

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**NOVAS ARQUITETURAS PARA SENSORES
MODIFICADOS COM MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS DE CARBONO**

Marina Baccarin*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

***Bolsista CAPES**

SÃO CARLOS

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B116n Baccarin, Marina
 Novas arquiteturas para sensores modificados com
 materiais nanoestruturados de carbono / Marina
Baccarin. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
 83 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
 São Carlos, 2016.

 1. Sensores. 2. Materiais. 3. Carbono. 4.
 Nanoestruturados. I. Título.

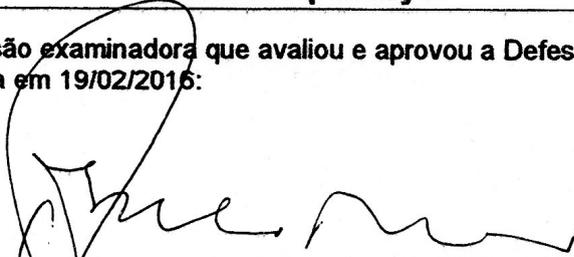


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Marina Baccarin, realizada em 19/02/2016:



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
UFSCar



Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro
IQSC/USP



Prof. Dr. Ricardo Francisco Brocenschi
UFSCar

À minha família pelo amor, carinho, boas risadas, paciência e incentivo.

Amo vocês!

DEDICO

*“Passo a passo. Não consigo pensar
em nenhum outro modo de se
realizar algo”*

Michael Jordan

*“ Você pode fazer o que quiser, você pode ser o
que quiser, basta estudar.”*

Meus pais

Agradecimentos

A Deus, por me mostrar sempre o caminho certo e me ajudar a superar os obstáculos da vida;

Aos meus pais, pelo amor incondicional e o suporte financeiro de toda minha educação;

Aos meus irmãos por todos os momentos de alegria e companherismo;

Ao meu namorado Yuri, por todo o seu amor, carinho, incentivo e alegria;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela orientação deste trabalho de mestrado, amizade, incentivo, bom humor, paciência e influência no meu crescimento profissional;

Ao Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz e ao Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini pelas discussões e sugestões que foram essenciais para o aprimoramento deste trabalho, pelo ensinamento científico e por suas amizades;

Às amigas de república, Nayara, Beatriz, Sabrina, Jéssica, Fiona e Bárbara pelos momentos de alegria, companherismo e convivência;

Às companheiras do time de basquete, pela amizade e ensinamentos de esforço e força de vontade;

Aos meus amigos de turma de graduação Rafael e Taís pela amizade e convívio;

A todos os meus familiares, avós, primos, tios que mesmo morando longe sempre me deram carinho, conselho e palavras de apoio;

A “galera do recreio”: Anderson, Elson e Camila pelos estudos até nos feriados, convívio e amizade;

Aos amigos e colegas do LABBES/LABiE, pelos momentos de discussão científica e também de descontração: Ademar, Alexandrino, Alana, Bruna, Cássio, Camila Proença, Camila Erbereli, Cláudia, Fred, Jorge, Gisela, Laís, Cyber, Marcão, Natália, Patrícia, Tássia, Thaísa e Tiago;

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, por permitir a realização de uma parte experimental deste trabalho em seu laboratório;

Aos colegas do grupo Gnano: Fabrício e Laís pelas discussões científicas;

Aos Professores do Departamento de Química da UFSCar pelos seus ensinamentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar pela oportunidade;

A todos os funcionários do DQ, especialmente as secretárias Ariane, Cristina e Luciani pela atenção e colaboração;

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPESP e principalmente CAPES pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho de mestrado.

Resumo

NOVAS ARQUITETURAS PARA SENSORES MODIFICADOS COM MATERIAIS NANOESTRUTURADOS DE CARBONO. Neste trabalho de mestrado são reportados o desenvolvimento de novas arquiteturas de sensores utilizando nanomateriais de carbono. Assim, primeiramente, a modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com os nanomateriais óxido de grafeno reduzido (RGO) e carbon black (CB; negro de fumo) em um filme de quitosana (CTS) para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico é descrito. O sensor foi caracterizado utilizando a microscopia eletrônica de varredura (SEM), espectroscopia de ultravioleta, infravermelho com transformada de Fourier, espalhamento dinâmico de luz e voltametria cíclica (CV). Utilizando-se o método de Nicholson e dados obtidos por CV a partir do eletrodo RGO-CB-CTS/GCE, a constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0) de $5,6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ foi obtida. O eletrodo proposto foi utilizado na determinação de dopamina (DA) (neurotransmissor) e paracetamol (PAR) (analgésico). Dessa forma, empregando-se a voltametria de onda quadrada (SWV), obteve-se um potencial de pico anódico em 0,25 V para a DA e em 0,50 V para o PAR vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). As curvas analíticas obtidas foram lineares nas faixas de $3,9 \times 10^{-6}$ a $3,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com limites de detecção de $2,0 \times 10^{-8}$ e $5,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para DA e PAR, respectivamente. Foi observado no sensor desenvolvido vantagens como a simples confecção do eletrodo, baixo custo dos nanomateriais utilizados, resposta rápida (7 s para cada medida). Ademais, este sensor foi aplicado com sucesso na determinação simultânea destes analitos em amostras de urina sintética.

O segundo sensor desenvolvido foi baseado na modificação da superfície do GCE com nanodiamantes (Dnano) em um filme de hidrocloreto de polialilamina (PAH). O sensor Dnano-PAH/GCE foi caracterizado utilizando-se um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier e CV. A

dispersão destes materiais em água foi estável e um k^0 igual a $2,0 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ foi estimado utilizando o método de Nicholson e dados de CV. O sensor desenvolvido foi usado para a determinação de catecol (CAT) utilizando-se a voltametria de pulso diferencial (DPV). Após as condições experimentais otimizadas, a corrente de pico anódica para o CAT foi linear na faixa de concentração de $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O método proposto foi aplicado para a determinação de CAT em amostras de águas naturais, com algumas vantagens como resposta rápida (9 s para realizar cada medida), seletividade e simplicidade de construção do eletrodo de trabalho.

Abstract

NEW ARCHITECTURES FOR SENSORS USING CARBON NANOMATERIALS. In this work are reported the development of new architectures for sensors using carbon nanomaterials. Firstly, the investigation of the nanomaterials reduced graphene oxide (RGO) and carbon black (CB) in chitosan film (CTS) modifying the surface of a glassy carbon electrode (GCE) for the development of new electrochemical sensor is described. The sensor was characterized by using scanning electron microscopy (SEM), ultraviolet spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering and cyclic voltammetry (CV). Using the Nicholson method and the results obtained by CV with the proposed RGO-CB-CTS/GCE, the heterogeneous electron transfer rate constant (k^0) of $5.6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ was obtained. The proposed electrode was applied for the simultaneous determination of dopamine (DA) (neurotransmitter) and paracetamol (PAR) (analgesic). Employing SWV, DA presented an anodic peak at 0.25 V and PAR at 0.50 V vs. Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹ KCl). The analytical curves obtained were linear in the range from 3.9×10^{-6} to $3.4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and between 2.0×10^{-6} and $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ with detection limits of 2.0×10^{-8} and $5.3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ for DA and PAR, respectively. The developed sensor presented advantages such as simple preparation, low cost of nanomaterials used, fast response (7 s for each measure). Besides, the sensor was successfully applied in the simultaneous determination of the analytes in synthetic urine samples.

The second fabricated sensor was based on the modification of a GCE with nanodiamond (Dnano) within a Poly(allylamine hydrochloride) (PAH) film. The Dnano-PAH/GCE sensor was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and cyclic voltammetry. It was observed a stability of the dispersion and a k^0 of $2.0 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ was obtained using the Nicholson method and the results obtained from CV technique. The developed sensor was applied for determination of catechol (CAT) using differential-pulse

voltammetry (DPV). Under optimal experimental conditions, the anodic peak current was linear in the CAT concentration range of 2.0×10^{-6} to 1.1×10^{-4} mol L⁻¹ with a detection limit of 1.5×10^{-6} mol L⁻¹. The proposed method was applied for the determination of CAT in natural water samples, presenting advantages such as fast response (9 s to carry out one measure), selectivity and simplicity of working electrode fabrication.

LISTA DE ABREVIATURAS

a - amplitude de potencial

A - ampere (unidade de corrente)

A - área eletroativa

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária

[] - concentração

CAT - catecol

CB - carbon black

CCE - eletrodo de carbono cerâmico (do inglês *ceramic carbon electrode*)

CE - contra-eletrodo (do inglês *counter electrode*)

CNTs - nanotubos de carbono (do inglês *carbon nanotubes*)

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTS - quitosana (do inglês *chitosan*)

CV - Voltametria cíclica (do inglês *Cyclic Voltammetry*)

D - coeficiente de difusão

DA - dopamina

DHP - dihexadecil hidrogenofosfato (do inglês *dihexadecyl hydrogen phosphate*)

DMF - dimetilformamida

Dnano - nanodiamantes

DPV - Voltametria de pulso diferencial (do inglês *Differential Pulse Voltammetry*)

ΔE - diferença de potencial

ΔE_p - diferença de potencial de pico

ΔE_s - incremento de varredura

ECL - quimiluminescência eletrogerada (do inglês *Electrogenerated chemiluminescence*)

f - frequência de aplicação de pulso

F - constante de Faraday (96485 C mol^{-1})

GCE - eletrodo de carbono vítreo (do inglês *glassy carbon electrode*)

GO - óxido de grafeno (do inglês *graphene oxide*)

I - corrente

I_a - corrente de pico anódica

I_c - corrente de pico catódica

I_p - corrente de pico

k^0 - constante heterogênea de transferência de elétrons

LD - limite de detecção

MWCNTs - nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*)

n - número de elétrons

PAH - hidrocloreto de polialilamina (do inglês *polyallylamine hydrochloride*)

PAR - paracetamol

pH - concentração hidrogeniônica

ψ - parâmetro cinético

r - coeficiente de correlação

R - constante universal dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

RE - eletrodo de referência (do inglês *reference electrode*)

RGO - óxido de grafeno reduzido (do inglês *reduced graphene oxide*)

RSD - desvios padrões relativos (do inglês *relative standard desviation*)

S - coeficiente angular (do inglês *slope*)

SD - desvio padrão (do inglês *standard desviation*)

SEM - Microscopia eletrônica de varredura (do inglês *Scanning Electron Microscopy*)

SWCNTs - nanotubos de carbonos de parede simples (do inglês *single-wall carbon nanotubes*)

SWV - Voltametria de onda quadrada (do inglês *Square-wave Voltammetry*)

t - tempo de modulação do pulso

T - temperatura termodinâmica

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês *Transmission Electron Microscopy*)

WE - eletrodo de trabalho (do inglês *working electrode*)

v - velocidade de varredura de potencial

vs. - versus

LISTA DE TABELAS

TABELA 3. 1 - Área eletroativa de diferentes eletrodos estudados.....	35
TABELA 3. 2 - Valores ΔE_p , $E_{\text{oxidação}}$ e $E_{\text{redução}}$ do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ obtidos com o RGO-CB-CTS/GCE em diferentes velocidades de varredura de potencial	39
TABELA 3. 3 - Parâmetros da técnica de DPV investigados e os valores selecionados para a determinação simultânea de DA e PAR utilizando o RGO-CB-CTS/GCE.....	43
TABELA 3. 4 - Parâmetros da técnica de SWV investigados e os valores selecionados para a determinação simultânea de DA e PAR utilizando o RGO-CB-CTS/GCE.....	43
TABELA 3. 5 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos empregando-se as técnicas de DPV e SWV para determinação de DA utilizando o RGO-CB-CTS/GCE.....	44
TABELA 3. 6 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos empregando-se as técnicas de DPV e SWV para deteminação de PAR utilizando o RGO-CB-CTS/GCE.....	44
TABELA 3. 7 - Resultados obtidos usando o método proposto na determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina	49
TABELA 3. 8 - Comparação entre o trabalho presente e alguns sensores reportados na literatura para a determinação simultânea de DA e PAR.....	50
TABELA 4. 1 - Valores ΔE_p , $E_{\text{oxidação}}$ e $E_{\text{redução}}$ do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ obtidos com o Dnano-PAH/GCE em diferentes velocidades de varredura de potencial	64
TABELA 4. 2 - Parâmetros de SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de CAT utilizando o Dnano-PAH/GCE	67
TABELA 4. 3 - Parâmetros de DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de CAT utilizando Dnano-PAH/GCE	69
TABELA 4. 4 - Comparação entre a DPV e SWV para determinação de DA...	70

TABELA 4. 5 - Resultados obtidos usando o método proposto na determinação de CAT em águas naturais da represa e da torneira..... 72

TABELA 4. 6 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos neste trabalho com alguns reportados na literatura utilizando outros sensores para a determinação de CAT..... 73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 - Estrutura dos nanomateriais de carbono sendo (a) fulereno, (b) grafeno, (c) carbono amorfo e (d) CNTs (de parede simples e paredes múltiplas)	3
FIGURA 1. 2 - Estrutura do grafite.....	4
FIGURA 1. 3 - Síntese do óxido de grafeno reduzido a partir do material <i>bulk</i> grafite.....	6
FIGURA 1. 4 - Estrutura do nanomaterial de carbon black (negro de fumo).	8
FIGURA 1. 5 - Esquema de síntese dos Dnano pelo método de detonação por choques de ondas.....	9
FIGURA 1. 6 - Estrutura da CTS.....	11
FIGURA 1. 7 - Estrutura do PAH.....	11
FIGURA 1. 8 - Estrutura molecular de alguns fenóis: (a) catecol (CAT) (b) resorcinol e (c) hidroquinona.	13
FIGURA 1. 9 - Estruturas moleculares de algumas catecolaminas: (a) dopamina, (b) adrenalina e (c) serotonina.....	15
FIGURA 1. 10 - Estrutura molecular do PAR.	16
FIGURA 3. 1 - Célula Eletroquímica.	24
FIGURA 3. 2 - Representação esquemática da síntese de RGO. Etapa 1: GO é preparado a partir do pó de grafite pelo método de Hummer modificado. Etapa 2: esfoliação química do óxido de grafite. Etapa 3: solução de GO é deixada em uma membrana de diálise (2 kDa) durante duas semanas. Etapa 4: foi adicionado 100 mL de DMF e 1 mL de NH ₃ (28 % v/v) em 50 mg de GO e a mistura é deixada em um banho ultrassônico por 2 horas. Passo 5: a solução é colocada em refluxo (T = 95 °C) e adiciona-se boroidreto de sódio. Passo 6: redução do GO ocorre durante 8 horas e para remover o DMF, a solução é mantida por uma semana em membrana de diálise (10 kDa).	26
FIGURA 3. 3 - Processo de preparo do sensor RGO-CB-CTS/GCE.....	27

FIGURA 3. 4 - Espectro de ultravioleta do RGO.	30
FIGURA 3. 5 - Espectros no infravermelho do RGO e GO.	31
FIGURA 3. 6 - (a) Medidas de espalhamento dinâmico de luz do RGO. (b) Imagem de SEM do RGO sobre a superfície de silício dopado do tipo N.	32
FIGURA 3. 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de diferentes proporções: 50: 50 %, 60: 40 %, 75: 25 %, 80: 20 % e 90: 10 % (v/v; RGO-CTS), gotejadas sobre a superfície de um GCE; (b) Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de adições diferentes de massas de CB (0,30; 0,50; 0,70 e 0,90 mg) a dispersão 60: 40 % (v/v; RGO-CTS). Ambos na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	33
FIGURA 3. 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para GCE (a), RGO-CTS/GCE (b), CB-CTS/GCE (c) e RGO-CB-CTS/GCE (d), na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de potencial.	36
FIGURA 3. 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o sensor RGO-CB-CTS/GCE em diferentes velocidades de varredura de potencial na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$	37
FIGURA 3. 10 - (a) $\log I_a$ vs. $\log \nu$ e (b) ψ vs. $32,79 \nu^{-1/2}$, ambos para o RGO-CB-CTS/GCE.....	39
FIGURA 3. 11 - (a) Voltamogramas cíclicos empregando o sensor RGO-CB-CTS/GCE, na ausência (linha azul) e na presença de DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (linha preta) ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$), $n = 5$. (b) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o GCE e o sensor RGO-CB-CTS/GCE em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) na presença de DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Sendo $a = 70 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$	41
FIGURA 3. 12 - (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs usando o RGO-CB-CTS/GCE. (b) Correntes de pico anódica	

para os diferentes pHs estudados. Parâmetros: $a = 70 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$	42
FIGURA 3. 13 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para: (a) PAR: (1) Branco, (2) $9,9 \times 10^{-7}$, (3) $2,0 \times 10^{-6}$, (4) $3,9 \times 10^{-6}$, (5) $7,8 \times 10^{-6}$, (6) $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com DA (2 a 6) $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (fixa); (b) DA: (1) Branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $4,0 \times 10^{-6}$, (4) $6,0 \times 10^{-6}$, (5) $8,0 \times 10^{-6}$, (6) $9,9 \times 10^{-6}$ (7) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com PAR (2 a 7) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (fixa). Ambas em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,2), utilizando o RGO-CB-CTS/GCE; $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. Inserida: as respectivas curvas analíticas ($n = 3$).....	46
FIGURA 3. 14 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de DA: (1) branco, (2) $3,9 \times 10^{-6}$, (3) $5,9 \times 10^{-6}$, (4) $7,8 \times 10^{-6}$, (5) $9,9 \times 10^{-6}$, (6) $1,2 \times 10^{-5}$, (7) $1,5 \times 10^{-5}$, (8) $2,5 \times 10^{-5}$, (9) $3,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; e de PAR: (1) Branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $3,0 \times 10^{-6}$, (4) $3,9 \times 10^{-6}$, (5) $4,9 \times 10^{-6}$, (6) $5,9 \times 10^{-6}$, (7) $7,3 \times 10^{-6}$, (8) $1,2 \times 10^{-5}$, (9) $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,2) usando o RGO-CB-CTS/GCE. (b) Curva analítica obtida para DA e (c) curva analítica obtida para PAR ($n = 3$); $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$	47
FIGURA 4. 1 - Processo de fabricação do sensor Dnano-PAH/GCE.	56
FIGURA 4. 2 - Espectros do infravermelho do Dnano.	58
FIGURA 4. 3 - Imagem de TEM do Dnano.	59
FIGURA 4. 4 - Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ obtidos para o GCE, PAH/GCE e o Dnano-PAH/GCE, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	61
FIGURA 4. 5 - Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de potencial obtidos usando o Dnano-PAH/GCE.	62
FIGURA 4. 6 - (a) $\log I_a$ vs. $\log \nu$ e (b) ψ vs. $32,79 \nu^{-1/2}$, ambos para o Dnano-PAH/GCE.....	63

- FIGURA 4. 7 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (linha preta) e na presença de CAT $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (linha vermelha) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) utilizando o sensor Dnano-PAH/GCE ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$), $n = 5$. (b) Voltamogramas de onda quadrada na presença de CAT $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) utilizando o GCE e o sensor Dnano-PAH/GCE. Parâmetros $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ 65
- FIGURA 4. 8 - (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o sensor Dnano-PAH/GCE em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs. (b) Correntes de pico anódico e valores de potencial para os diferentes pHs estudados. Sendo $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ 66
- FIGURA 4. 9 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o sensor Dnano-PAH/GCE em diferentes concentrações ((1) branco, (2) $3,9 \times 10^{-6}$, (3) $6,9 \times 10^{-6}$, (4) $7,8 \times 10^{-6}$, (5) $2,3 \times 10^{-5}$, (6) $3,6 \times 10^{-5}$, (7) $5,1 \times 10^{-5}$, (8) $8,1 \times 10^{-5}$, (9) $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,5) utilizando o Dnano-PAH/GCE. Sendo $f = 130 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$; (b) Curva analítica do CAT ($n = 3$). 68
- FIGURA 4. 10 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para CAT em diferentes concentrações ((1) branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $4,5 \times 10^{-6}$, (4) $6,9 \times 10^{-6}$, (5) $1,2 \times 10^{-5}$, (6) $2,3 \times 10^{-5}$, (7) $3,6 \times 10^{-5}$, (8) $5,1 \times 10^{-5}$, (9) $6,7 \times 10^{-5}$, (10) $9,2 \times 10^{-5}$, (11) $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,5). Sendo $a = 100 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; (b) Curva analítica obtida para o CAT ($n = 3$). 69

SUMÁRIO

1.2.2. Carbon black	6
1.2.3. Nanodiamantes	8
1.3. Sensores à base de filmes	9
1.3.1. Quitosana	10
1.3.2. Hidroclorato de polialilamina	11
1.4. Aplicação na área ambiental	12
1.5. Aplicação na área medicinal	14
1.5.1. Catecolaminas	14
1.5.2. Paracetamol	16
1.5.3. Determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina	16
2. OBJETIVOS GERAIS	19
3. Desenvolvimento de um sensor eletroquímico à base de grafeno e carbon black (negro de fumo) em filme de quitosana para determinação simultânea de dopamina e paracetamol em amostras biológicas.	20
3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	21
3.2. EXPERIMENTAL	22
3.2.1. Reagentes e soluções	22
3.2.2. Instrumentação	22
3.2.2.1. Morfologia e caracterização	22
3.2.2.2. Medidas voltamétricas	23
3.2.3. Síntese do óxido de grafeno reduzido	24
3.2.4. Preparo do sensor RGO-CB-CTS/GCE	27
3.2.5. Preparo das amostras de urina sintética	27
3.2.6. Procedimento desenvolvido para a caracterização dos nanomateriais	28
3.2.7. Procedimento eletroanalítico desenvolvido para a determinação simultânea de DA e PAR	28
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30

3.3.1. Caracterização do óxido de grafeno reduzido	30
3.3.2. Avaliação dos componentes do filme	32
3.3.3. Caracterização eletroquímica do sensor	33
3.3.3.1. Área eletroativa	34
3.3.3.2. Constante heterogênea de transferência de elétrons	36
3.3.4. Determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina	40
3.3.4.1. Comportamento eletroquímico da DA e PAR	40
3.3.4.2. Estudo dos parâmetros das técnicas: DPV vs. SWV	43
3.2.4.3. Determinação simultânea de DA e PAR empregando-se a SWV	45
3.2.4.4. Estudo da repetibilidade e de interferentes em potencial	47
3.2.4.5. Determinação de DA e PAR em amostras biológicas	48
3.2.4.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos com o método proposto neste trabalho com métodos já relatados na literatura para a determinação de DA e PAR	49
3.3. CONCLUSÕES PARCIAIS	51
4. Desenvolvimento de um sensor eletroquímico à base de nanodiamantes em filme de hidrocloreto de polialilamina (PAH) para determinação de catecol em águas naturais	52
4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	53
4.2. EXPERIMENTAL	54
4.2.1. Reagentes e soluções	54
4.2.2. Instrumentação	54
4.2.2.1. Morfologia e caracterização	54
4.2.2.2. Medidas voltamétricas	54
4.2.3. Preparo do sensor Dnano-PAH/GCE	55
4.2.4. Preparação das amostras de águas naturais e de distribuição	56
4.2.5. Procedimento eletroanalítico desenvolvido para a determinação de CAT	57
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.3.1. Caracterização do Dnano	58
4.3.2. Caracterização eletroquímica do sensor Dnano-PAH/GCE	59

4.3.2.1. Área eletroativa	60
4.3.2.2. Constante heterogênea de transferência de elétrons	61
4.3.3. Comportamento eletroquímico do CAT	64
4.3.3.1. Estudo do efeito do pH do eletrólito suporte	66
4.3.3.2. Determinação de CAT utilizando a técnica de SWV	67
4.3.3.3. Determinação de CAT utilizando a técnica de DPV	68
4.3.3.4. Comparação entre as técnicas SWV e DPV	70
4.3.3.5. Estudo da repetibilidade e de interferentes em potencial	70
4.3.3.6. Determinação de CAT em águas naturais	71
4.3.4. Comparação dos parâmetros obtidos neste trabalho com o de outros trabalhos descritos na literatura	72
4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS	74
5. CONCLUSÕES GERAIS E TRABALHOS FUTUROS	75
5.1. CONCLUSÕES GERAIS	75
5.2. Trabalhos futuros	75
6. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O estudo de sensores atrai crescente atenção da comunidade científica por ter uma vasta gama de aplicabilidade nas mais diversas áreas, a saber: saúde, militar, controle de processos, de alimentos, de bebidas e agricultura, entre outras. Os sensores são dispositivos que possibilitam uma variedade de modificações em sua estrutura por meio da utilização dos mais diferentes materiais e arquiteturas. São empregados juntamente com as técnicas eletroanalíticas (voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*), voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*), voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*), amperometria, entre outras) possibilitando a determinação dos mais diferentes analitos como pesticidas, compostos fenólicos, fármacos e metais pesados. Estes podem ser determinados em diversas matrizes como amostras de água naturais, alimentos e fluidos biológicos (*eg.* urina, fluido espinhal, soro). Dessa forma, a combinação dos sensores eletroquímicos com as técnicas eletroanalíticas despertam interesse por serem capazes de mudar significativamente o panorama da química analítica, uma vez que na quantificação de diferentes analitos utilizando estas ferramentas tem-se vantagens, de modo geral, como curtos tempos de análise, custo relativamente baixo, muitas vezes não há a necessidade de uma etapa de preparo de amostra, além de ser possível alcançar (com as técnicas de pulso) alta sensibilidade e baixos limites de detecção (LD) (10^{-9} a 10^{-6} mol L⁻¹).

Além disso, a escolha dos nanomateriais de carbono para modificar a superfície dos diferentes eletrodos e confeccionar novas arquiteturas de sensores eletroquímicos torna-se atraente uma vez que esses apresentam características distintas. De modo geral, essas propriedades são força mecânica, ampla faixa de potencial de trabalho, são razoavelmente inertes quimicamente e susceptíveis a modificação de suas estruturas, bem como inserção/remoção de

grupos funcionais em suas estruturas. Em alguns casos, esta última pode levar a uma maior transferência de elétrons na interface eletrodo/solução e aumentar a área eletroativa, o que torna uma ferramenta bastante interessante para aplicações analíticas.

1.2. Nanomateriais de carbono

Nanomaterias são estruturas que apresentam uma de suas dimensões compreendidas entre 1 e 100 nm. Quando comparados ao mesmo material na forma *bulk*, esses apresentam distintas características como força mecânica, condutividade elétrica e térmica e compatibilidade com materiais biológicos. Essas propriedades são devidas à sua escala nanométrica, o que permite suas aplicações nos mais diversos campos da ciência como mecânica, óptica, magnética, eletrônica, eletroquímica e bioquímica, bem como o desenvolvimento de novas arquiteturas de sensores eletroquímicos.

Nesse contexto, os nanomaterias de carbono são exemplos desses materiais com uma de suas dimensões nas escalas nanométricas. Estes apresentam características como ampla faixa de potencial de trabalho, são razoavelmente inertes quimicamente e suas superfícies podem ser modificadas por meios de procedimentos químicos, em sua maioria, fáceis de conduzir. São alguns exemplos destes nanomateriais o fulereno, o grafeno, o carbono amorfo e os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *carbon nanotubes*) (de parede simples e múltiplas paredes), apresentados na FIGURA 1.1.

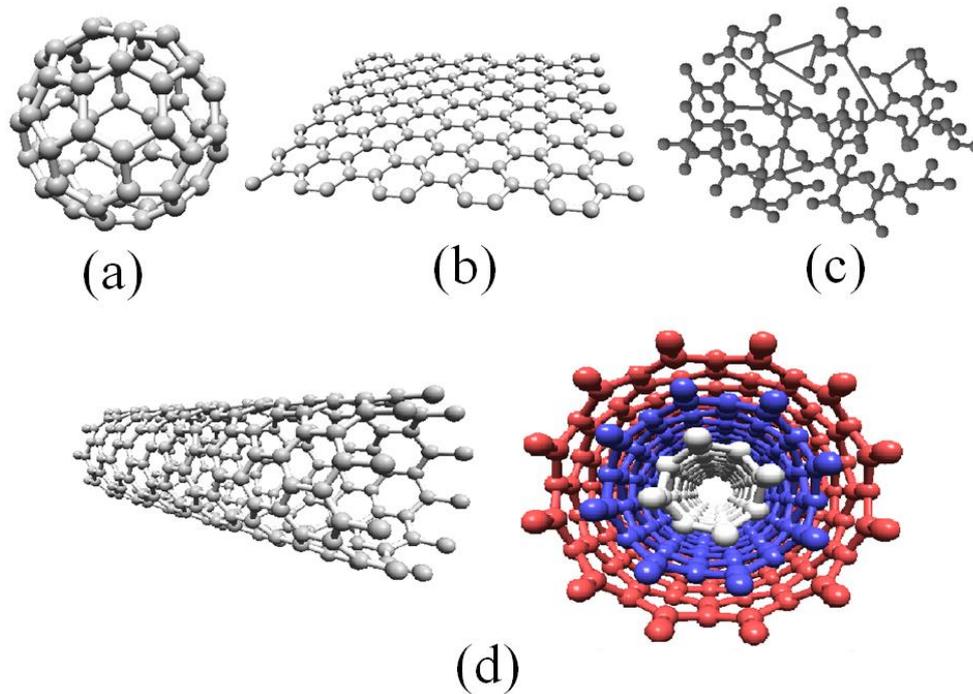


FIGURA 1. 1 - Estrutura dos nanomateriais de carbono sendo (a) fulereno, (b) grafeno, (c) carbono amorfo e (d) CNTs (de parede simples e paredes múltiplas)

1.2.1. Grafeno

O grafeno é um composto originado a partir do material *bulk* grafite, no qual tem-se uma estrutura organizada em camadas, onde em cada uma os átomos de carbono estão dispostos em hexágonos, sendo as ligações entre estes extremamente fortes (ligações π conjugadas). Ainda, no grafite, temos que entre essas camadas (distância aproximadamente de 3,35 Å), tem-se os carbonos fazendo ligações de Van Der Waals, e portanto, ligações fracas e fáceis de quebrar, o que o torna um material descamável¹. Assim, uma camada desse grafite é conhecida como grafeno. Na FIGURA 1.2 é apresentada a estrutura do grafite.

Desde 2004, quando Novoselov *et al.*² propuseram um mecanismo para preparar folhas de grafeno através da esfoliação do grafite pirolítico, este se tornou um material muito estudado por inúmeros pesquisadores. Nesse contexto, o grafeno é um material composto por átomos de carbono hibridizados sp^2 na

forma de uma camada bidimensional infinita³. Ele apresenta uma de suas dimensões laterais nas escalas nanométricas, o que lhe confere propriedades físico-químicas únicas quando comparadas com o mesmo material sólido na forma *bulk* (grafite), tais como elevada área superficial, condutividade térmica e elétrica e força mecânica.

Devido às propriedades diferenciadas que apresenta esse nanomaterial à base de carbono tem atraído bastante interesse científico e tecnológico, mostrando-se promissor para a otimização de componentes eletrônicos, células a combustível, células solares, biotecnologia e desenvolvimento de sensores e biossensores.

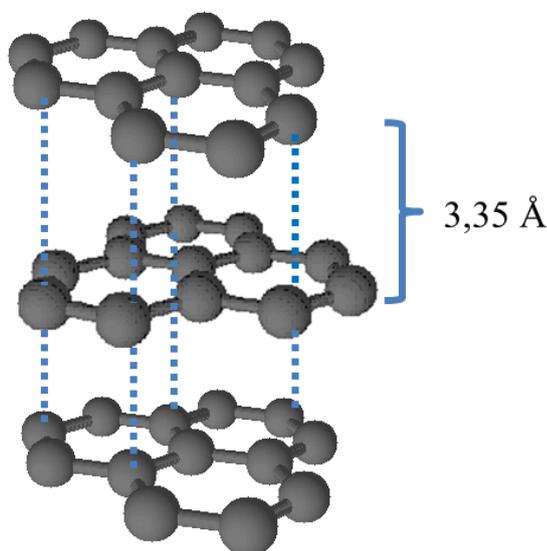


FIGURA 1. 2 - Estrutura do grafite.

1.2.1.1. Óxido de grafeno vs. óxido de grafeno reduzido

Para a síntese do grafeno, tem-se que o grafite pode ser oxidado por diferentes ácidos fortes e como resultado obtém-se a formação de folhas de óxido de grafite. Além disso, existem diferentes métodos para a separação dessas folhas, pois geralmente o desejado é descamar essas folhas de óxido de grafite para se obter a folha de óxido de grafeno. Assim, pode-se citar a esfoliação mecânica, onde a partir de um pedaço do *bulk* de grafite, utiliza-se

força mecânica para delaminar as camadas (esse método também é conhecido como *scotch tape*)². Outro procedimento seria a esfoliação na fase líquida, sendo geralmente empregados cátions metálicos como o K^+ e Na^+ entre as camadas do grafite para aumentar a distância entre as mesmas e, em seguida, utiliza-se forças mecânicas (sonificação, agitação mecânica ou borbulhamento) para separá-las totalmente, sendo todo este procedimento feito em solução⁴. Nesse contexto, obtém-se então a folha de óxido de grafeno (GO, do inglês *graphene oxide*). Neste material, observa-se a presença de diferentes grupos funcionais tais como hidroxila, epóxi, carbonila e carboxila, tanto no plano basal da folha (em cima e abaixo do plano desta) quanto no plano edge (extremidades da folha). Ainda, tem-se a quebra da maioria das duplas ligações na folha, sendo portanto a maioria dos carbonos sp^3 no GO. Assim, devido à essa mudança da hibridização do carbono e a existência desses grupos funcionais, principalmente no plano basal, observa-se uma perda significativa na condutividade do material^{1,5}. Pensando nisso, tem sido propostas as utilizações de alguns reagentes redutores como hidrazina⁶, ácido ascórbico⁷ e boroidreto de sódio⁸ para reduzir o GO. Como resultado, obtém-se a folha de óxido de grafeno reduzido (RGO, do inglês *reduced graphene oxide*)⁹, com poucos grupos funcionais nas extremidades, sendo a maioria dos carbonos do tipo sp^2 em sua rede extrutural, o que confere maior condutividade ao composto, e o torna um material interessante, como por exemplo, para a fabricação de sensores e biossensores eletroquímicos¹⁰. O processo de síntese do RGO, de maneira sucinta, é representado na FIGURA 1.3.

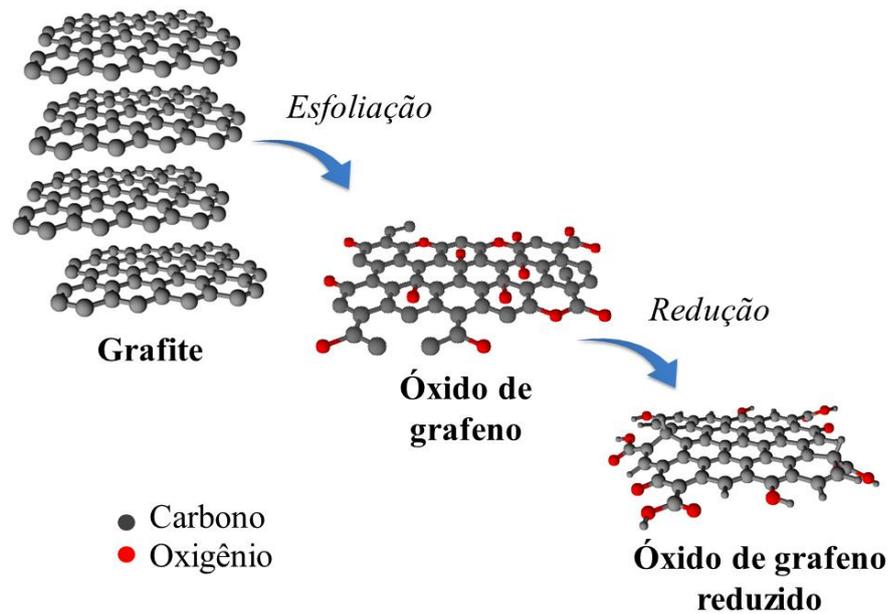


FIGURA 1. 3 - Síntese do óxido de grafeno reduzido a partir do material *bulk* grafite.

1.2.2. Carbon black

O carbon black (CB) também conhecido como negro de fumo é uma espécie de carbono amorfo, com alta relação entre área superficial e volume, sendo muito utilizado na área industrial para pigmentação de tintas, como agente condutor elétrico de materiais de alta tecnologia e principalmente na produção de borracha¹¹.

O CB pode ser produzido pelo método da decomposição térmica ou da combustão parcial sob condições controladas, tendo como matéria prima destes processos os hidrocarbonetos (*eg.* óleo ou gás natural). Assim, existem diferentes espécies de CB, sendo que suas características variam de acordo com a sua síntese. Dentre os diversos processos tem-se o de fornalha, o mais utilizado para a produção em massa devido ao elevado rendimento de sua produção. Esse processo é baseado na queima de óleo de petróleo ou carvão em altas temperaturas e, como resultado, apresenta partículas com tamanho e estrutura controladas, o que garante a obtenção das propriedades desejadas do

material. Outros processos seriam o de canal, (o qual fornece o CB com diversos grupos funcionais na superfície, sendo utilizado em algumas aplicações de pintura), o de acetileno negro (obtido pela decomposição térmica de gás acetileno, gerando um material com maior cristalinidade, sendo empregado em agentes condutores elétricos) e o *lampblack* (obtem-se o CB a partir de fuligem de fumaça da queima de óleos ou madeira de pinho, sendo usado para a produção de tintas)¹².

Sobre a estrutura química deste material tem-se que este é composto por carbonos sp^2 (grupos de 4 folhas de grafite) e carbonos sp^3 (ligados aleatoriamente), conferindo a este material uma forma amorfa, como pode ser visto na FIGURA 1.4. Ademais, ligados a esses carbonos pode-se ter grupos funcionais como hidroxila, carboxila, cetona e carbonila devido à síntese deste material ser geralmente na presença de oxigênio. Assim, as propriedades desse material são: alta condutividade devido à presença de carbono sp^2 , forma dispersões estáveis em meio aquoso (presença de grupos funcionais) e, além disso, trata-se de um material extremamente barato (~R\$ 3,00/kg), o que o torna uma alternativa interessante para a construção de novas arquiteturas de sensores^{13,14}.

Na literatura, são encontrados trabalhos empregando este nanomaterial na fabricação de sensores e biossensores para a determinação de diferentes analitos como pesticidas¹⁵, compostos fenólicos¹⁶, glicose¹⁷, fármacos¹⁸ e metais pesados^{19,20}.

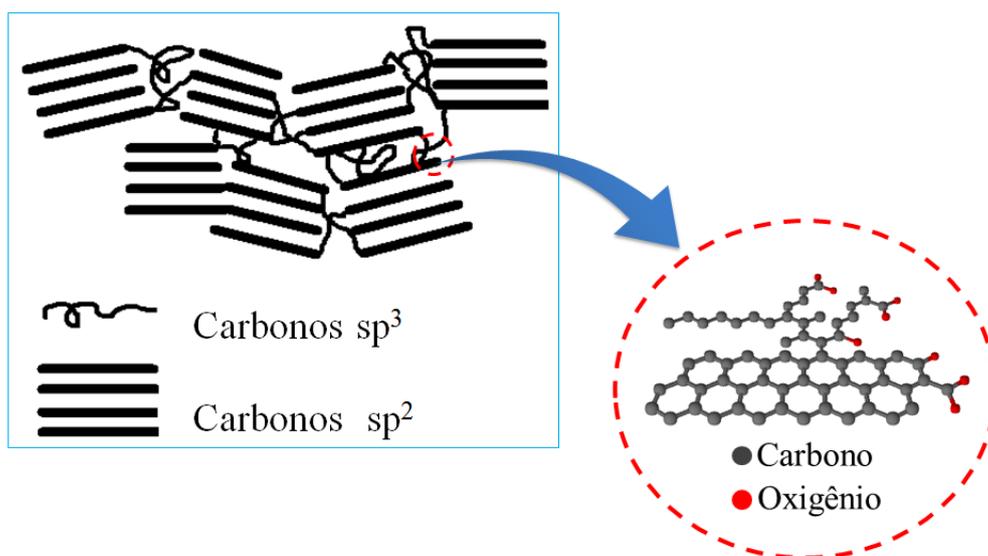


FIGURA 1. 4 - Estrutura do nanomaterial de carbon black (negro de fumo).

1.2.3. Nanodiamantes

Os nanodiamantes (Dnano) foram sintetizados pela primeira vez em 1960 na antiga União Soviética, baseado na irradiação do grafite por ondas de choque, geradas pela detonação de explosivos da mistura de TNT (2-metil-1,3,5-trinitrobenzeno, fórmula molecular $C_6H_2(NO_2)_3CH_3$) e RDX (hexogeno, fórmula molecular $C_3H_6N_6O_6$) em uma câmara fechada metálica com atmosfera de N_2 , CO_2 e água líquida e/ou gasosa^{21,22}. Após a detonação, as fuligens que sobraram estavam cheias de nanopartículas de diamante²¹, como apresentado na FIGURA 1.5. Entretanto, foi na década de 80 que este material passou a atrair interesse científico e industrial, sendo hoje produzido por diferentes métodos como por exemplo, detonação, ablação a laser, plasma assistido por deposição química de vapor, síntese em autoclave a partir de fluidos supercríticos e cavitação com ultrassom²².

Dnano é um material com partículas de tamanho menor que 10 nm (com formas de esfera), coloração acizentada e, além disso, apresenta estrutura tetraédrica com carbonos sp^3 hibridizados, com algumas ligações π deslocalizadas e grupos funcionais contendo oxigênio em sua superfície^{23,24}. Devido à algumas de suas propriedades este material tem uma versátil

aplicabilidade nos mais diferentes estudos²⁵. Por exemplo, por ter uma alta dureza e ser quimicamente estável, têm sido utilizado como um polidor muito eficiente²⁶. Por apresentar partículas pequenas e de baixa toxicidade, pesquisas tem sido direcionadas para o seu uso como veículo para princípio ativo de fármacos e tratamentos contra diferentes tipos de câncer²⁷. E ainda, devido a capacidade de produzir dispersões estáveis em meio aquoso (por causa dos grupos funcionais em sua estrutura) e a presença de ligações π em sua superfície (material condutivo)²³, ele torna-se uma interessante ferramenta para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Na literatura poucos trabalhos reportam a utilização de filmes deste material para a modificação da superfície de eletrodos para aplicações eletroanalíticas^{28,29}.

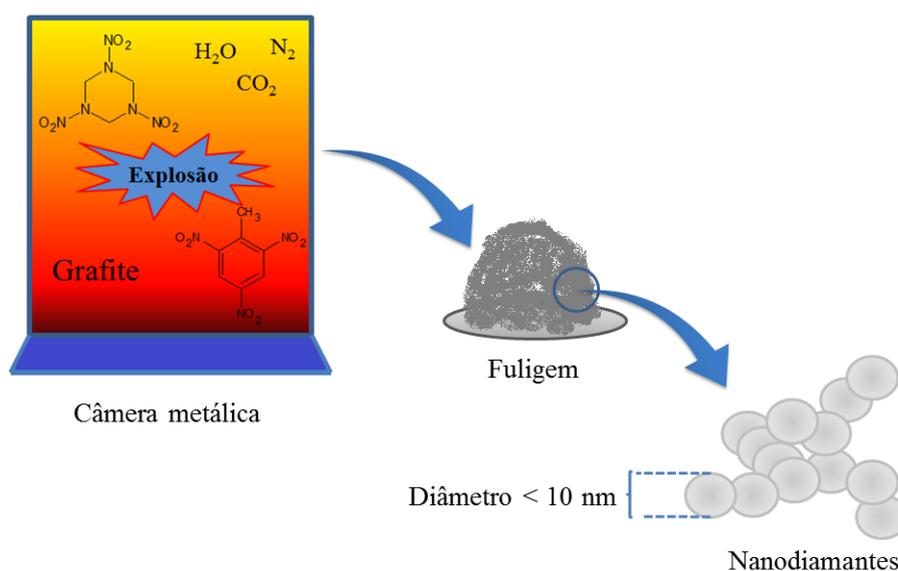


FIGURA 1. 5 - Esquema de síntese dos Dnano pelo método de detonação por choques de ondas.

1.3. Sensores à base de filmes

Estes nanomateriais de carbono podem ser utilizados em eletrodos como pasta, compósito ou filme. Nesse contexto, a preparação de dispersões estáveis com esses nanomateriais para a formação de um filme é uma alternativa para modificar a superfície dos diferentes eletrodos como o de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*), de carbono pirolítico e de ouro. Estas

dispersões devem ser estáveis, proporcionar aderência sobre a superfície do eletrodo e, além disso, não devem impedir a transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. Deste modo, algumas substâncias (*eg.* polímeros, líquidos iônicos, dendrímeros e outros) têm sido utilizados para preparar essas dispersões, a saber: dihexadecil hidrogenofosfato (DHP, do inglês *dihexadecyl hydrogen phosphate*)³⁰, poli(etilenoimina)³¹, hidrocloreto de polialilamina (PAH, do inglês *polyallylamine hydrochloride*)³² e quitosana (CTS, do inglês *chitosan*)³³.

1.3.1. Quitosana

A CTS é um polissacarídeo sintetizado a partir da reação de N-desacetilação da quitina (um biopolímero extraído principalmente de carapaças e exoesqueletos de crustáceos). A CTS apresenta em suas unidades estruturais grupos acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$), amina ($-\text{NH}_2$) e hidroxila ($-\text{OH}$) ligados diretamente ao heterocíclico³⁴ (ver FIGURA 1.6). Devido aos diversos sítios ativos que se encontram em sua molécula, ela torna-se um material extremamente versátil para modificações química, podendo ser aplicada nas mais diversas áreas da ciência como médica, biológica, química e biotecnológica.

Este biopolímero tem pK_a igual a 6,5. Trata-se de um composto insolúvel em água e em solventes orgânicos, entretanto apresenta solubilidade em meio ácido. Em solução ácida, os grupos amino são protonados ($-\text{NH}_3^+$), conferindo ao biopolímero um caráter catiônico, sendo solvatado pela moléculas de água^{35,36} e solubilizando-se. Dependendo do número de grupos amina que se encontram em seu esqueleto estrutural (propriedade essa conhecida como grau de desacetilação) podemos mudar algumas de suas características como, por exemplo, não afinidade pela água (caráter hidrofóbico), solubilidade e viscosidade de suas soluções, entre outras. Com isso, ela torna-se um material muito interessante para a formação de dispersões estáveis com alguns

nanomateriais de carbono para a construção de novas arquiteturas de sensores e biossensores eletroquímicos^{33,37}. Na literatura encontram-se diversos trabalhos utilizando materiais de carbonos como grafeno^{38,39}, nanotubos de carbono^{40,41} e fulereno⁴², dispersos em filme de CTS para modificar a superfície dos mais diferentes eletrodos.

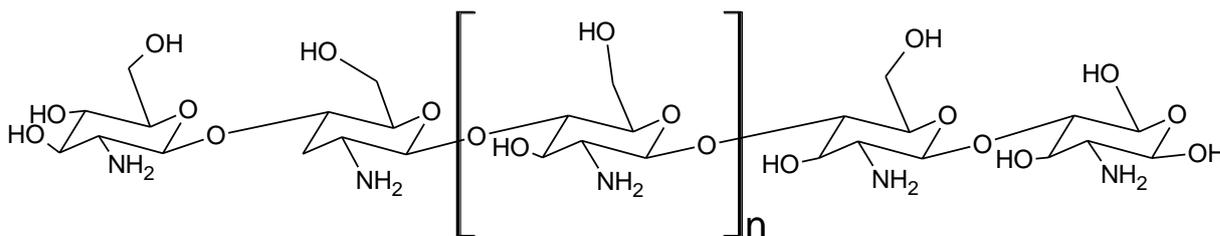


FIGURA 1. 6 - Estrutura da CTS.

1.3.2. Hidrocloreto de polialilamina

O PAH é um polycation em meio aquoso com vários grupos amino ionizáveis ($-\text{NH}_3^+$) em sua cadeia. Apresenta um pK_a entre 8,5 e 9,7, isto significa que em uma solução básica ($\text{pH} = 8,0$), somente uma parte dos aminogrupos estão protonados e o restante desprotonados (grupos amina, $-\text{NH}_2$)⁴³. Essa substância tem sido muito empregada para a técnica de camadas auto-organizadas⁴⁴ (layer-by-layer) e desenvolvimento de sensores eletroquímicos⁴⁵. Na FIGURA 1.7 é apresentada a estrutura do PAH.

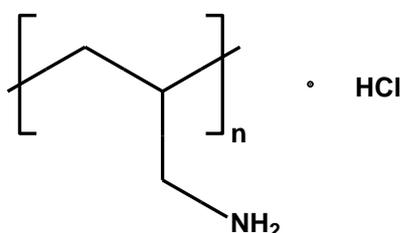


FIGURA 1. 7 - Estrutura do PAH.

Muitos trabalhos utilizando sensores e biossensores empregando PAH em dispersões contendo grafeno³², CNTs⁴⁶ e outros nanomateriais de carbono são reportados na literatura. O PAH interage com estes materiais, em meio aquoso, devido à presença de cargas positivas em sua molécula interagindo, por ligações eletrostáticas, com as cargas negativas dos grupos funcionais presentes nesses nanomateriais de carbono. Como consequência dessas interações, tem-se a formação de dispersões estáveis e homogêneas, que por sua vez, podem ser utilizadas para modificar a superfície dos mais diferentes eletrodos visando distintas aplicações. Assim, estes dispositivos têm sido empregados para a determinação de diversos analitos tais como ácido ascórbico⁴⁷, sulfito⁴⁸, ciprofibrato⁴⁹, compostos fenólicos⁵⁰ e propiltiouracil⁴⁵.

1.4. Aplicação na área ambiental

Um dos problemas mais sérios enfrentados pelas fiscalizações ambientais é o despejo desorganizado e incorreto de resíduos industriais no meio ambiente, responsáveis pela poluição da fauna e da flora. Estes efluentes de plantas industriais tais como refinarias, gaseificadores de coque e plantas petroquímicas, frequentemente contêm elevados teores de substâncias tóxicas, dentre elas, os compostos fenólicos⁵¹.

As substâncias fenólicas apresentam em suas moléculas um ou mais grupos hidroxila (–OH) ligados a um anel aromático, sendo alguns exemplos desta classe apresentados na FIGURA 1.8.

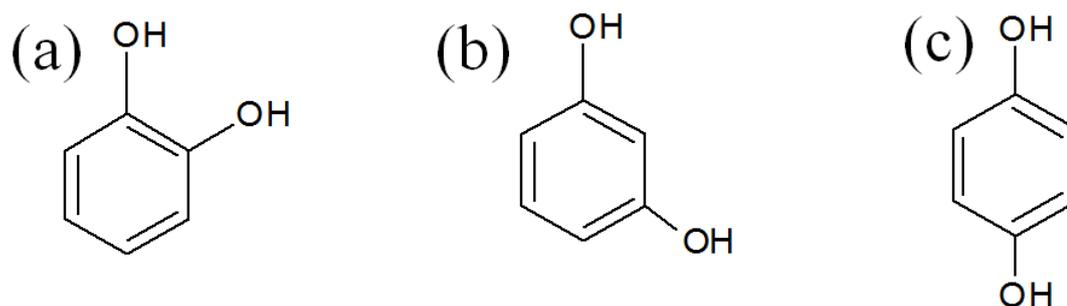


FIGURA 1. 8 - Estrutura molecular de alguns fenóis: (a) catecol (CAT) (b) resorcinol e (c) hidroquinona.

Em estudos laboratoriais foi constatado que em ambientes aquáticos a presença destes fenóis (a níveis de ppm) afeta significativamente as propriedades organolépticas⁵² da água e ainda, no processo de cloração da água potável ocorre a sua reação destes fenóis com o cloro ativo produzindo clorofenóis, substâncias carcinogênicas⁵³. A agência reguladora CONAMA regulamenta por meio da resolução nº 20, de 18 de junho de 1986⁵⁴ a classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional quanto a qualidade das mesmas. Nesse documento encontra-se a quantidade máxima permitida nessas águas de alguns compostos fenólicos (pentaclofenóis e triclorofenóis), sendo este valor de $0,010 \text{ mg L}^{-1}$.

Na literatura são encontrados muitos trabalhos que propõem a determinação de compostos fenólicos utilizando métodos cromatográficos⁵⁵, fluorescência⁵⁶, eletroforese capilar⁵⁷ e espectrofotometria⁵⁸. No entanto, a utilização de métodos eletroquímicos representa uma alternativa para a determinação destes analitos. Esses métodos podem oferecer vantagens como fácil manipulação instrumental, menores tempos de análise, possibilidade de miniaturização do equipamento, podendo assim serem empregados em análise *in situ*, sendo que em muitas aplicações, não são necessárias tratamentos sofisticados das amostras. Assim, na literatura já vem sendo relatados

trabalhados que utilizam como vantagens técnicas eletroquímicas na determinação de compostos fenólicos⁵⁹⁻⁶¹.

Foroughi *et al.*⁶² propuseram um sensor eletroquímico baseado em um GCE modificado com CNTs funcionalizados e rutênio vermelho (fórmula molecular é $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$) para a determinação simultânea de hidroquinona e CAT em águas naturais. O método desenvolvido apresentou alta seletividade e rápido tempo de resposta.

Em outro trabalho Mersal *et al.*⁶⁰ reportaram um método eletroanalítico simples, rápido e seletivo, utilizando um eletrodo impresso de grafite, para a determinação de CAT. A curva analítica obtida foi linear na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um LD de $2,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O sensor proposto foi empregado na determinação de CAT em amostras de águas naturais.

Vicentini *et al.*⁶³ desenvolveram um biossensor modificando a superfície de um GCE com nanopartículas de ouro e a enzima tirosinase em um filme. A determinação de CAT foi realizada utilizando-se a amperometria, sendo a curva analítica linear no intervalo de concentração de CAT de $2,5 \times 10^{-6}$ a $9,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com um LD de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O eletrodo proposto foi aplicado com sucesso na determinação de CAT em águas naturais.

1.5. Aplicação na área medicinal

1.5.1. Catecolaminas

Atualmente, busca-se cada vez mais investir em pesquisas que expliquem como funcionam certas disfunções neurológicas e cardíacas, tais como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, esquizofrenia, depressão e hiperatividade⁶⁴. Em alguns estudos foram observados, que essas patologias podem estar diretamente relacionadas as moléculas de catecolaminas, a saber: adrenalina, serotonina e dopamina (DA) (representadas na FIGURA 1.9).

Dentre as diversas funções que exercem no corpo humano, podem-se destacar algumas como a de neurotransmissor (relacionado a células nervosas enviando sinais e comandos para outras células), exercer ação excitória (que podem levar a um aumento dos batimentos cardíacos e da força de contração) e inibitória (relacionada ao controle da função endócrina como secreção da insulina)^{65,66}.

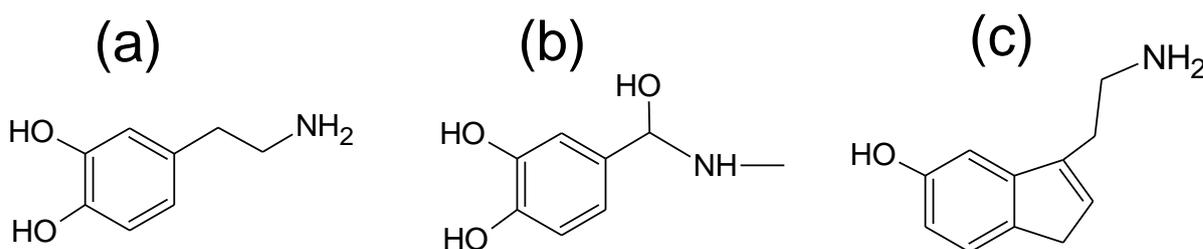


FIGURA 1. 9 - Estruturas moleculares de algumas catecolaminas: (a) dopamina, (b) adrenalina e (c) serotonina.

Muitos trabalhos tem sido propostos utilizando sensores eletroquímicos para a determinação de algumas catecolaminas em fluidos biológicos. Goyal *et al.*⁶⁷ descreveram um sensor eletroquímico para a determinação de DA na presença de altas concentrações de ácido ascórbico utilizando um eletrodo de ouro modificado com fulereno-C60. O método proposto foi utilizado para a determinação desse analito em formulações farmacêuticas, urina e plasma sanguíneo, sendo os fluidos analisados diretamente, sem nenhum tratamento prévio. Moraes *et al.*⁶⁸ reportaram o desenvolvimento, caracterização e utilização eletroquímica de um eletrodo compósito preparado pela mistura de ftalocianina de cobalto, CNTs e parafina, para a determinação quantitativa de adrenalina em amostras de urina humana. Esses pesquisadores empregaram o mesmo sensor em 1000 determinações do analito, indicando a elevada estabilidade do eletrodo compósito fabricado.

1.5.2. Paracetamol

O acetaminofeno (conhecido popularmente como paracetamol (PAR) introduzido pela primeira vez na medicina em 1893 por Von Mering é uma amida aromática acilada (ver FIGURA 1.10), solúvel em água e um dos medicamentos mais utilizados para alívio de dores crônicas, além de ser um dos melhores analgésicos disponíveis no mercado⁶⁹.

Apesar de apresentar baixa toxicidade em doses terapêuticas, em altas concentrações esta droga pode tornar-se nociva à saúde humana. Foi observado em estudos clínicos que uma superdosagem pode levar a insuficiência hepática e renal, podendo em alguns casos até levar a morte⁷⁰. Assim, a sua ingestão é regulamentada no Brasil pela ANVISA, que regulamenta, para adultos, uma ingestão diária admissível de 4g.

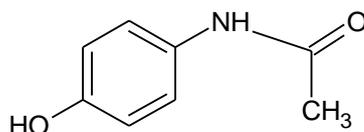


FIGURA 1. 10 - Estrutura molecular do PAR.

Quando ingerido, temos que cerca de 90% de uma dose terapêutica é eliminada na urina em 24 horas. Dessa quantidade, temos que a maioria são metabólitos conjugados e 1 a 4 % é o PAR inalterado⁷¹, o que viabiliza a determinação do mesmo em amostras de urina.

1.5.3. Determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina

Como mencionado, o PAR, uma das drogas mais populares utilizadas para o alívio da dor crônica e devido a sua atividade anti-inflamatória pode ser combinado com outros analgésicos opióides para promover o alívio da dor intensa após algumas cirurgias importantes⁷². Por outro lado, a DA um importante neurotransmissor no corpo humano⁷³, como já descrito

anteriormente, em baixas concentrações ou a sua disfunção do sistema pode estar associado com algumas doenças importantes como, por exemplo a doença de Parkinson⁷⁴. Um dos sintomas agravantes dessa enfermidade são a perda do controle da função motora levando a constantes dores crônicas. Assim, para o alívio dessa dor, alguns médicos receitam para o paciente diferentes analgésicos, dentre eles o PAR, e assim, há a possibilidade de serem encontrados a DA e o PAR na urina excretada pelo portador da doença. Sendo assim, como descrito, é importante quantificar estes analitos individualmente, bem como observar se um analito não interfere na quantificação do outro, quando presentes em uma mesma amostra. Para isso é necessário a busca por métodos cada vez mais seletivos e sensíveis para a determinação dos mesmos.

Neste cenário, surgem as técnicas eletroanalíticas como uma alternativa para a determinação simultânea desses analitos. Os métodos eletroanalíticos, via de regra, apresentam sensibilidades comparável àquelas obtidas com o emprego de técnicas de cromatografias, tendo como vantagem, na maioria dos casos, a não necessidade de preparo mais sofisticado da amostra, como é o caso da urina, requerendo apenas a diluição da mesma. Considerando-se a similaridade das estruturas moleculares da DA e do PAR, torna-se um desafio quantificá-las e/ou determiná-las empregando-se um método eletroquímico. Nestes casos, os eletrodos modificados surgem como alternativa viável para resolver ou solucionar os problemas de resolução do método, geralmente encontrados quando se usam eletrodos de trabalho sem modificação. Outras vantagens desses eletrodos modificados incluem geralmente a ampla janela de trabalho, a rápida transferência de elétrons na interface eletrodo/solução, além do que, em alguns trabalhos, o preparo desses eletrodos tem um custo reduzido do material empregado na modificação da superfície do eletrodo base.

Canevari *et al.*⁷⁵ propuseram um método sensível para a determinação simultânea de DA, ácido úrico e paracetamol em amostra de urina

humana, utilizando sílica mesoporosa (SiO_2) com CNTs de parede múltiplas (MWCNTs) modificando a superfície de um GCE (o sensor foi denominado $\text{SiO}_2/\text{MWCNTs}/\text{GCE}$). Os LDs encontrados foram $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para DA, $6,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para o ácido úrico e $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para PAR.

Em outro trabalho, Cheemalapati *et al.*⁷⁶ desenvolveram um sensor baseado na modificação da superfície de um GCE utilizando um nanocompósito de MWCNTs e GO. O sensor MWCNTs/GO/GCE foi utilizado para a determinação de DA e PAR em amostras farmacêuticas e de urina humana. Utilizando a amperometria, a curva analítica foi linear no intervalo de concentração de DA de $2,0 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e para PAR de $5,0 \times 10^{-7}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os limites de detecção calculados foram iguais a $2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para DA e $4,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho de dissertação teve por objetivo desenvolver e caracterizar novas arquiteturas de sensores utilizando eletrodos à base de nanomateriais de carbono para a determinação de compostos fenólicos e neurotransmissores em amostras biológicas e ambientais, respectivamente

3. Desenvolvimento de um sensor eletroquímico à base de grafeno e carbon black (negro de fumo) em filme de quitosana para determinação simultânea de dopamina e paracetamol em amostras biológicas.

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver uma nova arquitetura de sensor utilizando RGO e CB dispersos em um filme de CTS sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (RGO-CB-CTS/GCE) para a determinação simultânea de DA e PAR em amostras biológicas.

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Reagentes e soluções

Boroidreto de sódio, NH_3 , HCl , DA, PAR, CTS de baixa massa molar (grau de desacetilação de 80 %), ureia, glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e pó de grafite foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O CB, Vulcan XC72R, utilizado foi fornecido gratuitamente pela Cabot Corporação. Todos os outros reagentes foram de grau analítico e utilizados tais como recebidos. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade $\geq 18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtido a partir de um sistema Milli-Q da Millipore[®] (Billerica, EUA). Utilizou-se um tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 6,2$) como eletrólito suporte, preparado com os sais Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 obtidos da Sigma-Aldrich.

Uma solução estoque de CTS 1,0 % m/v foi preparada pela dissolução de 2,5 g de CTS em 250 mL de ácido acético 1,0 % v/v em água. A solução foi misturada e agitada com o auxílio de um agitador magnético durante 3 h até a dissolução completa, e em seguida, foi armazenada a 4°C .

As soluções estoque de DA e PAR $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas pela dissolução dessas substâncias em tampão de fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 6,2$). Quando necessário, as soluções padrões de ambos os analitos foram preparadas em concentrações diferentes por meio de diluições da solução estoque.

3.2.2. Instrumentação

3.2.2.1. Morfologia e caracterização

Para a caracterização do material sintetizado, RGO, foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) de alta resolução, utilizando um microscópio XL30 FEG (Philips[®]). Um espectrômetro Hitachi U2001 foi utilizado para as medidas espectrofotométricas do nanomaterial RGO. Também foi empregado um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Nicolet iS50

(Thermo Scientific) para verificar a presença de grupos funcionais nos nanomateriais de GO e RGO. E por fim, um equipamento de espalhamento dinâmico de luz Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) foi utilizado para estimar o diâmetro médio das nanopartículas de RGO.

3.2.2.2. Medidas voltamétricas

As medidas eletroquímicas foram realizadas usando um Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie) potenciostato/galvanostato acoplado a um microcomputador gerenciado pelo programa GPES 4.9. A célula eletroquímica utilizada foi um sistema convencional com compartimento único para encaixe de de três eletrodos, utilizando o sensor RGO-CB-CTS/GCE como eletrodo de trabalho (WE, do inglês *working electrode*), uma placa de platina como contra eletrodo (CE, do inglês *counter electrode*), e Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência (RE, do inglês *reference electrode*) (FIGURA 3.1).

Na célula eletroquímica foram utilizados uma alíquota de 10 mL de eletrólito suporte (tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH = 6,2) para a realização das medidas eletroquímicas. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura controlada de 25 ± 1 °C. As medições de pH foram realizadas em um pHmetro digital Orion (modelo EA 940), conectado a um eletrodo combinado de vidro Digimed com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). O equipamento de banho de ultrassom utilizado foi um UNIQUE modelo Ultraclean 1400 A, e todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Mettler (modelo H10) com precisão de ± 0,1 mg e uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D com precisão de ± 0,01 mg.

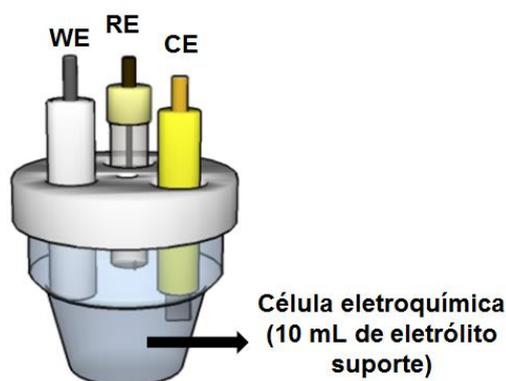


FIGURA 3. 1 - Célula Eletroquímica.

3.2.3. Síntese do óxido de grafeno reduzido

O procedimento da síntese do RGO é ilustrado na FIGURA 3.2. Inicialmente, o GO foi sintetizado a partir do pó de grafite pelo método de Hummer modificado^{77,78} (etapa 1).

No método original descrito por Tung et al.⁷⁸ utilizou-se grafite natural em pó com granulometria de 200 mesh, já na síntese desse trabalho a esfoliação foi realizada baseada no mesmo procedimento, entretanto algumas adaptações foram feitas devido ao uso do grafite expandido. Este possui um volume 200 vezes maior que o grafite em pó, o que pode levar a uma maior área de reação, aumentando a qualidade da esfoliação, e a utilização de uma menor quantidade de grafite oxidado, ou folhas de grafeno maiores que uma camada.

Assim, o grafite foi pré-tratado com a adição de 120 mL de H_2SO_4 concentrado e aquecido até 90 °C. A esta mistura foram adicionados 2,5 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ e P_2O_5 , em agitação, até a completa dissolução dos reagentes. A mistura foi esfriada até 80 °C e adicionou-se 3 g de grafite, mantendo-se a dispersão nesta temperatura durante 4,5 horas. Na sequência, a solução foi diluída em 500 mL de água deionizada, sendo deixada em descanso durante a noite inteira. Posteriormente, a solução foi filtrada utilizando-se filtro qualitativo 80g e água em abundância para retirar traços de ácido. Em seguida, esta foi secada em uma estufa a 50 °C por 24h.

Para a etapa de oxidação, foram adicionados 200 mL de H_2SO_4 em um erlenmeyer (mantido a $0\text{ }^\circ\text{C}$). A este erlenmeyer foram adicionados 15 g de KMnO_4 , sendo a temperatura monitorada constantemente para não ultrapassar os $10\text{ }^\circ\text{C}$ até a total adição do reagente. A solução foi mantida por 2 horas a $35\text{ }^\circ\text{C}$, e ao final deste período foi observada uma coloração esverdeada da mesma. Em sequência, adicionou-se 230 mL de água deionizada, vagarosamente a solução, sendo a temperatura controlada para não ultrapassar os $50\text{ }^\circ\text{C}$. Feito isso, a solução foi deixada sob agitação durante 2 horas, obtendo-se ao final deste período uma cor marrom escura para a solução. Em seguida completou-se o volume da solução até 700 mL seguido da adição de 12 mL de H_2O_2 30% v/v. É observada uma solução com coloração dourado brilhante, sendo esta deixada sob agitação por alguns minutos. Após isso, a solução ficou em repouso sob a bancada por toda a noite.

No dia posterior retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1250 mL de HCl 10% e centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 minutos a solução. Novamente foi retirado o sobrenadante e adicionou-se água para lavar o grafeno e neutralizar o ácido, sendo realizada esta etapa três vezes. Em seguida, o material foi colocado em uma membrana de diálise com um cutoff de 10 kDa e mantida por uma semana, sendo esta água trocada duas vezes ao dia. No final, foi observada uma cor marrom da solução e esta foi armazenada à $4\text{ }^\circ\text{C}$ para evitar proliferação de fungos.

Após a esfoliação química do óxido de grafite (etapa 2), foi formada uma solução viscosa de coloração escura a qual foi deixada em uma membrana de diálise de 2 kDa, durante duas semanas, para remover possíveis vestígios de metais e outros contaminantes, seguida por armazenagem a $4\text{ }^\circ\text{C}$ (etapa 3).

Uma massa de 50 mg de GO foi seca e transferida para um balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL, sendo então adicionados 100 mL de dimetilformamida (DMF) e 1 mL de NH_3 28 % v/v. Essa solução foi deixada em

um banho ultrassônico durante 2 horas (etapa 4). Sequencialmente, a mistura resultante foi deixada em refluxo a uma temperatura de 95 °C e, então, foi adicionado 16 mL de boroidreto de sódio 0,10 mol L⁻¹ (etapa 5). A reação de redução do GO ocorreu durante 8 horas. Para remover o DMF, a solução foi mantida por uma semana em membrana de diálise de 10 kDa, sendo esta inserida em uma proveta de 500 mL contendo água ultra pura, e o solvente então passou a ser água (concentração final de RGO foi de 0,80 mg mL⁻¹) (etapa 6). Ao final, a dispersão foi estocada em um frasco âmbar e armazenada a 4 °C.

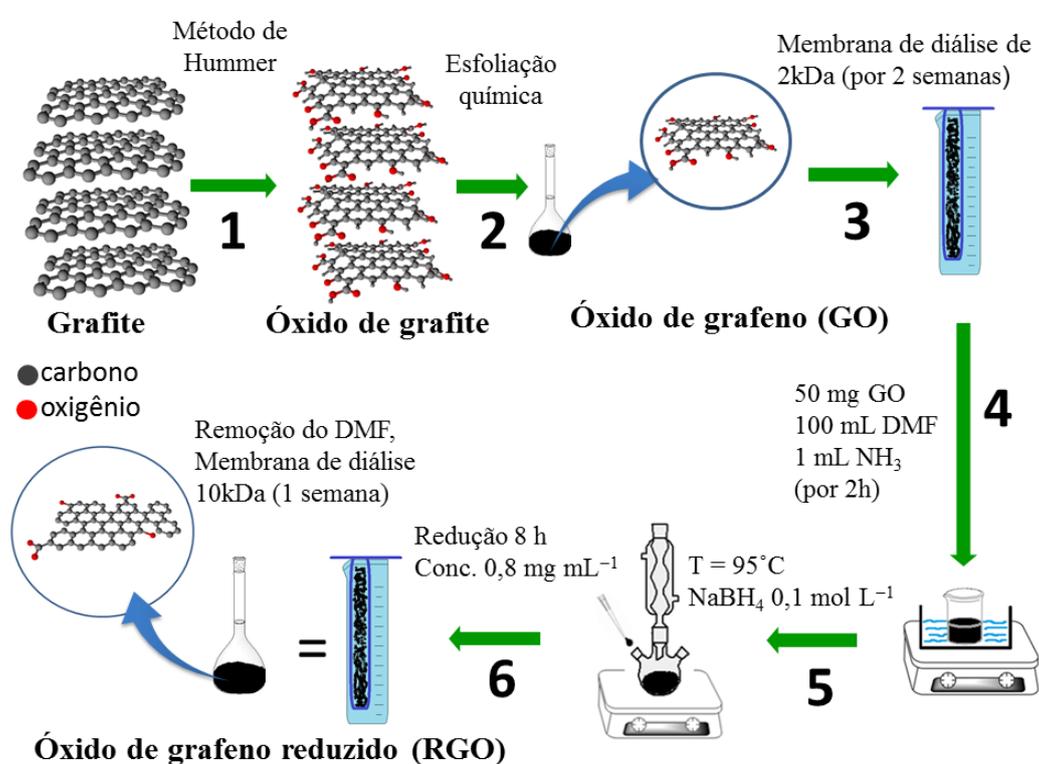


FIGURA 3. 2 - Representação esquemática da síntese de RGO. Etapa 1: GO é preparado a partir do pó de grafite pelo método de Hummer modificado. Etapa 2: esfoliação química do óxido de grafite. Etapa 3: solução de GO é deixada em uma membrana de diálise (2 kDa) durante duas semanas. Etapa 4: foi adicionado 100 mL de DMF e 1 mL de NH₃ (28 % v/v) em 50 mg de GO e a mistura é deixada em um banho ultrassônico por 2 horas. Passo 5: a solução é colocada em refluxo (T = 95 °C) e adiciona-se boroidreto de sódio. Passo 6: redução do GO ocorre durante 8 horas e para remover o DMF, a solução é mantida por uma semana em membrana de diálise (10 kDa).

3.2.4. Preparo do sensor RGO-CB-CTS/GCE

O GCE ($\varnothing = 3,0$ mm) foi polido com alumina (partículas de $0,5$ μm) com o auxílio de uma politriz durante 5 min para se obter uma superfície espelhada. Em seguida, lavou-se com água ultrapura, sonicou-se com isopropanol absoluto e água deionizada por aproximadamente 1 min, todos os dias antes da preparação do eletrodo de trabalho.

Para o preparo da dispersão, em um microtubo foram adicionados 600 μL da solução estoque de RGO $0,80$ mg mL^{-1} , $0,50$ mg de CB e 400 μL de CTS (a partir da solução estoque). A solução foi homogeneizada em um banho ultrassônico durante 30 min, e em seguida 8 μL da dispersão RGO-CB-CTS foram pipetados e gotejados sobre a superfície do GCE previamente limpo. Deixou-se o eletrodo secar a temperatura ambiente (25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$) durante 2 horas. E quando não utilizado, o mesmo era armazenado nas condições já supramencionadas. O sensor fabricado foi denominado RGO-CB-CTS/GCE (FIGURA 3.3).

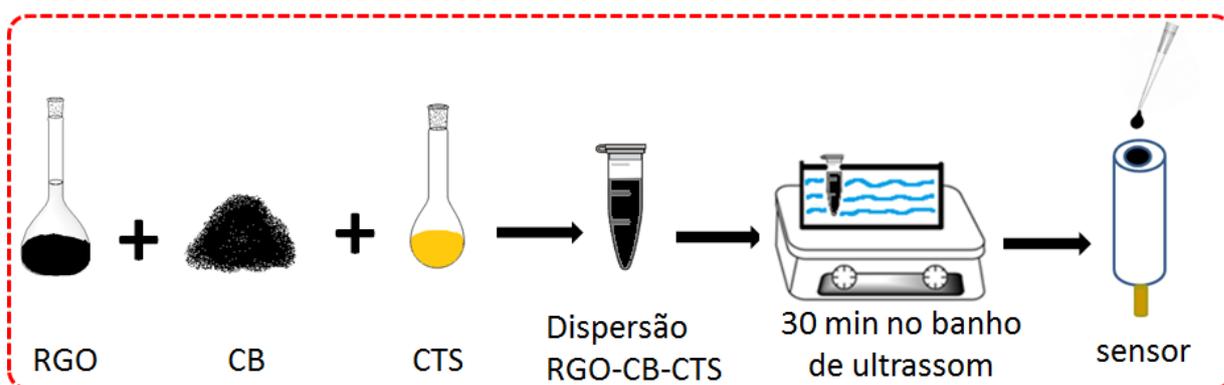


FIGURA 3. 3 - Processo de preparo do sensor RGO-CB-CTS/GCE.

3.2.5. Preparo das amostras de urina sintética

Para preparar as amostras de urina foram utilizados alguns componentes presentes em amostras reais, tais como $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,28$ g), NaCl ($0,73$ g), Na_2SO_4 ($0,56$ g), KH_2PO_4 ($0,35$ g), KCl ($0,40$ g), NH_4Cl ($0,25$ g) e

ureia (6,25 g)^{79,80}. Todos os reagentes foram dissolvidos em 250 mL de água ultrapura. É importante destacar que esta solução foi utilizada imediatamente após a sua preparação para evitar possíveis interferentes no caso de ocorrer a hidrólise da ureia.

3.2.6. Procedimento desenvolvido para a caracterização dos nanomateriais

O processo de redução do GO foi investigado por meio de medidas espectrofotométricas. Assim, 100 μL da solução estoque de RGO foi diluída com água ultrapura para um volume final de 1,0 mL e o espectro de absorção do material foi então obtido. Do mesmo modo, para o estudo de espalhamento dinâmico de luz do nanomaterial RGO foram preparadas três soluções diferentes. Assim, 10 μL , 50 μL e 100 μL de solução estoque de RGO foram diluídas em água ultrapura com o auxílio de um microtubo para completar o volume final para 1,0 mL de solução.

3.2.7. Procedimento eletroanalítico desenvolvido para a determinação simultânea de DA e PAR

Inicialmente foi investigado o efeito da concentração hidrogeniônica (pH) do eletrólito suporte sob a resposta voltamétrica dos analitos DA e PAR pela técnica de DPV. Em seguida, foram estudados as melhores condições experimentais das técnicas de SWV e DPV para a quantificação de DA e PAR. Os parâmetros avaliados na SWV foram frequência de aplicação de pulso de potenciais (f), amplitude de potencial (a) e incremento de varredura (ΔE_s), e para DPV foram velocidade de varredura de potencial (v), amplitude de potencial (a), e tempo de modulação do pulso (t). Posteriormente, as curvas analíticas foram construídas para os dois analitos, individualmente, pelas duas técnicas, e os valores de LD, faixa linear e sensibilidade foram

encontrados e comparados. Para todas as curvas analíticas, os valores de LD foram calculados pela relação: $3 \times SD/S$, sendo SD o desvio padrão (do inglês *standard deviation*) do branco ($n = 10$) e S o coeficiente angular (do inglês *slope*) da curva analítica e a técnica selecionada para as próximas etapas foi a SWV, como apresentado na seção resultados e discussão.

Um vez selecionada a técnica voltamétrica, foram construídas as curvas analíticas fixando-se um analito e fazendo-se adições sucessivas do outro. Após esse estudo, foi feita então a determinação simultânea dos analitos, adicionando-se diferentes concentrações de ambos analitos na célula eletroquímica.

Também foram conduzidos estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 8$) e inter-dias ($n = 3$) para uma concentração de DA $7,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e de PAR $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, para avaliar a seletividade do método desenvolvido, foi realizada a adição de possíveis interferentes presentes em amostras de urina (ureia, glicose, ácido ascórbico e ácido úrico) a uma solução padrão contendo DA e PAR, nas razões das concentrações da solução padrão: interferentes: 10: 1; 1: 1 e 1: 10. Por fim, o método proposto utilizando o sensor RGO-CB-CTS/GCE foi aplicado para a determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina sintética. Nestas determinações, nas amostras de urina foram adicionadas soluções de DA e PAR, sendo as concentrações finais destes analitos na célula eletroquímica de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a DA e $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o PAR. O método da adição e recuperação da concentração dos analitos foi feita em triplicata ($n = 3$).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Caracterização do óxido de grafeno reduzido

Inicialmente, foram feitas medidas de espectroscopia na região do ultravioleta e visível para a caracterização do RGO sintetizado e o espectro obtido está apresentado na FIGURA 3.4. Para esse estudo, a solução estoque de RGO foi diluída 100 vezes em água ultrapura. Foi observado que o nanomaterial absorve na região entre 260 a 280 nm, que corresponde a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da ligação C=C do anel aromático, o que corrobora com valores encontrados na literatura^{8,81}.

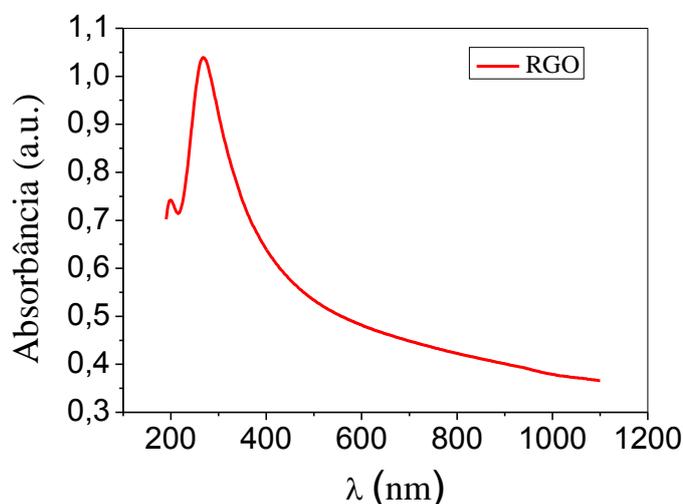


FIGURA 3. 4 - Espectro de ultravioleta do RGO.

Em seguida, foram obtidos espectros de infravermelho dos nanomateriais de GO e RGO e os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 3.5. A partir do espectro obtido para GO, identificou-se alguns grupos funcionais presentes na estrutura deste como grupos hidroxila (OH, em 3300 e 1420 cm^{-1}), carboxila (COOH, em 1745 cm^{-1}) e cetona (C=O, em 1620 cm^{-1})⁸². Já no material RGO observou-se uma diminuição significativa do pico de absorção do grupo OH em 3300 cm^{-1} , sendo um indicativo da redução do GO e ainda, observa-se a presença do grupo C=C (em 1560 cm^{-1})⁸³, evidenciando a restauração de algumas ligações π ao longo da folha do RGO, responsáveis pela

condutividade do mesmo. Apesar dessas evidências, é importante destacar, que mesmo após a redução do GO, ainda é observado a presença de alguns grupos funcionais presentes, evidenciado pela presença do grupo OH em 1240 cm^{-1} .

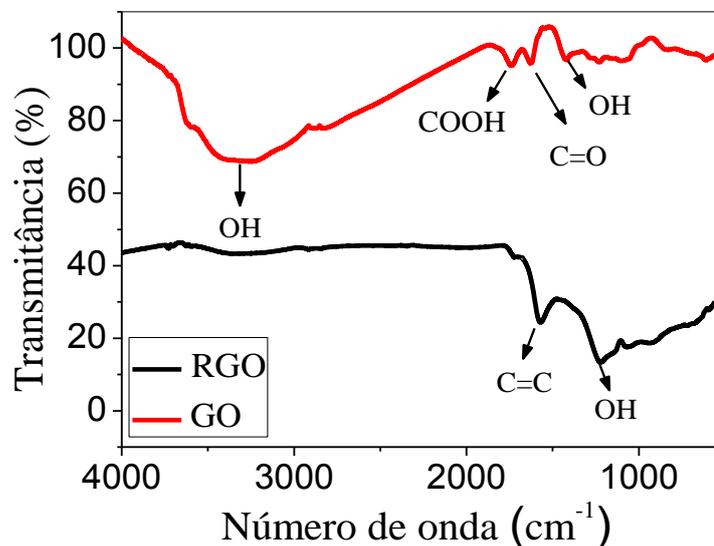


FIGURA 3. 5 - Espectros no infravermelho do RGO e GO.

Foram realizadas medidas de espalhamento dinâmico de luz para estimar o diâmetro médio das nanopartículas de RGO. Para isso foram estudadas 3 diluições (10 vezes, 50 vezes e 100 vezes mais diluídas) a partir de uma solução estoque do nanomaterial, como descrito anteriormente na seção experimental. Com os resultados obtidos construiu-se um gráfico de porcentagem (quantidade das nanopartículas) vs. o tamanho do diâmetro dessas partículas de RGO (ver FIGURA 3.6a). Assim, foi observado um diâmetro entre 300 e 400 nm para a maioria das partículas nas diferentes diluições. Uma imagem de SEM do RGO também foi obtida para avaliar a morfologia do mesmo. Na FIGURA 3.6b, pode ser observado, nas regiões destacados pelos círculos em vermelho, a ocorrência de folhas do RGO.

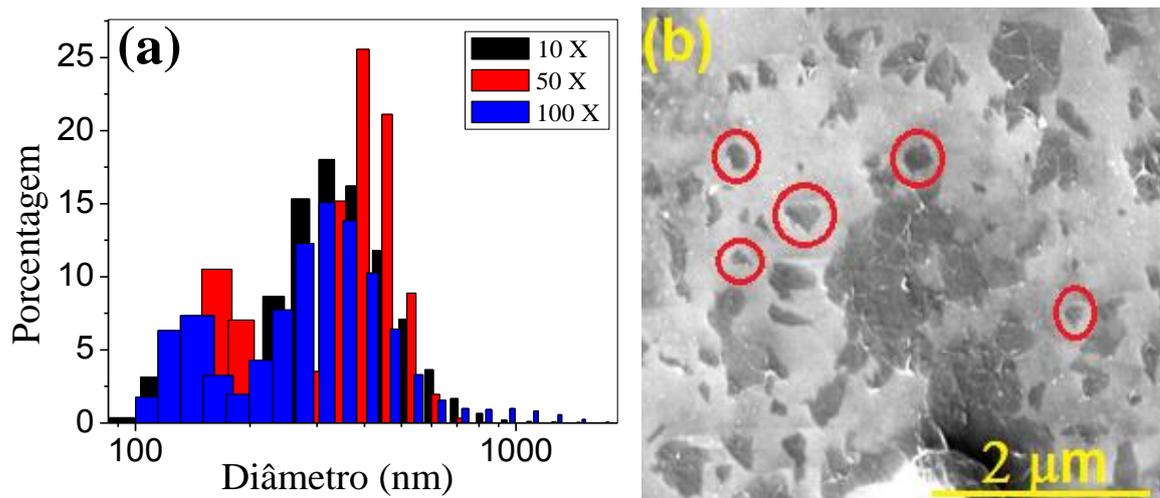


FIGURA 3. 6 - (a) Medidas de espalhamento dinâmico de luz do RGO. (b) Imagem de SEM do RGO sobre a superfície de silício dopado do tipo N.

3.3.2. Avaliação dos componentes do filme

Após a caracterização dos nanomateriais utilizados na dispersão proposta (RGO-CB-CTS), investigou-se, inicialmente, as diferentes razões de RGO e CTS (% v/v). Para esse estudo, utilizou-se a sonda de hexacianoferrato(III) de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e CV ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$) tendo como eletrólito suporte uma solução KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Assim, para 1,0 mL de solução (RGO-CTS), preparou-se as razões seguintes: 50: 50 %, 60: 40 %, 75: 25 %, 80: 20 % e 90: 10 % (v/v; RGO-CTS) e gotejou-se essas dispersões sobre a superfície de um GCE. Na FIGURA 3.7a, encontram-se os respectivos voltamogramas cíclicos obtidos para cada proporção estudada.

A partir dos resultados obtidos foi verificado que a razão 60: 40 % (v/v; RGO-CTS) foi a que apresentou o melhor sinal analítico, sendo assim selecionada para os trabalhos futuros. Além disso, apesar de apresentar uma magnitude de corrente próxima daquela obtida empregando-se a razão de 50: 50 % (v/v; RGO-CTS), a razão selecionada foi aquela que apresentou uma menor separação entre os potenciais de pico ($\Delta E_p = 137 \text{ mV}$), bem menor do que aquela obtida para a razão de 50: 50 % (v/v; RGO-CTS) ($\Delta E_p = 187 \text{ mV}$),

evidenciando uma maior reversibilidade do sistema, corroborando assim com a seleção da razão supramencionada.

A massa de CB no compósito RGO-CB-CTS também foi investigado (FIGURA 3.7b), usando a melhor proporção 60: 40 % (v/v; RGO-CTS) (FIGURA 3.7a). Assim, prepararam-se diferentes dispersões adicionando-se as seguintes massas de CB: 0,30; 0,50; 0,70 e 0,90 mg. Observou-se que com o aumento da massa de CB no filme, houve um aumento da magnitude do sinal analítico até a massa de 0,50 mg. Após esse valor, observou-se que um excesso do nanomaterial pode levar a um bloqueio parcial da superfície ativa do GCE, dificultando a transferência eletrônica e causando uma diminuição da magnitude do sinal analítico. Assim, a partir dos resultados obtidos, foi selecionado a massa 0,50 mg de CB para os estudos seguintes.

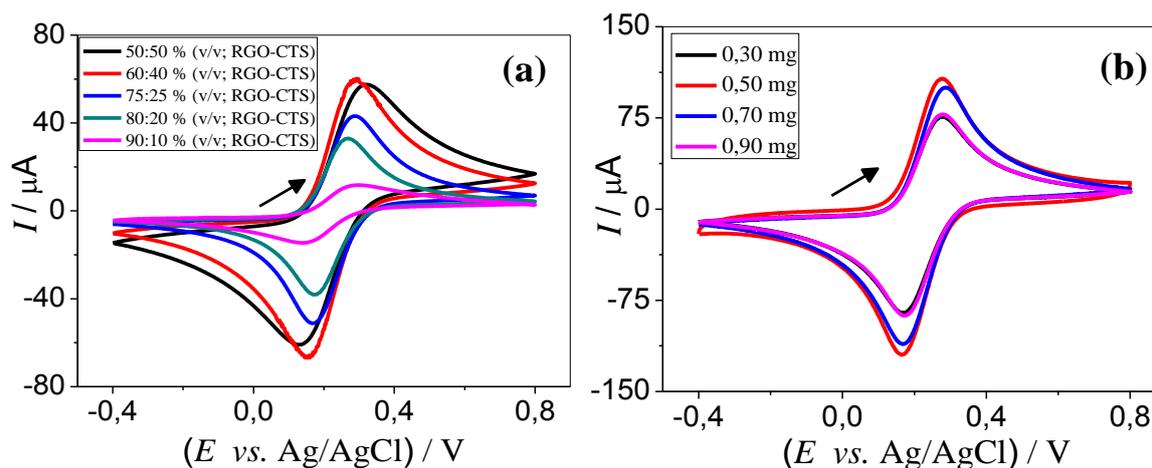


FIGURA 3. 7 - Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de diferentes proporções: 50: 50 %, 60: 40 %, 75: 25 %, 80: 20 % e 90: 10 % (v/v; RGO-CTS), gotejadas sobre a superfície de um GCE; (b) Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de adições diferentes de massas de CB (0,30; 0,50; 0,70 e 0,90 mg) a dispersão 60: 40 % (v/v; RGO-CTS). Ambos na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

3.3.3. Caracterização eletroquímica do sensor

Utilizando a sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foram conduzidos estudos sobre o comportamento eletroquímico do sensor proposto comparando-

se com o comportamento de outros eletrodos. Com os resultados obtidos, foi possível estimar o valor da área eletroativa do RGO-CB-CTS/GCE e entender qual o processo que controla o transporte de massa das espécies na sua superfície, bem como calcular o valor da constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0).

3.3.3.1. Área eletroativa

Após definir a melhor razão para o preparo da dispersão, foram calculados as áreas eletroativas para os eletrodos: GCE, RGO-CTS/GCE, CB-CTS/GCE e RGO-CB-CTS/GCE. Para isso, utilizou-se a CV em diversas velocidades de varredura de potencial de 10 a 500 mV s^{-1} , na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ no eletrólito suporte KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Com os resultados obtidos, contruiu-se um gráfico relacionando a corrente de pico de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. A área eletroativa dos eletrodos desenvolvidos foi estimada utilizando a equação de Randles-Sevcik (Equação 1),

$$I_p = \pm 2,69 \times 10^5 ACD^{1/2}n^{3/2}v^{1/2} \quad (\text{Equação 1})$$

sendo I_p a corrente de pico (A), A a área eletroativa (cm^2), C a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução (mol cm^{-3}), D ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)⁸⁴ o coeficiente de difusão da molécula em solução, n é o número de elétrons envolvidos na reação redox e v a velocidade de varredura de potencial (V s^{-1}).

Na TABELA 3.1 são apresentados os valores obtidos para cada eletrodo, utilizando nos cálculos os valores de correntes anódicas (referentes ao potencial de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). Analisando-se os resultados obtidos observou-se que com a utilização dos dois nanomateriais de carbono (RGO e CB) houve um efeito sinérgico, responsáveis pelo aumento de oito vezes a área eletroativa do eletrodo modificado em comparação com o

GCE. Este fator pode estar relacionado à interação de cargas do biopolímero catiônico (CTS) com os grupos funcionais das extremidades dos nanomateriais aniônicos (RGO e CB). Dessa interação, tem-se um aumento de sítios eletroativos expostos de ambos os nanomateriais (principalmente em seus planos basais onde tem-se uma grande concentração de anéis aromáticos, logo uma concentração de elétrons- π), facilitando desta maneira a transferência eletrônica na superfície do eletrodo. Esse aumento de área pode ser significativo para uma possível aplicação do sensor em eletroanálise, pois pode levar a um aumento de sinal analítico, em alguns casos diminuição do potencial de trabalho, aumento da sensibilidade e diminuição do LD.

TABELA 3. 1 - Área eletroativa de diferentes eletrodos estudados

Eletrodo	Área eletroativa (cm ²)
GCE	0,050
CB-CTS/GCE	0,24
RGO-CTS/GCE	0,23
RGO-CB-CTS/GCE	0,41

Área geométrica = 0,070 cm²

Nas FIGURA 3.8a, b, c e d são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos para os diferentes eletrodos propostos estudando-se a faixa de velocidade de varredura de potencial de 10 a 500 mV s⁻¹.

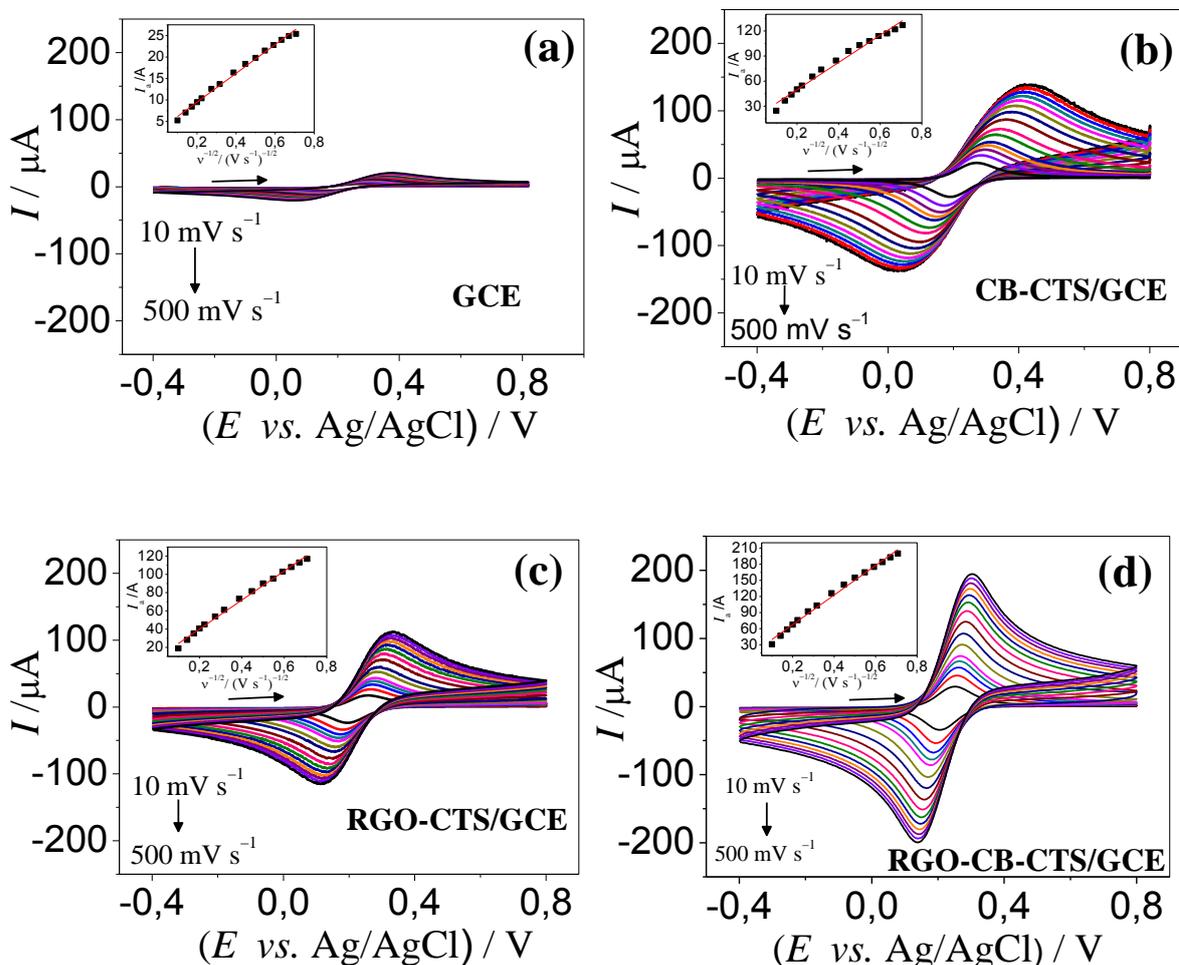


FIGURA 3. 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos para GCE (a), RGO-CTS/GCE (b), CB-CTS/GCE (c) e RGO-CB-CTS/GCE (d), na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de potencial.

3.3.3.2. Constante heterogênea de transferência de elétrons

Em seguida, para se entender melhor como acontecia o processo de transporte de massas das espécies do seio da solução para a superfície do eletrodo, estudou-se o efeito da velocidade de varredura de potencial sobre a

resposta voltamétrica do RGO-CB-CTS/GCE para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma solução de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (FIGURA 3.9).

A partir dos valores das correntes de pico anódica (I_a) e catódica (I_c), observou-se que estes foram crescendo linearmente proporcionais à velocidade de varredura de potencial na faixa de 50 a 500 mV s^{-1} .

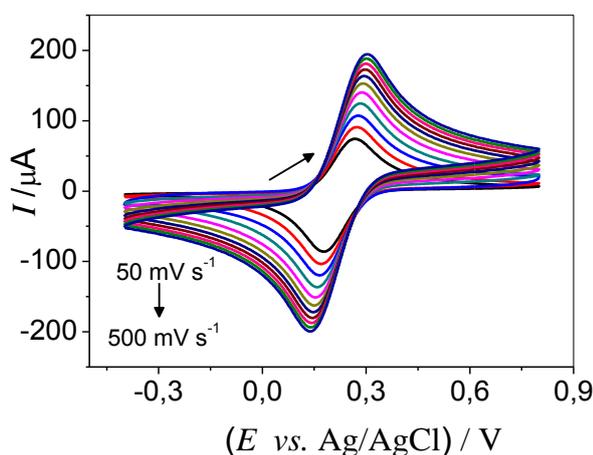


FIGURA 3. 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o sensor RGO-CB-CTS/GCE em diferentes velocidades de varredura de potencial na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Para entender se o sistema redox na superfície do eletrodo era difusional ou adsortivo, a partir dos voltamogramas apresentados na FIGURA 3.9, construiu-se um gráfico de $\log I_a$ vs. $\log v$ (FIGURA 3.10a), o qual apresentou um coeficiente angular de 0,45 (próximo do valor teórico de 0,50), indicando que o transporte de massa das espécies na superfície do eletrodo é controlado por difusão⁸⁵.

Utilizando o método de Nicholson⁸⁶, proposto para sistemas reversíveis e controlados por difusão (Equação 2) calculou-se o valor da k^0 para o RGO-CB-CTS/GCE e o GCE.

$$\psi = k^0 \left[\frac{\pi D n F}{RT} v \right]^{-1/2} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo ψ um parâmetro cinético, R a constante universal dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura termodinâmica ($298,15 \text{ K}$), n o número de elétrons envolvidos na reação e F a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), D o coeficiente de difusão ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)⁸⁴ e v é a velocidade de varredura de potencial.

Ainda, os valores de ψ para cada v podem ser calculados utilizando a Equação 3 proposta por Lavagnini *et al.*⁸⁷ baseada na relação de ψ com a diferença de potencial (ΔE_p , em mV) para cada v .

$$\psi = (-0,63 + 0,0021 \Delta E_p)/(1,0 - 0,017\Delta E_p) \quad (\text{Equação 3})$$

A partir dos valores calculados de ψ , o valor de k^0 foi obtido por meio do coeficiente angular do gráfico de ψ vs. $32,79 v^{-1/2}$ (FIGURA 3.10b), sendo este valor igual ao termo $[\pi D n F/(R T)]^{-1/2}$ considerando os valores utilizados na Equação 2. Os valores de ΔE_p para cada v encontram-se na Tabela 3.2.

Pelo gráfico de ψ vs. $32,79 v^{-1/2}$, encontrou-se um valor para k^0 igual a $5,6 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ para o sensor RGO-CB-CTS/GCE. O mesmo procedimento foi realizado para calcular o valor de k^0 para o GCE ($2,2 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$). Com os resultados encontrados foi possível constatar que a modificação do GCE com o filme RGO-CB-CTS proporcionou um aumento na transferência de elétrons entre a solução e a superfície do eletrodo.

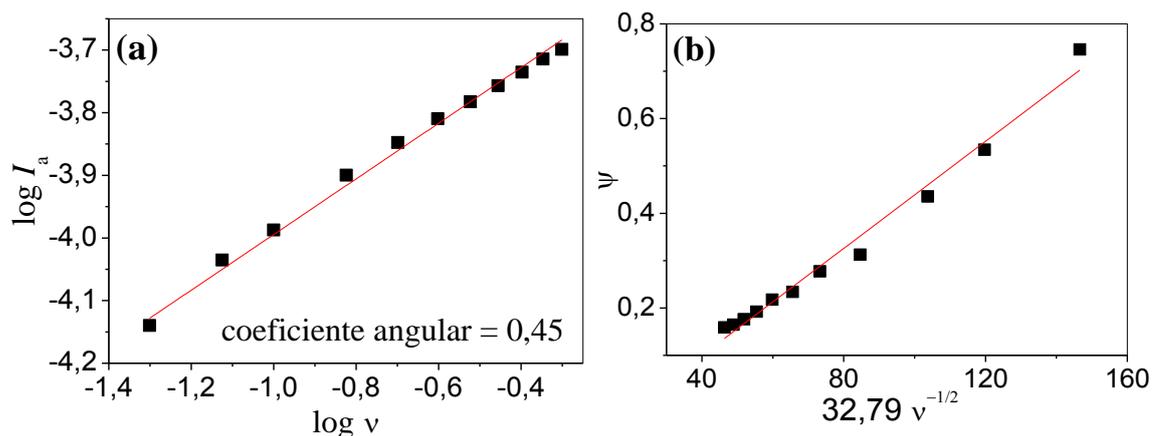


FIGURA 3. 10 - (a) $\log I_a$ vs. $\log v$ e (b) ψ vs. $32,79 v^{-1/2}$, ambos para o RGO-CB-CTS/GCE.

TABELA 3. 2 - Valores ΔE_p , $E_{\text{oxidação}}$ e $E_{\text{redução}}$ do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ obtidos com o RGO-CB-CTS/GCE em diferentes velocidades de varredura de potencial

Velocidade (V s^{-1})	$E_{\text{oxidação}}$ (mV)	$E_{\text{redução}}$ (mV)	ΔE_p (mV)
0,050	267	178	89
0,075	272	170	102
0,10	277	166	111
0,15	284	158	126
0,20	288	155	133
0,25	290	151	139
0,30	295	148	147
0,35	296	147	149
0,40	299	143	156
0,45	301	140	161
0,50	305	138	167

3.3.4. Determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina

A fim de verificar a potencialidade analítica do sensor desenvolvido foram escolhidos dois analitos para se quantificar. Nesse contexto, foram selecionados o PAR e a DA para quantificar, pois podem ser encontrados juntos, em amostras biológicas de urina excretada por pacientes portadores da doença de Parkinson.

3.3.4.1. Comportamento eletroquímico da DA e PAR

Inicialmente, a CV ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) foi empregada como teste preliminar na caracterização eletroquímica da DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0) utilizando o RGO-CB-CTS/GCE e o GCE (FIGURA 3.11a). Como pode ser observado na figura, no sentido da varredura de potencial positivo foram observados picos de oxidação em 0,33 V e em 0,56 V que corresponde a oxidação da DA e PAR respectivamente. No sentido reverso da varredura de potencial, foram observados dois picos de redução destes analitos, o da DA em 0,10 V e do PAR em 0,45 V, respectivamente, caracterizando assim como processos quasi-reversíveis, uma vez que temos para DA um ΔE_p ($E_{\text{oxidação}} - E_{\text{redução}}$) de 0,23 V e para o PAR de 0,09 V.

Outrossim, um estudo envolvendo voltametria de pulso diferencial (DPV) para os parâmetros dessa técnica previamente selecionados ($a = 70 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$), foi feito objetivando-se obter uma melhor comparação entre as magnitudes de sinais analíticos empregando-se o GCE e sensor desenvolvido (FIGURA 3.11b). Além disso, com a CV não é possível detectar a DA e PAR com baixos LDs. Entretanto com DPV, é possível ter uma baixa corrente capacitiva e detectar menores LDs dos analitos de interesse.

Como pode ser observado na Figura 3.11b, o eletrodo modificado proporcionou um aumento acentuado do sinal analítico para os analitos

(principalmente para o PAR, a corrente foi 16 vezes maior comparado ao GCE) comparado ao daquele obtido empregando-se o GCE para os dois analitos (DA e PAR), justificando assim a utilização desse sensor para a quantificação dos mesmos.

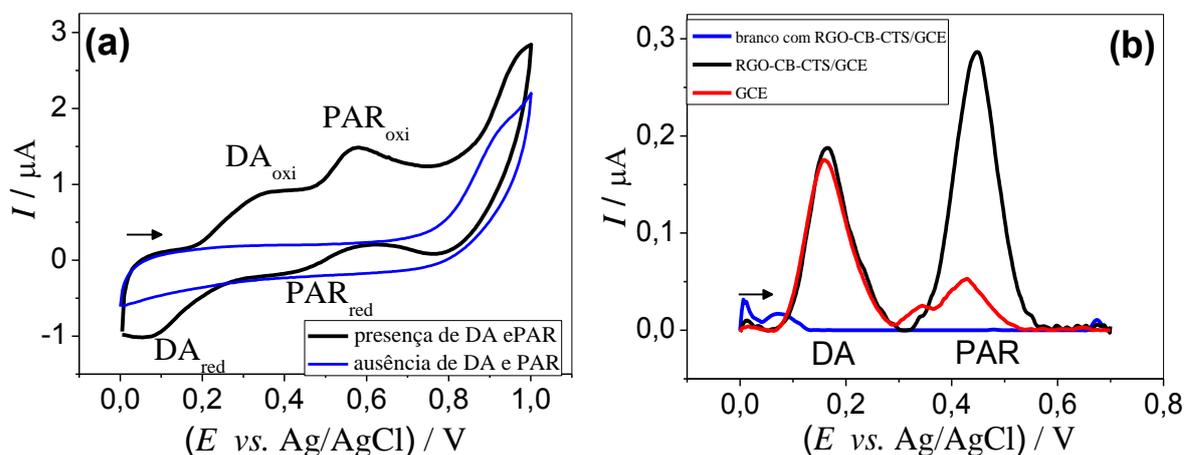


FIGURA 3. 11 - (a) Voltamogramas cíclicos empregando o sensor RGO-CB-CTS/GCE, na ausência (linha azul) e na presença de DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (linha preta) ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$), $n = 5$. (b) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o GCE e o sensor RGO-CB-CTS/GCE em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) na presença de DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Sendo $a = 70 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Em sequência, estudou-se o efeito da concentração hidrogeniônica nos pHs do eletrólito suporte de 5,1; 6,2; 7,0 e 7,8 sobre o sinal analítico para as soluções de DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por DPV ($a = 70 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$) vide FIGURA 3.12a. Os valores de corrente de pico de oxidação para a DA e PAR foram graficadas com os respectivos valores de pHs da solução (FIGURA 3.12b).

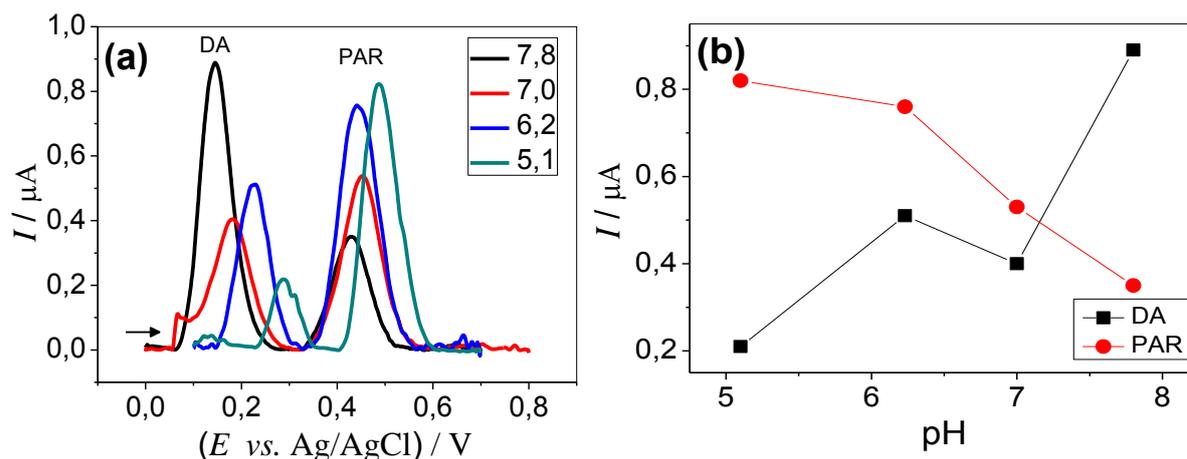


FIGURA 3. 12 - (a) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs usando o RGO-CB-CTS/GCE. (b) Correntes de pico anódica para os diferentes pHs estudados. Parâmetros: $a = 70 \text{ mV}$; $t = 10 \text{ ms}$ e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Analisando as figuras acima a solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,2 foi selecionada por proporcionar maiores valores de I_a na detecção simultânea de DA e PAR. Ainda, como mencionado, o pK_a da CTS é igual a 6,5 e neste valor há a protonação de 50 % dos amino grupos ($-\text{NH}_3^+$). Em valores de pH menores há um aumento da percentagem de protonação deste biopolímero aumentando assim a sua solubilidade na solução aquosa. Dessa forma, no preparo de filmes deste polímero usa-se reagentes de reticulação como o glicoxal, glutaraldeído, epicloridrina³⁴ entre outros para manter insolúvel o filme polimérico na superfície do eletrodo. No trabalho desenvolvido, não houve necessidade de se empregar os reagentes de reticulação uma vez que foram obtidos filmes com estabilidade sobre a superfície do eletrodo em pH 6,2. A estabilização do filme pode ser atribuído a interação entre o polímero da CTS e os grupos funcionais oxigenados carregados negativamente na superfície dos nanomateriais.

3.3.4.2. Estudo dos parâmetros das técnicas: DPV vs. SWV

Neste estudo, foi feita otimização dos parâmetros das técnicas de DPV e SWV, visto que estes parâmetros podem ter um efeito considerável nas respostas voltamétricas dos analitos DA e PAR. Para a DPV os parâmetros avaliados foram: velocidade de varredura de potencial (v), amplitude de potencial (a) e tempo de modulação do pulso (t), e para a SWV: frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f), amplitude de potencial (a) e incremento de varredura (ΔE_s). Os valores estudados e o valores selecionados destes parâmetros estão apresentados nas TABELAS 3.3 e 3.4 .

TABELA 3. 3 - Parâmetros da técnica de DPV investigados e os valores selecionados para a determinação simultânea de DA e PAR utilizando o RGO-CB-CTS/GCE

Parâmetro	Faixa estudada	Selecionado
a (mV)	10 a 100	90
t (ms)	2 a 20	20
v (mV s ⁻¹)	2 a 20	10

TABELA 3. 4 - Parâmetros da técnica de SWV investigados e os valores selecionados para a determinação simultânea de DA e PAR utilizando o RGO-CB-CTS/GCE

Parâmetro	Faixa estudada	Selecionado
f (Hz)	10 a 70	10
a (mV)	10 a 100	70
ΔE_s (mV)	1 a 5	3

Após a otimização dos parâmetros experimentais que envolveram as técnicas de DPV e SWV, as curvas analíticas foram construídas para os dois analitos, individualmente, pelas duas técnicas, para se entender melhor o

comportamento eletroquímico da DA e do PAR empregando-se o eletrodo proposto. Nas TABELAS 3.5 e 3.6 são apresentados os resultados obtidos empregando-se a DPV e SWV para a determinação de DA e PAR.

TABELA 3. 5 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos empregando-se as técnicas de DPV e SWV para determinação de DA utilizando o RGO-CB-CTS/GCE

Parâmetros	SWV	DPV
LD (mol L ⁻¹)	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-7}$
Faixa linear (μmol L ⁻¹)	1,0 a 38	1,0 a 19
Sensibilidade (μA mol ⁻¹ L)	$6,8 \times 10^{-2}$	$7,1 \times 10^{-2}$

TABELA 3. 6 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos empregando-se as técnicas de DPV e SWV para deteminação de PAR utilizando o RGO-CB-CTS/GCE

Parâmetros	SWV	DPV
LD (mol L ⁻¹)	$2,8 \times 10^{-7}$	$9,6 \times 10^{-7}$
Faixa linear (μmol L ⁻¹)	1,0 a 64	2,0 a 64
Sensibilidade (μA mol ⁻¹ L)	$3,4 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$

Analisando-se os resultados apresentados na TABELA 3.5 para a DA, verifica-se que foi obtida praticamente a mesma sensibilidade empregando-se as duas técnicas voltamétricas. Por outro lado, quando se empregou a técnica de SWV foi possível obter maior linearidade da curva analítica para a DA quando comparado com os valores obtidos empregando-se a técnica DPV.

Já na TABELA 3.6 observa-se que as melhores condições analíticas para a determinação de PAR foram obtidas com a SWV, por apresentar uma maior sensibilidade, menor LD e maior faixa linear quando comparado com os valores obtidos pela DPV. Diante desses resultados, a SWV foi a técnica

selecionada para ser empregada no desenvolvimento de um procedimento eletroanalítico para a determinação simultânea de DA e PAR.

3.2.4.3. Determinação simultânea de DA e PAR empregando-se a SWV

A resposta eletroquímica da DA e do PAR (um na presença do outro) foi investigada em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,2) empregando-se a técnica de SWV. Na FIGURA 3.13a são apresentados os voltamogramas de onda quadrada, na qual foram obtidos por adições sucessivas de PAR em diferentes concentrações na faixa de $9,9 \times 10^{-7}$ a $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo-se a concentração de DA constante em $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se que, mesmo em concentrações elevadas, a DA não interfere significativamente na quantificação do PAR. A curva analítica obtida ($I \text{ (A)} = 5,2 \times 10^{-9} + 0,082 [\text{PAR}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$), coeficiente de correlação ($r = 0,995$) está inserida na FIGURA 3.13a, sendo o LD igual a $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Tem-se que a corrente de pico da DA se mantém aproximadamente constante mesmo com as adições sucessivas de PAR, com um desvio padrão relativo de 10 %.

Na FIGURA 3.13b são apresentados os voltamogramas de onda quadrada da DA nas concentrações de $2,0 \times 10^{-6}$ a $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo a concentração de PAR fixada em $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,2) obtido no RGO-CB-CTS/GCE. Observou-se que o PAR não interferiu significativamente na determinação da DA, cuja curva analítica ($I \text{ (A)} = 1,2 \times 10^{-8} + 0,077 [\text{DA}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$), $r = 0,995$) obtida está inserida na FIGURA 3.13b, com um LD de $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, a corrente de pico do PAR se manteve constante com um desvio padrão relativo de 2,3 %.

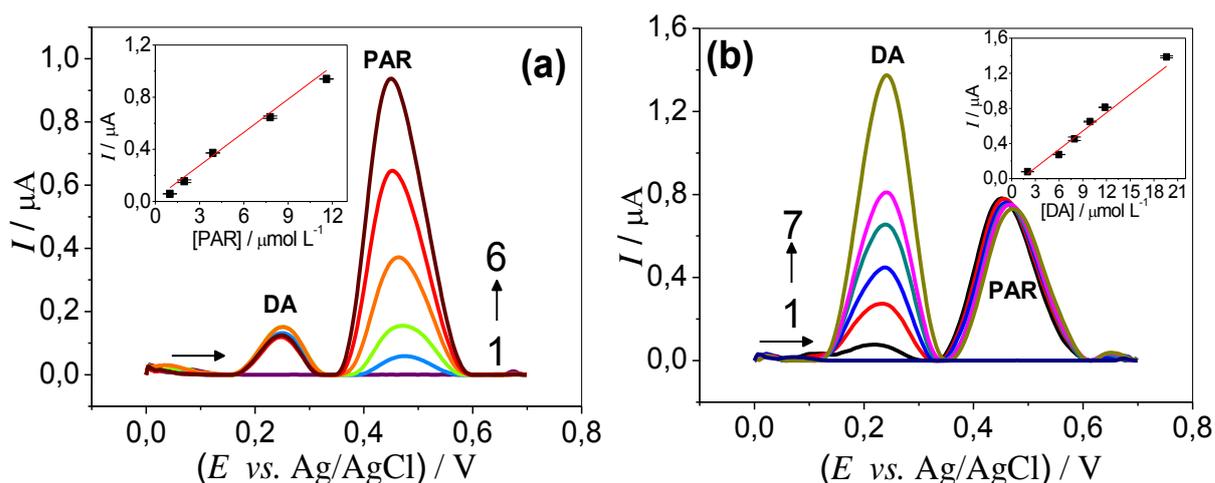


FIGURA 3. 13 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para: (a) PAR: (1) Branco, (2) $9,9 \times 10^{-7}$, (3) $2,0 \times 10^{-6}$, (4) $3,9 \times 10^{-6}$, (5) $7,8 \times 10^{-6}$, (6) $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com DA (2 a 6) $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (fixa); (b) DA: (1) Branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $4,0 \times 10^{-6}$, (4) $6,0 \times 10^{-6}$, (5) $8,0 \times 10^{-6}$, (6) $9,9 \times 10^{-6}$ (7) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com PAR (2 a 7) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (fixa). Ambas em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,2), utilizando o RGO-CB-CTS/GCE; $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. Inserida: as respectivas curvas analíticas ($n = 3$).

Em seguida, utilizou-se a SWV para a determinação simultânea de DA e PAR com adições sucessivas de uma solução contendo ambos os analitos. A faixa de concentração estudada para a DA foi entre $3,9 \times 10^{-6}$ e $3,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e para o PAR foi de $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, como mostrado na FIGURA 3.14a. Além disso, estão apresentadas nas FIGURA 3.14b e c as respectivas curvas analíticas para a DA ($I \text{ (A)} = 9,9 \times 10^{-9} + 0,018 [\text{DA}] \text{ (mol L}^{-1})$, $r = 0,992$) e para o PAR ($I \text{ (A)} = 8,8 \times 10^{-8} + 0,046 [\text{PAR}] \text{ (mol L}^{-1})$, $r = 0,998$). Os LDs calculados foram $2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para DA e $5,3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para PAR.

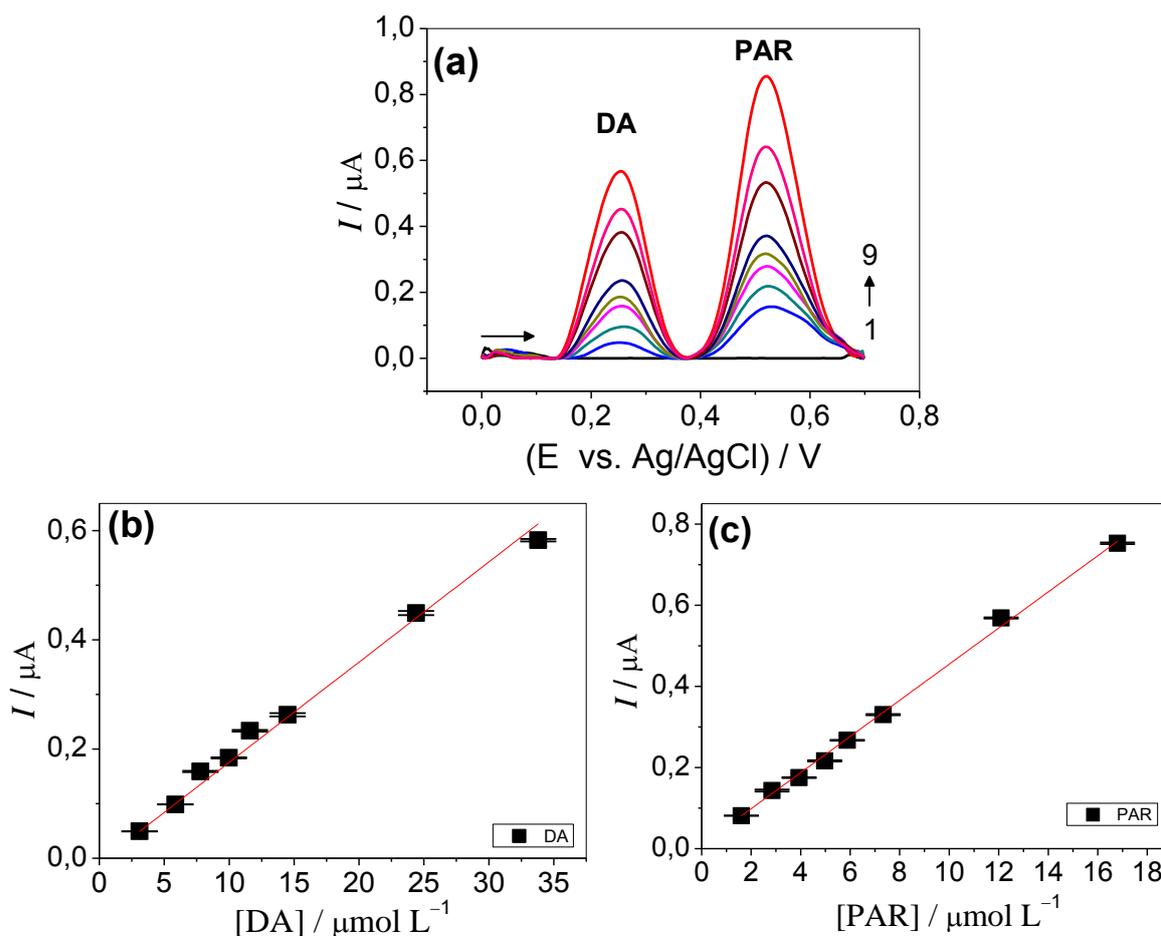


FIGURA 3. 14 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para diferentes concentrações de DA: (1) branco, (2) $3,9 \times 10^{-6}$, (3) $5,9 \times 10^{-6}$, (4) $7,8 \times 10^{-6}$, (5) $9,9 \times 10^{-6}$, (6) $1,2 \times 10^{-5}$, (7) $1,5 \times 10^{-5}$, (8) $2,5 \times 10^{-5}$, (9) $3,4 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} ; e de PAR: (1) Branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $3,0 \times 10^{-6}$, (4) $3,9 \times 10^{-6}$, (5) $4,9 \times 10^{-6}$, (6) $5,9 \times 10^{-6}$, (7) $7,3 \times 10^{-6}$, (8) $1,2 \times 10^{-5}$, (9) $1,7 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,2) usando o RGO-CB-CTS/GCE. (b) Curva analítica obtida para DA e (c) curva analítica obtida para PAR (n = 3); $f = 10$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.

3.2.4.4. Estudo da repetibilidade e de interferentes em potencial

Foi realizado ainda o estudo da repetibilidade intra- e entre-dias para a determinação simultânea dos analitos. Neste estudo foram empregadas uma concentração de $7,9 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} para a DA e $4,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} para o PAR. No estudo da repetibilidade intra-dia foram feitas medidas sucessivas no

mesmo dia ($n = 8$) de uma solução contendo ambos os analitos, sendo os valores encontrados dos desvios padrões relativos (RSD, do inglês *relative standard deviation*) para DA de 2,5 % e para o PAR de 2,3 %. Já a repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas das mesmas concentrações em dias diferentes ($n = 3$) sendo o RSD de 3,1% e 3,7 % obtidos para DA e PAR, respectivamente. Os resultados obtidos foram satisfatórios, visto que todos os RSD foram menores que 5,0 %, evidenciando a repetibilidade do método proposto.

Em seguida, a seletividade do método desenvolvido foi verificada por meio da adição de possíveis interferentes presentes em amostras de urina, (tais como ureia, glicose, ácido ascórbico e ácido úrico) em uma solução padrão contendo DA ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e PAR ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), nas razões de concentração (solução padrão: interferentes) de 10:1; 1:1 e 1:10, conforme descrito anteriormente, na seção experimental 3.2.7. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles utilizando-se apenas a solução padrão dos analitos, e as respostas analíticas das soluções contendo os possíveis interferentes tiveram uma variação inferior a 5%. Assim, pode-se concluir que, na concentração verificada, estes compostos não interferem significativamente na determinação simultânea de DA e PAR utilizando o sensor RGO-CB-CTS/GCE.

3.2.4.5. Determinação de DA e PAR em amostras biológicas

Para verificar a aplicabilidade do método proposto e possíveis interferentes existentes na amostra sobre o sinal dos analitos, empregou-se o estudo de adição e recuperação para a determinação simultânea das concentrações de DA e PAR em amostra de urina sintética. Para isso, foram feitas medidas em triplicata de amostras de urina com adições de soluções padrão de DA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e PAR $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Na TABELA 3.7 estão apresentados os resultados obtidos. Observou-se que as recuperações variaram entre 85 % e 101 % para a DA e entre 100 % e 111 % para o PAR. Nota-se a partir destes valores que não houve interferência significativa da

matriz da amostra de urina na determinação simultânea de DA e PAR, evidenciando a seletividade do método eletroquímico desenvolvido.

TABELA 3. 7 - Resultados obtidos usando o método proposto na determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina

Amostra	DA			PAR		
	Adic. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encont. ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec. (%)	Adic. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encont. ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec. (%)
Urina I	5,85	5,30 \pm 0,03	91	2,96	2,97 \pm 0,01	100
Urina II	11,6	12,40 \pm 0,02	107	5,88	6,54 \pm 0,04	111
Urina III	24,4	24,70 \pm 0,02	101	12,1	13,40 \pm 0,01	111

^a $n = 3$; Adic. = Adicionado; Encont. = Encontrado; Rec. = Recuperado.

3.2.4.6. Comparação dos parâmetros analíticos obtidos com o método proposto neste trabalho com métodos já relatados na literatura para a determinação de DA e PAR

Finalmente, para avaliar o desempenho e os resultados obtidos com o sensor proposto este foi comparado com outros eletrodos recentemente reportados na literatura para a determinação simultânea de DA e PAR (ver TABELA 3.8). Com o eletrodo desenvolvido neste trabalho foi possível obter vantagens como a simplicidade de preparação, baixo custo dos nanomateriais utilizados e resposta rápida (7 s para realizar a medida). Além disso, os LDs obtidos foram similares aos de outros eletrodos descritos na literatura utilizando outros nanomateriais^{75,76,88}.

TABELA 3. 8 - Comparação entre o trabalho presente e alguns sensores reportados na literatura para a determinação simultânea de DA e PAR

Sensor	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	DA	PAR	DA	PAR
SWCNT/CCE ⁸⁸	0,40 – 150	0,20 – 100	0,22	0,12
MWCNT/GO/GCE ⁷⁶	0,2 – 400	0,50 – 400	0,020	0,047
SiO ₂ /MWCNT/GCE ⁷⁵	0,050 – 6	0,050 – 6	0,014	0,098
Este trabalho	3,90 – 34	2,00 – 17	0,020	0,053

SWCNT/CCE: nanotubos de carbono de parede simples/eletrodo de carbono cerâmico

MWCNT/GO/GCE: nanotubos de carbono de paredes múltiplas/ óxido de grafeno/eletrodo de carbono vítreo

SiO₂/MWCNT/GCE: sílica/nanotubos de carbono de paredes múltiplas/eletrodo de carbono vítreo

3.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Uma nova arquitetura de sensor foi desenvolvida por meio da modificação da superfície de um GCE com os nanomateriais de carbono (RGO e CB) dispersos em um filme de CTS. Foi verificada a estabilidade da dispersão proposta e o eletrodo proposto foi aplicado na determinação simultânea de DA e PAR em amostras de urina. Ademais, com o método desenvolvido apresentou vantagens como simplicidade de preparação do eletrodo, baixo custo dos nanomateriais utilizados, resposta rápida (7 s para cada medida), seletividade, além de apresentar LDs similares que outras arquiteturas de sensores descritos na literatura^{75,76,88}.

4. Desenvolvimento de um sensor eletroquímico à base de nanodiamantes em filme de hidrocloreto de polialilamina (PAH) para determinação de catecol em águas naturais

4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver um sensor eletroquímico utilizando Dnano dispersos em uma solução aquosa de PAH sob a superfície de um GCE (Dnano-PAH/GCE) para a determinação de CAT em amostras de águas residuárias.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Reagentes e soluções

Os reagentes Dnano, PAH, CAT e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes foram de grau analítico e utilizados como recebidos. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade $\geq 18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtido a partir de um sistema Milli-Q da Millipore[®] (Billerica, EUA). Utilizou-se um tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,5) como eletrólito suporte, o qual foi preparado com os sais Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 obtidos da Sigma-Aldrich.

Uma solução estoque de CAT $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução da substância (obtida da Sigma-Aldrich) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,5). Quando necessário, as devidas diluições eram feitas a partir da solução estoque.

4.2.2. Instrumentação

4.2.2.1. Morfologia e caracterização

Para a caracterização do material Dnano foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), utilizando um equipamento TECNAI G2F20. Também foi empregado um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Nicolet iS50 (Thermo Scientific), para identificar a presença de grupos funcionais nos Dnano.

4.2.2.2. Medidas voltamétricas

As medidas eletroquímicas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Metrohm) acoplado a um microcomputador gerenciado pelo programa GPES 4.9. A célula eletroquímica utilizada foi um sistema convencional com compartimento único encaixe de três

eletrodos, a saber: eletrodo modificado Dnano-PAH/GCE como WE, uma placa de platina como CE, e Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como RE (ver FIGURA 3.1).

Na célula eletroquímica foram utilizados uma alíquota de 10 mL de eletrólito suporte (tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹, pH = 6,5) para a realização das medidas eletroquímicas. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

As medições de pH foram feitas empregando-se um pHmetro digital Orion (modelo EA 940), conectado a um eletrodo combinado de vidro Digimed com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (solução interna KCl 3,0 mol L⁻¹).

4.2.3. Preparo do sensor Dnano-PAH/GCE

O GCE (Ø = 3,0 mm) foi polido com alumina 5µm durante 5 minutos para se obter uma superfície limpa e homogênea e, em seguida, lavou-se com água ultrapura, sonicou-se com isopropanol absoluto e água deionizada por aproximadamente 1 min. O procedimento foi repetido todos os dias antes da realização das medidas.

Para o preparo da dispersão, em um microtubo eppendorf foram adicionados 1 mg de Dnano, 1 mg de PAH e 1 mL de água ultra-pura. A solução foi homogeneizada em um banho ultrassônico durante 30 min e, em seguida, 8 µL da dispersão Dnano-PAH foram transferidos para a superfície do GCE previamente limpo com o auxílio de um micropipetador. Deixou-se o filme secar a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 2 horas. O eletrodo modificado quando não utilizado, era armazenado também a temperatura ambiente. O sensor desenvolvido foi denominado Dnano-PAH/GCE (FIGURA 4.1).

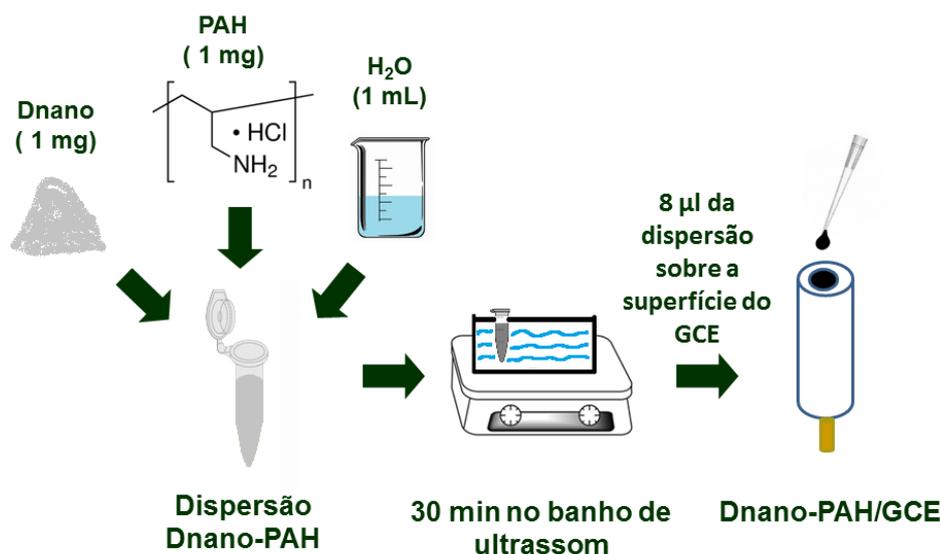


FIGURA 4. 1 - Processo de fabricação do sensor Dnano-PAH/GCE.

4.2.4. Preparação das amostras de águas naturais e de distribuição

Amostras de águas naturais da represa da Universidade Federal de São Carlos (cidade de São Carlos) foram coletadas (sendo as coordenadas geográficas das amostras A1 = 21°59'08.88''S 47°52'43.21''W e A2 = 21°59'06.84''S 47°52'48.82''W), bem como uma amostra de água de torneira (água de distribuição) da mesma universidade.

As amostras da água da represa foram filtradas em um papel filtro (marca Nalgon) com porosidade de 3 µm para retirada de pequenas folhas e suspensões. A água de distribuição foi utilizada sem qualquer tratamento prévio.

Feito isso, em uma alíquota fixa de 900 µL de cada uma das amostras foram adicionados 100 µL de uma solução padrão de CAT $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, obtendo-se assim um volume final de 1,0 mL de CAT $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Estas soluções foram agitadas, homogeneizadas e identificadas como amostra A, B (referentes a água da represa) e C (água de distribuição).

4.2.5. Procedimento eletroanalítico desenvolvido para a determinação de CAT

O primeiro estudo conduzido foi o efeito da concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte (pH) sob a resposta voltamétrica do CAT utilizando a técnica de SWV, sendo a faixa de pH estudada de 3,3 a 9,1. Na sequência, foram estudados as melhores condições experimentais das técnicas de SWV e de DPV para a quantificação do composto fenólico. Os parâmetros f , a e ΔE_s para SWV, v , a e t para DPV. Feito isso, as curvas analíticas foram construídas por ambas as técnicas e os LDs, faixas lineares e sensibilidades foram encontrados e comparados. Para todas as curvas, os valores de LD foram calculados pela relação: $3 \times SD/S$, já descrito anteriormente.

Também foram conduzidos estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 8$) e inter-dias ($n = 3$) para uma concentração de CAT $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,2). Em seguida, para avaliar a seletividade do método desenvolvido foi realizada a adição de possíveis interferentes presentes em amostras de águas naturais (carbonato, cloreto e sulfato) a uma solução contendo CAT ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), em proporções de concentração (solução padrão: interferentes) 10: 1, 1: 1, e 1: 10. E por fim, o sensor Dnano-PAH/GCE foi aplicado para a determinação de CAT em amostras de águas naturais. Para esta investigação, as amostras foram fortificadas com CAT ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e foram realizadas as adições de alíquotas, em triplicata, na célula eletroquímica, sendo as concentrações finais de CAT no eletrólito suporte igual a $5,0 \times 10^{-6}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Assim, utilizando o método de adição e recuperação foi possível quantificar o analito nas amostras de águas naturais.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Caracterização do Dnano

Inicialmente, foram obtidos espectros de infravermelho do Dnano, a fim de verificar-se a existência de grupos funcionais em sua estrutura, uma vez que sua síntese é conduzida na presença de oxigênio. Os resultados obtidos estão reportados na FIGURA 4.2.

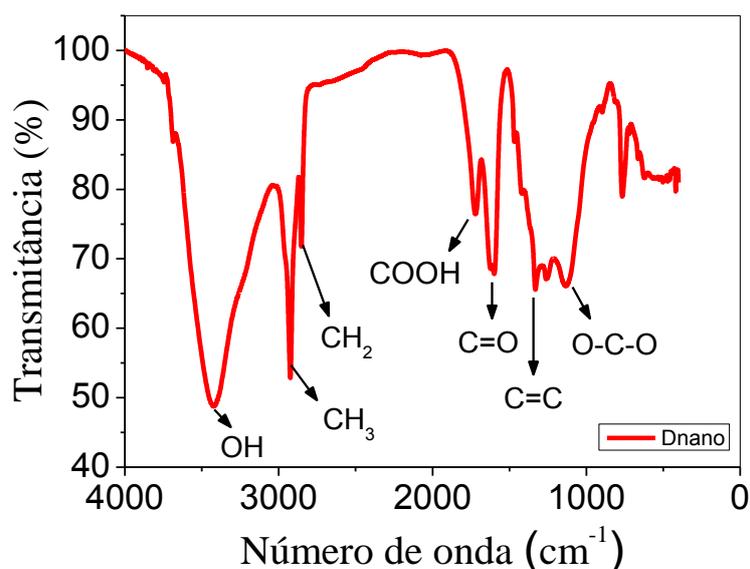


FIGURA 4. 2 - Espectros do infravermelho do Dnano.

Analisando-se o espectro de infravermelho obtido para esse nanomaterial, identificou-se alguns grupos funcionais presentes em sua estrutura como grupos hidroxila (OH, em 3412 cm^{-1}), carboxila (COOH, em 1730 cm^{-1}), cetona (C=O, em 1622 cm^{-1}), éter (C-O-C, 1130 cm^{-1}) e, ainda observou-se a presença de grupos CH₃, CH₂ e C=C (2925 , 2851 e 1340 cm^{-1} , respectivamente) 89-91.

Os resultados do infravermelho permitiram conhecer algumas características dos Dnano, a saber: o caráter condutivo, uma vez que fica evidente a presença de ligações π (C=C) em sua estrutura. A outra é quanto a dispersão estável que este formou com o PAH (policátion), uma vez que, devido a presença dos grupos funcionais (o nanomaterial possui um caráter aniônico

em solução aquosa) em seu esqueleto estrutural, tem-se assim ligações eletrostáticas entre os Dnanos e o PAH.

Também foram obtidas imagens de TEM do Dnano para avaliar a morfologia do mesmo. Vide exemplo dessas imagens está apresentada na FIGURA 4.3, na qual podem ser observadas, nas regiões destacados pelos círculos em amarelo, as partículas do material. Ainda utilizando a imagem de TEM obtida juntamente com o software Image J foi possível estimar uma média do tamanho do diâmetro dessas nanopartículas. Foi encontrado um tamanho de 2 a 4 nm aproximadamente para a maioria das nanopartículas.

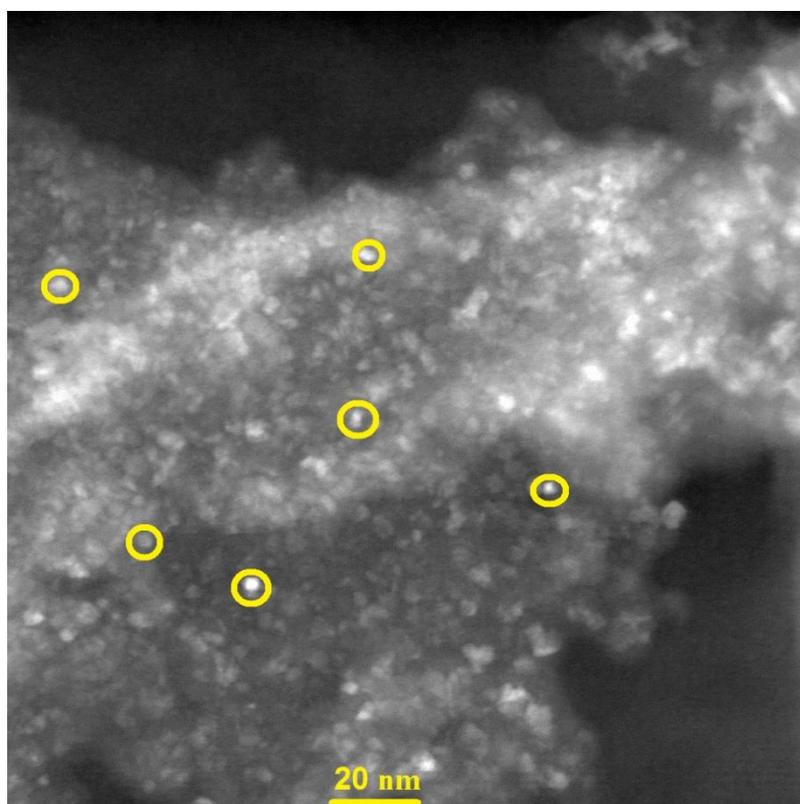


FIGURA 4. 3 - Imagem de TEM do Dnano.

4.3.2. Caracterização eletroquímica do sensor Dnano-PAH/GCE

Utilizando a sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foram realizados estudos sobre a resposta voltamétrica do sensor proposto comparando ao GCE. Com os resultados obtidos foi possível estimar o valor da área eletroativa do Dnano-PAH/GCE e entender qual o processo que controlava o transporte de massa das espécies na superfície do eletrodo, bem como estimar o valor de k^0 .

4.3.2.1. Área eletroativa

As áreas eletroativas dos eletrodos de GC e Dnano-PAH/GC foram estimadas por meio de resultados obtidos utilizando-se a CV em diversas velocidades de varredura de potencial (10 a 200 mV s^{-1}), na presença da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ no eletrólito suporte KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando a equação de Randles-Sevcik (Equação 1) para sistemas reversíveis, como discutido anteriormente.

As áreas foram calculadas utilizando-se os valores de corrente anódica (referente ao potencial de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) e obtiveram-se os valores de $0,070 \text{ cm}^2$ para o GCE, e $0,22 \text{ cm}^2$ para o Dnano-PAH/GCE (sendo a área geométrica do GCE de $0,070 \text{ cm}^2$). Com os resultados obtidos, observou-se que o Dnano promoveu um aumento de cerca de 3 vezes na área eletroativa do eletrodo modificado em comparação com o GCE. Este aumento de área ativa pode ser significativo para uma possível aplicação do sensor em eletroanálise, pois pode levar a um aumento de sinal analítico, diminuição do potencial de trabalho, aumento da sensibilidade e diminuição do LD. É importante ressaltar que o PAH formou uma dispersão estável com o nanomaterial e um filme de boa aderência sobre a superfície do GCE. Este mesmo polímero foi empregado pelo nosso grupo de pesquisa^{45,48} e, o polímero na ausência de um material condutor apresenta baixa condutividade e bloqueia parcialmente a entrada e saída de substâncias, como pode ser observado na FIGURA 4.4 (voltamogramas cíclicos obtidos para os diferentes eletrodos, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$). A presença do filme polimérico (PAH) sobre a superfície do GCE leva a um deslocamento de potencial de pico de oxidação e redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ para valores mais positivos.

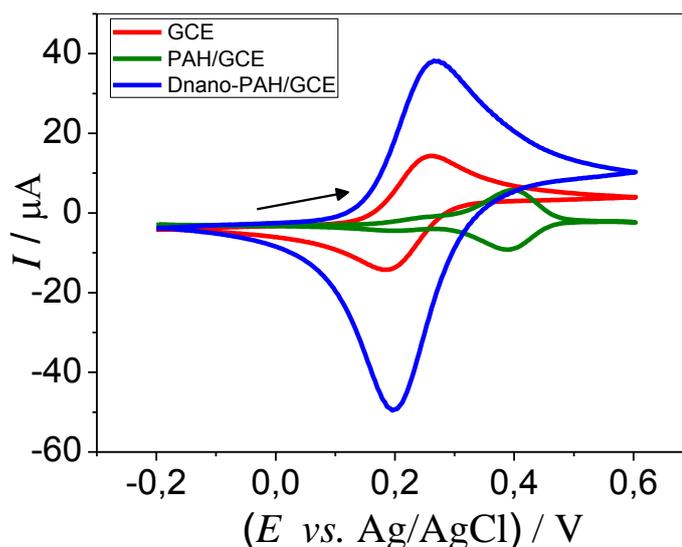


FIGURA 4. 4 - Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ obtidos para o GCE, PAH/GCE e o Dnano-PAH/GCE, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3.2.2. Constante heterogênea de transferência de elétrons

A próxima etapa realizada, para se entender melhor como acontecia o processo de transporte de massas das espécies do seio da solução para a superfície do eletrodo, foi o estudo do efeito da velocidade de varredura de potencial (10 a 350 mV s^{-1}) sobre a resposta voltamétrica do sensor proposto e para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (FIGURA 4.5).

Como pode ser observado nesta figura, os valores das correntes de pico anódica e catódica aumentam com o aumento da velocidade de varredura de potencial.

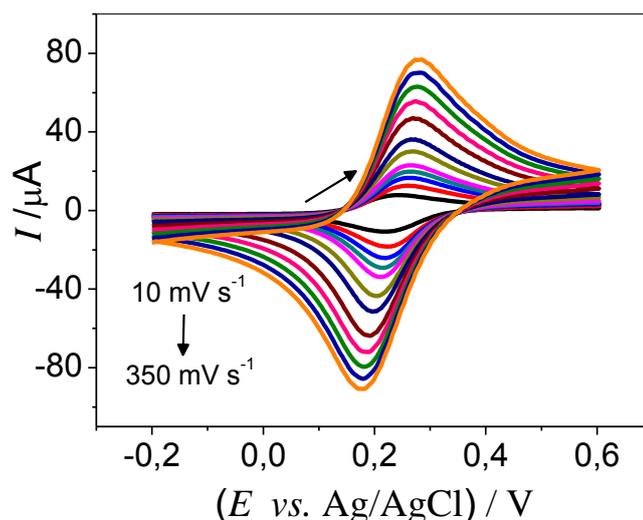


FIGURA 4. 5 - Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de potencial obtidos usando o Dnano-PAH/GCE.

A partir das correntes de pico obtidas em cada um dos voltamogramas apresentados na FIGURA 4.5 construiu-se um gráfico de $\log I_a$ vs. $\log \nu$ (FIGURA 4.6a). A equação que descreve a regressão linear do gráfico apresentou um coeficiente angular de 0,56 o que indica que o transporte de massa das espécies na superfície do eletrodo é controlado por difusão⁸⁵.

Em seguida, utilizando o método de Nicholson⁸⁶ (Equação 2), reportado anteriormente, calculou-se o valor do k^0 para o Dnano-PAH/GCE e o GCE (sendo descritos anteriormente os valores de ψ para cada ν utilizados na Equação 2 calculados a partir da Equação 3 proposta por Lavagnini *et al.*⁸⁷). Dessa forma, tem-se que o k^0 foi determinado a partir do coeficiente angular do gráfico de ψ vs. $32,79 \nu^{-1/2}$ (FIGURA 4.6b), sendo o valor 32,79 equivalente ao termo $[\pi D n F / (R T)]^{-1/2}$ considerando os valores utilizados na Equação 2. É importante mencionar, que para valores inferiores a 150 mV s^{-1} de ν , o ΔE_p (valores utilizados na Equação 3) apresentaram valores menores que 59 mV (valor teórico que caracteriza um sistema como reversível), o que inviabilizou-se obter uma reta para o cálculo do k^0 , sendo então considerado os valores ΔE_p acima de 150 mV s^{-1} e até 350 mV s^{-1} (justificando assim o número reduzido de

5 pontos empregado no gráfico mostrado na FIGURA 4.6b). Os valores de ΔE_p para cada ν encontram-se na TABELA 4.1.

Feito os cálculos, encontrou-se um k^0 igual a $2,0 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ usando o sensor Dnano-PAH/GCE e igual a $1,5 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ usando o GCE, utilizando o mesmo procedimento. Por meio destes resultados foi possível evidenciar a habilidade do sensor em promover mais rápida transferência de elétrons entre a espécie eletroativa e a superfície do eletrodo em comparação ao GCE sem modificação, uma vez que apresentou maior k^0 .

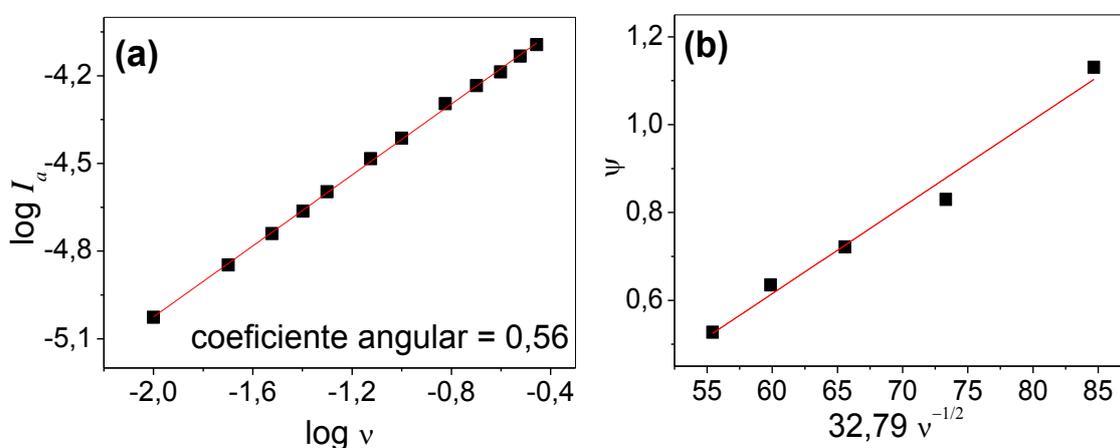


FIGURA 4. 6 - (a) $\log I_a$ vs. $\log \nu$ e (b) ψ vs. $32,79 \nu^{-1/2}$, ambos para o Dnano-PAH/GCE.

TABELA 4. 1 - Valores ΔE_p , $E_{\text{oxidação}}$ e $E_{\text{redução}}$ do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ obtidos com o Dnano-PAH/GCE em diferentes velocidades de varredura de potencial

Velocidade (V s^{-1})	$E_{\text{oxidação}}$ (mV)	$E_{\text{redução}}$ (mV)	ΔE_p (mV)
0,010	266	245	21
0,020	266	233	33
0,030	266	222	44
0,040	268	217	51
0,050	268	213	55
0,10	268	210	58
0,15	268	196	72
0,20	274	186	88
0,25	276	181	95
0,30	277	175	102
0,35	281	173	108

4.3.3. Comportamento eletroquímico do CAT

Experimentos preliminares foram realizados utilizando CV ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) e o sensor Dnano-PAH/GCE em solução de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 6,5$) na presença de CAT $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a fim de se observar a presença de processos de oxidação ou de redução deste composto. Os resultados alcançados estão apresentados na FIGURA 4.7a, nos quais observou-se uma resposta eletroativa do analito no sentido positivo de varredura, isto é, um processo de oxidação do CAT (pico de oxidação em $0,32 \text{ V}$ para o sensor proposto). O mesmo foi feito para a varredura no sentido inverso (redução), no qual observou-se um pequeno pico de redução em $0,10 \text{ V}$ para o sensor Dnano-PAH/GCE, o que caracteriza como um processo quasi-reversível. O mesmo estudo foi feito utilizando-se a SWV ($f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$), com o propósito de se ter uma melhor comparação entre as magnitudes de sinais

analíticos obtidos com o GCE e sensor desenvolvido (FIGURA 4.7b). Com os resultados obtidos, observou-se que o eletrodo modificado, isto é a presença dos nanomateriais imobilizados na superfície do GCE levou a uma aumento da magnitude do pico de oxidação do CAT e diminuição de potencial, característico de um processo catalítico. O aumento do sinal analítico para CAT foi significativo (quase 2 vezes maior a intensidade de corrente anódica) quando comparado com aquele obtido empregando-se o GCE, justificando assim a utilização desse sensor para a quantificação do analito. Este pico de oxidação do CAT esta relacionado com a oxidação deste analito na superfície do eletrodo gerando como produto a *o*-quinona (REAÇÃO 1).

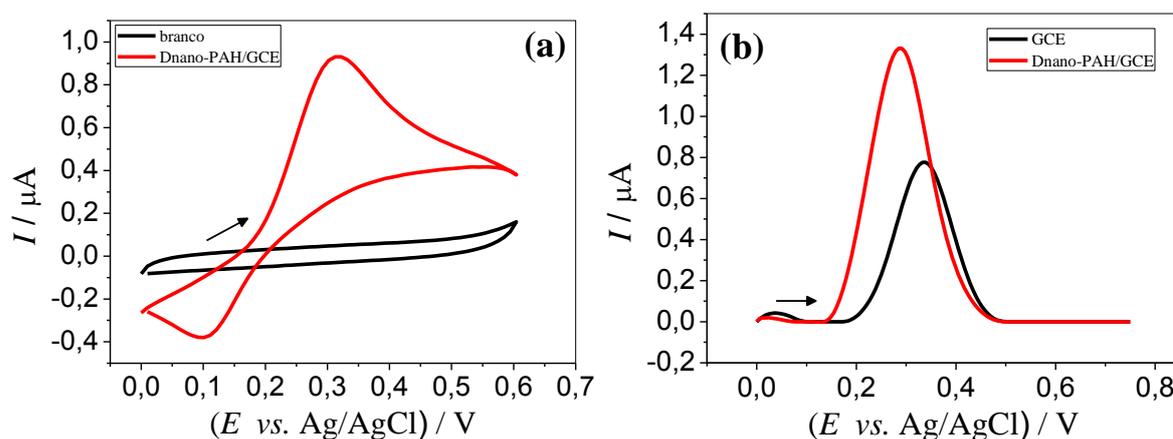
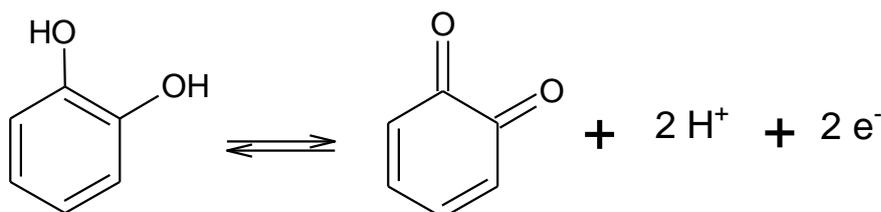


FIGURA 4. 7 - (a) Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência (linha preta) e na presença de CAT $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (linha vermelha) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) utilizando o sensor Dnano-PAH/GCE ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$), $n = 5$. (b) Voltamogramas de onda quadrada na presença de CAT $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) utilizando o GCE e o sensor Dnano-PAH/GCE. Parâmetros $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.



REAÇÃO 1- Mecanismo de oxidação do CAT na superfície do eletrodo proposto.

4.3.3.1. Estudo do efeito do pH do eletrólito suporte

Outro estudo conduzido foi a investigação da influência do pH do eletrólito suporte (solução tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹) na determinação de CAT por SWV ($f = 10$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV). Assim, na presença de CAT $5,0 \times 10^{-5}$ analisou-se os valores de pHs na faixa de 3,3 a 9,1 (FIGURA 4.8).

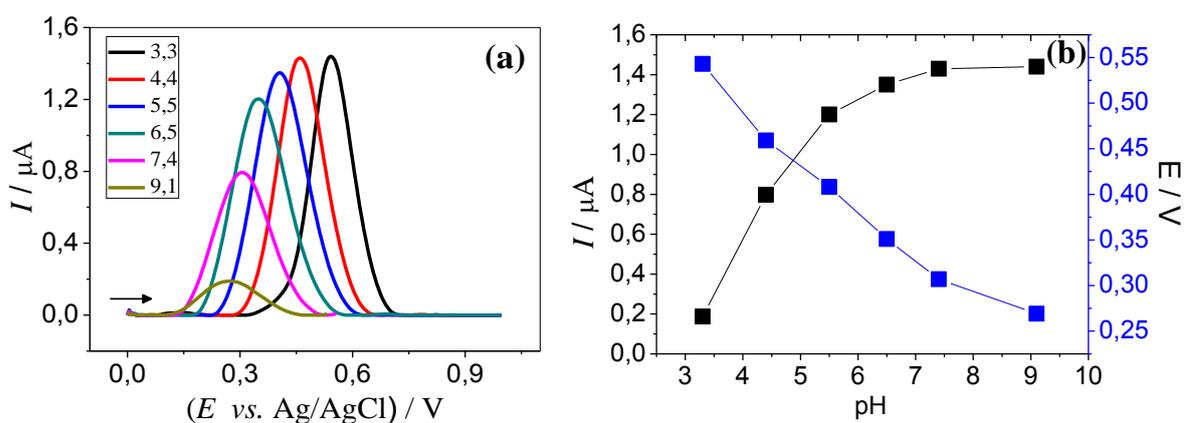


FIGURA 4. 8 - (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o sensor Dnano-PAH/GCE em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ em diferentes pHs. (b) Correntes de pico anódico e valores de potencial para os diferentes pHs estudados. Sendo $f = 10$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 3$ mV.

Como pode ser observado na FIGURA 4.8a, quanto menor o pH maior o potencial de oxidação para este analito e maior a magnitude de corrente anódica. Dessa forma, o valor selecionado foi de 6,5 uma vez que apresentou maior magnitude de sinal analítico quando comparado à valores maiores de pH, mantendo-se constante para valores menores que 6,5. Além disso, em relação aos valores de pH inferiores ele apresentou um menor potencial de oxidação (mais próximo da origem), vide FIGURA 4.8b, o que nos próximos estudos pode reduzir a possibilidade de interferentes eletroativos.

4.3.3.2. Determinação de CAT utilizando a técnica de SWV

Utilizando a SWV, avaliou-se alguns parâmetros como f , a e ΔE_s e investigou-se os efeitos desses sobre o potencial e corrente de pico para a determinação de CAT. Esses estudos foram conduzidos na presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). Os parâmetros estudados da SWV e os valores selecionados de cada parâmetro estão apresentados na TABELA 4.2.

TABELA 4. 2 - Parâmetros de SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de CAT utilizando o Dnano-PAH/GCE

Parâmetro	Faixa estudada	Selecionado
f (Hz)	10 a 150	130
a (mV)	10 a 100	90
ΔE_s (mV)	1 a 6	4

Após a otimização dos parâmetros de SWV foi construída a curva analítica para a determinação de CAT. Na FIGURA 4.9a foram apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de CAT de 1 a 9 ((1) branco, (2) $3,9 \times 10^{-6}$, (3) $6,9 \times 10^{-6}$, (4) $7,8 \times 10^{-6}$, (5) $2,3 \times 10^{-5}$, (6) $3,6 \times 10^{-5}$, (7) $5,1 \times 10^{-5}$, (8) $8,1 \times 10^{-5}$, (9) $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e na FIGURA 4.9b a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $I \text{ (A)} = - 4,6 \times 10^{-7} + 0,24 [\text{CAT}] \text{ (}\mu\text{mol L}^{-1}\text{)}$, com um coeficiente de correlação = 0,998 e LD de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

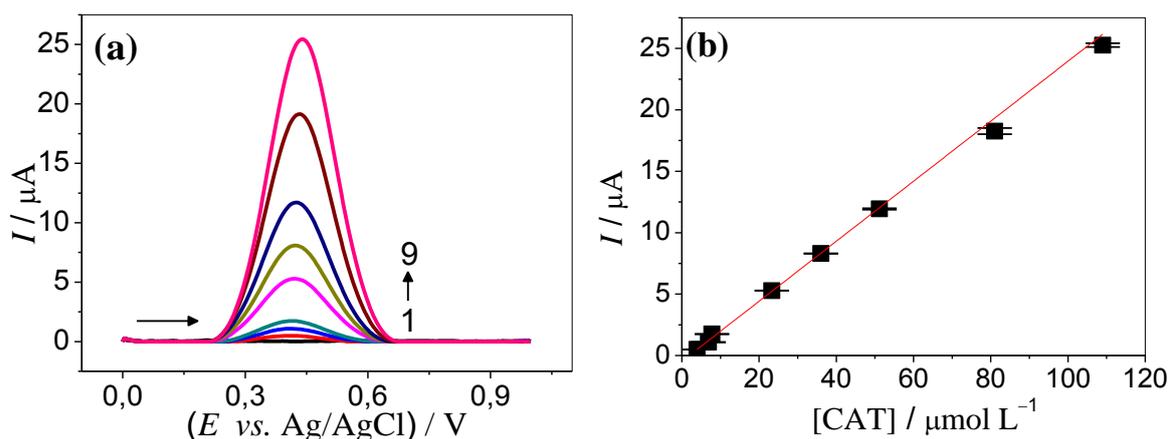


FIGURA 4. 9 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o sensor Dnano-PAH/GCE em diferentes concentrações ((1) branco, (2) $3,9 \times 10^{-6}$, (3) $6,9 \times 10^{-6}$, (4) $7,8 \times 10^{-6}$, (5) $2,3 \times 10^{-5}$, (6) $3,6 \times 10^{-5}$, (7) $5,1 \times 10^{-5}$, (8) $8,1 \times 10^{-5}$, (9) $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 6,5) utilizando o Dnano-PAH/GCE. Sendo $f = 130 \text{ Hz}$, $a = 90 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$; (b) Curva analítica do CAT (n = 3).

4.3.3.3. Determinação de CAT utilizando a técnica de DPV

A DPV também foi utilizada para desenvolver um método para a determinação de CAT, e, a fim de escolher as melhores condições experimentais estudaram-se os parâmetros ν , a e t , bem como seus efeitos sobre o potencial e corrente de pico do CAT. Esses estudos foram conduzidos na presença de catecol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) e os parâmetros investigados e os valores selecionados estão reportados na TABELA 4.3.

TABELA 4. 3 - Parâmetros de DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de CAT utilizando Dnano-PAH/GCE

Parâmetro	Faixa estudada	Selecionado
a (mV)	10 a 100	100
t (ms)	2 a 20	10
v (mV s ⁻¹)	2 a 20	10

Em seguida, foi construída a curva analítica para a determinação de CAT, utilizando-se os parâmetros otimizados. Na FIGURA 4.10a estão ilustrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos variando-se a concentração de CAT de 1 a 11 ((1) branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $4,5 \times 10^{-6}$, (4) $6,9 \times 10^{-6}$, (5) $1,2 \times 10^{-5}$, (6) $2,3 \times 10^{-5}$, (7) $3,6 \times 10^{-5}$, (8) $5,1 \times 10^{-5}$, (9) $6,7 \times 10^{-5}$, (10) $9,2 \times 10^{-5}$, (11) $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e na FIGURA 4.10b a curva analítica. A equação da reta obtida foi: I (A) = $-1,5 \times 10^{-8} + 0,10$ [CAT] ($\mu\text{mol L}^{-1}$), com um coeficiente de correlação (r) = 0,992 e um LD de $1,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

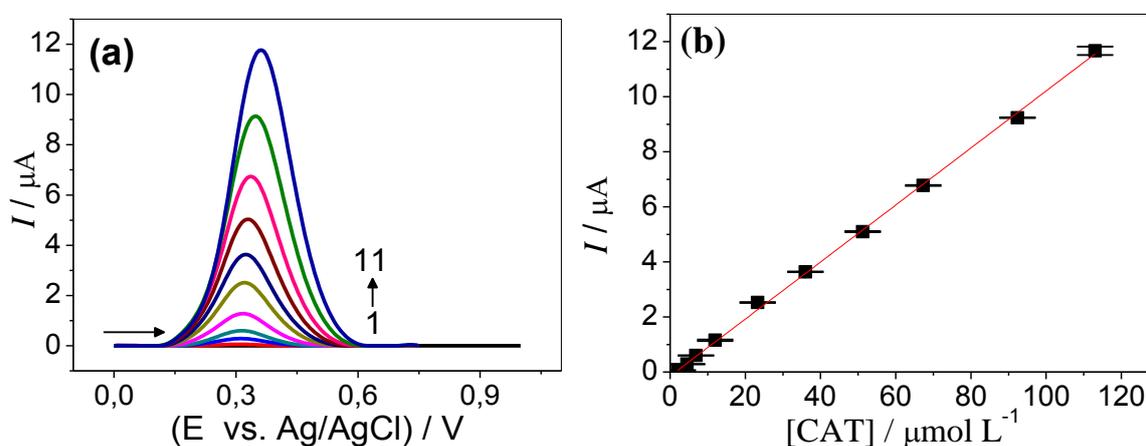


FIGURA 4. 10 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para CAT em diferentes concentrações ((1) branco, (2) $2,0 \times 10^{-6}$, (3) $4,5 \times 10^{-6}$, (4) $6,9 \times 10^{-6}$, (5) $1,2 \times 10^{-5}$, (6) $2,3 \times 10^{-5}$, (7) $3,6 \times 10^{-5}$, (8) $5,1 \times 10^{-5}$, (9) $6,7 \times 10^{-5}$, (10) $9,2 \times 10^{-5}$, (11) $1,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em tampão fosfato $0,10$ mol L⁻¹ (pH = 6,5). Sendo $a = 100$ mV; $t = 10$ ms e $v = 10$ mV s⁻¹; (b) Curva analítica obtida para o CAT ($n = 3$).

4.3.3.4. Comparação entre as técnicas SWV e DPV

Comparando-se os resultados obtidos empregando-se as técnicas SWV e DPV para a determinação de CAT, pode-se concluir que ambas as técnicas apresentaram resultados semelhantes (ver TABELA 4.4), podendo assim, indiscriminadamente, as duas técnicas serem utilizadas para a quantificação deste analito em amostras de águas naturais e de distribuição. Entretanto, para as etapas seguintes foi selecionada a DPV, uma vez que apresentou menor LD e maior faixa linear comparada a SWV.

TABELA 4. 4 - Comparação entre a DPV e SWV para determinação de DA

Parâmetros	SWV	DPV
LD (mol L^{-1})	$2,0 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-6}$
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3,9 a 110	2,0 a 110
Sensibilidade ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$)	$2,4 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$

4.3.3.5. Estudo da repetibilidade e de interferentes em potencial

A próxima etapa, foi o estudo de repetibilidade intra- e entre-dias para a determinação do composto. Assim, para o estudo de repetibilidade intra-dia foi utilizada uma solução de concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CAT e realizou-se medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 8$) desta solução, sendo os valores encontrados de RSD igual a 3,8 %. Já a repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas da mesma concentração do analito em dias distintos ($n = 3$) sendo o RSD encontrado igual a 4,6 %. Os resultados obtidos foram satisfatórios, visto que os RSD foram menores que 5,0 %, evidenciando assim a repetibilidade do método proposto.

Também foi avaliado a seletividade do método proposto por meio da adição de possíveis interferentes presentes em amostras de águas naturais tais como carbonatos, cloretos e sulfatos em uma solução de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 6,5$) contendo CAT ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) conforme descrito

anteriormente na seção experimental 4.2.5. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando-se apenas a solução padrão do CAT, e as respostas analíticas das soluções contendo os possíveis interferentes tiveram uma variação menor a 5%, o que evidenciou a seletividade do método em determinar CAT utilizando o sensor Dnano-PAH/GCE.

4.3.3.6. Determinação de CAT em águas naturais

O sensor Dnano-PAH/GCE foi utilizado para a determinação de CAT em água naturais, sendo duas amostras de água da represa (A e B) e uma amostra de água da torneira (C), ambas coletadas como descrito na seção experimental, seção 4.2.4. Assim, para essa análise foi utilizado o método de adição e recuperação; Adicionou-se alíquotas das amostras de águas naturais fortificadas (adicionadas) com CAT ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) à solução do eletrólito suporte (tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,5), vide TABELA 4.5.

Observou-se que as recuperações variaram entre 90 % e 109 % o que indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras de água naturais na determinação de CAT, evidenciando mais uma vez a seletividade do método eletroanalítico desenvolvido.

TABELA 4. 5 - Resultados obtidos usando o método proposto na determinação de CAT em águas naturais da represa e da torneira

Amostra	CAT		
	Adic. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encont. ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec. (%)
A	5,0	4,8 \pm 0,3	96
B	20	18,4 \pm 0,2	109
C	5,0	4,5 \pm 0,2	90

^a $n = 3$; Adic. = Adicionado; Encont. = Encontrado; Rec. = Recuperado.

4.3.4. Comparação dos parâmetros obtidos neste trabalho com o de outros trabalhos descritos na literatura

Para avaliar o desempenho e os resultados obtidos com o sensor proposto este foi comparado com outros eletrodos recentemente reportados na literatura para a determinação do CAT (ver TABELA 4.6). O dispositivo desenvolvido apresentou vantagens tais como a simplicidade de preparação, resposta rápida (9 s para realizar a medida) e, além disso, apresentou LD e faixa linear próximo aqueles apresentados por outras arquiteturas de sensores descritos na literatura utilizando outros materiais.

TABELA 4. 6 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos neste trabalho com alguns reportados na literatura utilizando outros sensores para a determinação de CAT

Sensor	Técnica analítica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
$\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4\text{-}\beta\text{-CD/GCE}^{92}$	DPV	1 a 200	0,12
GP/MWCNTs/AuNCs/GCE ⁹³	ECL	1 a 80	0,30
3-APBA-PTCA-CNTs/GCE ⁶¹	DPV	0,50 a 30	0,10
Este trabalho	DPV	2 a 110	1,5

$\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4\text{-}\beta\text{-CD}$: β -ciclodextrina ferrite de cobalto

GP/MWCNTs/AuNCs: grafeno/nanotubos de carbono de paredes múltiplas/nanocluster de ouro

ECL: quimiluminescência eletrogerada (do inglês *Electrogenerated chemiluminescence*)

3-APBA-PTCA-CNTs: ácido 3-aminofenilborônico- ácido 3,4,9,10-perileno tetracarboxílico -nanotubos de carbono

4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Uma nova arquitetura de sensor foi desenvolvida pela modificação da superfície de um GCE com o Dnano em um filme de PAH. Foi observado a estabilidade da dispersão e o eletrodo fabricado foi aplicado com sucesso na determinação de CAT em amostras de águas naturais e de distribuição. Além disso, com o método desenvolvido obteve-se vantagens como simplicidade de preparação, resposta rápida (9 s para cada medida) e seletividade, além de apresentar LD e faixa linear similar a outras arquiteturas de sensores reportados na literatura.

5. CONCLUSÕES GERAIS E TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÕES GERAIS

Duas novas arquiteturas de sensores foram desenvolvidas modificando-se a superfície do GCE utilizando nanomateriais de carbono como RGO, CB e Dnano. Foi observado a estabilidade de ambas as dispersões modificadoras (RGO-CB-CTS e Dnano-PAH), e com os eletrodos modificados foi confirmada a rápida transferência de elétrons na interface eletrodo/solução comparado ao GCE.

O sensor RGO-CB-CTS/GCE foi utilizado juntamente com a SWV para a determinação simultânea de DA e PAR quantificação em amostra biológica.

O sensor Dnano-PAH/GCE juntamente com a DPV foi utilizado para a determinação de CAT em amostras de água de torneira e de lago.

5.2. Trabalhos futuros

Propor novas arquitetura de sensores com o Dnano utilizando outros polímeros e/ou polieletrólitos, uma vez que a aplicação destes torna-se uma alternativa para a formação de dispersões estáveis (através das interações eletrostáticas entre os grupos funcionais do Dnano com esses polímeros e/ou polieletrólitos), as quais podem ser utilizadas para modificar a superfície dos mais diferentes eletrodos (*eg.* GCE, eletrodo de grafite pirolítico e eletrodo de ouro).

6. REFERÊNCIAS

1. FERRARI, A.C.; BONACCORSO, F.; FAL'KO, V.; NOVOSELOV, K.S.; ROCHE, S.; BOGGILD, P.; BORINI, S.; KOPPENS, F.H.; PALERMO, V. & PUGNO, N., "Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems". *Nanoscale*. **7**(11): 4598, 2015.
2. NOVOSELOV, K.S.; GEIM, A.K.; MOROZOV, S.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S.A.; GRIGORIEVA, I. & FIRSOV, A., "Electric field effect in atomically thin carbon films". *Science*. **306**(5696): 666, 2004.
3. KATSNELSON, M.I., "Graphene: carbon in two dimensions". *Mater. Today*. **10**(1): 20, 2007.
4. LI, D.; MUELLER, M.B.; GILJE, S.; KANER, R.B. & WALLACE, G.G., "Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets". *Nat. Nanotechnol.* **3**(2): 101, 2008.
5. PUMERA, M.; AMBROSI, A.; BONANNI, A.; CHNG, E.L.K. & POH, H.L., "Graphene for electrochemical sensing and biosensing". *TrAC, Trends Anal. Chem.* **29**(9): 954, 2010.
6. PARK, S.; AN, J.; POTTS, J.R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S. & RUOFF, R.S., "Hydrazine-reduction of graphite-and graphene oxide". *Carbon*. **49**(9): 3019, 2011.
7. ZHANG, J.; YANG, H.; SHEN, G.; CHENG, P.; ZHANG, J. & GUO, S., "Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid". *Chem. Commun.* **46**(7): 1112, 2010.
8. JANEGITZ, B.C.; DOS SANTOS, F.A.; FARIA, R.C. & ZUCOLOTTI, V., "Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate". *Mater. Sci. Eng., C*. **37**: 14, 2014.
9. PEI, S. & CHENG, H.-M., "The reduction of graphene oxide". *Carbon*. **50**(9): 3210, 2012.
10. SHAO, Y.; WANG, J.; WU, H.; LIU, J.; AKSAY, I.A. & LIN, Y., "Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review". *Electroanalysis*. **22**(10): 1027, 2010.
11. HARRIS, P.J., "New perspectives on the structure of graphitic carbons". *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **30**(4): 235, 2005.
12. DONNET, J.-B., *Carbon Black* Second ed. 1993.
13. MALHA, S.I.R.; MANDLI, J.; OURARI, A. & AMINE, A., "Carbon black-modified electrodes as sensitive tools for the electrochemical detection of nitrite and nitrate". *Electroanalysis*. **25**(10): 2289, 2013.
14. VICENTINI, F.C.; RAVANINI, A.E.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.; INIESTA, J.; BANKS, C.E. & FATIBELLO-FILHO, O., "Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon

- blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms". *Electrochim. Acta.* **157**: 125, 2015.
15. LEE, J.H.; PARK, J.Y.; MIN, K.; CHA, H.J.; CHOI, S.S. & YOO, Y.J., "A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents". *Biosens. Bioelectron.* **25**(7): 1566, 2010.
 16. ARDUINI, F.; GIORGIO, F.D.; AMINE, A.; CATALDO, F.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G., "Electroanalytical characterization of carbon black nanomaterial paste electrode: development of highly sensitive tyrosinase biosensor for catechol detection". *Anal. Lett.* **43**(10-11): 1688, 2010.
 17. EL KHATIB, K. & HAMEED, R.A., "Development of Cu₂O/Carbon Vulcan XC-72 as non-enzymatic sensor for glucose determination". *Biosens. Bioelectron.* **26**(8): 3542, 2011.
 18. DEROCO, P.B.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "An electrochemical sensor for the simultaneous determination of paracetamol and codeine using a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles and carbon black". *Electroanalysis.* **27**(9): 2214, 2015.
 19. ARDUINI, F.; MAJORANI, C.; AMINE, A.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G., "Hg²⁺ detection by measuring thiol groups with a highly sensitive screen-printed electrode modified with a nanostructured carbon black film". *Electrochim. Acta.* **56**(11): 4209, 2011.
 20. REEDER, G.S. & HEINEMAN, W.R., "Electrochemical characterization of a microfabricated thick-film carbon sensor for trace determination of lead". *Sens. Actuators, B.* **52**(1): 58, 1998.
 21. KRUEGER, A., "Diamond nanoparticles: jewels for chemistry and physics". *Adv. Mater.* **20**(12): 2445, 2008.
 22. MOCHALIN, V.N.; SHENDEROVA, O.; HO, D. & GOGOTSI, Y., "The properties and applications of nanodiamonds". *Nat. Nanotechnol.* **7**(1): 11, 2012.
 23. HOLT, K.B.; ZIEGLER, C.; CARUANA, D.J.; ZANG, J.; MILLÁN-BARRIOS, E.J.; HU, J. & FOORD, J.S., "Redox properties of undoped 5 nm diamond nanoparticles". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**(2): 303, 2008.
 24. KULAKOVA, I., "Surface chemistry of nanodiamonds". *Phys. Solid State.* **46**(4): 636, 2004.
 25. WILLIAMS, O.A.; ZIMMERMANN, T.; KUBOVIC, M.; DENISENKO, A.; KOHN, E.; JACKMAN, R. & GRUEN, D., *Electronic properties and applications of ultrananocrystalline diamond*, in *Synthesis, Properties and Applications of Ultrananocrystalline Diamond*. 2005, Springer. p. 373.
 26. TAKESHI AKASAKA, F.W.E.S.N., *Chemistry of Nanocarbons*. First ed. 2010.
 27. XI, G.; ROBINSON, E.; MANIA-FARNELL, B.; VANIN, E.F.; SHIM, K.-W.; TAKAO, T.; ALLENDER, E.V.; MAYANIL, C.S.; SOARES, M.B.

- & HO, D., "Convection-enhanced delivery of nanodiamond drug delivery platforms for intracranial tumor treatment". *Nanomedicine*. **10**(2): 381, 2014.
28. CHEN, L.; ZANG, J.; WANG, Y. & BIAN, L., "Electrochemical oxidation of nitrite on nanodiamond powder electrode". *Electrochim. Acta*. **53**(8): 3442, 2008.
29. HIAN, L.C.; GREHAN, K.J.; COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. & MARKEN, F., "Nanodiamond thin films on titanium substrates growth and electrochemical properties". *J. Electrochem. Soc.* **150**(1): E59, 2003.
30. JANEGITZ, B.C.; BACCARIN, M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; DOS SANTOS, F.A.; OLIVEIRA, G.G.; MACHADO, S.A.S.; LANZA, M.R.V.; FATIBELLO-FILHO, O. & ZUCOLOTTO, V., "The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing". *Sens. Actuators, B*. **220**(1): 805, 2015.
31. LAKARD, B.; HERLEM, G.; LAKARD, S.; ANTONIOU, A. & FAHYS, B., "Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films". *Biosens. Bioelectron.* **19**(12): 1641, 2004.
32. KONG, B.-S.; YOO, H.-W. & JUNG, H.-T., "Electrical conductivity of graphene films with a poly (allylamine hydrochloride) supporting layer". *Langmuir*. **25**(18): 11008, 2009.
33. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M., "Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors". *Electrochim. Acta*. **55**(21): 6239, 2010.
34. GONSALVES, A.D.A.; ARAÚJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F. & DE ABREU, F.C., "Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana". *Quim. Nova*. **34**(7): 1215, 2011.
35. CRINI, G. & BADOT, P.-M., "Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature". *Prog. Polym. Sci.* **33**(4): 399, 2008.
36. JANEGITZ, B.C.; OLIVEIRA, A.; GOMES, M.S.; SARTORI, E.R.; PEREIRA-FILHO, E.R. & FATIBELLO-FILHO, O., "Removal of copper (II) from sugar-cane spirits employing chitosan". *Quim. Nova*. **33**(2): 458, 2010.
37. KRAJEWSKA, B., "Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review". *Enzyme Microb. Technol.* **35**(2): 126, 2004.
38. WU, H.; WANG, J.; KANG, X.; WANG, C.; WANG, D.; LIU, J.; AKSAY, I.A. & LIN, Y., "Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film". *Talanta*. **80**(1): 403, 2009.

39. XU, H.; DAI, H. & CHEN, G., "Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin protein entrapped in graphene and chitosan composite film". *Talanta*. **81**(1): 334, 2010.
40. PAULIUKAITE, R.; EMILIA GHICA, M.; FATIBELLO-FILHO, O. & MA BRETT, C., "Graphite-epoxy electrodes modified with functionalised carbon nanotubes and chitosan for the rapid electrochemical determination of dipyrone". *Comb. Chem. High Throughput Screening*. **13**(7): 590, 2010.
41. GHICA, M.E.; PAULIUKAITE, R.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M., "Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors". *Sens. Actuators, B*. **142**(1): 308, 2009.
42. ZHILEI, W.; ZAIJUN, L.; XIULAN, S.; YINJUN, F. & JUNKANG, L., "Synergistic contributions of fullerene, ferrocene, chitosan and ionic liquid towards improved performance for a glucose sensor". *Biosens. Bioelectron*. **25**(6): 1434, 2010.
43. SILVA, C.P. & CARAPUÇA, H.M., "Glassy carbon electrodes coated with poly (allylamine hydrochloride), PAH: Characterization studies and application to ion-exchange voltammetry of trace lead (II) at combined PAH/mercury film electrodes". *Electrochim. acta*. **52**(3): 1182, 2006.
44. ZUCOLOTTI, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M.R.; CONSTANTINO, C.J.; BALOGH, D.T.; ZANATTA, A.R.; MOREIRA, W.C. & OLIVEIRA, O.N., "Unusual interactions binding iron tetrasulfonated phthalocyanine and poly (allylamine hydrochloride) in layer-by-layer films". *J. Phys. Chem. B*. **107**(16): 3733, 2003.
45. SARTORI, E.R.; TAKEDA, H.H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film for the voltammetric determination of sulfite in foods". *Electroanalysis*. **23**(11): 2526, 2011.
46. KIM, J.B.; PREMKUMAR, T.; LEE, K. & GECKELER, K.E., "A facile approach to single-wall carbon nanotube/poly (allylamine) nanocomposites". *Macromol. Rapid Commun*. **28**(3): 276, 2007.
47. SARTORI, E.R. & FATIBELLO-FILHO, O., "Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and sulfite in beverages employing a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film". *Electroanalysis*. **24**(3): 627, 2012.
48. SARTORI, E.R.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly (allylamine hydrochloride) film". *Talanta*. **87**: 235, 2011.
49. TAKEDA, H.H.; JANEGITZ, B.C.; MEDEIROS, R.A.; MATTOSO, L.H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon

- electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film". *Sens. Actuators, B.* **161**(1): 755, 2012.
50. YANG, S.; LI, Y.; JIANG, X.; CHEN, Z. & LIN, X., "Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds". *Sens. Actuators, B.* **114**(2): 774, 2006.
51. ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N. & KUBOTA, L.T., "Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental". *Quim. Nova.* **24**(1): 77, 2001.
52. ZHOU, G.-M. & FANG, H.H., "Co-degradation of phenol and m-cresol in a UASB reactor". *Bioresour. Technol.* **61**(1): 47, 1997.
53. BRITTO, J.M. & DO CARMO RANGEL, M., "Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais". *Quim. Nova.* **31**(1): 114, 2008.
54. CONAMA, 20. 18 junho 1986.
55. FATTAHI, N.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.R.M. & JAHROMI, E.Z., "Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection". *J. Chromatogr. A.* **1157**(1): 23, 2007.
56. VINAS, P.; LOPEZ-ERROZ, C.; MARIN-HERNANDEZ, J.J. & HERNANDEZ-CORDOBA, M., "Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection". *J. Chromatogr. A.* **871**(1): 85, 2000.
57. TSUKAGOSHI, K.; KAMEDA, T.; YAMAMOTO, M. & NAKAJIMA, R., "Separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection". *J. Chromatogr. A.* **978**(1): 213, 2002.
58. STRATIL, P.; KLEJDUS, B. & KUBAN, V., "Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods". *J. Agric. Food Chem.* **54**(3): 607, 2006.
59. HU, F.; CHEN, S.; WANG, C.; YUAN, R.; YUAN, D. & WANG, C., "Study on the application of reduced graphene oxide and multiwall carbon nanotubes hybrid materials for simultaneous determination of catechol, hydroquinone, p-cresol and nitrite". *Anal. Chim. Acta.* **724**: 40, 2012.
60. MERSAL, G.A., "Electrochemical sensor for voltammetric determination of catechol based on screen printed graphite electrode". *Int. J. Electrochem. Sci.* **4**: 1167, 2009.
61. LIU, W.; WU, L.; ZHANG, X. & CHEN, J., "Highly-selective electrochemical determination of catechol based on 3-aminophenylboronic acid-3, 4, 9, 10-perylene tetracarboxylic acid functionalized carbon nanotubes modified electrode". *Anal. Methods.* **6**(3): 718, 2014.

62. FOROUGHI, M.M.; NOROOZIFAR, M. & KHORASANI-MOTLAGH, M., "Simultaneous determination of hydroquinone and catechol using a modified glassy carbon electrode by ruthenium red/carbon nanotube". *J. Iran Chem. Soc.* **12**(7): 1139, 2015.
63. VICENTINI, F.C.; GARCIA, L.L.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.; JANEGITZ, B.C. & FATIBELLO-FILHO, O., "A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water". *Enzyme Microb. Technol.*, 2015.
64. PARK, S.J.; SONG, H.S.; KWON, O.S.; CHUNG, J.H.; LEE, S.H.; AN, J.H.; AHN, S.R.; LEE, J.E.; YOON, H. & PARK, T.H., "Human dopamine receptor nanovesicles for gate-potential modulators in high-performance field-effect transistor biosensors". *Sci. Rep.* **4** 2014.
65. NICHKOVA, M.; WYNVEEN, P.M.; MARC, D.T.; HUISMAN, H. & KELLERMANN, G.H., "Validation of an ELISA for urinary dopamine: applications in monitoring treatment of dopamine-related disorders". *J. Neurochem.* **125**(5): 724, 2013.
66. SILVA, L.I.; FERREIRA, F.D.; FREITAS, A.C.; ROCHA-SANTOS, T.A. & DUARTE, A., "Optical fiber biosensor coupled to chromatographic separation for screening of dopamine, norepinephrine and epinephrine in human urine and plasma". *Talanta.* **80**(2): 853, 2009.
67. GOYAL, R.N.; GUPTA, V.K.; BACHHETI, N. & SHARMA, R.A., "Electrochemical sensor for the determination of dopamine in presence of high concentration of ascorbic acid using a Fullerene-C60 coated gold electrode". *Electroanalysis.* **20**(7): 757, 2008.
68. MORAES, F.C.; GOLINELLI, D.L.; MASCARO, L.H. & MACHADO, S.A., "Determination of epinephrine in urine using multi-walled carbon nanotube modified with cobalt phthalocyanine in a paraffin composite electrode". *Sens. Actuators, B.* **148**(2): 492, 2010.
69. BOSCH, M.E.; SÁNCHEZ, A.R.; ROJAS, F.S. & OJEDA, C.B., "Determination of paracetamol: Historical evolution". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**(3): 291, 2006.
70. BERGMAN, K.; MÜLLER, L. & TEIGEN, S.W., "The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re) view". *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **349**(2): 263, 1996.
71. FILIK, H.; ŞENER, İ.; CEKIÇ, S.D.; KILIÇ, E. & APAK, R., "Spectrophotometric determination of paracetamol in urine with tetrahydroxycalix [4] arene as a coupling reagent and preconcentration with Triton X-114 using cloud point extraction". *Chem. Pharm. Bull.* **54**(6): 891, 2006.
72. HYLLESTED, M.; JONES, S.; PEDERSEN, J. & KEHLET, H., "Comparative effect of paracetamol, NSAIDs or their combination in postoperative pain management: a qualitative review". *Br. J. Anaesth.* **88**(2): 199, 2002.

73. KALIVAS, P.W., "Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area". *Brain Res. Rev.* **18**(1): 75, 1993.
74. DEUTCH, A., "Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease". *J. Neural Transm.: Gen. Sect.* **91**(2-3): 197, 1993.
75. CANEVARI, T.C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; LANDERS, R.; BENVENUTTI, E.V. & MACHADO, S.A., "Sol-gel thin-film based mesoporous silica and carbon nanotubes for the determination of dopamine, uric acid and paracetamol in urine". *Talanta.* **116**: 726, 2013.
76. CHEEMALAPATI, S.; PALANISAMY, S.; MANI, V. & CHEN, S.-M., "Simultaneous electrochemical determination of dopamine and paracetamol on multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide nanocomposite-modified glassy carbon electrode". *Talanta.* **117**: 297, 2013.
77. SHAO, G.; LU, Y.; WU, F.; YANG, C.; ZENG, F. & WU, Q., "Graphene oxide: the mechanisms of oxidation and exfoliation". *J. Mater. Sci.* **47**(10): 4400, 2012.
78. TUNG, V.C.; ALLEN, M.J.; YANG, Y. & KANER, R.B., "High-throughput solution processing of large-scale graphene". *Nat. Nanotechnol.* **4**(1): 25, 2009.
79. OPALKO, F.J.; ADAIR, J. & KHAN, S., "Heterogeneous nucleation of calcium oxalate trihydrate in artificial urine by constant composition". *J. Cryst. Growth.* **181**(4): 410, 1997.
80. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A., "Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines". *J. Cryst. Growth.* **233**(1-2): 367, 2001.
81. WANG, G.; SHEN, X.; YAO, J. & PARK, J., "Graphene nanosheets for enhanced lithium storage in lithium ion batteries". *Carbon.* **47**(8): 2049, 2009.
82. HAN, D.; YAN, L.; CHEN, W. & LI, W., "Preparation of chitosan/graphene oxide composite film with enhanced mechanical strength in the wet state". *Carbohydrate Polymers.* **83**(2): 653, 2011.
83. GUO, Y.; SUN, X.; LIU, Y.; WANG, W.; QIU, H. & GAO, J., "One pot preparation of reduced graphene oxide (RGO) or Au (Ag) nanoparticle-RGO hybrids using chitosan as a reducing and stabilizing agent and their use in methanol electrooxidation". *Carbon.* **50**(7): 2513, 2012.
84. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Vol. 2. 1980: Wiley New York.
85. GOSSER, D.K., *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1993: VCH New York.
86. NICHOLSON, R.S., "Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics". *Anal. Chem.* **37**(11): 1351, 1965.

87. LAVAGNINI, I.; ANTIOCHIA, R. & MAGNO, F., "An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data". *Electroanalysis*. **16**(6): 505, 2004.
88. HABIBI, B.; JAHANBAKHSI, M. & POURNAGHI-AZAR, M.H., "Simultaneous determination of acetaminophen and dopamine using SWCNT modified carbon-ceramic electrode by differential pulse voltammetry". *Electrochim. Acta*. **56**(7): 2888, 2011.
89. CHUNG, P.-H.; PEREVEDENTSEVA, E.; TU, J.-S.; CHANG, C. & CHENG, C.-L., "Spectroscopic study of bio-functionalized nanodiamonds". *Diamond Relat. Mater.* **15**(4): 622, 2006.
90. HUANG, L.-C.L. & CHANG, H.-C., "Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds". *Langmuir*. **20**(14): 5879, 2004.
91. WILLIAMS, O.A.; HEES, J.; DIEKER, C.; JÄGER, W.; KIRSTE, L. & NEBEL, C.E., "Size-dependent reactivity of diamond nanoparticles". *Acs Nano*. **4**(8): 4824, 2010.
92. HAN, J.-T.; HUANG, K.-J.; LI, J.; LIU, Y.-M. & YU, M., "β-cyclodextrin-cobalt ferrite nanocomposite as enhanced sensing platform for catechol determination". *Colloids Surf., B*. **98**: 58, 2012.
93. YUAN, D.; CHEN, S.; YUAN, R.; ZHANG, J. & ZHANG, W., "An electrogenerated chemiluminescence sensor prepared with a graphene/multiwall carbon nanotube/gold nanocluster hybrid for the determination of phenolic compounds". *Analyst*. **138**(20): 6001, 2013.