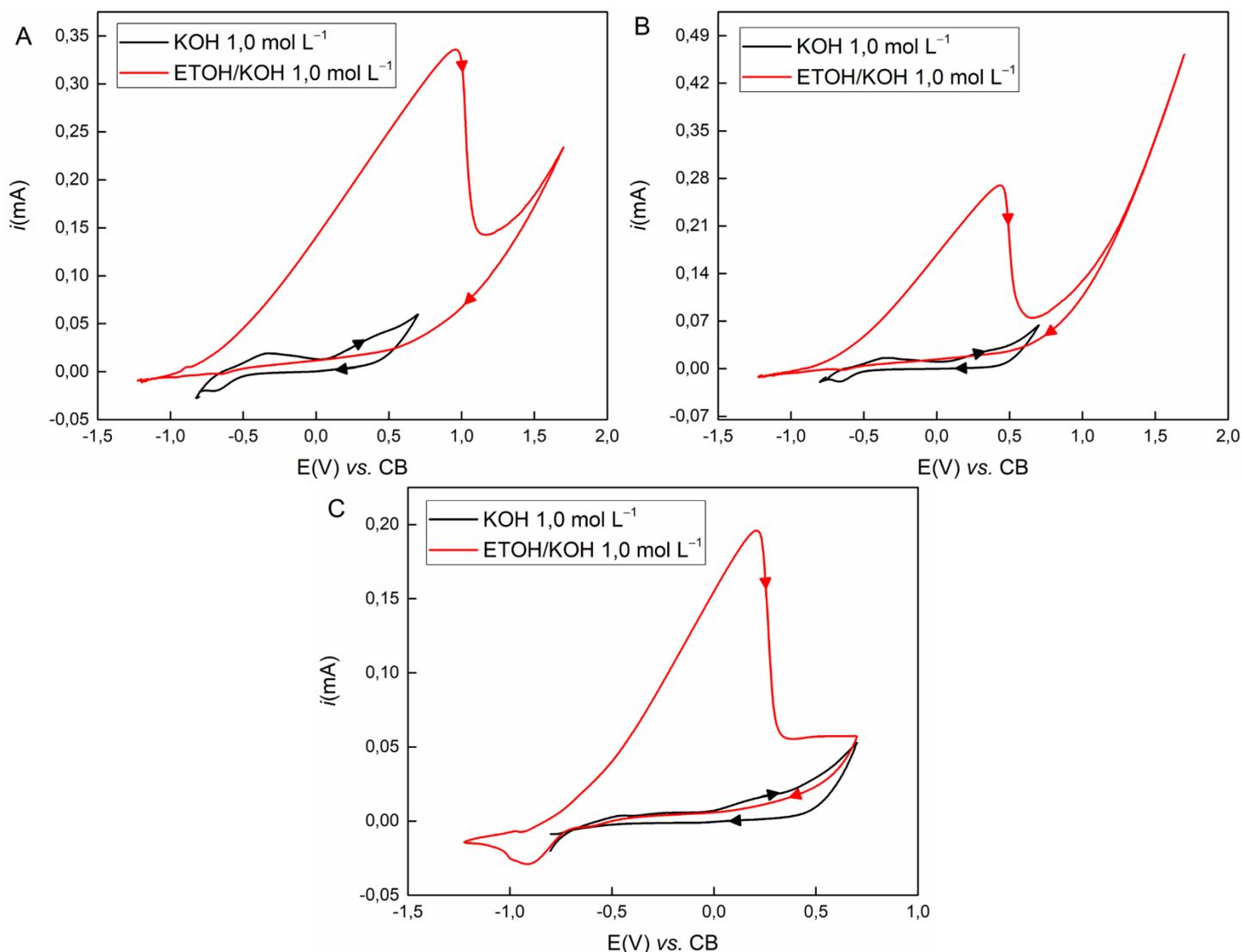


Figura 64. Voltamogramas cíclicos de AuBi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com diferentes parâmetros de eletrodeposição: $v_1 = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $v_2 = 0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ e $v_3 = 300 \text{ s}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamograma cíclico de AuBi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com diferentes parâmetros de eletrodeposição: $v_1 = 2,16 \text{ mmol L}^{-1}$, $v_2 = 0,133 \text{ mmol L}^{-1}$ e $v_3 = 254 \text{ s}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Voltamograma cíclico de AuBi/CB-PVA na ausência (preto) e presença (verde) de EtOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com diferentes parâmetros de eletrodeposição: $v_1 = 1,83 \text{ mmol L}^{-1}$, $v_2 = 0,117 \text{ mmol L}^{-1}$ e $v_3 = 210 \text{ s}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Tabela 20. Respostas reais e previstas para os experimentos de validação

Experimento	Resposta real (mA)	Resposta prevista (mA)	Desvio (%)
I	0,336	0,400	+16,0
II	0,269	0,262	-2,67
III	0,196	0,161	-21,7

Com os parâmetros ótimos de eletrodeposição encontrados, diferentes técnicas de caracterização foram empregadas para melhor compreender a modificação superficial. A começar pela caracterização morfológica: utilizou-se MEV para evidenciar as estruturas formadas com o processo de eletrodeposição. As Figura 65 até a Figura 70 apresentam as imagens obtidas. A superfície da tinta CB-PVA (Figura 65) apresenta distribuição homogênea com alta rugosidade superficial, comumente identificada em tintas do tipo [135, 139, 147].

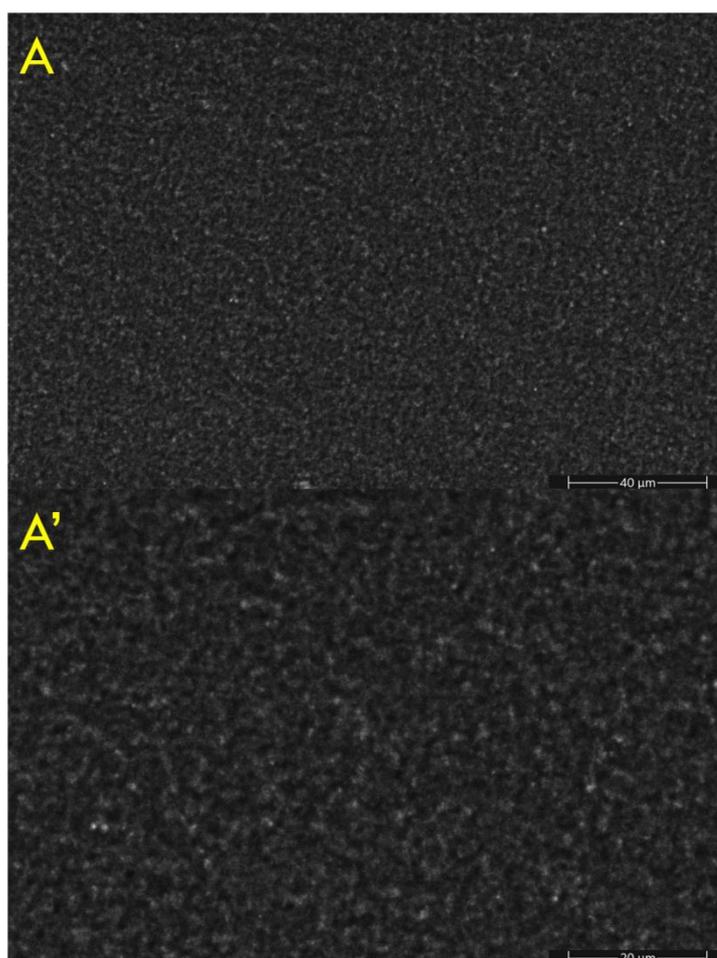


Figura 65. Imagens de MEV de CB-PVA com ampliação de 1000× (A) e 2000× (A')

Para estudar a estrutura obtida com a deposição conjunta dos dois metais, é vantajoso primeiro entender o comportamento deles, separadamente. Nesse sentido, fixamos o tempo de eletrodeposição em 300 segundos e variamos a concentração do metal, desde uma concentração maior até a otimizada. A Figura 66 apresenta o CB-PVA modificado com $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Au, no qual se formaram flores metálicas sobre a superfície do eletrodo, com tamanhos variados, mas distribuídas uniformemente por toda a superfície (como no Capítulo III). O diâmetro médio dessas partículas é $2,08 \mu\text{m}$. Por outro lado, quando o Au é eletrodepositado com a concentração ótima (Figura 67) mais partículas esféricas são distribuídas pela superfície, e em tamanho mais homogêneo, aparecendo pouquíssimas e menores flores, indicando que esta é uma etapa tardia na nucleação, também associada à quantidade de Au fornecida. Neste sistema, o diâmetro médio das partículas é de 350 nm .

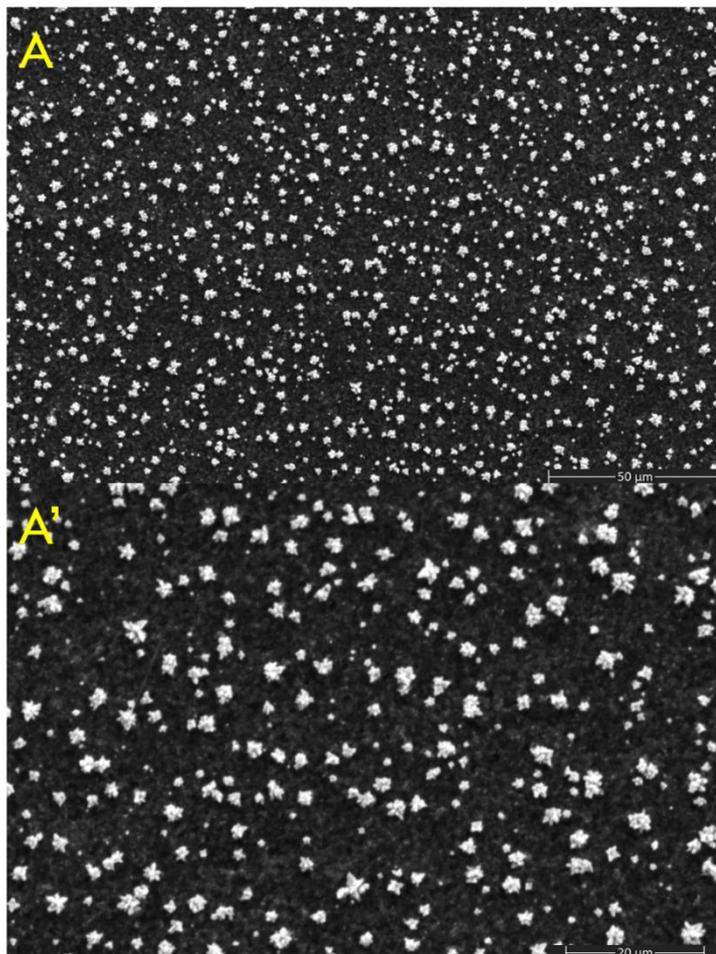


Figura 66. Imagens de MEV de Au/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Au $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com ampliação de $1000\times$ (A) e $2000\times$ (A')

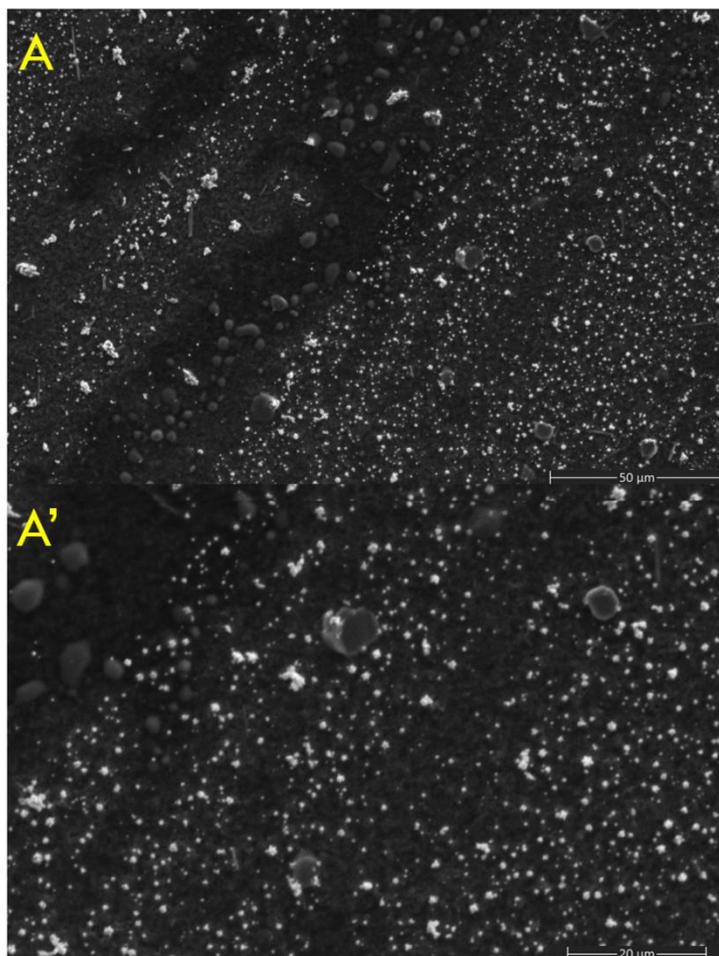


Figura 67. Imagens MEV de Au/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Au $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, com ampliação de $1000\times$ (A) e $2000\times$ (A')

A eletrodeposição de elevada quantidade ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) de Bi, apresentada na Figura 68, promoveu o recobrimento da superfície carbonácea com estruturas de Bi clavadas. Os microcristais parecem distribuídos homogeneamente pela superfície do dispositivo, apresentando diâmetro médio de $6,0 \mu\text{m}$. Quando na concentração ideal, e inferior, de $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$, toda a superfície é coberta por minúsculos cristais, de diâmetro médio igual a 12 nm . Porém, essa modificação também proporcionou o crescimento de poucos, porém maiores, cristais de Bi ainda em estrutura claviforme, como pode ser visto na Figura 69. Essas estruturas maiores possuem diâmetro médio de $115 \mu\text{m}$.



Figura 68. Imagens MEV de Bi/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Bi $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com ampliação de $1000\times$ (A) e $2000\times$ (A')

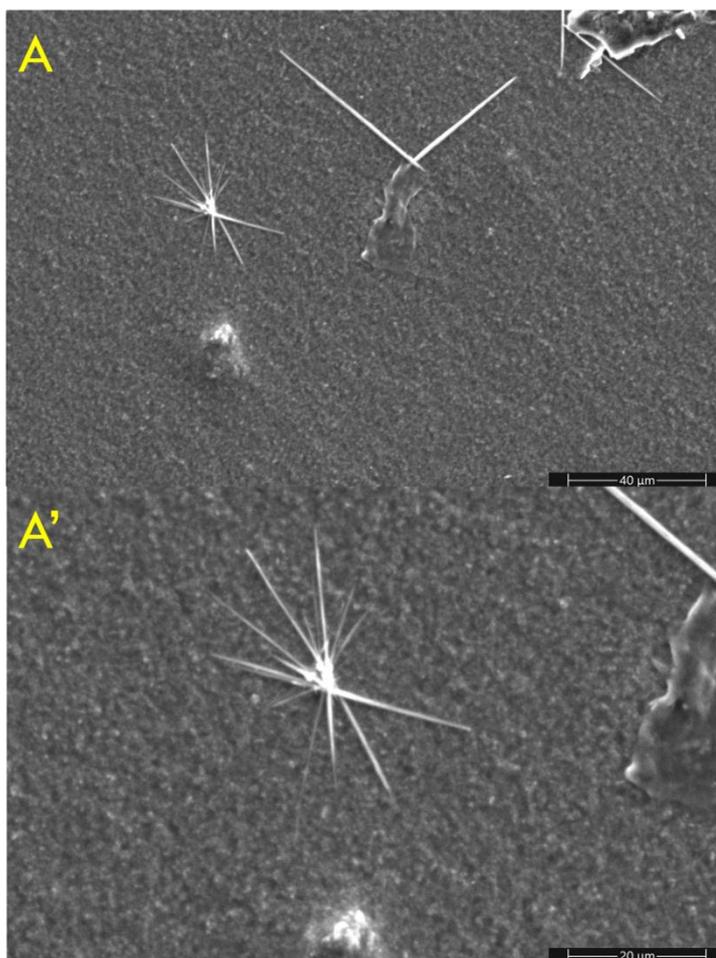


Figura 69. Imagens SEM de Bi/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de Bi $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$, com ampliação de $1000\times$ (A) e $2000\times$ (A')

A configuração ideal de eletrodeposição (Figura 70) alcançou uma mistura de ambas as estruturas aparentes: as flores de Au são interligadas por estruturas clavadas. Como a concentração de Bi é bastante baixa, supõe-se que a presença de Bi induz Au a participar nesta intrincada formação estrutural. Essas partículas têm um diâmetro médio calculada de $2,7 \mu\text{m}$. Algumas estruturas aglomeradas (diâmetro médio de $112 \mu\text{m}$) também foram encontradas nesta modificação, o que pode implicar estruturas que necessitam compensar uma elevada energia superficial por agregação.

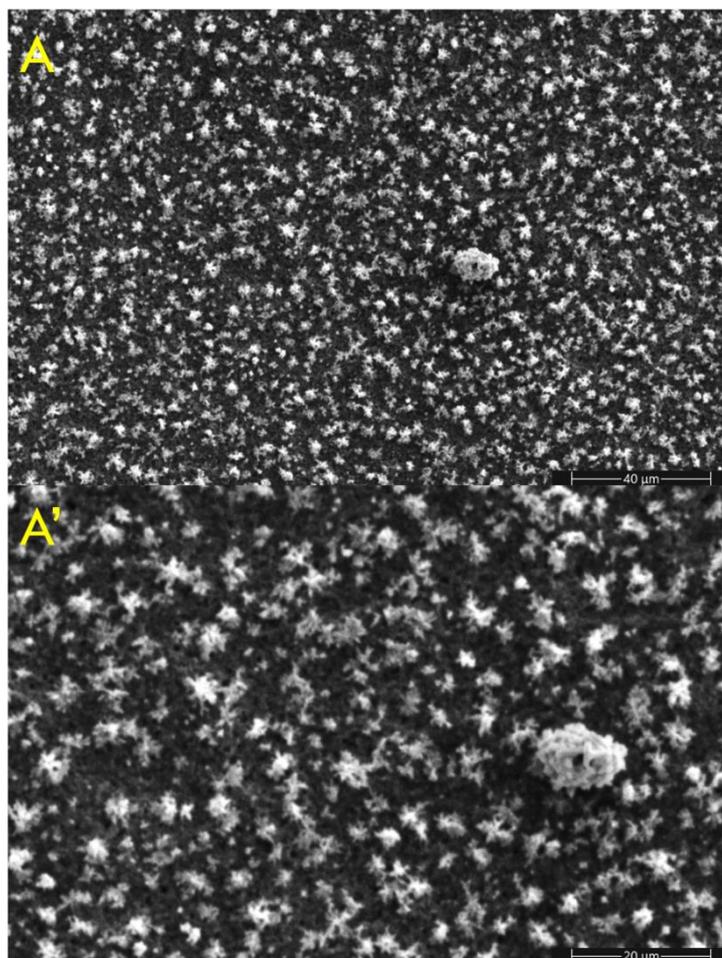


Figura 70. Imagens de MEV de AuBi/CB-PVA, eletrodepositadas com solução de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Au e $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ Bi, com ampliação de $1000\times$ (A) e $2000\times$ (A')

Após a caracterização por MEV, foram realizadas técnicas eletroquímicas para estudar o comportamento do dispositivo nas questões de seu perfil eletroquímico, cinética de transferência de elétrons e impedância da interface solução-eletrodo. O CB-PVA e o AuBi/CB-PVA tiveram seu perfil investigado na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol como sonda eletroquímica, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, em $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. A Figura 71 mostra os voltamogramas, nos quais é possível notar que o CB-PVA apresenta um pico anódico em 181 mV ($22,2 \mu\text{A}$) e um pico catódico em $-43,3 \text{ mV}$ ($-15,3 \mu\text{A}$), correspondendo ao processo redox da sonda eletroquímica. A separação pico-a-pico (ΔE) obtida foi de 224 mV , e o sistema apresentou um quociente de correntes ($i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$) de $1,45$, indicando que o sistema favorece altamente o processo de oxidação. Esses dados qualificam o comportamento do sistema como *quasi-reversível*. Nota-se, contudo, que o perfil obtido se difere um pouco do apresentado na Figura 31, onde os parâmetros experimentais são os mesmos. Uma possível explicação para tal

é a da alteração da geometria do dispositivo, onde as condições para a formação e execução da camada de difusão são diferentes, incluindo o tamanho da superfície de trabalho.

Com a adição dos metais, uma mudança de potencial significativa pode ser observada para ambos os picos, com os picos anódico e catódico agora em -116 e -485 mV, respectivamente. Isso indica um deslocamento de 297 mV para o processo anódico e de 442 mV para o processo catódico, ambos para potenciais mais negativos. O pico anódico apresentou corrente de $18,3$ μA , enquanto o catódico apresentou valor de $-20,6$ μA . Esses dados revelam que o ΔE deste sistema é 369 mV, e seu $i_{\text{anod}}/i_{\text{catod}}$ é $0,888$, sugerindo que o sistema agora não apenas deixa de favorecer o processo de oxidação, mas também passa a beneficiar ligeiramente o processo de redução. Todos estes parâmetros também conferem um caráter de *quasi*-reversibilidade a este sistema. Além disso, quando na presença das microestruturas metálicas, outro par redox, com menor resolução de pico, pode ser observado em 184 e 111 mV, para os processos anódico e catódico, respectivamente. Esses picos estão associados à formação e posterior dessorção de óxidos de Au e Bi e podem ser uma pista na diferença de magnitudes de corrente, já que a oxidação da sonda pode agora competir com óxidos metálicos, enquanto sua dessorção ocorre em potenciais bastante diferentes.

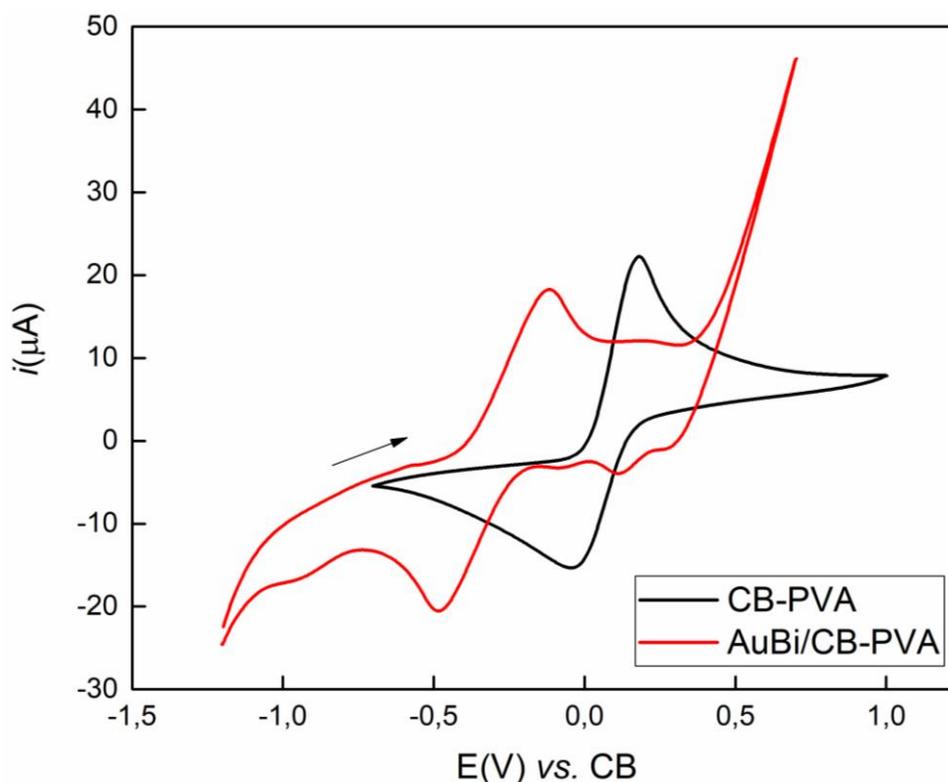


Figura 71. Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA (preto) e AuBi/CB-PVA (vermelho) na presença de ferrocenometanol $1,0$ mmol L^{-1} , em KCl $0,1$ mol L^{-1} ; $\nu = 50$ mV s^{-1}

Ao estudar como o perfil voltamétrico varia com o aumento da v , é possível obter informações muito interessantes de cada dispositivo, como calcular parâmetros cinéticos, bem como o mecanismo geral de transferência de massa da sonda. Portanto, a v foi variada, com cada dispositivo, de 50 a 250 mV s^{-1} , na presença de 1,0 mmol L^{-1} de ferrocenometanol e KCl 0,1 mol L^{-1} . Os voltamogramas podem ser observados na Figura 72A, e é possível notar que enquanto o pico catódico se desloca ligeiramente para potenciais mais negativos, sugerindo alguma pequena contribuição por adsorção, o pico anódico permanece aproximadamente no mesmo potencial em cada v , o que implica em um processo controlado principalmente por difusão, sem processos adsorptivos. A Figura 72B mostra o gráfico de dispersão de i vs. $v^{1/2}$, com um comportamento bastante linear para ambos os picos ($r^2_{\text{anod}} = 0,9869$, $r^2_{\text{catod}} = 0,9918$), sugerindo ainda que a difusão é o processo de transferência de massa que mais contribui para esta interação.

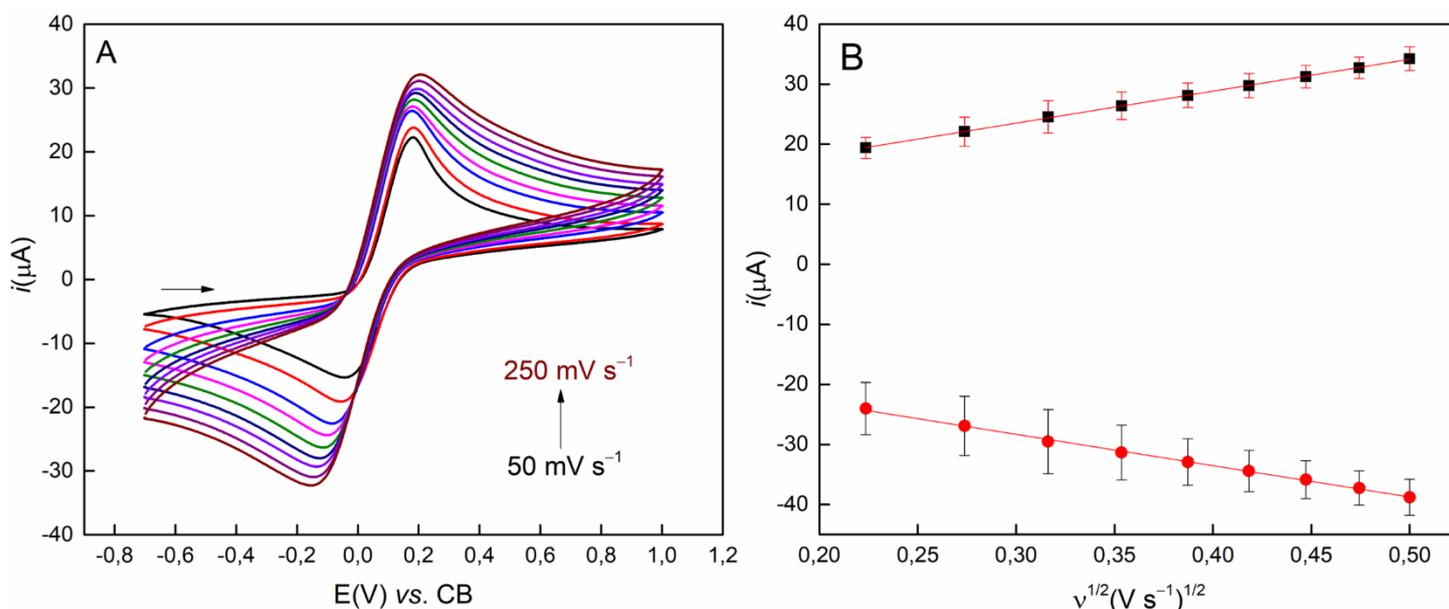


Figura 72. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por CB-PVA na presença de 1,0 mmol L^{-1} de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L^{-1} , com diferentes v , de 50 a 250 mV s^{-1} . (B) Correlação i vs. $v^{1/2}$

Os mesmos experimentos foram realizados para o eletrodo AuBi/CB-PVA, e os voltamogramas podem ser observados na Figura 73, na qual pode-se apontar que a presença dos metais fez com que ambos os potenciais de pico se deslocassem com o incremento da v em direção a potenciais mais positivos e negativos, respectivamente para os processos anódico e catódico. Isto sugere que a adsorção desempenha um papel no transporte de massa da sonda, mas a Figura 73B, a correlação i vs. $v^{1/2}$, deixa claro que a difusão ainda controla o sistema

global, com valores de r^2 bastante lineares: 0,9997 e 0,9982 para picos anódicos e catódicos, respectivamente.

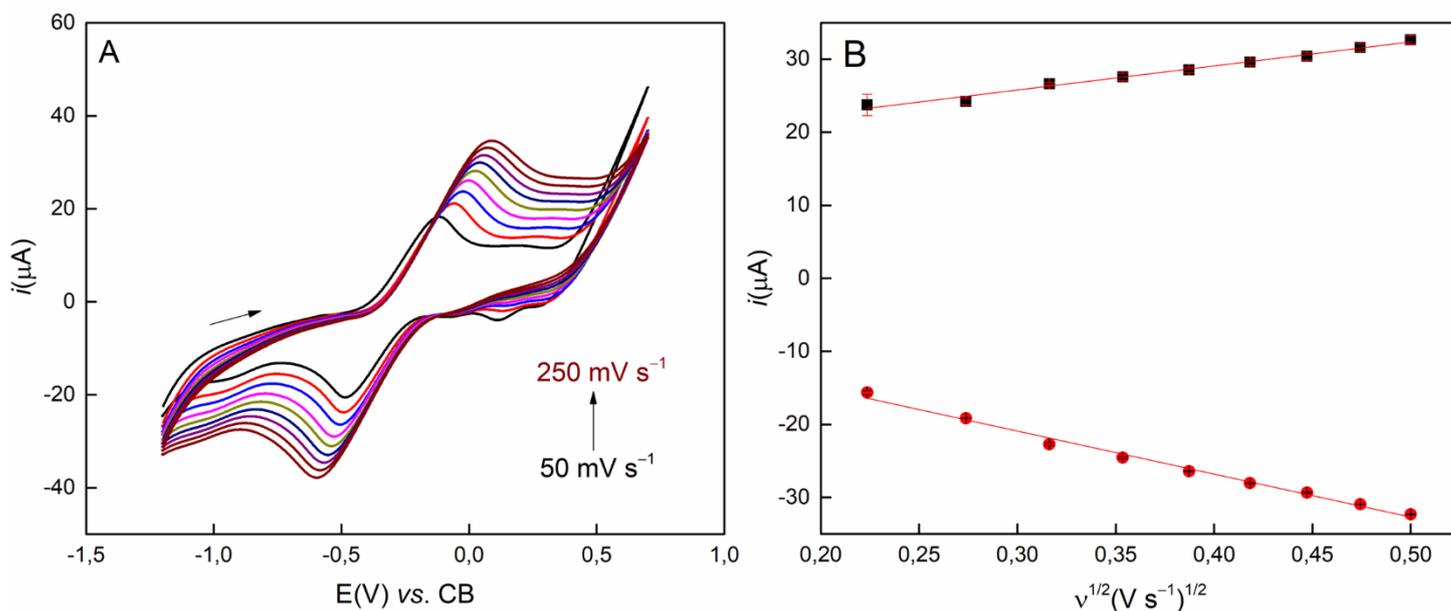


Figura 73. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos por AuBi/CB-PVA na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ferrocenometanol, em KCl 0,1 mol L⁻¹, com taxas de varredura variadas, de 50 a 250 mV s⁻¹. (B) correlação i vs. $v^{1/2}$

A equação de Randles-Ševčík (Eq. 16) pode ser empregada para estimar a A de cada dispositivo, aproveitando especialmente os dados coletados até o momento. Portanto, ambos os sistemas foram submetidos a este cálculo, resultando nos respectivos valores de 0,062 e 0,070 cm² para CB-PVA e AuBi/CB-PVA, respectivamente. Esses valores correspondem, respectivamente, a 49 e 56% da área geométrica do aparelho, 0,1257 cm².

A constante heterogênea de transferência de elétrons, k^0 é um parâmetro cinético que pode ser usado para investigar as mudanças de uma determinada superfície, pois se correlaciona diretamente com a taxa de reações eletrônicas do eletrodo [287, 288]. Sistemas *quasi*-reversíveis, como estes, podem ser investigados com a equação de Nicholson-Shain, mais especificamente, com a aproximação alcançada por Lavagnini *et al.* [287]. Primeiramente, precisamos encontrar o parâmetro cinético Ψ , obtido pela seguinte equação (Eq. 20):

$$\Psi = \frac{-0.6288 + 0.0021 * \Delta E (mV)}{1 - 0.0017 * \Delta E (mV)} \quad \text{Eq. 20}$$

com o valor conhecido, Ψ pode ser usado diretamente na seguinte equação (Eq. 21), para identificar k^0 :

$$\Psi = k^0 \left(\frac{\pi D n F v}{RT} \right)^{-1/2} \quad \text{Eq. 21}$$

em que k^0 é a constante heterogênea de transferência de elétrons, dada em cm s^{-1} , D é o coeficiente de difusão ($7,6 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, [289, 290]), n é o número de elétrons participantes da reação, F é a constante de Faraday, v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) e R e T têm seu significado usual, a constante universal dos gases e a temperatura em Kelvin. Portanto, os valores calculados para a constante são os seguintes: $k^0_{\text{CB-PVA}} = 1,15 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ e $k^0_{\text{AuBi/CB-PVA}} = 6,78 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$. Isto sugere que, com um k^0 maior, o eletrodo CB-PVA atingirá o equilíbrio mais rapidamente, mas ambos ainda apresentam valores característicos de sistemas *quasi-reversíveis* [288], corroborando o que foi encontrado anteriormente. Observe, entretanto, que a adição dos metais está mudando o comportamento para um sistema mais irreversível (k^0 inferior [288]), como também foi visto em estudos de voltametrias cíclicas.

A EIE foi utilizada para caracterizar os dispositivos quanto às suas capacidades capacitivas e resistivas na interação interfacial entre solução e superfície. Esses experimentos também foram realizados na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. O OCP de cada sistema de três eletrodos foi mensurado durante 5 min, para garantir a estabilização, e os valores encontrados foram aplicados em onda senoidal, com amplitude de 10 mV. Para CB-PVA, o OCP correspondeu a $-3,0 \text{ mV}$, enquanto para AuBi/CB-PVA esse valor foi -39 mV . Essa discrepância provavelmente está relacionada à carga superficial e energia de cada dispositivo e à forma como os materiais interagem com a sonda e o eletrólito. A Figura 74 mostra os diagramas de Nyquist (Figura 74A) e os gráficos de Bode (Figura 74B e C) obtidos, nos quais é observado um comportamento híbrido de resistor capacitivo para CB-PVA. Este é o perfil típico e esperado para um sensor eletroquímico, no qual um pico de capacitância é alcançado na etapa de transporte de massa controlada cineticamente (altas frequências), passando para uma transferência de massa principalmente difusional nas frequências mais baixas, controlada por um elemento de impedância semi-infinito: Warburg.

Nas frequências mais altas, ou seja, de 10^5 a 10^4 , o CB-PVA apresenta uma descarga de capacitância com resistência estática, o que é classificado como artefato pelos autores. Portanto, este segmento não foi utilizado para os cálculos de ajuste. Um pico de $-$ fase é observado em 10^3 Hz , em um máximo de 22° (impedância de $5,92 \text{ k}\Omega$), indicando um processo definido principalmente por fatores resistivos, pois a capacitância é consideravelmente baixa.

O circuito equivalente correspondente a este sistema é uma modificação do circuito de Randles, com termo para incluir o elemento Warburg, $[R([RW]Q)]$.

AuBi/CB-PVA promoveu uma mudança considerável no comportamento da interface, levando a um diagrama de Nyquist sem semicírculo e, portanto, nenhum pico de $-$ fase é observado. O mesmo tipo de circuito equivalente ($[R([RW]Q)]$) foi utilizado para ajustar os dados, sugerindo um R_{CT} de 634Ω , uma redução de cerca de 8 vezes devido à adição das estruturas metálicas. Além disso, os circuitos montados revelam que a exponencial do elemento de fase constante, N , é de aproximadamente 0,86 para CB-PVA e 1,1 para AuBi/CB-PVA, o que, corroborando com as imagens de MEV, confirma uma superfície mais metálica para este dispositivo enquanto indica que este fator (a modificação) é o principal responsável pela sua menor resistência.

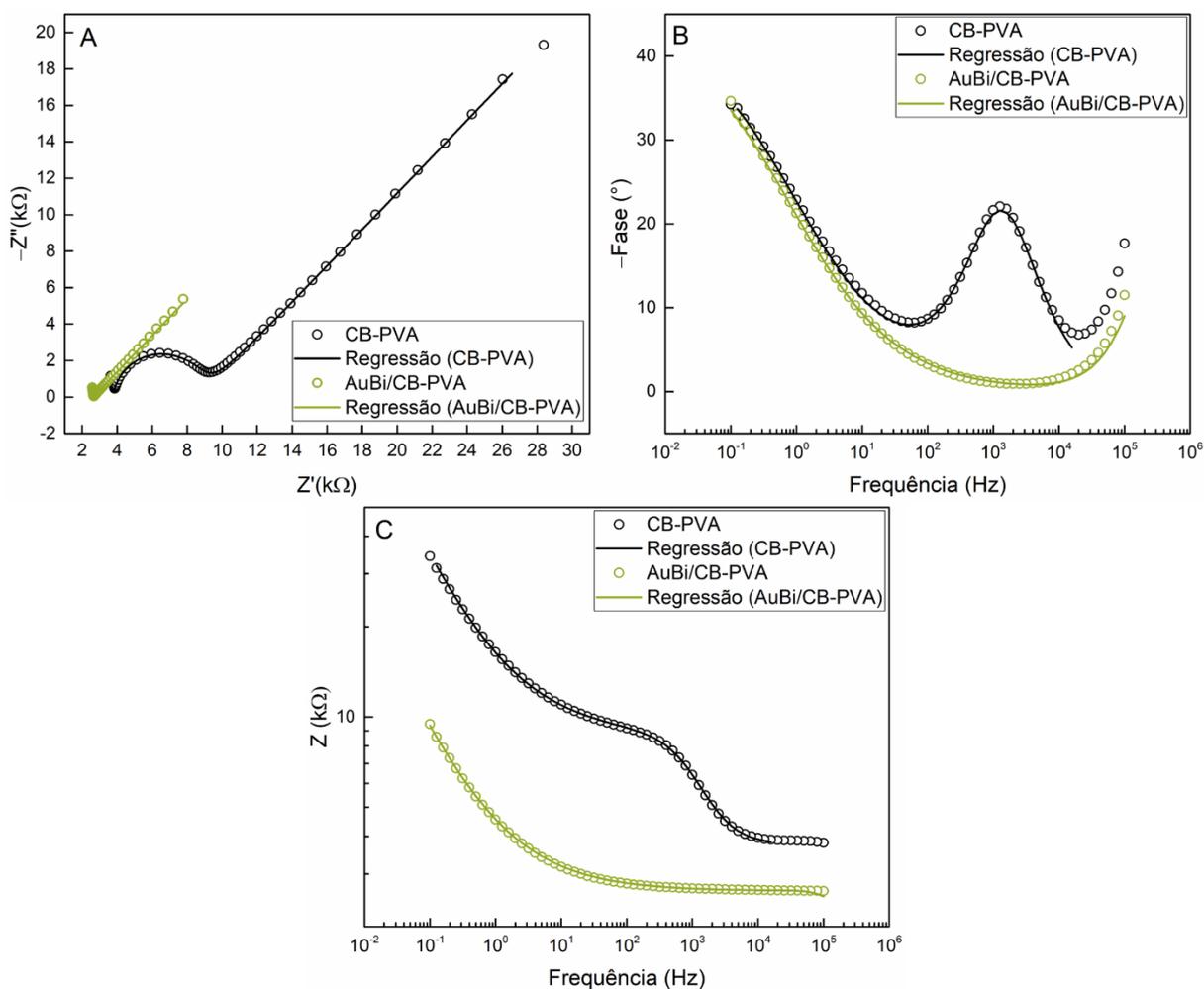


Figura 74. (A) Diagramas de Nyquist obtidos por CB-PVA (**preto**) e AuBi/CB-PVA (**dourado**) na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E_{\text{CB-PVA}} = -3,0 \text{ mV}$, $E_{\text{AuBi/CB-PVA}} = -39 \text{ mV}$. Gráficos de Bode de $-$ fase (B) ou Z (C) vs. frequência, obtidos por CB-

PVA (**preto**) e AuBi/CB-PVA (**dourado**) na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $E_{\text{CB-PVA}} = -3,0 \text{ mV}$, $E_{\text{AuBi/CB-PVA}} = -39 \text{ mV}$

Todos os dados confirmam que a interação entre Au e Bi é muito benéfica para a oxidação direta do EtOH, levando a incrementos de geração de corrente extremamente maiores, na faixa de 10^3 mais corrente gerada por mesma energia gasta e concentração de EtOH. Porém, esperava-se que o Bi facilitasse a reação anódica na varredura catódica, levando a uma maior vida útil do dispositivo, pois este é o processo associado à sua regeneração de superfície por dessorção de produtos. Infelizmente, nenhum dos resultados indica isso. Assim, desvia-se da ideia inicial, direcionando o dispositivo proposto para diferentes aplicações, principalmente aquelas que requerem alta produção de energia em um curto espaço de tempo.

14. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo obter uma proporção ideal entre partículas eletrodepositadas de Au e Bi sobre um eletrodo serigrafado, feito com uma tinta condutora de CB e PVA, preparada em laboratório. A otimização foi realizada com Planejamento de Experimentos: um planejamento fatorial completo 2^4 seguido de um planejamento de matriz do tipo Doehlert. Com o primeiro, foi possível entender que o potencial aplicado, na faixa estudada, não influenciou a resposta do dispositivo para oxidação do EtOH, sendo, portanto, fixado em $-0,8 \text{ V}$. O estudo com a matriz Doehlert revelou que a concentração de Au, o tempo de deposição e sua interação foram os principais fatores responsáveis pela alta geração de corrente. Porém, a interação da concentração de Bi com o tempo de deposição também desempenhou um papel importante no processo, desde que a concentração de Bi seja relativamente baixa, em torno de 6,0% do total de metais. Portanto, os parâmetros ótimos encontrados para este sistema são os seguintes: $C_{\text{Au}} = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $C_{\text{Bi}} = 0,15 \text{ mmol L}^{-1}$, tempo de eletrodeposição = 300 s e $E = -0,8 \text{ V}$. Esta configuração ótima promoveu um aumento de cerca de 103 vezes mais corrente quando comparado com o dispositivo modificado apenas com Au, principal catalisador do dispositivo. Porém, esperava-se que o Bi ajudasse na regeneração superficial de estruturas de Au, que sofrem fortes adsorções ao longo do processo catalítico. Este envenenamento não é mitigado na composição encontrada e, portanto, dificulta a aplicação do dispositivo como catalisador de célula a combustível. No entanto, os principais resultados obtidos apontam para aplicações que alta relação entre corrente gerada por energia consumida em curto período de tempo, uma vez que a modificação proposta tornou o dispositivo altamente atrativo para oxidação de EtOH nestes parâmetros.

15. CONCLUSÕES GERAIS

Esta pesquisa buscou investigar o uso de partículas metálicas para aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas, de diferentes formas, em momentos tentando unificar frentes diferentes de pesquisa, e em outros, mostrando tanto métodos corriqueiros das áreas, quanto aplicações não-convencionais, como espectroscopia de impedância eletroquímica não-faradáica.

O primeiro capítulo se trata da tentativa de desenvolver um material multifuncional: um eletrocatalisador ternário, que possa ser usado tanto para a oxidação de etanol em células à combustível alcalinas de processo direto, quanto para o sensoriamento de moléculas orgânicas. Dentre os materiais explorados, o catalisador Pd₅₀Ag₄₅Bi₀₅/C demonstrou uma eficiência, quando em análise de meia-célula, de quase 12,4 maior corrente e 16,5 vezes maior carga geradas. Em análises em célula à combustível real, a 70 °C, o dispositivo se mostrou de desempenho próximo ao catalisador Pd/C, mas, devido ao baixo custo do catalisador ternário, existe um incremento em custo benefício proporcionado pelo mesmo. Em seguida, este catalisador foi aplicado para a modificação de um eletrodo convencional, na detecção e determinação de dopamina, como prova de conceito. Nestas condições, o dispositivo foi capaz de responder linearmente para dois mecanismos distintos, também em faixas distintas de concentração: entre 0,2 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a dopamina é coordenada com os metais do catalisador, de modo que ocorra uma extinção do pico de óxidos metálicos, consumidos pelo grupo catecol; e entre 4,0 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que a dopamina é oxidada por uma transferência heterogênea de elétrons, como convencionalmente ocorre em eletrodos sistemas deste tipo.

O segundo trabalho traz a proposta de uma nova tinta condutora, feita com negro de fumo e poliacetato de vinila, para substituição de materiais mais convencionais como sensores eletroquímicos. A tinta apresenta características interessantes, como facilidade no preparo e aplicação, além de secagem relativamente rápida. Quando modificada com nanopartículas de Pd, o eletrodo de trabalho foi aplicado para a determinação de epinefrina, com resposta linear de 0,750 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 0,051 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este dispositivo também teve uma recuperação de 91,0 a 115% quando em amostras fortificadas de líquido cefalorraquiano sintético. Após, o eletrodo de trabalho foi modificado com camadas automontadas de componentes orgânicos, para a determinação de α -sinucleína. Com o incremento da resistência por interação entre o par imuno, a resposta do biossensor foi linear no intervalo de 1,5 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com LOD = 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para amostras preparadas em tampão fosfato e de 6,0 a 100,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com LOD de 1,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para com o preparo em amostras de soro de sangue humano.

O terceiro trabalho seguiu com a modificação da plataforma feita com a tinta do capítulo anterior, mas mudando-se a abordagem de interesse: a ideia foi a construção de um imunossensor de capacitância não-faradáico. As microfiores de ouro foram empregadas para a modificação da superfície de trabalho, uma vez que a contribuição com a capacitância eletroquímica poderia ser elevada com a variação da densidade de estados que partículas metálicas e de óxidos metálicos fornecem ao sistema. Também a partir de uma abordagem envolvendo monocamadas automontadas, a determinação de PARK7/DJ-1 foi possível. Com o devido preparo, o dispositivo respondeu linearmente entre a concentração do antígeno e a capacitância da superfície para a faixa de concentração de 20 a 120 ng mL⁻¹, com LOD de 0,207 ng mL⁻¹.

O quarto e último trabalho almejou encontrar uma proporção em que Bi pudesse ajudar estruturas de Au a oxidar etanol de maneira mais eficiente e com o mínimo de envenenamento possível. Utilizando-se de conhecimento prévio da literatura e uma extensa investigação experimental com Planejamento de Experimentos, foi possível encontrar uma proporção em que os metais funcionassem de modo sinérgico. Os dados tipos como ótimo foram 2,5 e 0,15 mmol L⁻¹ para as respectivas concentrações de Au e Bi, 300 s como tempo de deposição e potencial de deposição igual a -0,8 V. Esta configuração promoveu um aumento de 103 vezes na corrente gerada quando comparado ao Au/C puro, mas não encontramos uma configuração em que Bi fosse capaz de dificultar os processos de envenenamento do metal principal.

16. REFLEXÕES

Para o planejamento desta tese de doutorado, muitas questões foram levantadas. Ao longo do desenvolvimento destes trabalhos, logo, muitos problemas foram encontrados, e enfrentados. A ideia de se utilizar um mesmo material para duas frentes de pesquisa que não necessariamente se relacionam, apesar dos conceitos compartilhados da eletroquímica, foi prontamente questionada pelos revisores do periódico. Com a alegação de que o que estávamos fazendo não era ciência, tentaram recusar o aceite. Na visão compartilhada pelos autores, a ciência deve ser afrontosamente utilizada para derrubar as barreiras que protegem o *status quo*, sempre em direção ao progresso. Encontrar materiais multifuncionais parece uma abordagem mais científica do que nunca a fazer. Não significa que é uma tarefa fácil: embora o dispositivo tenha se provado relativamente eficiente em ambas as aplicações, não foi simples a interpretação dos dados de sensoriamento. A presença dos metais causa formação de óxidos,

que limitam a janela de trabalho do dispositivo. Uma análise de estabilidade era mais do que necessária, onde a instabilidade das partículas poderia causar uma resposta extremamente complexa e caótica. A interação com o analito também se mostrou intrigante, onde a formação e depois extinção dos picos dos óxidos metálicos foi de difícil discussão. Uma extensa investigação da literatura foi necessária para encontrar possíveis mecanismos que explicassem o fenômeno, como a coordenação proposta. Embora o trabalho tenha sido publicado, existem espaços para mais investigações acadêmicas neste e em materiais do tipo. Todavia, isso se mostra um fator pois não existem muitos estudos que exploram métodos mais complicados, e a resposta pode estar nas páginas de um outro documento com assuntos tangenciais a este, bastando com que sejam encontrados e estudados.

O desenvolvimento de novas tintas condutoras deve ser feito com muito cuidado, também. Não ter base teórica disso pode levar a tomadas de decisões equivocadas, como tentar usar solvente numa tinta que não precisaria, mas foi misturada de maneira errada, ou o limiar de percolação do material condutor, na viscosidade que o polímero apresenta, não foi respeitado. O uso de colas comerciais pode ser uma boa saída, mas estamos à mercê das indústrias, nunca sabendo de fato o que é o material que utilizamos. Assim, passa-se a ter uma contribuição limitada à área, mas que abre o espaço para futuras pesquisas envolvendo o desenvolvimento de matrizes poliméricas para o uso específico em tintas condutoras. Para tanto, deixo registrado que é de interesse da área manter uma viscosidade baixa, com tempo de cura inferior a 50 minutos. Assim, ela pode ser facilmente espalhada, podendo ter alteração de viscosidade com o incremento de massa dispersa na mesma, e pode secar num tempo hábil para a pesquisa. Não é necessário que uma alta quantidade de material condutor seja disperso na mesma para que ela tenha condução aceitável. A tinta desenvolvida e aqui descrita teve apenas 13% de sua massa em negro de fumo, por exemplo, e é de fácil preparo e manuseio, sendo uma atraente opção para o preparo de eletrodos.

Alternativas não faradáicas e sensores eletroquímicos para capacitância também são raros de encontrar na área. Embora suas aplicações sejam mais simples e rápidas que sistemas faradáico, dificulta-se a discussão por uma exigência maior de investigação teórica e matemática, além de uma falta de material, no geral. Convencionalmente, a regressão para um semicírculo é a abordagem utilizada para dados de impedância eletroquímica, mas quando se tem momentos de alta resistência ou capacitância, os dados brutos fogem da escala possível de trabalho em eletrólitos aquosos (de 10^6 a 10^{-2} Hz), tornando a extrapolação matemática rigidamente necessária e dando incerteza à quem investiga. Com a conversão do diagrama de

Nyquist para o de Cole-Cole, tem-se a oportunidade de se entender estes materiais mais complicados, voltando a discussão para a capacitância da superfície.

A eletrodeposição de metais, como explorado com Pd, Au e Bi, é uma ferramenta útil para a eletroquímica, mas precisa ser estudada com cuidado. Baixas concentrações de metais podem afetar muito o perfil do dispositivo, como apresentado, e o uso de metais pode encarecer a metodologia à ponto de inviabilizá-la. Aqui, uma ferramenta em ascensão é o Planejamento de Experimentos. Com análises estatísticas, pode-se observar que nem todos os experimentos de um ensaio univariado é útil, e comportamentos que antes impossíveis de se observar podem ser a chave para identificar uma combinação ótima. Um exemplo foi observado no quarto capítulo, onde AuBi/C foi cerca de 100 vezes mais eficiente que Au/C para a oxidação de etanol, e isso só foi possível devido ao modelamento matemático do comportamento do sistema, obtido com o Planejamento de Experimentos adequado. A partir do planejamento fatorial completo também foi possível perceber que, por exemplo, a concentração de Bi e o tempo de eletrodeposição tinham efeito sinérgico, porém negativo, indicando que estes parâmetros precisavam estar em condições opostas. Este tipo de discussão não é possível ajustando uma variável por vez.

Eletroquímica e eletroanalítica modernas são tópicos difíceis, com pouca discussão em cursos de graduação Brasil afora. Muito do conteúdo que se é aprendido pelos profissionais da área vem de um estudo intenso de materiais publicados, como este. O Brasil hoje é um forte expoente científico da área e muito se deve à publicações com tópicos relativos aos apresentados aqui. Logo, este documento se conclui como uma tentativa de incentivar futuras gerações, para que busquem respostas para seus resultados complexos, que **tragam** explorem as análises mais difíceis, das quais a maioria tenta se esquivar. Espera-se, por fim, que esta tese elucidie algumas técnicas, métodos e abordagens da eletroquímica, para aqueles que desejarem estudarem-na fervorosamente, como eu fiz dez anos atrás.

17. REFERÊNCIAS

- [1] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment, ACS Publications 2003.
- [2] Y. Zhang, R. Huang, X. Zhu, L. Wang, C. Wu, Synthesis, properties, and optical applications of noble metal nanoparticle-biomolecule conjugates, Chinese Science Bulletin, 57(2012) 238-46.
- [3] D.L. Fedlheim, C.A. Foss, Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications: CRC press; 2001.
- [4] N. Sankar, N. Mathew, C. Sobhan, Molecular dynamics modeling of thermal conductivity

enhancement in metal nanoparticle suspensions, *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 35(2008) 867-72.

[5] S. Bhatia, Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications, *Natural polymer drug delivery systems*, Springer2016, pp. 33-93.

[6] P. Alexandridis, Gold nanoparticle synthesis, morphology control, and stabilization facilitated by functional polymers, *Chemical Engineering & Technology*, 34(2011) 15-28.

[7] T.K. Sau, A.L. Rogach, Nonspherical noble metal nanoparticles: colloid-chemical synthesis and morphology control, *Advanced Materials*, 22(2010) 1781-804.

[8] C. Wang, W. Tian, Y. Ding, Y.-q. Ma, Z.L. Wang, N.M. Markovic, et al., Rational synthesis of heterostructured nanoparticles with morphology control, *Journal of the American Chemical Society*, 132(2010) 6524-9.

[9] C. Vauthier, K. Bouchemal, Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharmaceutical research*, 26(2009) 1025-58.

[10] J.M. Chan, P.M. Valencia, L. Zhang, R. Langer, O.C. Farokhzad, Polymeric nanoparticles for drug delivery, *Cancer Nanotechnology*, Springer2010, pp. 163-75.

[11] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C.J.C. Yadav, s.B. biointerfaces, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*, 75(2010) 1-18.

[12] B. Yuan, P. Sun, L.-j. Zhao, D. Zhang, Y. Zhang, C. Qi, et al., Pd nanoparticles supported on 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione modified graphene oxide as superior bifunctional electrocatalyst for highly sensitive sensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 861(2020) 113945.

[13] S.J. Saleem, M. Guler, Electroanalytical determination of paracetamol using Pd nanoparticles deposited on carboxylated graphene oxide modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 31(2019) 2187-98.

[14] C. Kp, V.S. Bhat, T. Maiyalagan, G. Hegde, A. Varghese, L. George, Unique host matrix to disperse Pd nanoparticles for electrochemical sensing of morin: sustainable engineering approach, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(2020) 5264-73.

[15] P.B. Deroco, I.G. Melo, L.S.R. Silva, K.I.B. Eguiluz, G.R. Salazar-Banda, O. Fatibello-Filho, Carbon black supported Au-Pd core-shell nanoparticles within a dihexadecylphosphate film for the development of hydrazine electrochemical sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256(2018) 535-42.

[16] X. Luo, A. Morrin, A.J. Killard, M.R. Smyth, Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(2006) 319-26.

[17] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures, *Analytical chemistry*, 87(2014) 230-49.

[18] G. Maduraiveeran, W. Jin, Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 13(2017) 10-23.

[19] E.V. Suprun, A.L. Shilovskaya, A.V. Lisitsa, T.V. Bulko, V.V. Shumyantseva, A.I. Archakov, Electrochemical immunosensor based on metal nanoparticles for cardiac myoglobin

detection in human blood plasma, *Electroanalysis*, 23(2011) 1051-7.

[20] G. Liu, J. Wang, R. Barry, C. Petersen, C. Timchalk, P.L. Gassman, et al., Nanoparticle-Based Electrochemical Immunosensor for the Detection of Phosphorylated Acetylcholinesterase: An Exposure Biomarker of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents, *Chemistry—A European Journal*, 14(2008) 9951-9.

[21] M. Altun, M. Bilgi Kamaç, A. Bilgi, M. Yılmaz, Dopamine biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutral red and gold nanoparticle, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(2020) 451-67.

[22] V.Q. Khue, T.Q. Huy, V.N. Phan, A. Tuan-Le, D.T.T. Le, M. Tonezzer, et al., Electrochemical stability of screen-printed electrodes modified with Au nanoparticles for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Materials Chemistry and Physics*, 255(2020) 123562.

[23] Q.K. Vu, Q.H. Tran, N.P. Vu, T.-L. Anh, T.T. Le Dang, T. Matteo, et al., A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens, *Materials Today Communications*, 26(2021) 101726.

[24] M. Pandiaraj, N.K. Sethy, K. Bhargava, V. Kameswararao, C. Karunakaran, Designing label-free electrochemical immunosensors for cytochrome c using nanocomposites functionalized screen printed electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 54(2014) 115-21.

[25] T. Lopes, E. Antolini, E. Gonzalez, Carbon supported Pt–Pd alloy as an ethanol tolerant oxygen reduction electrocatalyst for direct ethanol fuel cells, *international journal of hydrogen energy*, 33(2008) 5563-70.

[26] A. Sheikh, P. Correa, E.L. da Silva, I. Savaris, S. Amico, C. Malfatti, Energy conversion using Pd-based catalysts in direct ethanol fuel cell, *RE&PQJ*, 11(2013) 300.

[27] L. Moraes, B. Matos, C. Radtke, E. Santiago, F. Fonseca, S. Amico, et al., Synthesis and performance of palladium-based electrocatalysts in alkaline direct ethanol fuel cell, *International journal of hydrogen energy*, 41(2016) 6457-68.

[28] J. Solla-Gullón, J.M. Feliu, State of the art in the electrochemical characterization of the surface structure of shape-controlled Pt, Au, and Pd nanoparticles, *Current Opinion in Electrochemistry*, 22(2020) 65-71.

[29] M. Han, S. Liu, J. Bao, Z. Dai, Pd nanoparticle assemblies—As the substitute of HRP, in their biosensing applications for H₂O₂ and glucose, *Biosensors and Bioelectronics*, 31(2012) 151-6.

[30] O.D. Renedo, M. Alonso-Lomillo, M.A. Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta*, 73(2007) 202-19.

[31] J. Wang, B. Tian, V.B. Nascimento, L. Angnes, Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks, *Electrochimica Acta*, 43(1998) 3459-65.

[32] A. Pietrikova, P. Lukacs, D. Jakubeczyova, B. Balloková, J. Potencki, G. Tomaszewski, et al., Surface analysis of polymeric substrates used for inkjet printing technology, *Circuit World*, 42(2016) 9-16.

[33] A. Pekarovicova, P.D. Fleming, Innovations in Ink and paper technology to improve printability: Pira international Ltd; 2005.

- [34] B.K. Park, D. Kim, S. Jeong, J. Moon, J.S. Kim, Direct writing of copper conductive patterns by ink-jet printing, *Thin solid films*, 515(2007) 7706-11.
- [35] B.-H. Jun, K.-J. Lee, H.-J. Cho, J.-W. Joung, Method for producing silver nanoparticles and conductive ink, Google Patents2009.
- [36] E. Antolini, Platinum-based ternary catalysts for low temperature fuel cells: Part I. Preparation methods and structural characteristics, *Applied Catalysis B: Environmental*, 74(2007) 324-36.
- [37] S.G. Silva, M.H. Assumpção, R.F. Souza, G.S. Buzzo, E.V. Spinacé, A.O. Neto, et al., Electrochemical and Fuel Cell Evaluation of PtIr/C Electrocatalysts for Ethanol Electrooxidation in Alkaline Medium, *Electrocatalysis*, 4(2014) 438-44.
- [38] J. Ribeiro, D. Dos Anjos, K.B. Kokoh, C. Coutanceau, J.-M. Léger, P. Olivi, et al., Carbon-supported ternary PtSnIr catalysts for direct ethanol fuel cell, *Electrochimica Acta*, 52(2007) 6997-7006.
- [39] M. Priya, S. Kiruthika, B. Muthukumaran, Mesoporous Carbon Supported Pt-Sn-W Ternary Electrocatalyst for Membraneless Ethanol Fuel cell, *JOURNAL OF MATERIALS*, 8(2017) 410-9.
- [40] E. Higuchi, T. Takase, M. Chiku, H. Inoue, Preparation of ternary Pt/Rh/SnO₂ anode catalysts for use in direct ethanol fuel cells and their electrocatalytic activity for ethanol oxidation reaction, *Journal of Power Sources*, 263(2014) 280-7.
- [41] J.C.M. Silva, M.H. Assumpção, P. Hammer, A.O. Neto, E.V. Spinacé, E.A. Baranova, Iridium– Rhodium Nanoparticles for Ammonia Oxidation: Electrochemical and Fuel Cell Studies, *ChemElectroChem*, 4(2017) 1101-7.
- [42] E. Antolini, Catalysts for direct ethanol fuel cells, *Journal of Power Sources*, 170(2007) 1-12.
- [43] M.H. Assumpção, R.M. Piasentin, P. Hammer, R.F. De Souza, G.S. Buzzo, M.C. Santos, et al., Oxidation of ammonia using PtRh/C electrocatalysts: fuel cell and electrochemical evaluation, *Applied Catalysis B: Environmental*, 174(2015) 136-44.
- [44] M. Assumpção, J. Nandenha, G. Buzzo, J. Silva, E. Spinacé, A. Neto, et al., The effect of ethanol concentration on the direct ethanol fuel cell performance and products distribution: A study using a single fuel cell/attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Power Sources*, 253(2014) 392-6.
- [45] E.S. Steigerwalt, G.A. Deluga, D.E. Cliffel, C. Lukehart, A Pt– Ru/graphitic carbon nanofiber nanocomposite exhibiting high relative performance as a direct-methanol fuel cell anode catalyst, *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(2001) 8097-101.
- [46] A. Hamnett, B. Kennedy, Bimetallic carbon supported anodes for the direct methanol-air fuel cell, *Electrochimica Acta*, 33(1988) 1613-8.
- [47] J.-H. Choi, K.-W. Park, I.-S. Park, W.-H. Nam, Y.-E. Sung, Methanol electro-oxidation and direct methanol fuel cell using Pt/Rh and Pt/Ru/Rh alloy catalysts, *Electrochimica Acta*, 50(2004) 787-90.
- [48] M. Götz, H. Wendt, Binary and ternary anode catalyst formulations including the elements W, Sn and Mo for PEMFCs operated on methanol or reformat gas, *Electrochimica Acta*, 43(1998) 3637-44.

- [49] A. Kowal, M. Li, M. Shao, K. Sasaki, M. Vukmirovic, J. Zhang, et al., Ternary Pt/Rh/SnO₂ electrocatalysts for oxidizing ethanol to CO₂, *Nature materials*, 8(2009) 325.
- [50] S. Shen, T. Zhao, J. Xu, Y. Li, High performance of a carbon supported ternary PdIrNi catalyst for ethanol electro-oxidation in anion-exchange membrane direct ethanol fuel cells, *Energy & Environmental Science*, 4(2011) 1428-33.
- [51] A. Lima, C. Coutanceau, J.-M. Léger, C. Lamy, Investigation of ternary catalysts for methanol electrooxidation, *Journal of applied electrochemistry*, 31(2001) 379-86.
- [52] K. Neyerlin, G. Bugosh, R. Forgie, Z. Liu, P. Strasser, Combinatorial study of high-surface-area binary and ternary electrocatalysts for the oxygen evolution reaction, *Journal of The Electrochemical Society*, 156(2009) B363-B9.
- [53] N.V. Long, Y. Yang, C.M. Thi, N. Van Minh, Y. Cao, M. Nogami, The development of mixture, alloy, and core-shell nanocatalysts with nanomaterial supports for energy conversion in low-temperature fuel cells, *Nano Energy*, 2(2013) 636-76.
- [54] M.M. Tusi, N.S. Polanco, S.G. da Silva, E.V. Spinacé, A.O. Neto, The high activity of PtBi/C electrocatalysts for ethanol electro-oxidation in alkaline medium, *Electrochemistry Communications*, 13(2011) 143-6.
- [55] T. Jurzinsky, C. Cremers, K. Pinkwart, J. Tübke, On the influence of Ag on Pd-based electrocatalyst for methanol oxidation in alkaline media: A comparative differential electrochemical mass spectrometry study, *Electrochimica Acta*, 199(2016) 270-9.
- [56] T.H. Oh, Gold-based bimetallic electrocatalysts supported on multiwalled carbon nanotubes for direct borohydride–hydrogen peroxide fuel cell, *Renewable Energy*, 163(2021) 930-8.
- [57] C. Jin, I. Taniguchi, Electrocatalytic activity of silver modified gold film for glucose oxidation and its potential application to fuel cells, *Materials Letters*, 61(2007) 2365-7.
- [58] K. Wang, Y. Ding, Carbon-free nanoporous gold based membrane electrocatalysts for fuel cells, *Progress in Natural Science: Materials International*, 30(2020) 775-86.
- [59] M.H. Naveen, R. Khan, J.H. Bang, Gold Nanoclusters as Electrocatalysts: Atomic Level Understanding from Fundamentals to Applications, *Chemistry of Materials*, 33(2021) 7595-612.
- [60] P. Rodriguez, M.T.M. Koper, Electrocatalysis on gold, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(2014) 13583-94.
- [61] P. Rodriguez, N. Garcia-Araez, M.T.M. Koper, Self-promotion mechanism for CO electrooxidation on gold, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(2010) 9373-80.
- [62] A. Cuesta, N. López, C. Gutiérrez, Electrolyte electroreflectance study of carbon monoxide adsorption on polycrystalline silver and gold electrodes, *Electrochimica acta*, 48(2003) 2949-56.
- [63] Y. Kwon, S.C.S. Lai, P. Rodriguez, M.T.M. Koper, Electrocatalytic oxidation of alcohols on gold in alkaline media: base or gold catalysis?, *Journal of the American Chemical Society*, 133(2011) 6914-7.
- [64] P. Rodriguez, Y. Kwon, M.T.M. Koper, The promoting effect of adsorbed carbon monoxide on the oxidation of alcohols on a gold catalyst, *Nature chemistry*, 4(2012) 177-82.

- [65] I.G. Casella, M. Gatta, M. Contursi, Oxidation of sugar acids on polycrystalline platinum and gold electrodes modified with adsorbed bismuth oxide adlayers, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 561(2004) 103-11.
- [66] L.A. Larew, D.C. Johnson, Concentration dependence of the mechanism of glucose oxidation at gold electrodes in alkaline media, *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, 262(1989) 167-82.
- [67] Y. Xia, W. Huang, J. Zheng, Z. Niu, Z. Li, Nonenzymatic amperometric response of glucose on a nanoporous gold film electrode fabricated by a rapid and simple electrochemical method, *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2011) 3555-61.
- [68] X. Ren, Q. Lv, L. Liu, B. Liu, Y. Wang, A. Liu, et al., Current progress of Pt and Pt-based electrocatalysts used for fuel cells, *Sustainable Energy & Fuels*, 4(2020) 15-30.
- [69] L. Yaqoob, T. Noor, N. Iqbal, A comprehensive and critical review of the recent progress in electrocatalysts for the ethanol oxidation reaction, *RSC advances*, 11(2021) 16768-804.
- [70] X. Gong, L. Peng, X. Wang, L. Wu, Y. Liu, Duckweed derived nitrogen self-doped porous carbon materials as cost-effective electrocatalysts for oxygen reduction reaction in microbial fuel cells, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(2020) 15336-45.
- [71] F.M. Cuevas-Muñiz, M. Guerra-Balcázar, F. Castaneda, J. Ledesma-García, L.G. Arriaga, Performance of Au and AuAg nanoparticles supported on Vulcan in a glucose laminar membraneless microfuel cell, *Journal of Power Sources*, 196(2011) 5853-7.
- [72] G. Xing, L. Wang, H. Fu, Advanced Research Progress on High-Efficient Utilization of Pt Electrocatalysts in Fuel Cells, *Energy Technology*, 9(2021) 2100227.
- [73] Z. Kong, D. Zhang, Y. Lu, C. Yang, S. Du, W. Li, et al., Advanced Cathode Electrocatalysts for Fuel Cells: Understanding, Construction, and Application of Carbon-Based and Platinum-Based Nanomaterials, *ACS Materials Letters*, 3(2021) 1610-34.
- [74] F.S. Lima, E.H. Fontes, J. Nandenha, R.F.B. de Souza, A.O. Neto, Addition of bismuth to Pt and Pd for electric power generation with selective cogeneration of acetate from ethanol in a fuel cell type reactor, *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 49(2021) 1540-8.
- [75] X. Ning, X. Zhou, J. Luo, L. Ma, X. Xu, L. Zhan, Effects of the Synthesis Method and Promoter Content on Bismuth-Modified Platinum Catalysts in the Electro-oxidation of Glycerol and Formic Acid, *ChemElectroChem*, 6(2019) 1870-7.
- [76] A.O. Neto, M.M. Tusi, N.S. de Oliveira Polanco, S.G. Da Silva, M.C. Dos Santos, E.V. Spinace, PdBi/C electrocatalysts for ethanol electro-oxidation in alkaline medium, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(2011) 10522-6.
- [77] N. Rogozhnikov, Quantum-Chemical Study of the Adsorption of Bi³⁺ Ions on Au (111), *Russian Journal of Electrochemistry*, 54(2018) 1201-8.
- [78] H.M. Mohamed, Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82(2016) 1-11.
- [79] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, Bismuth-coated screen-printed electrodes for stripping voltammetric measurements of trace lead, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 13(2001) 13-6.
- [80] A. Hayat, J.L. Marty, Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for

environmental monitoring, *Sensors*, 14(2014) 10432-53.

[81] U. Bilitewski, G. Chemnitz, P. Rüger, R. Schmid, Miniaturized disposable biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 7(1992) 351-5.

[82] S. Cinti, F. Santella, D. Moscone, F. Arduini, Hg²⁺ detection using a disposable and miniaturized screen-printed electrode modified with nanocomposite carbon black and gold nanoparticles, *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2016) 8192-9.

[83] I.A. de Araujo Andreotti, L.O. Orzari, J.R. Camargo, R.C. Faria, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, et al., Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink, *J Electroanal Chem*, (2019).

[84] C. Welch, C. Banks, A. Simm, R. Compton, Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382(2005) 12-21.

[85] R.P. Deo, J. Wang, Electrochemical detection of carbohydrates at carbon-nanotube modified glassy-carbon electrodes, *Electrochemistry communications*, 6(2004) 284-7.

[86] J. Wang, L.D. Hutchins, Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment, *Analytica Chimica Acta*, 167(1985) 325-34.

[87] T. Gan, C. Hu, Z. Chen, S. Hu, A disposable electrochemical sensor for the determination of indole-3-acetic acid based on poly (safranin T)-reduced graphene oxide nanocomposite, *Talanta*, 85(2011) 310-6.

[88] Y. Lin, F. Lu, J. Wang, Disposable carbon nanotube modified screen-printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 16(2004) 145-9.

[89] A. Erdem, P. Papakonstantinou, H. Murphy, Direct DNA hybridization at disposable graphite electrodes modified with carbon nanotubes, *Analytical chemistry*, 78(2006) 6656-9.

[90] D. Sharp, R. Burkitt, Carbon materials for analytical electrochemistry: printed carbon materials and composites, *Materials Technology*, 30(2015) B155-B62.

[91] N. Jaiswal, I. Tiwari, Recent build outs in electroanalytical biosensors based on carbon-nanomaterial modified screen printed electrode platforms, *Analytical Methods*, 9(2017) 3895-907.

[92] J.S. Stefano, L.O. Orzari, H.A. Silva-Neto, V.N. de Ataíde, L.F. Mendes, W.K.T. Coltro, et al., Different approaches for fabrication of low-cost electrochemical sensors, *Current Opinion in Electrochemistry*, 32(2022) 100893.

[93] T.A. Silva, F.C. Moraes, B.C. Janegitz, O. Fatibello-Filho, Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review, *Journal of Nanomaterials*, 2017(2017).

[94] P.B. Deroco, B.C. Lourenco, O. Fatibello-Filho, The use of modified electrode with carbon black as sensor to the electrochemical studies and voltammetric determination of pesticide mesotrione, *Microchemical Journal*, 133(2017) 188-94.

[95] M. Santhiago, C.t.C. Corrêa, J.S. Bernardes, M.P. Pereira, L.J.M. Oliveira, M. Strauss, et al., Flexible and foldable fully-printed carbon black conductive nanostructures on paper for high-performance electronic, electrochemical, and wearable devices, *ACS applied materials &*

interfaces, 9(2017) 24365-72.

[96] F. Calegari, L.P. de Souza, M.M. Barsan, C.M.A. Brett, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, Construction and evaluation of carbon black and poly (ethylene co-vinyl) acetate (EVA) composite electrodes for development of electrochemical (bio) sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 253(2017) 10-8.

[97] F. Della Pelle, R. Di Battista, L. Vazquez, F.J. Palomares, M. Del Carlo, M. Sergi, et al., Press-transferred carbon black nanoparticles for class-selective antioxidant electrochemical detection, 9(2017) 29-36.

[98] K.P. Delgado, P.A. Raymundo-Pereira, A.M. Campos, O.N. Oliveira Jr, B.C. Janegitz, Ultralow cost electrochemical sensor made of potato starch and carbon black nanoballs to detect tetracycline in waters and milk, *Electroanalysis*, 30(2018) 2153-9.

[99] M. Ozawa, E. Ōsawa, Carbon blacks as the source materials for carbon nanotechnology, *Carbon Nanotechnology*, Elsevier2006, pp. 127-51.

[100] F.C. Vicentini, A.E. Ravanini, L.C.S. Figueiredo-Filho, J. Iniesta, C.E. Banks, O. Fatibello-Filho, Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms, *Electrochimica Acta*, 157(2015) 125-33.

[101] L. Vieira Jodar, L.O. Orzari, T. Storti Ortolani, M.H.M.T. Assumpção, F.C. Vicentini, B.C. Janegitz, Electrochemical sensor based on casein and carbon black for bisphenol A detection, *Electroanalysis*, 31(2019) 2162-70.

[102] F. Arduini, S. Cinti, V. Mazzaracchio, V. Scognamiglio, A. Amine, D. Moscone, Carbon black as an outstanding and affordable nanomaterial for electrochemical (bio) sensor design, *Biosensors and Bioelectronics*, 156(2020) 112033.

[103] D.C. de Souza, L.O. Orzari, P.R. de Oliveira, C. Kalinke, J.A. Bonacin, O. Malaspina, et al., Electrochemical sensor based on beeswax and carbon black thin biofilms for determination of paraquat in apis mellifera honey, *Food Analytical Methods*, 14(2021) 606-15.

[104] H. Qi, B.r. Schulz, T. Vad, J. Liu, E. Mäder, G. Seide, et al., Novel carbon nanotube/cellulose composite fibers as multifunctional materials, *ACS applied materials interfaces*, 7(2015) 22404-12.

[105] L. Nicole, C. Laberty-Robert, L. Rozes, C. Sanchez, Hybrid materials science: a promised land for the integrative design of multifunctional materials, *Nanoscale*, 6(2014) 6267-92.

[106] Y. Zhang, Y. Shen, J. Yuan, D. Han, Z. Wang, Q. Zhang, et al., Design and synthesis of multifunctional materials based on an ionic-liquid backbone, *Angewandte Chemie*, 118(2006) 5999-6002.

[107] M. Ko, L. Mendecki, K.A. Mirica, Conductive two-dimensional metal-organic frameworks as multifunctional materials, *Chemical Communications*, 54(2018) 7873-91.

[108] G. Pacchioni, Two-dimensional oxides: Multifunctional materials for advanced technologies, *Chemistry-A European Journal*, 18(2012) 10144-58.

[109] P.W. Menezes, A. Indra, N.R. Sahraie, A. Bergmann, P. Strasser, M. Driess, Cobalt-manganese-based spinels as multifunctional materials that unify catalytic water oxidation and oxygen reduction reactions, *ChemSusChem*, 8(2015) 164-71.

- [110] A. Gómez-Avilés, M. Darder, P. Aranda, E. Ruiz-Hitzky, Multifunctional materials based on graphene-like/sepiolite nanocomposites, *Applied Clay Science*, 47(2010) 203-11.
- [111] J.L. Durham, A.S. Poyraz, E.S. Takeuchi, A.C. Marschilok, K.J. Takeuchi, Impact of multifunctional bimetallic materials on lithium battery electrochemistry, *Accounts of Chemical Research*, 49(2016) 1864-72.
- [112] L.R. Schoukroun-Barnes, S. Wagan, R.J. White, Enhancing the analytical performance of electrochemical RNA aptamer-based sensors for sensitive detection of aminoglycoside antibiotics, *Analytical chemistry*, 86(2014) 1131-7.
- [113] M. Santhiago, M. Strauss, M.P. Pereira, A.i.S. Chagas, C.C. Bufon, Direct drawing method of graphite onto paper for high-performance flexible electrochemical sensors, *ACS Applied Materials Interfaces*, 9(2017) 11959-66.
- [114] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures, *Analytical chemistry*, 87(2015) 230-49.
- [115] A. Wieckowski, *Fuel cell catalysis: a surface science approach*: John Wiley & Sons; 2009.
- [116] I.E. Stephens, A.S. Bondarenko, U. Grønbjerg, J. Rossmeisl, I. Chorkendorff, Understanding the electrocatalysis of oxygen reduction on platinum and its alloys, *Energy Environmental Science*, 5(2012) 6744-62.
- [117] F. Zhu, J. Kim, K.-C. Tsao, J. Zhang, H. Yang, Recent development in the preparation of nanoparticles as fuel cell catalysts, *Current Opinion in Chemical Engineering*, 8(2015) 89-97.
- [118] V. Mazumder, Y. Lee, S. Sun, Recent development of active nanoparticle catalysts for fuel cell reactions, *Advanced Functional Materials*, 20(2010) 1224-31.
- [119] N.Q. Minh, High-temperature fuel cells, *Chemtech*, 21(1991) 120-6.
- [120] R. Baldwin, M. Pham, A. Leonida, J. McElroy, T. Nalette, Hydrogen \square oxygen proton-exchange membrane fuel cells and electrolyzers, *Journal of power sources*, 29(1990) 399-412.
- [121] M. Weber, J.T. Wang, S. Wasmus, R. Savinell, Formic Acid Oxidation in a Polymer Electrolyte Fuel Cell A Real-Time Mass-Spectrometry Study, *Journal of the Electrochemical Society*, 143(1996) L158-L60.
- [122] X. Wang, J.-M. Hu, I.-M. Hsing, Electrochemical investigation of formic acid electro-oxidation and its crossover through a Nafion[®] membrane, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 562(2004) 73-80.
- [123] O. Muneeb, E. Do, D. Boyd, J. Perez, J.L. Haan, PdCu/C anode catalysts for the alkaline ascorbate fuel cell, *Applied energy*, 235(2019) 473-9.
- [124] A. Hamnett, Mechanism and electrocatalysis in the direct methanol fuel cell, *Catalysis today*, 38(1997) 445-57.
- [125] S. Wasmus, A. Küver, Methanol oxidation and direct methanol fuel cells: a selective review, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 461(1999) 14-31.
- [126] H. Liu, C. Song, L. Zhang, J. Zhang, H. Wang, D.P. Wilkinson, A review of anode catalysis in the direct methanol fuel cell, *Journal of Power Sources*, 155(2006) 95-110.
- [127] A. Arico, P. Creti, P. Antonucci, V. Antonucci, Comparison of ethanol and methanol oxidation in a liquid-feed solid polymer electrolyte fuel cell at high temperature,

Electrochemical and Solid-State Letters, 1(1998) 66-8.

[128] H. Hou, G. Sun, R. He, Z. Wu, B. Sun, Alkali doped polybenzimidazole membrane for high performance alkaline direct ethanol fuel cell, *Journal of Power Sources*, 182(2008) 95-9.

[129] S. Rousseau, C. Coutanceau, C. Lamy, J.-M. Léger, Direct ethanol fuel cell (DEFC): electrical performances and reaction products distribution under operating conditions with different platinum-based anodes, *Journal of Power Sources*, 158(2006) 18-24.

[130] C. Lamy, S. Rousseau, E. Belgsir, C. Coutanceau, J.-M. Léger, Recent progress in the direct ethanol fuel cell: development of new platinum–tin electrocatalysts, *Electrochimica Acta*, 49(2004) 3901-8.

[131] D. Larcher, J.-M. Tarascon, Towards greener and more sustainable batteries for electrical energy storage, *Nature chemistry*, 7(2015) 19-29.

[132] N. Mariotti, M. Bonomo, L. Fagiolari, N. Barbero, C. Gerbaldi, F. Bella, et al., Recent advances in eco-friendly and cost-effective materials towards sustainable dye-sensitized solar cells, *Green chemistry*, 22(2020) 7168-218.

[133] T. Gebretsadik, T. Belayneh, S. Gebremichael, W. Linert, M. Thomas, T. Berhanu, Recent advances in and potential utilities of paper-based electrochemical sensors: beyond qualitative analysis, *Analyst*, 144(2019) 2467-79.

[134] W. Mazurkiewicz, M. Podrażka, E. Jarosińska, K. Kappalakandy Valapil, M. Wiloch, M. Jönsson-Niedziółka, et al., Paper-Based Electrochemical Sensors and How to Make Them (Work), *ChemElectroChem*, 7(2020) 2939-56.

[135] J.R. Camargo, L.O. Orzari, D.A.G. Araujo, P.R. de Oliveira, C. Kalinke, D.P. Rocha, et al., Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors, *Microchemical Journal*, 164(2021) 105998.

[136] T.P. Lisboa, L.V. de Faria, G.F. Alves, M.A.C. Matos, R.C. Matos, Development of paper devices with conductive inks for sulfanilamide electrochemical determination in milk, synthetic urine, and environmental and pharmaceutical samples, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 25(2021) 2301-8.

[137] Y. Tang, Y. Zhang, X. Rui, D. Qi, Y. Luo, W.R. Leow, et al., Conductive inks based on a lithium titanate nanotube gel for high-rate lithium-ion batteries with customized configuration, *Advanced Materials*, 28(2016) 1567-76.

[138] J. Kim, R. Kumar, A.J. Bandodkar, J. Wang, Advanced materials for printed wearable electrochemical devices: A review, *Advanced Electronic Materials*, 3(2017) 1600260.

[139] L.O. Orzari, R.C. de Freitas, I.A. de Araujo Andreotti, A. Gatti, B.C. Janegitz, A novel disposable self-adhesive inked paper device for electrochemical sensing of dopamine and serotonin neurotransmitters and biosensing of glucose, *Biosensors and Bioelectronics*, 138(2019) 111310.

[140] I.A. de Araujo Andreotti, L.O. Orzari, J.R. Camargo, R.C. Faria, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, et al., Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840(2019) 109-16.

[141] C. Pijolat, 16 - Screen-printing for the fabrication of solid oxide fuel cells (SOFC), in: M. Prudenziati, J. Hormadaly (Eds.), *Printed Films*, Woodhead Publishing 2012, pp. 469-95.

- [142] N. Marković, F. Conzuelo, J. Szczesny, M.B. González García, D. Hernández Santos, A. Ruff, et al., An Air-breathing Carbon Cloth-based Screen-printed Electrode for Applications in Enzymatic Biofuel Cells, *Electroanalysis*, 31(2019) 217-21.
- [143] A. Kamyshny, S. Magdassi, Conductive nanomaterials for printed electronics, *Small*, 10(2014) 3515-35.
- [144] Y. Meng, T. Ma, F.J. Pavinatto, J.D. MacKenzie, Interface modified flexible printed conductive films via Ag₂O nanoparticle decorated Ag flake inks, *ACS applied materials & interfaces*, 11(2019) 9190-6.
- [145] T.S. Tran, N.K. Dutta, N.R. Choudhury, Graphene inks for printed flexible electronics: graphene dispersions, ink formulations, printing techniques and applications, *Advances in colloid and interface science*, 261(2018) 41-61.
- [146] J.R. Camargo, T.A. Silva, G.A. Rivas, B.C. Janegitz, Novel eco-friendly water-based conductive ink for the preparation of disposable screen-printed electrodes for sensing and biosensing applications, *Electrochimica Acta*, (2022) 139968.
- [147] L.A. Pradela-Filho, I.A. Andreotti, J.H. Carvalho, D.A. Araújo, L.O. Orzari, A. Gatti, et al., Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors, *Sensors Actuators B: Chemical*, 305(2020) 127433.
- [148] J.M. Henrique, J.R. Camargo, G.G. de Oliveira, J.S. Stefano, B.C. Janegitz, Disposable electrochemical sensor based on shellac and graphite for sulfamethoxazole detection, *Microchemical Journal*, 170(2021) 106701.
- [149] J.-Y. Yoon, *Introduction to biosensors: from electric circuits to immunosensors*: Springer; 2016.
- [150] F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi, A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors, *Electrochimica Acta*, 84(2012) 74-83.
- [151] P. Skládal, Advances in electrochemical immunosensors, *Electroanalysis*, 9(1997) 737-45.
- [152] S.A. Lim, M.U. Ahmed, Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: A review, *RSC advances*, 6(2016) 24995-5014.
- [153] F.S. Felix, L. Angnes, Electrochemical immunosensors—a powerful tool for analytical applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 102(2018) 470-8.
- [154] X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang, Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review, *Analytica chimica acta*, 758(2013) 1-18.
- [155] K.K. Mistry, K. Layek, A. Mahapatra, C. RoyChaudhuri, H. Saha, A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes, *Analyst*, 139(2014) 2289-311.
- [156] K. Mahato, S. Kumar, A. Srivastava, P.K. Maurya, R. Singh, P. Chandra, Electrochemical immunosensors: fundamentals and applications in clinical diagnostics, *Handbook of immunoassay technologies*, Elsevier2018, pp. 359-414.
- [157] K.M. Slagle, S.J. Ghosn, Immunoassays: tools for sensitive, specific, and accurate test results, *Laboratory medicine*, 27(1996) 177-83.

- [158] G. Liu, Y. Lin, Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays, *Talanta*, 74(2007) 308-17.
- [159] M. Yang, H. Li, A. Javadi, S. Gong, Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as labels for the preparation of ultrasensitive electrochemical immunosensors, *Biomaterials*, 31(2010) 3281-6.
- [160] L. Yuan, W. Wei, S. Liu, Label-free electrochemical immunosensors based on surface-initiated atom radical polymerization, *Biosensors and Bioelectronics*, 38(2012) 79-85.
- [161] K. Mao, D. Wu, Y. Li, H. Ma, Z. Ni, H. Yu, et al., Label-free electrochemical immunosensor based on graphene/methylene blue nanocomposite, *Analytical biochemistry*, 422(2012) 22-7.
- [162] Q. Wei, K. Mao, D. Wu, Y. Dai, J. Yang, B. Du, et al., A novel label-free electrochemical immunosensor based on graphene and thionine nanocomposite, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149(2010) 314-8.
- [163] J. Huang, G. Yang, W. Meng, L. Wu, A. Zhu, X.a. Jiao, An electrochemical impedimetric immunosensor for label-free detection of *Campylobacter jejuni* in diarrhea patients' stool based on O-carboxymethylchitosan surface modified Fe₃O₄ nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 25(2010) 1204-11.
- [164] A. Hayat, L. Barthelmebs, J.-L. Marty, Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of okadaic acid in mussel sample, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171(2012) 810-5.
- [165] F.C. Fernandes, A. Santos, D.C. Martins, M.S. Góes, P.R. Bueno, Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures, *Biosensors and Bioelectronics*, 57(2014) 96-102.
- [166] J. Parkinson, An essay on the shaking palsy. 1817, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14(2002) 223-36; discussion 2.
- [167] W. Poewe, K. Seppi, C.M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkman, et al., Parkinson disease, *Nature reviews Disease primers*, 3(2017) 17013.
- [168] F. Sixel-Döring, E. Trautmann, B. Mollenhauer, C. Trenkwalder, Associated factors for REM sleep behavior disorder in Parkinson disease, *Neurology*, 77(2011) 1048-54.
- [169] R. Mayeux, Y. Stern, J. Rosen, J. Leventhal, Depression, intellectual impairment, and Parkinson disease, *Neurology*, 31(1981) 645-.
- [170] L.B. Quagliato, M.A. Viana, E.M.A.B. Quagliato, S. Simis, Olfactory Dysfunction In Parkinson's Disease [alterações Do Olfato Na Doença De Parkinson], *Arquivos de neuro-psiquiatria*, (2007).
- [171] D. Iacono, M. Geraci-Erck, M.L. Rabin, C.H. Adler, G. Serrano, T.G. Beach, et al., Parkinson disease and incidental Lewy body disease: just a question of time?, *Neurology*, 85(2015) 1670-9.
- [172] A.A. Dijkstra, P. Voorn, H.W. Berendse, H.J. Groenewegen, N.B. Bank, A.J. Rozemuller, et al., Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and Parkinson's disease, *Movement disorders*, 29(2014) 1244-51.
- [173] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R.A. De Vos, E.N.J. Steur, E. Braak, Staging of brain

- pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiology of aging*, 24(2003) 197-211.
- [174] D. Twelves, K.S. Perkins, C. Counsell, Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease, *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 18(2003) 19-31.
- [175] R. Savica, B.R. Grossardt, J.H. Bower, J.E. Ahlskog, W.A. Rocca, Incidence and pathology of synucleinopathies and tauopathies related to parkinsonism, *JAMA neurology*, 70(2013) 859-66.
- [176] S.K. Van Den Eeden, C.M. Tanner, A.L. Bernstein, R.D. Fross, A. Leimpeter, D.A. Bloch, et al., Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity, *American journal of epidemiology*, 157(2003) 1015-22.
- [177] B. Pinter, A. Diem-Zangerl, G.K. Wenning, C. Scherfler, W. Oberger, K. Seppi, et al., Mortality in Parkinson's disease: a 38-year follow-up study, *Movement Disorders*, 30(2015) 266-9.
- [178] E. Dorsey, R. Constantinescu, J. Thompson, K. Biglan, R. Holloway, K. Kieburtz, et al., Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, *Neurology*, 68(2007) 384-6.
- [179] D. Morens, J. Davis, A. Grandinetti, G. Ross, J. Popper, L. White, Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men, *Neurology*, 46(1996) 1044-50.
- [180] A. Elbaz, L. Carcaillon, S. Kab, F. Moisan, Epidemiology of Parkinson's disease, *Revue neurologique*, 172(2016) 14-26.
- [181] I.B.D.G.E.E. IBGE, Projeções da População. Brasil e Unidades da Federação, IBGE, Rio de Janeiro, 2013.
- [182] A. Ascherio, M.A. Schwarzschild, The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention, *The Lancet Neurology*, 15(2016) 1257-72.
- [183] Q. Xu, H. Cheng, J. Lehr, A.V. Patil, J.J. Davis, Graphene oxide interfaces in serum based autoantibody quantification, *Analytical chemistry*, 87(2014) 346-50.
- [184] R. Barbour, K. Kling, J.P. Anderson, K. Banducci, T. Cole, L. Diep, et al., Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood, *Neurodegenerative Diseases*, 5(2008) 55-9.
- [185] W.P. Gai, L.B. Geffen, L. Denoroy, W.W. Blessing, Loss of C1 and C3 epinephrine-synthesizing neurons in the medulla oblongata in Parkinson's disease, *Annals of neurology*, 33(1993) 357-67.
- [186] M. Buleandră, D.E. Popa, I.G. David, A.A. Ciucu, A simple and efficient cyclic square wave voltammetric method for simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine using an activated pencil graphite electrode, *Microchemical Journal*, 160(2021) 105621.
- [187] E. Wierzbicka, G.D. Sulka, Fabrication of highly ordered nanoporous thin Au films and their application for electrochemical determination of epinephrine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222(2016) 270-9.
- [188] N.H. Arani, S.M. Ghoreishi, A. Khoobi, Increasing the electrochemical system performance using a magnetic nanostructured sensor for simultaneous determination of L-

tyrosine and epinephrine, *Analytical Methods*, 11(2019) 1192-8.

[189] E. Eldrup, P. Mogensen, J. Jacobsen, H. Pakkenberg, N.J. Christensen, CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease, *Acta neurologica scandinavica*, 92(1995) 116-21.

[190] R.A. McPherson, M.R. Pincus, *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-book: Elsevier Health Sciences*; 2021.

[191] R. Hou, A.M. Leathersich, B.T. Ruud, Pheochromocytoma presenting with arterial and intracardiac thrombus in a 47-year-old woman: a case report, *Journal of Medical Case Reports*, 5(2011) 1-7.

[192] A. Cerqueira, T. Seco, A. Costa, M. Tavares, J. Cotter, Pheochromocytoma and paraganglioma: a review of diagnosis, management and treatment of rare causes of hypertension, *Cureus*, 12(2020).

[193] C. Diamandis, R. Honda, F. Rocha, A. Shirazi, How to reduce endogenous adrenaline synthesis in patients with a dysfunctional renal medulla using an APZ-BMZ-DXM combination therapy-preliminary report, (2023).

[194] P. Wichit, S. Thanprasertsuk, T. Hopetrungraung, O. Phokaewvarangkul, S. Bongsebandhu-phubhakdi, R. Bhidayasiri, Increased epinephrine in the saliva of Parkinson's disease patients: A preliminary observation, WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA2020, pp. S372-S3.

[195] E. Stoica, O. Enulescu, Abnormal epinephrine urinary excretion in Parkinsonians: correction of the disorder by levodopa administration, *Journal of the neurological sciences*, 38(1978) 215-27.

[196] A. Muller, V. Joseph, P.A. Slesinger, D. Kleinfeld, Cell-based reporters reveal in vivo dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex, *Nature methods*, 11(2014) 1245-52.

[197] Y.-S. Ding, K.-S. Lin, J. Logan, PET imaging of norepinephrine transporters, *Current pharmaceutical design*, 12(2006) 3831-45.

[198] Y.S. Ding, K.S. Lin, J. Logan, H. Benveniste, P. Carter, Comparative evaluation of positron emission tomography radiotracers for imaging the norepinephrine transporter:(S, S) and (R, R) enantiomers of reboxetine analogs ([11C] methylreboxetine, 3-Cl-[11C] methylreboxetine and [18F] fluororeboxetine),(R)-[11C] nisoxetine,[11C] oxaprotiline and [11C] lortalamine, *Journal of neurochemistry*, 94(2005) 337-51.

[199] M. van Faassen, R. Bischoff, K. Eijkelenkamp, W.H.A. de Jong, C.P. van der Ley, I.P. Kema, In matrix derivatization combined with LC-MS/MS results in ultrasensitive quantification of plasma free metanephrines and catecholamines, *Analytical Chemistry*, 92(2020) 9072-8.

[200] C. Ji, W. Li, X.-d. Ren, A.F. El-Kattan, R. Kozak, S. Fountain, et al., Diethylation labeling combined with UPLC/MS/MS for simultaneous determination of a panel of monoamine neurotransmitters in rat prefrontal cortex microdialysates, *Analytical Chemistry*, 80(2008) 9195-203.

[201] S. Kiranmai, C. Kuchi, B. Sravani, T. Łuczak, M.J. Kim, G. Madhavi, et al., Construction of ultrasensitive electrochemical sensor using TiO₂-reduced graphene oxide nanofibers

nanocomposite for epinephrine detection, *Surfaces and Interfaces*, 35(2022) 102455.

[202] S. Renjini, P. Abraham, V.A. Kumary, P.G. Chithra, K. Sreevalsan, Progress on carbon-based electrochemical sensors for epinephrine and norepinephrine, *Journal of The Electrochemical Society*, 169(2022) 046519.

[203] A. Santhan, K.-Y. Hwa, Construction of 2D niobium carbide-embedded silver/silver phosphate as sensitive disposable electrode material for epinephrine detection in biological real samples, *Materials Today Chemistry*, 27(2023) 101332.

[204] X. Yang, P. Zhao, Z. Xie, M. Ni, C. Wang, P. Yang, et al., Selective determination of epinephrine using electrochemical sensor based on ordered mesoporous carbon/nickel oxide nanocomposite, *Talanta*, 233(2021) 122545.

[205] D.S. Sipuka, T.I. Sebokolodi, F.O.G. Olorundare, C. Muzenda, O.V. Nkwachukwu, D. Nkosi, et al., Electrochemical sensing of epinephrine on a carbon nanofibers and gold nanoparticle-modified electrode, *Electrocatalysis*, 14(2023) 9-17.

[206] H. Ariga, S.M.M. Iguchi-Arigo, *DJ-1/PARK7 Protein: Parkinson's Disease, Cancer and Oxidative Stress-Induced Diseases*: Springer; 2017.

[207] F.J. Jiménez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, E. Garcia-Martin, J.A.G. Agúndez, Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease, *Frontiers in cellular neuroscience*, 8(2014) 369.

[208] M. Waragai, K. Sekiyama, A. Sekigawa, Y. Takamatsu, M. Fujita, M. Hashimoto, α -Synuclein and DJ-1 as potential biological fluid biomarkers for Parkinson's disease, *International journal of molecular sciences*, 11(2010) 4257-66.

[209] 小川郁子, パーキンソン病における酸化 DJ-1 測定のバイオマーカーとしての意義の検討, 博士学位論文/内容の要旨および審査結果の要旨 (平成 25 年度授与), (2014) 49-54.

[210] Y. Saito, Y. Akazawa-Ogawa, A. Matsumura, K. Saigoh, S. Itoh, K. Sutou, et al., Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients, *Scientific reports*, 6(2016) 1-11.

[211] X. Lin, T.J. Cook, C.P. Zabetian, J.B. Leverenz, E.R. Peskind, S.-C. Hu, et al., DJ-1 isoforms in whole blood as potential biomarkers of Parkinson disease, *Scientific reports*, 2(2012) 1-10.

[212] Z. Hong, M. Shi, K.A. Chung, J.F. Quinn, E.R. Peskind, D. Galasko, et al., DJ-1 and α -synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease, *Brain*, 133(2010) 713-26.

[213] B.L. Garrote, L.C. Lopes, E.F. Pinzon, F.C. Mendonca-Natividade, R.B. Martins, A. Santos, et al., Reagentless Quantum-Rate-Based Electrochemical Signal of Graphene for Detecting SARS-CoV-2 Infection Using Nasal Swab Specimens, *ACS sensors*, 7(2022) 2645-53.

[214] P.R. Bueno, Nanoscale origins of super-capacitance phenomena, *Journal of Power Sources*, 414(2019) 420-34.

[215] S. Ghosh, S.K. Behera, A. Mishra, C.S. Casari, K.K. Ostrikov, Quantum Capacitance of Two-Dimensional-Material-Based Supercapacitor Electrodes, *Energy & Fuels*, 37(2023) 17836-62.

- [216] M. Pathak, D. Bhatt, R.C. Bhatt, B.S. Bohra, G. Tatrari, S. Rana, et al., High Energy Density Supercapacitors: An Overview of Efficient Electrode Materials, Electrolytes, Design, and Fabrication, *The Chemical Record*, 24(2024) e202300236.
- [217] L. Zhao, Y. Li, M. Yu, Y. Peng, F. Ran, Electrolyte-Wettability Issues and Challenges of Electrode Materials in Electrochemical Energy Storage, Energy Conversion, and Beyond, *Advanced Science*, (2023) 2300283.
- [218] S.R. Khaladkar, O. Maurya, G. Gund, B. Sinha, D. Dubal, R.R. Deshmukh, et al., Improving the charge kinetics through in-situ growth of NiSe nanoparticles on g-C₃N₄ nanosheets for efficient hybrid supercapacitors, *Journal of Energy Chemistry*, 87(2023) 304-13.
- [219] D. Echeverri, E. Calucho, J. Marrugo-Ramírez, R. Álvarez-Diduk, J. Orozco, A. Merkoçi, Capacitive immunosensing at gold nanoparticle-decorated reduced graphene oxide electrodes fabricated by one-step laser nanostructuring, *Biosensors and Bioelectronics*, (2024) 116142.
- [220] H. Li, X. Wang, C. Li, X. Wang, X. Liu, B. Li, et al., First-principles study of quantum capacitance of transition metal oxides and nitrogen functionalized graphene as electrode materials for supercapacitor, *Physica B: Condensed Matter*, 667(2023) 415195.
- [221] J.C.M. Silva, G.S. Buzzo, R.F.B. De Souza, E.V. Spinacé, A.O. Neto, M. Assumpção, Enhanced electrooxidation of ethanol using Pd/C+ TiO₂ electrocatalysts in alkaline media, *Electrocatalysis*, 6(2015) 86-91.
- [222] B.B. Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns, *Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*: Bookman Editora; 2010.
- [223] F.C. Vicentini, L.C.S. Figueiredo-Filho, B.C. Janegitz, A. Santiago, E.R. Pereira-Filho, O. Fatibello-Filho, Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de ag(i) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono, *Química Nova*, 34(2011) 825-30.
- [224] M. Baccarin, F.A. Santos, F.C. Vicentini, V. Zucolotto, B.C. Janegitz, O. Fatibello-Filho, Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/carbon black/chitosan composite for the simultaneous determination of dopamine and paracetamol concentrations in urine samples, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 799(2017) 436-43.
- [225] A.M. Campos, P.A. Raymundo-Pereira, C.D. Mendonça, M.L. Calegari, S.A. Machado, O.N. Oliveira Jr, Size control of carbon spherical shells for sensitive detection of paracetamol in sweat, saliva, and urine, *ACS Applied Nano Materials*, 1(2018) 654-61.
- [226] P.A. Raymundo-Pereira, F.M. Shimizu, D. Coelho, M.H. Piazzeta, A.L. Gobbi, S.A. Machado, et al., A nanostructured bifunctional platform for sensing of glucose biomarker in artificial saliva: synergy in hybrid Pt/Au surfaces, *Biosensors and Bioelectronics*, 86(2016) 369-76.
- [227] C.A. Martins, P.S. Fernández, H.E. Troiani, M.E. Martins, A. Arenillas, G.A. Camara, Agglomeration and cleaning of carbon supported palladium nanoparticles in electrochemical environment, *Electrocatalysis*, 5(2014) 204-12.
- [228] R. Lamber, S. Wetjen, N.I. Jaeger, Size dependence of the lattice parameter of small palladium particles, *Physical Review B*, 51(1995) 10968.
- [229] A. Neto, S. da Silva, G. Buzzo, R. de Souza, M. Assumpção, E. Spinacé, et al., Ethanol electrooxidation on PdIr/C electrocatalysts in alkaline media: electrochemical and fuel cell

studies, *Ionics*, 21(2015) 487-95.

[230] S. Liu, W. Xiao, J. Wang, J. Zhu, Z. Wu, H. Xin, et al., Ultralow content of Pt on Pd–Co–Cu/C ternary nanoparticles with excellent electrocatalytic activity and durability for the oxygen reduction reaction, *Nano energy*, 27(2016) 475-81.

[231] L. An, Y. Chen, J. Shi, J. Cao, B. Liu, J. Yang, Oxygen Reduction Activity and Stability of Composite Pd_x/Co-Nanofilms/C Electrocatalysts in Acid and Alkaline Media, *Frontiers in chemistry*, 6(2018).

[232] H. Meng, D. Zeng, F. Xie, Recent development of Pd-based electrocatalysts for proton exchange membrane fuel cells, *Catalysts*, 5(2015) 1221-74.

[233] S.T. Nguyen, H.M. Law, H.T. Nguyen, N. Kristian, S. Wang, S.H. Chan, et al., Enhancement effect of Ag for Pd/C towards the ethanol electro-oxidation in alkaline media, *Applied Catalysis B: Environmental*, 91(2009) 507-15.

[234] C. Bianchini, P.K. Shen, Palladium-based electrocatalysts for alcohol oxidation in half cells and in direct alcohol fuel cells, *Chemical Reviews*, 109(2009) 4183-206.

[235] G. Li, L. Jiang, Q. Jiang, S. Wang, G. Sun, Preparation and characterization of Pd_xAg_y/C electrocatalysts for ethanol electrooxidation reaction in alkaline media, *Electrochimica Acta*, 56(2011) 7703-11.

[236] P.K. Shen, C. Xu, Alcohol oxidation on nanocrystalline oxide Pd/C promoted electrocatalysts, *Electrochemistry Communications*, 8(2006) 184-8.

[237] S. Mahapatra, J. Datta, Characterization of Pt-Pd/C electrocatalyst for methanol oxidation in alkaline medium, *International Journal of Electrochemistry*, 2011(2011).

[238] S.T. Nguyen, Y. Yang, X. Wang, Ethanol electro-oxidation activity of Nb-doped-TiO₂ supported PdAg catalysts in alkaline media, *Applied Catalysis B: Environmental*, 113(2012) 261-70.

[239] B. Cermenek, J. Ranninger, B. Feketeöldi, I. Letofsky-Papst, N. Kienzl, B. Bitschnau, et al., Novel highly active carbon supported ternary PdNiBi nanoparticles as anode catalyst for the alkaline direct ethanol fuel cell, 12(2019) 683-93.

[240] L.-l. Fang, Q. Tao, M.-f. Li, L.-w. Liao, D. Chen, Y.-x. Chen, Determination of the real surface area of palladium electrode, *Chinese Journal of Chemical Physics*, 23(2010) 543-8.

[241] A.O. Neto, S.G. Da Silva, G.S. Buzzo, R.F.B. De Souza, M. Assumpção, E.V. Spinacé, et al., Ethanol electrooxidation on PdIr/C electrocatalysts in alkaline media: electrochemical and fuel cell studies, *Ionics*, 21(2015) 487-95.

[242] M. Assumpção, J. Nandenha, G.S. Buzzo, J.C.M. Silva, E.V. Spinacé, A.O. Neto, et al., The effect of ethanol concentration on the direct ethanol fuel cell performance and products distribution: A study using a single fuel cell/attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Power Sources*, 253(2014) 392-6.

[243] A.N. Gerales, D.F. Da Silva, E.S. Pino, J.C.M. Da Silva, R.F.B. De Souza, P. Hammer, et al., Ethanol electro-oxidation in an alkaline medium using Pd/C, Au/C and PdAu/C electrocatalysts prepared by electron beam irradiation, *Electrochimica Acta*, 111(2013) 455-65.

[244] A.S. Bandarenka, M.T.M. Koper, Structural and electronic effects in heterogeneous electrocatalysis: Toward a rational design of electrocatalysts, *Journal of Catalysis*, 308(2013)

11-24.

[245] L.O. Orzari, R.C. de Freitas, I.A. de Araujo Andreotti, A. Gatti, B.C. Janegitz, A novel disposable self-adhesive inked paper device for electrochemical sensing of dopamine and serotonin neurotransmitters and biosensing of glucose, *Biosensors Bioelectronics*, 138(2019) 111310.

[246] L.O. Orzari, F.A. Santos, B.C. Janegitz, Manioc starch thin film as support of reduced graphene oxide: A novel architecture for electrochemical sensors, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 823(2018) 350-8.

[247] J. Guo, Y. Ping, H. Ejima, K. Alt, M. Meissner, J.J. Richardson, et al., Engineering multifunctional capsules through the assembly of metal-phenolic networks, *Angewandte Chemie International Edition*, 53(2014) 5546-51.

[248] Z. Xu, Mechanics of metal-catecholate complexes: the roles of coordination state and metal types, *Scientific reports*, 3(2013) 2914.

[249] M. Ata, Y. Liu, I. Zhitomirsky, A review of new methods of surface chemical modification, dispersion and electrophoretic deposition of metal oxide particles, *Rsc Advances*, 4(2014) 22716-32.

[250] A.C. Rossi-Fernández, L.A. Meier, N.F. Domancich, N.J. Castellani, Electric Field Effects on the Adsorption of Dopamine Species on Ag (111): DFT Investigation of Interaction Mechanism, *ChemistrySelect*, 5(2020) 4728-39.

[251] K. Ding, W. Wang, D. Yu, P. Gao, B. Liu, Facile formation of flexible Ag/AgCl/polydopamine/cotton fabric composite photocatalysts as an efficient visible-light photocatalysts, *Applied Surface Science*, 454(2018) 101-11.

[252] J. Fan, D. Yu, W. Wang, B. Liu, The self-assembly and formation mechanism of regenerated cellulose films for photocatalytic degradation of CI Reactive Blue 19, *Cellulose*, 26(2019) 3955-72.

[253] G. Bauer, M. Nieger, D. Gudat, Heterobimetallic catechol-phosphine complexes with palladium and a group-13 element: structural flexibility and dynamics, *Dalton Transactions*, 43(2014) 8911-20.

[254] F.C. Vicentini, P.A. Raymundo-Pereira, B.C. Janegitz, S.A. Machado, O. Fatibello-Filho, Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids, *Sensors Actuators B: Chemical*, 227(2016) 610-8.

[255] S. Yang, G. Li, Y. Yin, R. Yang, J. Li, L. Qu, Nano-sized copper oxide/multi-wall carbon nanotube/Nafion modified electrode for sensitive detection of dopamine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 703(2013) 45-51.

[256] L.-N. Wu, Y.-L. Tan, L. Wang, S.-N. Sun, Z.-Y. Qu, J.-M. Zhang, et al., Dopamine sensor based on a hybrid material composed of cuprous oxide hollow microspheres and carbon black, *Microchimica Acta*, 182(2015) 1361-9.

[257] Z.-N. Huang, J. Zou, J. Teng, Q. Liu, M.-M. Yuan, F.-P. Jiao, et al., A novel electrochemical sensor based on self-assembled platinum nanochains-multi-walled carbon nanotubes-graphene nanoparticles composite for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid, *Ecotoxicology and environmental safety*, 172(2019) 167-75.

[258] W. He, Y. Ding, W. Zhang, L. Ji, X. Zhang, F. Yang, A highly sensitive sensor for

simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on ultra-small Ni nanoparticles, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775(2016) 205-11.

[259] H.-S. Jang, D. Kim, C. Lee, B. Yan, X. Qin, Y. Piao, Nafion coated Au nanoparticle-graphene quantum dot nanocomposite modified working electrode for voltammetric determination of dopamine, *Inorganic Chemistry Communications*, 105(2019) 174-81.

[260] N. Tian, Z.-Y. Zhou, N.-F. Yu, L.-Y. Wang, S.-G. Sun, Direct electrodeposition of tetrahedral Pd nanocrystals with high-index facets and high catalytic activity for ethanol electrooxidation, *Journal of the American Chemical Society*, 132(2010) 7580-1.

[261] T. Zhang, X. Zhu, D.-D. Ye, R. Chen, Y. Zhou, Q. Liao, Cyclic voltammetry electrodeposition of well-dispersed Pd nanoparticles on carbon paper as a flow-through anode for microfluidic direct formate fuel cells, *Nanoscale*, 12(2020) 20270-8.

[262] R.A. De Toledo, M.C.d. Santos, E.T.G. Cavaleiro, L.H. Mazo, Determination of dopamine in synthetic cerebrospinal fluid by SWV with a graphite-polyurethane composite electrode, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381(2005) 1161-6.

[263] F.C. Vicentini, P.A. Raymundo-Pereira, B.C. Janegitz, S.A.S. Machado, O. Fatibello-Filho, Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 227(2016) 610-8.

[264] R.C. Freitas, L.O. Orzari, L.M. Ferreira, T.R. Paixão, W.K. Coltro, F.C. Vicentini, et al., Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode, 897(2021) 115550.

[265] I.A. Mattioli, P. Cervini, É.T.G. Cavaleiro, Screen-printed disposable electrodes using graphite-polyurethane composites modified with magnetite and chitosan-coated magnetite nanoparticles for voltammetric epinephrine sensing: a comparative study, *Microchimica Acta*, 187(2020).

[266] A. Salimi, V. Alizadeh, R.G. Compton, Disposable amperometric sensor for neurotransmitters based on screen-printed electrodes modified with a thin iridium oxide film, *Analytical sciences*, 21(2005) 1275-80.

[267] I.M. Apetrei, C. Apetrei, Study of different carbonaceous materials as modifiers of screen-printed electrodes for detection of catecholamines, *IEEE Sensors Journal*, 15(2014) 3094-101.

[268] G.C.M. de Oliveira, J.H. de Souza Carvalho, L.C. Brazaca, N.C.S. Vieira, B.C. Janegitz, Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson's disease biomarkers, *Biosensors and Bioelectronics*, 152(2020) 112016.

[269] J. Lović, S. Stevanović, B.D. Anđelković, S. Petrović, D. Vuković, N. Prlainović, et al., Electrochemical glucose biosensor with the characterization of surface morphology and content of glucose oxidase-glutaraldehyde-cysteine layers on gold electrode, *International Journal of Electrochemical Science*, 13(2018) 12340-8.

[270] L.A. Layqah, S. Eissa, An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes, *Microchimica Acta*, 186(2019) 1-10.

[271] O.C. Ozoemena, T.J. Ehirim, T. Khawula, K. Makgopa, L.J. Shai, K.I. Ozoemena, Bovine Serum Albumin-Dependent Charge-Transfer Kinetics Controls the Electrochemical Immunosensitive Detection: *Vibrio cholerae* as a Model Bioanalyte, *Electrocatalysis*, 12(2021)

595-604.

[272] J. Munoz, M. Pumera, 3D-Printed COVID-19 immunosensors with electronic readout, *Chemical Engineering Journal*, 425(2021) 131433.

[273] L.R.G. Silva, J.S. Stefano, L.O. Orzari, L.C. Brazaca, E. Carrilho, L.H. Marcolino-Junior, et al., Electrochemical Biosensor for SARS-CoV-2 cDNA Detection Using AuPs-Modified 3D-Printed Graphene Electrodes, *Biosensors*, 12(2022) 622.

[274] A. García-Miranda Ferrari, C.W. Foster, P.J. Kelly, D.A.C. Brownson, C.E. Banks, Determination of the electrochemical area of screen-printed electrochemical sensing platforms, *Biosensors*, 8(2018) 53.

[275] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical impedance spectroscopy*, New Jersey, (2008) 383-9.

[276] S. Wang, J. Zhang, O. Gharbi, V. Vivier, M. Gao, M.E. Orazem, Electrochemical impedance spectroscopy, *Nature Reviews Methods Primers*, 1(2021) 1-21.

[277] A. Lasia, *Electrochemical impedance spectroscopy and its applications*, Modern aspects of electrochemistry, Springer 2002, pp. 143-248.

[278] P. Jolly, M.R. Batistuti, A. Miodek, P. Zhuravski, M. Mulato, M.A. Lindsay, et al., Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection, *Scientific Reports*, 6(2016) 36719.

[279] A. Díaz-Fernández, E. Bernalte, C. Fernández-Ramos, S. Moise, P. Estrela, M. Di Lorenzo, An impedimetric immunosensor for the selective detection of CD34+ T-cells in human serum, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 356(2022) 131306.

[280] S.K. Arya, P. Zhuravski, P. Jolly, M.R. Batistuti, M. Mulato, P. Estrela, Capacitive aptasensor based on interdigitated electrode for breast cancer detection in undiluted human serum, *Biosensors and Bioelectronics*, 102(2018) 106-12.

[281] C. Kalinke, P.R. De Oliveira, C.E. Banks, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, 3D-printed immunosensor for the diagnosis of Parkinson's disease, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 381(2023) 133353.

[282] M.N.S. Karaboğa, M.K.J.B. Sezgintürk, A nano-composite based regenerative neuro biosensor sensitive to Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 in cerebrospinal fluid and saliva, 138(2021) 107734.

[283] M. Dhinesh Kumar, C. Karunakaran, M. Karthikeyan, N. Sharma, S.V. Kalivendi, V. Raju, et al., Molecular Imprinting Synthetic Receptor Based Sensor for Determination of Parkinson's Disease Biomarker Dj-1, Chandran and Karthikeyan, Murugesan and Sharma, Neelam and Kalivendi, Shasi V and Raju, Vadthya and Vatsalarani, J, *Molecular Imprinting Synthetic Receptor Based Sensor for Determination of Parkinson's Disease Biomarker Dj-1*, 183(2022) 107959.

[284] A.A. Elkhawaga, M.M. Khalifa, O. El-Badawy, M.A. Hassan, W.A. El-Said, Rapid and highly sensitive detection of pyocyanin biomarker in different *Pseudomonas aeruginosa* infections using gold nanoparticles modified sensor, *PLoS One*, 14(2019) e0216438.

[285] U.M.F.M. Cerqueira, M.A. Bezerra, S.L.C. Ferreira, R. de Jesus Araújo, B.N. da Silva, C.G. Novaes, Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review, *Food Chemistry*, 364(2021) 130429.

- [286] S.L.C. Ferreira, W.N.L. Dos Santos, C.M. Quintella, B.c.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry, *Talanta*, 63(2004) 1061-7.
- [287] I. Lavagnini, R. Antiochia, F. Magno, An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 16(2004) 505-6.
- [288] J.B. Allen, R.F. Larry, *Electrochemical methods fundamentals and applications*: John Wiley & Sons; 2001.
- [289] C. Amatore, N. Da Mota, C. Sella, L. Thouin, Theory and experiments of transport at channel microband electrodes under laminar flows. 1. Steady-state regimes at a single electrode, *Analytical chemistry*, 79(2007) 8502-10.
- [290] L. Chen, E. Kätelhön, R.G. Compton, Unscrambling illusory inhibition and catalysis in nanoparticle electrochemistry: Experiment and theory, *Applied Materials Today*, 16(2019) 141-5.