

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIO ROBERTO CAETANO

**DESENVOLVIMENTO DE (BIO)SENSORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO PRODUZIDAS PELO MÉTODO BIFÁSICO**

CURITIBA

2016

FABIO ROBERTO CAETANO

**DESENVOLVIMENTO DE (BIO)SENSORES ELETROQUÍMICOS UTILIZANDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO PRODUZIDAS PELO MÉTODO BIFÁSICO**

Tese apresentada ao Curso Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Junior

Coorientadores:

Prof. Dr. Aldo José Gorgatti Zarbin

Prof. Dr. Arben Merkoçi.

CURITIBA

2016

C128d

Caetano, Fabio Roberto

Desenvolvimento de (bio)sensores eletroquímicos utilizando nanopartículas de ouro produzidas pelo método bifásico / Fabio Roberto Caetano. – Curitiba, 2016.

165 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

Orientador: Luiz Humberto Marcolino-Junior.

Coorientadores: Aldo José Gorgatti Zarbin, Arben Merkoçi.

1. Química eletroanalítica. 2. Biossensores. 3. Nanopartículas de Ouro. 4. Inkjet. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marcolino-Junior, Luiz Humberto. III. Zarbin, Aldo José Gorgatti. IV. Merkoçi, Arben. V. Título.

CDD: 543

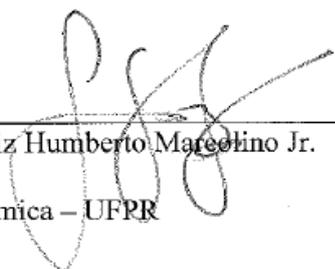
TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE (BIO)SENSORES ELETROQUÍMICOS
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO PRODUZIDAS PELO
MÉTODO BIFÁSICO**

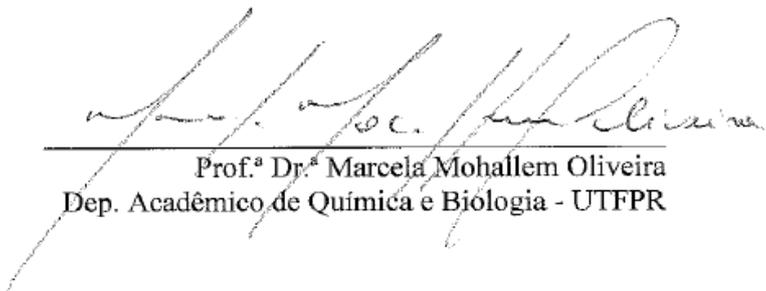
por

FABIO ROBERTO CAETANO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



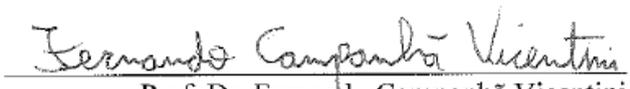
Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr.
Orientador
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Marcela Mohallem Oliveira
Dep. Acadêmico de Química e Biologia - UTFPR



Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
Dep. de Ciências da Natureza, Matemática e Educação - UFSCar



Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini
Centro de Ciências da Natureza – UFSCar



Prof. Dr. Marcelo Eduardo Vidotti Miyata
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 26 de agosto de 2016.

Em homenagem às duas grandes mulheres da minha vida: minha Mãe, Rosana Caetano e em memória de minha avó, Matilde da Silveira Caetano. Com carinho, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a orientação do Prof. Luiz Humberto Marcolino Junior, por aceitar a missão de orientar essa tese de doutorado, com meus horários alternativos e condições especiais de dedicação não exclusiva devido à jornada de servidor público. A toda atenção e cuidado dedicados à minha pessoa, não só no doutorado, mas nesses sete anos de amizade. Terminar o doutorado sem ao menos poder listar uma situação de animosidade é com certeza o reflexo do seu bom trato e cuidado na relação interpessoal durante todo o tempo. Certamente um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Márcio Fernando Bergamini, pela co-orientação, amizade, entusiasmo e transmissão de paixão pela ciência e disponibilidade de ajudar e sugerir soluções e estudos durante a execução dos experimentos.

Aos professores avaliadores desta tese: Dra. Marcela M. Oliveira, Dr. Bruno C. Janegitz, Dr. Fernando C. Vicentini e em especial ao Dr. Marcio E. V. Miyata que pela quarta vez é membro de uma banca de avaliação dos meus trabalhos da pós graduação, desde o mestrado.

Ao Prof. Aldo J. G. Zarbin pela coorientação e a todos os alunos do GQM que muitas vezes me ajudaram com equipamentos, análises e sugestões.

Ao Dr. Arben Merkoçi pela orientação do doutorado sanduiche.

Em memória da minha avó Matilde da Silveira Caetano, que me criou e foi grande exemplo de pessoa honesta e idônea.

À minha mãe, Rosana Caetano, que sempre me ensinou que devemos agradecer pelo que temos e lutar pelo que queremos. Por todo carinho, amor e cuidado desde sempre. Por ser meu exemplo de honestidade, simplicidade e força.

Ao meu amor e companheiro, meu marido Leopoldo Ricardo Malta Barbosa Bahia, por todo carinho, apoio e compreensão. Por aguentar meu mau humor durante o processo de escrita da tese e por me incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia. A sua presença ao meu lado durante essa etapa final foi fundamental para aliviar a tensão e o peso da escrita deste documento

A toda Família Caetano: ao meu irmão Paulo, em especial às minhas tias Rosangela Caetano, Sueli F. Caetano e Vera Lucia Caetano. Aos meus primos e por todo o carinho e orgulho expressado por todos eles pela minha trajetória de vida.

À minha amiga Kelly J. C. Brambilla pelos onze anos de amizade e muito amor envolvido. Pelos conselhos, puxões de orelha e risadas. Pelo amor profundo e cuidado que sempre me foi dado nas horas mais difíceis.

Às amigas “cretinas”: Vânia R. Ferreira e Vannia C. Santos pela amizade e companheirismo nesses 11 anos de caminhada. Ao Gabriel K. B. Ferreira, pelo empréstimo de reagentes, risadas e passeios durante nossa estadia na Espanha. Dias que jamais esqueceremos.

Ao meu ex-chefe Prof. Dr. Anderson J. M. Andrade e a atual chefe do departamento de Fisiologia da UFPR, Prof. Dra. Ana Lucia Tararhuch por todo apoio e compreensão durante esse período de jornada de trabalho reduzida. Pelo cuidado e trato pessoal comigo.

A todo o pessoal do Departamento de fisiologia, em especial a Hely de Moraes, minha parceira pro que der e vier, que aguentou minhas lamentações sobre: trabalhar e fazer doutorado.

Ao pessoal do LabSense por toda ajuda nesses anos, pelas conversas, risadas e trocas de ideias. Em especial, Emmanuelle pela paciência e boa vontade em ajudar com a parte de aplicação do biossensor. Aos 45 do segundo tempo, vale um agradecimento especial à Priscilla Mengarda pela revisão e ajuda de formatação da tese.

Aos colegas do grupo de pesquisa NANO: nanobiosensors and bioelectronics, do Instituto Catalão de nanociência e nanotecnologia onde desenvolvi o doutorado sanduiche. Em especial à Dra. Lívia Flório pela convivência, companheirismo e descontração nos momentos difíceis longe de casa.

Aos amigos de convivência na Casita Llançà 27: Dayane Doffinger, Fabio Gozzi, Silvânia, Cícero e Vanessa. Um “muito obrigado” especial à Andressa Bortotti, pela convivência tranquila, risadas e cuidado com minha pessoa. Por me presentear com “aquela” massa com molho branco acompanhado de um vinho ao final de um dia pesado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

A CAPES pela bolsa de doutorado sanduiche concedida.

*“A maior utilidade da vida é usá-la em
prol de algo que sobreviva a ela.”*

William James

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo a abordagem eletroanalítica de nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método bifásico, o qual é dividido em três partes: *i) síntese e caracterização de um nanocompósito entre nanopartículas de ouro (NPAu) e nanotubos de carbono (NTC) pelo método bifásico e a construção de um sensor eletroquímico para a determinação de dopamina.* Nesta parte, os NTCs foram funcionalizados por oxidação química por rota ácida para promover melhor dispersão das NPAu sobre os NTCs. A efetividade da funcionalização química foi avaliada por espectroscopia RAMAN e titulações potenciométricas, indicaram a introdução de grupos oxigenados na estrutura dos NTCs. Após isso, o NTC funcionalizado foi utilizado como suporte para o crescimento de NPAu, utilizando uma rota inédita para a sua obtenção. Após caracterização, o material foi utilizado como sensor eletroquímico para a determinação de dopamina na presença de ácido ascórbico e ácido úrico por meio da voltametria de onda quadrada. Posterior à otimização dos parâmetros analíticos, a faixa linear encontrada foi de 0,48 a 5,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, com limite de detecção e quantificação de 0,071 a 0,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente; *ii) aplicação do nanocompósito NTC-NPAu na construção de um biossensor.* Eletrodos impressos modificados com NTC-NPAu foram utilizados como suporte para a imobilização da enzima tirosinase e este biossensor foi acoplado a um sistema microfluídico de baixo custo constituídos de fios de algodão como microcanais de fluxo de solução. O sistema foi aplicado para a determinação de fenol e, após a otimização dos parâmetros analíticos, o limite de detecção e quantificação foram de 2,91 nmol L^{-1} e 8,92 nmol L^{-1} respectivamente. O sistema foi aplicado no estudo de adição e recuperação de fenol em água potável, obtendo recuperações entre 89 e 110%; *iii) desenvolvimento de tintas a base de NPAu passivadas por dodecanotiol e construção de eletrodos impressos.* Neste estudo, as NPAu foram utilizadas na formulação de tintas para a produção de eletrodos utilizando a tecnologia jato de tinta de impressão (JTI). A produção de eletrodos foi avaliada na construção de um dispositivo de multidetecção onde os desvios padrão relativos de repetibilidade e reprodutibilidade encontrados foram de 2,7% e 10%, indicando a potencialidade analítica do sistema.

Palavras-chave: Química eletroanalítica. Biossensores. Nanopartículas de Ouro. Inkjet.

ABSTRACT

This work aims to electroanalytical approach of gold nanoparticles synthesized by biphasic method, which is divided into three parts: *i) synthesis and characterization of nanocomposite between gold nanoparticles (NPAu) and carbon nanotubes (NTC) by biphasic method and construction of electrochemical sensor for dopamine determination.* In this section, NCTs were functionalized by adicic chemical oxidation to promote better NPAu dispersion onto CNTs, the effectiveness of chemical functionalization was evaluated by RAMAN spectroscopy and potentiometric titrations indicating the introduction of oxygenated groups on the CNTs surface occurred. Thereafter, the functionalized NTC was applied as support for NPAu growth by a new synthetic route. After structural characterization, the material was used as electrochemical sensor for the determination of dopamine in presence of ascorbic acid and uric acid using a square wave voltammetry. Thereafter, optimization of analytical parameters was carried out and the linear range was found from $0.48 \times$ to $5.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ with limit of detection and quantification 0.07 and $0.24 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively; *ii) application of the NTC-NPAu nanocomposite for biosensor construction.* Screen printed electrodes modified NTC-NPAu were used as support for immobilizing tyrosinase enzyme, and the biosensor was coupled to microfluidic low-cost system consisting of cotton thread as solution flow microchannels. The system was evaluated for phenol quantification after optimized analytical parameters of limit of detection and limit of quantification were found $2,9 \text{ nmol L}^{-1}$ and $8,9 \text{ nmol L}^{-1}$ respectively. The system was applied on phenol addition and recovery studies in tap water, obtaining recoveries rates between 89 and 110%; *iii) development NPAu-dodecanethiol capped-based inks and construction of printed electrodes.* In this study, NPAu were used in ink formulations for producing electrodes using inkjet printing technology. After optimization of ink composition and printing parameters, the electrodes were characterized by electrochemical techniques. The printing process was evaluated in a multidetection device where repeatability and reproducibility standard deviation values were found 2.7% and 10 %, indicating good analytical performance.

Keywords: Electroanalytical chemistry. Biosensors. Gold Nanoparticles. Inkjet.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PELA ROTA BIFÁSICA	5
FIGURA 2 - ALÓTROPOS DE CARBONO DE ESTRUTURA sp^2 : A) FULERENO B) NANOTUBO DE CARBONO C) GRAFENO.....	7
FIGURA 3 - NANOTUBOS DE CARBONO A) PAREDE ÚNICA E B) MÚLTIPLAS PAREDES	7
FIGURA 4 - AS TRÊS ETAPAS DE CRESCIMENTO DE NANOTUBOS DE CARBONO CATALISADAS POR UMA ESPÉCIE METÁLICA (I) FORMAÇÃO DE UMA FOLHA DE GRAFENO SOBRE O CATALISADOR (II) PARA MANTER O CRESCIMENTO DO NTC SOBRE A PARTICULA, A ESTRUTURA SE DOBRA FORMANDO UM CILINDRO (III) CRESCIMENTO CONTÍNUO DAS PAREDES CILINDRICAS.	8
FIGURA 5 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS CONTENDO DIFERENTES (NANO)ESTRUTURAS DE CARBONO B) ORIENTAÇÃO DOS PLANOS NA ESTRUTURA GRAFÍTICA.....	10
FIGURA 6 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE NTCS POR ROTA ÁCIDA.....	12
FIGURA 7 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE UMA SOLUÇÃO CONTENDO $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE DA, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE AA E $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE AU. OS ELETRODOS DE TRABALHO FORAM A) DIAMANTE DOPADO COM BORO B) GRAFITE PIROLÍTICO C) CARBONO CERÂMICO D) PASTA DE CARBONO E) CARBONO VÍTREO	16
FIGURA 8 - ITENS COMPONENTES DE UM BIOSENSOR	18
FIGURA 9 - PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM IMUNOSSENSOR.....	19
FIGURA 10 - PRINCÍPIO DE RECONHECIMENTO DE UM GENOSSENSOR	20
FIGURA 11 - EXEMPLO DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	21
FIGURA 12 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS FORMAS DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA APRESENTADAS BIOSSENSORES	23
FIGURA 13 - FORMAS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA a) ADSORÇÃO b) IMOBILIZAÇÃO EM REDE POLIMÉRICA c) FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO COVALENTE	26
FIGURA 14 - MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE a) PRIMEIRA GERAÇÃO b) SEGUNDA GERAÇÃO E c) TERCEIRA GERAÇÃO	28
FIGURA 15 - REAÇÕES CATALISADAS PELA TIROSINASE	29

FIGURA 16 - CICLO CATALÍTICO DA TIROSINASE	30
FIGURA 17 - SISTEMA MICROFLUIDICO BASEADO EM CANAIS CONSTITUIDOS DE FÍOS DE ALGODÃO.....	34
FIGURA 18 - PARTES CONSTITUINTES DE UM ELETRODO IMPRESSO	35
FIGURA 19 - TRANSDUTORES PARA IJT NA MODALIDADE DOD: A) TRANSDUTOR TÉRMICO B) PIEZOELÉTRICO	37
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE FORMAÇÃO DA GOTA NA IJT UTILIZANDO TRANSDUTOR PIEZOELÉTRICO	38
FIGURA 21 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO RESUMINDO AS ETAPAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS NTCs FUNCIONALIZADOS POR TRATAMENTO ÁCIDO.....	43
FIGURA 22 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO RESUMINDO AS ETAPAS DE SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS NTC-NPAu.....	44
FIGURA 23 - CURVA DE TITULAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE NTCs UTILIZANDO HCl COMO TITULANTE (■) SOLUÇÃO DE NaOH, (■) SOLUÇÃO DE NaOH E SUSPENSÃO DE NTCs), (■) PRIMEIRA DERIVADA DO pH EM FUNÇÃO DO VOLUME DE NaOH ADICIONADO.....	48
FIGURA 24 - TEOR DE GRUPOS CARBOXÍLICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TIPO DE TRATAMENTO OXIDATIVO ADOPTADO PARA OS NTCs EM MEIO ÁCIDO (NTC H ⁺) E EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (NTC H ₂ O ₂).....	48
FIGURA 25 - IMAGENS DE MEV DOS NTCs ANTES E APÓS O TRATAMENTO QUÍMICO	50
FIGURA 26 - ESPECTRO RAMAN DOS NTCs ANTES E APÓS A FUNCIONALIZAÇÃO EM MEIO ÁCIDO	51
FIGURA 27 - CURVAS DE TGA/TGD PARA AS AMOSTRAS DE A) NTCs <i>PRISTINE</i> E B) SUBMETIDA AO TRATAMENTO OXIDATIVO COM ÁCIDO	52
FIGURA 28 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA SÍNTESE DO NANOCOMPÓSITO NTC-NPAu	54
FIGURA 29 - IMAGENS DE MET PARA OS TRÊS COMPÓSITOS SINTETIZADOS E O TAMANHO MÉDIO PARA CADA COMPÓSITO	55
FIGURA 30 - IMAGEM DE CAMPO CLARO E CAMPO ESCURO DO NANOCOMPÓSITO NTC-NPAu 03.....	56
FIGURA 31 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS DOS DIFERENTES ECV MODIFICADOS. SOLUÇÃO DE [K ₃ Fe(CN) ₆] 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , ELETRÓLITO: NaNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , ν= 50 mV s ⁻¹	57

FIGURA 32 - VOLTAMETRIA CÍCLICA DO ECV MODIFICADO NTC-NPAu E COMPARAÇÃO COM ELETRODO CONVENCIONAL DE OURO. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, ELETRÓLITO SUPORTE: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	58
FIGURA 33 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X PARA AS DIFERENTES AMOSTRAS	59
FIGURA 34 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS NTCS H^+ E O COMPÓSITO NTC-NPAu: a) CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA b) CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DIFERENCIAL	59
FIGURA 35 - VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DE ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu CONTENDO SOLUÇÃO DE DOPAMINA, $C_{\text{DA}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 , $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ E AS RESPECTIVAS REAÇÕES.....	61
FIGURA 36 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE UM ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu DOPAMINA (—) TAMPÃO ACETATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 (---) TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, $C_{\text{DA}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	63
FIGURA 37 - ESTRUTURA DA POLI-DOPAMINA.....	64
FIGURA 38 - VOLTAMOGRAMAS LINEARES DE UM ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu NA PRESENÇA DE DOPAMINA EM DIFERENTES VALORES DE pH UTILIZANDO TAMPÃO ACETATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{DA}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	64
FIGURA 39 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA AS DIFERENTES VELOCIDADES DE VARREDURA (2, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 E 200 mV s^{-1}). $C_{\text{DA}} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, ET: ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu	65
FIGURA 40 - RELAÇÃO ENTRE $\log i_p$ vs $\log \nu$ (■) REFERE-SE AO PROCESSO ANÓDICO E (●) REFERE-SE AO PROCESSO CATÓDICO DA DOPAMINA	67
FIGURA 41 - PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA SWV	68
FIGURA 42 - VOLTAMOGRAMA DE ONDA QUADRADA DE UM ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu EM SOLUÇÃO DE DOPAMINA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 4,5 $a: 40 \text{ mV}$, $E_{\text{step}}: 5 \text{ mV}$, $f: 12 \text{ Hz}$	68
FIGURA 43 - VOLTAMOGRAMA DE ONDA QUADRADA PARA SOLUÇÃO CONTENDO DA $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DA NA PRESENÇA DE DE AA E AU $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ EM TAMPÃO ACETATO pH 4,5 $a = 20 \text{ mV}$, $f = 12 \text{ Hz}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$	69
FIGURA 44 - FORMAÇÃO DE DIPOLOS POR EFEITO INDUTIVO	72
FIGURA 45 - CURVA ANALÍTICA DE DOPAMINA PARA OS DOIS ELETRODOS MODIFICADOS NA PRESENÇA DE AA E AU $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO pH 4,5	72
FIGURA 46 - A) VARIAÇÃO DA AMPLITUDE DE PULSO DE PULSO B) COMPARAÇÃO ENTRE A CORRENTE DE PICO E A LARGURA DO PICO A MEIA ALTURA PARA AS	

DIFERENTES AMPLITUDES DE PULSO DE POTENCIAL APLICADAS f : 12 Hz, E_{step} 5 mV	74
FIGURA 47 - COMPARAÇÃO ENTRE A CORRENTE DE PICO E A LARGURA DO PICO A MEIA ALTURA PARA AS DIFERENTES FREQUÊNCIAS APLICADAS.CONDIÇÕES: a : 40 mV, E_{step} : 5 mV	75
FIGURA 48 - RELAÇÃO ENTRE CORRENTE DE PICO E FREQUÊNCIA NA OXIDAÇÃO DE DA. ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO pH 4,5. a : 40 mV, E_{step} : 5 mV.....	76
FIGURA 49 - a) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA PARA SUCESSIVAS ADIÇÕES DE DA PRESENÇA DE AA E AU $2,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ . b) CURVA ANALÍTICA.....	78
FIGURA 50: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO μ TED	82
FIGURA 51 - PROCEDIMENTO DE CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR.....	83
FIGURA 52 - RELAÇÃO DE DIMENSÕES RELATIVAS ESPERADAS PARA O SISTEMA NTC-NPAu- Tir	84
FIGURA 53 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA EI MODIFICADO COM NTC-NPAu ANTES E APÓS A MODIFICAÇÃO COM Tir. $C_{\text{catecol}} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , ELETRÓLITO TAMPÃO FOSFATO pH 6,5 E AS REAÇÕES ENVOLVIDAS. $\nu = 5$ mV s ⁻¹	85
FIGURA 54 - INTERAÇÃO DO GRUPAMENTO HISTIDINICO LIVRE COM O CENTRO METÁLICO a) pH 6,0 b) pH 8,5	86
FIGURA 55 - INTENSIDADE DE CORRENTE CATÓDICA DO BIOSSENSOR UTILIZADO TAMPÃO FOSTATO 0,1 mol L ⁻¹ EM DIFERENTES VALORES DE pH. VALORES OBTIDOS POR VOLTAMETRIA CÍCLICA, . $C_{\text{catecol}} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , $\nu = 5$ mV s ⁻¹	86
FIGURA 56: ESTRUTURA QUÍMICA DO NAFION®	88
FIGURA 57 - QUANTIDADE DE ENZIMA ADICIONADA.....	89
FIGURA 58 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS ESPÉCIAS ANALISADAS: a) FENOL b) CATECOL E c) BISFENOL-A	89
FIGURA 59 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS PARA AS TRÊS ESPÉCIAS ESTUDADAS. $C_{\text{espécies}} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSTATO 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,5, $\nu = 5$ mV s ⁻¹	90
FIGURA 60 - a) VISTA DO μ TED DE UM PLANO SUPERIOR, ONDE O CIRCULO EM VERMELHO INDICA A ÁREA DE INJEÇÃO DA AMOSTRA b) VISTA LATERAL	91
FIGURA 61 - COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO μ TED NA AUSÊNCIA E APÓS ADIÇÃO DE FENOL.	92

FIGURA 62 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO FUNCIONAMENTO DO μ TED a) ADIÇÃO DE FENOL b) OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DO FENOL GERANDO O-QUINONA c) REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DA O-QUINONA d) TODAS AS ESPÉCIES SEGUEM PARA O DESCARTE	92
FIGURA 63 – VARIAÇÃO DA CORRENTE DE REDUÇÃO DA O-QUINONA EM DIFERENTES POTENCIAIS APLICADOS. C_{FENOL} : $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ EM pH 6,5.....	93
FIGURA 64 – a) SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FENOL ENTRE 10 E 800 nmol L^{-1} . ÁREA DESTACADA EM AZUL CORRESPONDE AOS SINAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE (a) 10; (b) 30; (c) 50; e (d) 120 nmol L^{-1} E A RESPECTIVA CURVA ANALÍTICA. ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ EM pH 6,5.....	96
FIGURA 65 – ADIÇÕES DE FENOL E INTERPOLAÇÃO DE UMA AMOSTRA REAL. CONCENTRAÇÕES DE FENOL (nmol L^{-1}): a) 10 b) 20 c) 40 d) 80 e) 100 f) 200 e S) AMOSTRA DE ÁGUA ENRIQUECIDA COM 20 nmol L^{-1} DE FENOL	99
FIGURA 66 – MECANISMO DE INATIVAÇÃO POR SUBSTRATO PROPOSTO.	101
FIGURA 67 – IMPRESSORA SIMILAR A UTILIZADA NESTE TRABALHO.....	104
FIGURA 68 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TERPINEOL.	107
FIGURA 69 – IMAGEM DE TEM DAS NP _{Au} SINTETIZADAS PELO MÉTODO BIFÁSICO. A BARRA REFERE-SE A 50 nm	108
FIGURA 70 – CARTUCHO PREENCHIDO COM A TINTA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PRODUZIDAS PELO MÉTODO BIFÁSICO	108
FIGURA 71 – GOTAS GERADAS DURANTE O PROCESSO DE IMPRESSÃO: a) GOTA COM EFEITO DE CAUDA PRONUNCIADO b) SEQUÊNCIA DE FORMAÇÃO DE UMA GOTA IDEAL c) FORMAÇÃO DE GOTA SATÉLITE.	109
FIGURA 72 – FUNÇÃO DE ONDA INICIAL E OTIMIZADA PARA A IMPRESSÃO DA TINTA DE NP _{Au}	110
FIGURA 73 – IMAGEM DA CAMERA FIDUCIAL PARA Au-ink contendo $100 \mu\text{m}$ DE ESPAÇAMENTO ENTRE GOTAS CONSECUTIVAS.	111
FIGURA 74 – ESTRUTURA QUÍMICA DA POLIIMIDA.....	112
FIGURA 75 – a) ELETRODOS ANTES DA SINTERIZAÇÃO b) APÓS A SINTERIZAÇÃO c) MECANISMO DE FORMAÇÃO DO FILME DE OURO.	113
FIGURA 76 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NP _{Au} COM A VARIAÇÃO DO TEMPO.	113

FIGURA 77 – IMAGENS DO FILME DE OURO IMPRESSO EM MAGNITUDES DE: a) 400 X e b) 96.697 X	114
FIGURA 78 – RESULTADOS DE PERFILOMETRIA: a) CURVA TOPOGRÁFICA PARA IMPRESSÃO DE DUAS CAMADAS DE Au-ink b) VARIAÇÃO DA ESPESSURA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CAMADAS.	115
FIGURA 79 - DADOS DE RESISTIVIDADE E CAPACITÂNCIA PARA DIFERENTES CAMADAS.....	116
FIGURA 80 – IMAGENS GERADAS POR STM PARA UM ELETRODO DE OURO (1 1 1): a) ANTES DA OXIDAÇÃO b) DEPOIS DA OXIDAÇÃO	117
FIGURA 81 – INVERSÃO DE POSIÇÕES ENTRE DIPOLOS DURANTE A VARREDURA ANÓDICA.	118
FIGURA 82 – COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO EI-Au EM H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ a) PRIMEIRO CICLO b) CICLOS CONSECUTIVOS c) VARIAÇÃO DE CARGA DO PROCESSO CATÓDICO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CICLOS.....	118
FIGURA 83 – IMAGEM DE MEV NO MODO BSE PARA O ELETRODO EI-Au.....	119
FIGURA 84 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ELETRODO IMPRESSO PARA MULTIDETECCÃO PROPOSTO.	120
FIGURA 85 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ELETRODOS NO MESMO DISPOSITIVO	121
FIGURA 86 – VARIAÇÃO DA CORRENTE DE PICO a) PARA UM MESMO DISPOSITIVO b) DIFERENTES DISPOSITIVOS	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS CONFORME O SUBSTRATO PREFERENCIAL	21
TABELA 2 - ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS CARACTERÍSTICAS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS ANTES (NTC- <i>PRISTINE</i>) E APÓS TRATAMENTO ÁCIDO (NTC H ⁺)	51
TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CORRENTE DE PICO OBTIDOS NA VOLTAMETRIA CÍCLICA DOS DIFERENTES NANOMATERIAIS EM PRESENÇA DE K ₃ [Fe(CN) ₆].....	57
TABELA 4 - ESPÉCIES PREDOMINANTES NA CÉLULA ELETROQUÍMICA EM pH 4,5..	71
TABELA 5 - VARIAÇÃO DA <i>i</i> _{pa} DE DA (1,0 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE AA E AU 2,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ . ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO pH 4,5.....	73
TABELA 6 - RESUMO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS OTIMIZADAS PARA A DETECÇÃO DE DOPAMINA.....	77
TABELA 7 - COMPARATIVO DE DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS DADOS DA LITERATURA.....	78
TABELA 8 - MEDIDAS DE CORRENTE DE PICO E CAPACITÂNCIA PARA DIFERENTES ELETRODOS.....	87
TABELA 9 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS E OTIMIZADOS NO FUNCIONAMENTO DO BIOSENSOR.....	95
TABELA 10 - COMPARATIVO ENTRE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS NA DETERMINAÇÃO DE FENOL	97
TABELA 11 – VALORES DE <i>K</i> _{Mapp} PARA DIFERENTES BIOSSENSORES	98
TABELA 12 - VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA AMOSTRAS DE ÁGUA FORTIFICADAS COM FENOL.....	100
TABELA 13 – PARAMETROS AVALIADOS E OS VALORES ESCOLHIDOS NA IJT.	112
TABELA 14 - ESPECIFICAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATG – Análise Termogravimétrica

Ac – Anticorpo

AC– do inglês, *Alternating Current*

Ag – Antígeno

AN – Ácido Nucleico

Amp – Amperometria

BDD – Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

BTOA – Brometo de Tetraoctilamônio

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CVD – do inglês, *Chemical Vapour Deposition*

DA – Dopamina

DOPA - Dihidroxifenilalanina

DPASV – do inglês, *Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry*

DRX – Difração de Raios-x

DT – Dodecanotiol

EA – Eletrodo Auxiliar

ECV – Eletrodo de Carbono Vítreo

EI- Ag – Eletrodo Impresso de Prata

EI-Au – Eletrodo Impresso de Ouro

EPC – Eletrodo Pasta de Carbono

EQM – Eletrodo Quimicamente Modificado

E.C. – do inglês, *Enzyme Commission*

EDC – 1-etil-3-[3- dimetilaminopropil] carbodiimida

EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

EPA – do inglês, *Environmental Protection Agency*

ER – Eletrodo de Referência

ET – Eletrodo de Trabalho

FIA – Análise por Injeção em Fluxo

Fc – Fração Constante

Fab – Fração Variável

GOx – Glucose oxidase

HA – Hidroxiapatita

Ig – Imunoglobulina

LPME – do inglês, *Liquid Phase MicroExtraction*

MWCNTs – do inglês, *Multi Walled Carbon Nanotubes*

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MPA – Ácido Mercaptopropiônico

NHS – N-hidroxisuccinimida

NTC – Nanotubos de Carbono

NP – Nanopartículas

NPAu – Nanopartícula de Ouro

o-DAQ – Orto-dopaminoquinona

PDMS – poli-Dimetilsiloxano

p-RE – Pseudo Eletrodo de Referência

PTFE - Politetrafluoretileno

Quit – Quitosana

SWASV – do inglês, *Square Wave Anodic Stripping Voltammetry*

SPME – do inglês, *Solid Phase MicroExtraction*

SWCNT – do inglês, *Single Walled Carbon Nanotubes*

TAS – do inglês, *Total Chemical Analysis Systems*

Tir – Tirosinase

UV-Vis – Espectrofotometria na região do Ultravioleta-Visível

μTED – Dispositivo Microfluídico Eletroanalítico de Baixo Custo Baseado em Fios de Algodão

LISTA DE SIMBOLOS

- v – Velocidade de varredura
- α – Coeficiente de transferência eletrônica
- k – Constante de velocidade
- e^- – Elétron
- f – Frequência de pulso
- a – Amplitude de pulso
- T – Temperatura absoluta
- t – Tempo
- n_e – Número de elétrons transferidos
- F – Constante de Faraday
- Z – Carga do íon
- E_{cel} – Potencial da célula eletroquímica
- E_{ind} – Potencial do eletrodo indicador
- E_j – Potencial de junção líquida
- E_{ref} – Potencial do eletrodo de referência
- E_{step} – incremento de potencial
- A – área
- R – Constante dos gases ideais
- C – Concentração
- D – Coeficiente de difusão
- a_x – Atividade de uma espécie genérica X

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	NANOPARTÍCULAS DE OURO	2
1.2	NANOTUBOS DE CARBONO	6
1.2.1	<i>Conceitos e propriedades</i>	6
1.2.2	<i>Síntese de nanotubos de carbono</i>	7
1.2.3	<i>Estrutura e propriedades dos nanotubos de carbono</i>	8
1.2.4	<i>Funcionalização dos nanotubos de carbono</i>	11
1.2.5	<i>Nanotubos de Carbono decorados com nanopartículas metálicas</i>	12
1.2.6	<i>Nanocompósitos entre NTC e nanopartículas metálicas como sensores eletroquímicos</i>	14
1.3	DETECÇÃO DE DOPAMINA	14
1.4	BIOSSENSORES	17
1.4.1	<i>Biossensores enzimáticos</i>	20
1.4.2	<i>Biossensores enzimáticos com detecção eletroquímica</i>	22
1.4.3	<i>Formas de imobilização enzimática</i>	26
1.4.4	<i>Classificação dos biossensores enzimáticos com detecção amperométrica ou voltamétrica</i>	27
1.5	TIROSINASE	29
1.5.1	<i>Biossensores contendo tirosinase como elemento de reconhecimento</i>	30
1.6	COMPOSTOS FENÓLICOS	31
1.7	MICROFLUIDICA	33
1.8	MÉTODOS DE IMPRESSÃO	34
1.8.1	<i>Eletrodos impressos por silk-screen</i>	35
1.8.2	<i>Impressão a jato de tinta</i>	36
2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS ENTRE NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO	41
2.1	OBJETIVOS	41
2.2	OBJETIVO GERAL	41
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.4.1	<i>Reagentes</i>	41
2.4.1.1	<i>Funcionalização dos nanotubos de carbono</i>	41
2.4.1.2	<i>Titulação dos nanotubos de carbono</i>	42
2.4.1.3	<i>Síntese dos nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro</i>	43
2.4.2	<i>Caracterizações estruturais</i>	44
2.4.2.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	44
2.4.2.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	44
2.4.2.3	<i>Espectroscopia RAMAN</i>	44
2.4.2.4	<i>Análise termogravimétrica</i>	45
2.4.2.5	<i>Difratometria de raios-x</i>	45

2.4.3	<i>Medidas eletroquímicas</i>	45
2.4.3.1	Preparação dos ECV modificados com o nanocompósito NTC-NPAu	45
2.4.3.2	Deteção de dopamina em presença de ácido ascórbico e ácido úrico	46
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.5.1	<i>Síntese e caracterização de nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro</i>	46
2.5.1.1	Funcionalização dos nanotubos de carbono.....	46
2.5.1.2	Microscopia eletrônica de varredura dos NTCs	49
2.5.1.3	Espectroscopia RAMAN dos nanotubos de carbono e análise termogravimétrica	50
2.5.2	<i>Síntese dos nanocompósitos NTC-NPAu</i>	52
2.5.2.1	Comportamento eletroquímico.....	56
2.5.2.2	Caracterização por difração de raios-X.....	59
2.5.2.3	Análise termogravimétrica do nanocompósito NTC-NPAu	59
2.5.3	<i>Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para deteção de dopamina utilizando o nanocompósito NTC-NPAu</i>	61
2.5.3.1	Deteção de Dopamina na presença de ácido úrico e ácido ascórbico.....	61
2.5.3.2	Estudo do efeito do pH no comportamento voltamétrico da dopamina.....	62
2.5.3.3	Estudo da Velocidade de Varredura	65
2.5.3.4	Estudo da reversibilidade da oxidação da dopamina por voltametria de onda quadrada	67
2.5.3.5	Determinação eletroquímica de dopamina na presença de ácido ascórbico e ácido úrico utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.....	69
2.5.3.6	Otimização dos parâmetros da técnica para determinação de DA por voltametria de onda quadrada	74
2.5.3.7	Amplitude de pulso de potencial	74
2.5.3.8	Estudo da variação de frequência	75
2.5.3.9	Incremento de potencial.....	76
2.5.3.10	Resumo das condições analíticas estudadas	77
2.5.3.11	Construção da curva analítica.....	77
2.6	CONCLUSÕES PARCIAIS	79

3	UTILIZAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO NTC-NPAU PARA CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR PARA A DETERMINAÇÃO DE FENOL	80
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	80
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	80
3.2.1	<i>Preparação dos eletrodos modificados com o nanocompósitos e tirosinase e caracterização eletroquímica</i>	80
3.2.2	<i>Ensaio usando o microdispositivo</i>	81
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
3.3.1	<i>Desenvolvimento de um biossensor baseado na imobilização de tirosinase sobre o nanocompósito NTC-NPAu</i>	82
3.3.1.1	Investigação da Imobilização de tirosinase em eletrodo impresso	82
3.3.1.2	Estudo da influência do pH.....	85
3.3.1.3	Efeito da quantidade de modificador	87

3.3.1.4	Quantidade de enzima.....	88
3.3.1.5	Resposta para diferentes substratos	89
3.3.2	<i>Aplicação do biossensor em um dispositivo para análise por injeção de fluxo.....</i>	90
3.3.2.1	Potencial aplicado.....	93
3.3.2.2	Resumo dos parâmetros otimizados.....	94
3.3.2.3	Curva analítica.....	95
3.3.2.4	Afinidade enzima-substrato	97
3.3.2.5	Aplicação do biossensor em amostra real	99
3.3.2.6	Efeito suicida	100
3.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	102
4	DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE OURO PRODUZIDOS PELA TECNOLOGIA INKJET DE IMPRESSÃO.....	103
4.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	103
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	103
4.2.1	<i>Síntese de Nanopartículas de Ouro.....</i>	103
4.2.2	<i>Fabricação da tinta.</i>	103
4.2.3	<i>Impressão</i>	104
4.2.4	<i>Medidas eletroquímicas</i>	105
4.2.5	<i>Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e varredura</i>	106
4.2.6	<i>Análise de resistividade</i>	106
4.2.7	<i>Perfilometria.....</i>	106
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4.3.1	<i>Tinta de nanopartículas de ouro</i>	106
4.3.2	<i>Otimização da impressão</i>	108
4.3.3	<i>Sinterização</i>	112
4.3.4	<i>Estabilidade da tinta.....</i>	113
4.3.5	<i>Caracterização dos eletrodos.....</i>	114
4.3.5.1	<i>Caracterização morfológica e espessura de filme</i>	114
4.3.5.2	<i>Medidas de capacitância e resistividade.....</i>	115
4.3.6	<i>Repetibilidade e reprodutibilidade</i>	120
4.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	123
5.	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	124
6	REFERÊNCIAS	125
	ANEXO 1	141
	ANEXO 2.....	142

1 INTRODUÇÃO

Por ser uma ciência que estuda os fenômenos de interface, o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a identificação e quantificação de uma determinada espécie passa pela busca de novos materiais que possam proporcionar simplicidade operacional, sensibilidade, seletividade, robustez, bem como baixos limites de detecção e quantificação, e quando possível baixo custo (Wang, J., 1994). Analisando a linha temporal de construção do conhecimento e desenvolvimento da química eletroanalítica, dois fatores possuem relevância: primeiramente o aprimoramento das técnicas eletroquímicas, como por exemplo, a passagem da amostragem de corrente do modo contínuo para o pulsado (Zuman, 1992), e também pela estreita ligação com a síntese e caracterização de novos materiais.

Pode-se citar o ano de 1924 como o primeiro de grande relevância nesta linha do tempo, no qual o químico Jaroslav Heyrovsky publicou o artigo em que descreve a deposição de metais em um eletrodo de gota de mercúrio. Tal linha de pesquisa, além de datar o início das técnicas polarográficas, levou o cientista tcheco a receber o prêmio Nobel de Química posteriormente, em 1959. Nesta mesma época, Adams e colaboradores (Adams, 1958) desenvolveram o eletrodo de pasta de carbono (EPC), em um trabalho que inicialmente buscava a preparação de eletrodos gotejantes alternativos ao mercúrio. Este estudo deu início a uma gama de trabalhos envolvendo a modificação química de EPCs e possibilitando a aplicação em diversos sistemas. Os anos seguintes, décadas de 60 e 70, foram marcados pelos estudos de eletrodos constituídos de metais nobres como ouro e platina (Rosen e Schuldiner, 1973; Climent e Feliu, 2011), bem como modificação superficial e formação de ligações do tipo covalente (Untereker *et al.*, 1977). Já os anos 80, são lembrados pelos avanços na química de coordenação, em que complexos inorgânicos foram aplicados como mediadores redox para diversas determinações analíticas, como a formação e emprego de filmes azul da Prússia (Neff, 1978), por exemplo. O desenvolvimento da química de polímeros também trouxe uma nova classe de eletrodos quimicamente modificados e os materiais mais amplamente utilizados foram o polipirrol e polianilina (Diaz *et al.*, 1981; Macdiarmid, 1997), além de eletrodos

modificados com membranas trocadoras como o Nafion®, que permitiram maior seletividade nas análises (Rubinstein e Bard, 1980).

O início dos anos 2000 consolidou a síntese e caracterização de nanomateriais, refletindo diretamente nas aplicações em eletroanálise. A alta área superficial, possibilidade de funcionalização química, relativo baixo custo, aumento da sensibilidade e seletividade através de processos eletrocatalíticos (Welch e Compton, 2006; Campbell e Compton, 2010) são características relevantes justificadas para a aplicação desta classe de materiais emergentes. Certamente os mais relevantes na construção de sensores eletroquímicos são os NTCs (Gao *et al.*, 2012), o grafeno (Ambrosi *et al.*, 2014) e as nanopartículas metálicas (Kleijn *et al.*, 2014), os quais compreendem maior tópico de pesquisa no desenvolvimento e aprimoramento de métodos eletroanalíticos.

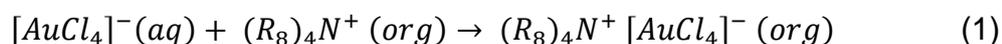
Nesta tese de doutorado, a síntese, caracterização e aplicação de nanomateriais no desenvolvimento de (bio)sensores eletroquímicos foram investigados. O tema central dos estudos aqui descrito compreende a síntese de nanopartículas de ouro (NPAu) obtidas pela rota bifásica e a sua aplicação em duas situações (i) obtenção de nanocompósitos entre NTC e NPAu através da rota bifásica, bem como a investigação de sua potencialidade eletroanalítica na detecção de dopamina e como suporte na construção de um biossensor contendo tirosinase para a detecção de fenol ii) desenvolvimento de tinta para a impressão de eletrodos de ouro pela tecnologia de impressão por jato de tinta (IJT).

1.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

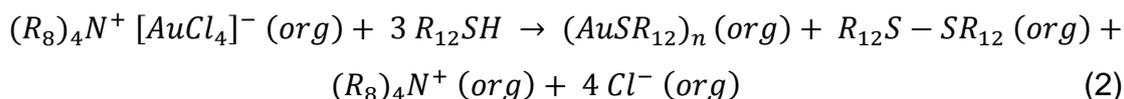
O primeiro registro da síntese de ouro coloidal foi descrito por Faraday e colaboradores (Faraday, 1857), onde foi descrita a redução de um sal precursor na presença de fósforo. Praticamente cem anos mais tarde, a síntese de NPAu voltou a ser objeto de estudo com o trabalho publicador por Turkevich e colaboradores (Turkevich *et al.*, 1951), em que NPAu são geradas a partir de um refluxo do precursor metálico em meio aquoso na presença de íons citrato. Posteriormente, tal trabalho teve um aprimoramento no quesito de distribuição de tamanho médio de partículas, através da variação da relação Au/citrato proposta por Frenz e colaboradores (Frenz, 1973). Na década de 90, Brust e

colaboradores (Brust *et al.*, 1994) apresentaram a síntese de NPAu utilizando uma rota bifásica, em que a reação ocorre em um sistema contendo uma mistura água/tolueno, o precursor metálico, geralmente o ácido tetracloroaurico, é reduzido na presença de borohidreto de sódio. O crescimento das nanopartículas é regulado pela adição de um agente passivante, que, por meio de efeito estérico, o qual cessa a incorporação de novos núcleos de ouro metálico às nanopartículas já formadas, onde o reagente mais utilizado é o dodecanotiol (DT, $R_{12}SH = C_{12}H_{26}S$). Tal metodologia tornou-se amplamente utilizada por apresentar diversas vantagens como a simplicidade na execução, temperatura ambiente de síntese, nanopartículas com estreita distribuição de tamanho e alta estabilidade, podendo ser submetida à secagem e redispersão sem coalescência. A rota bifásica pode ser considerada um grande acontecimento na síntese de nanopartículas, onde a produção de *clusters* passivados por monocamadas se tornou um tópico relevante dentro da nanoquímica e suas aplicações (Liz-Marzan, 2013), inspirando a síntese de outras nanopartículas metálicas, como prata (Brust e Kiely, 2002; Oliveira, M. M. *et al.*, 2005) e platina (Castro *et al.*, 2010).

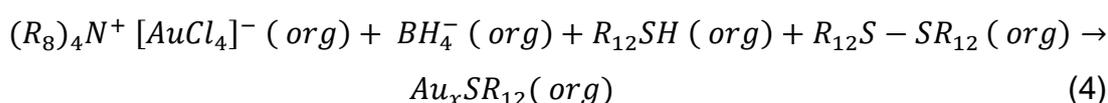
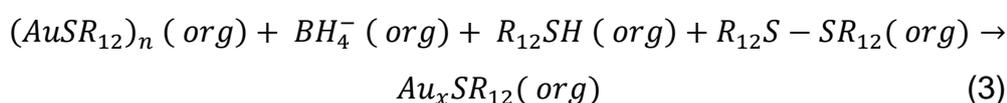
O mecanismo de formação pela rota bifásica ainda não é consenso (Perala e Kumar, 2013) sendo composto por várias etapas. A primeira delas, descrita na Equação (1), refere-se à transferência do precursor metálico, Au (III), da fase aquosa para a fase orgânica na presença de um agente de transferência de fase, normalmente brometo de tetraoctilamônio (BTOA, $R_8 = C_8H_{17}$). As reações a seguir estão simplificadas de modo a focar na síntese dos produtos relevantes e levar à fácil compreensão:



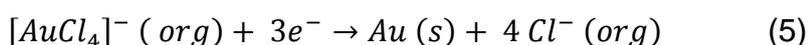
Estudos indicam que uma porção de íons Au(III) na presença de alcanotióis são reduzidos para Au(I) e formam uma espécie de polímero de coordenação, alcanotiolato de ouro (I) (Corbierre e Lennox, 2005). Também ocorre o desproporcionamento de parte dos alcanotióis formando dialquildissulfeto, como pode ser observado na Equação (2):



Nesse estágio, a fase orgânica é composta por uma mistura de Au (III), um polímero de coordenação contendo íons Au (I), BTOA e dialquildissulfeto proveniente da redução de DT. No momento em que o borohidreto de sódio é introduzido na mistura reacional, ocorre a redução das espécies de Au(III) e Au(I) para ouro metálico. Por muito tempo acreditou-se que a reação de redução dos precursores metálicos ocorresse na interface água/tolueno. Porém, se a afirmativa fosse verdadeira, o resultado final teria relação direta com os parâmetros relevantes para reações interfaciais como velocidade de agitação, área de contato entre as fases, entre outros fatores. No entanto, a síntese de NPAu pelo método bifásico mostra-se robusta e o tamanho/forma das partículas não é alterada por esses fatores. Assim, o mecanismo deve envolver a transferência de fase do borohidreto para a fase orgânica, como pode ser visto nas equações (3 e 4). O produto final desta etapa é a redução das espécies que gera núcleos de ouro-tiolato e serão cruciais para a posterior passivação das nanopartículas geradas.



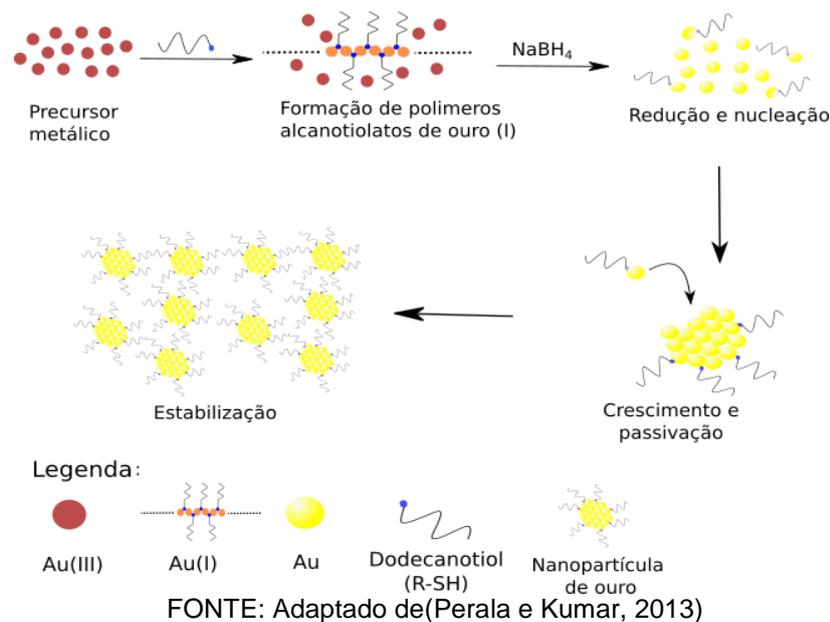
Para a parcela de precursores que não sofre reação com o DT, a redução gera os núcleos de ouro metálico e o processo simplificado está descrito na Equação (5).



Após a formação dos núcleos gerados pela reação descrita na Equação (5), os processos de crescimento e passivação ocorrem de forma relativamente rápida. A adição de partículas contendo dodecanotiol aos núcleos de ouro

bloqueia a adição de outros núcleos de ouro naquela região por efeito de impedimento estérico e, quando toda superfície está recoberta de agentes passivantes, o crescimento e a coalescência das partículas é evitado. Na FIGURA 1 encontra-se ilustrada a rota resumida de síntese de NPAu pelo método bifásico, indicando as etapas de formação.

FIGURA 1 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PELA ROTA BIFÁSICA



Torna-se quase intuitivo imaginar que a quantidade de agente passivante tem papel fundamental no tamanho e estabilidade destas nanopartículas. Deste modo, o controle da razão Au/alcanotíol pode ser utilizado como regulador do tamanho de partícula. Altas razões tendem a formar partículas maiores e menos uniformes, enquanto menores valores levam a formação de partículas menores e mais estáveis, devido à efetiva passivação no início do processo de nucleação (Hostetler *et al.*, 1998). A quantidade de agente passivante na superfície da NPAu também influencia diretamente em suas propriedades eletroquímicas (Hostetler *et al.*, 1998; Gevaerd *et al.*, 2015).

Além da simplicidade de preparação, a possibilidade de utilização de alcanotíóis com diferentes grupos terminais (Sardar e Shumaker-Parry, 2009) apresenta uma alternativa para a síntese de NPAu direcionadas às mais diversas aplicações como catálise (Corma e Garcia, 2008), fotoquímica (Kamat, 2007) e

bionanotecnologia principalmente na produção de biossensores (Yeh *et al.*, 2012).

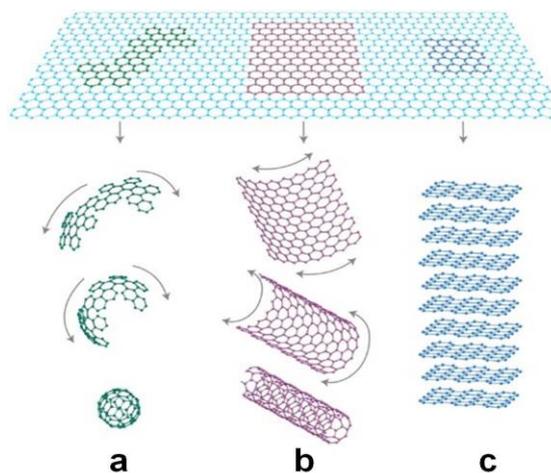
1.2 NANOTUBOS DE CARBONO

1.2.1 Conceitos e propriedades

A era do estudo, preparação e aplicação de nanoestruturas de carbono teve seu início em meados da década de 80, a qual foi marcada por descobertas de novas formas de carbono. Com o intuito de entender o processo de formação de longas cadeias de carbono no espaço interestelar, cientistas da Universidade de Houston sintetizaram formas alotrópicas de carbono com estruturas finitas variando de 44 a 90 átomos, chamados fulerenos (Kroto *et al.*, 1985). A descoberta destes compostos gerou grande empolgação na comunidade científica pelo “mundo” de aplicações e possibilidades que apresentavam em diversas áreas (Popov *et al.*, 2013). Em 1991, o físico japonês Sumio Iijima publicou o primeiro artigo relatando tubos de carbono, intitulado “*Helicoidal microtubules of graphitic carbon*” no qual através da utilização da mesma técnica de síntese de fulerenos, Iijima relatou a presença de partículas de carbono submicrométricas em formato de agulha (Iijima, 1991) Desde então, a síntese, caracterização, modificação e aplicação de tais materiais vem sendo objeto de estudo de diversos de grupos de pesquisa pelo mundo.

No que se refere à definição e classificação, os nanotubos de carbono (NTC) são formas alotrópicas do carbono com hibridização sp^2 e dispostos em arranjos hexagonais cilíndricos, que podem ser concebidos como materiais resultantes do enrolamento de uma ou mais folhas grafeno. A FIGURA 2 ilustra as diferentes estruturas de carbono que foram isoladas nos últimos 30 anos, todas originárias da mesma estrutura primitiva.

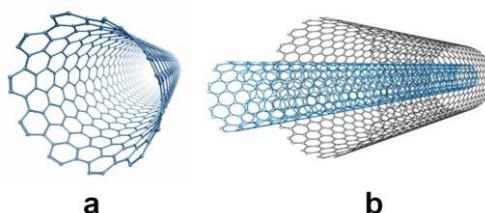
FIGURA 2 - ALÓTROPOS DE CARBONO DE ESTRUTURA sp^2 : A) FULERENO B) NANOTUBO DE CARBONO C) GRAFENO



FONTE: (Geim e Novoselov, 2007)

Com relação ao número de folhas concêntricas de grafeno, duas configurações de NTCs são possíveis: os nanotubos de carbono de única parede (do inglês, *single walled carbon nanotubes*, SWCNTs) ou nanotubos de múltiplas paredes (do inglês, *multi walled carbon nanotubes*, MWCNTs), os quais estão ilustrados na FIGURA 3. Seu diâmetro pode variar de 5 a 100 nm enquanto seu comprimento pode chegar à centena de micrômetros (Thostenson *et al.*, 2001) e, por causa de tal comportamento, são classificados como materiais 1D devido à sua alta razão de aspecto (relação comprimento/largura).

FIGURA 3 - NANOTUBOS DE CARBONO A) PAREDE ÚNICA E B) MÚLTIPLAS PAREDES



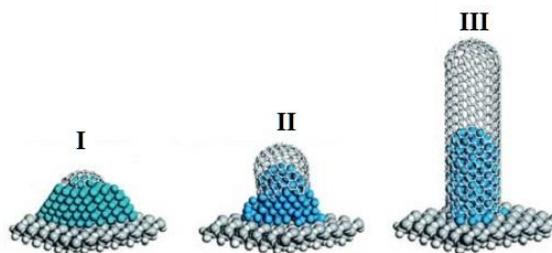
FONTE: (Prasek *et al.*, 2011)

1.2.2 Síntese de nanotubos de carbono

A síntese dos NTCs pode ser realizada por diversas técnicas como ablação a laser, descarga por arco elétrico, sonoquímica, deposição catalítica de hidrocarbonetos (do inglês *chemical vapour deposition*, CVD), hidrotermal

(Prasek *et al.*, 2011). Todas as rotas de preparação apresentam vantagens e desvantagens que podem ser relacionadas à produção de impurezas, geração de subprodutos como fulerenos, grafite, carbono amorfo e óxidos metálicos. Dentre as metodologias existentes, a síntese por CVD é a mais amplamente utilizada por apresentar algumas vantagens pela aplicação de temperaturas de síntese relativamente baixas (na faixa de 700 °C em comparação com as temperaturas superiores a 1700 °C no método de ablação a laser), baixo custo de síntese, além de possibilitar o crescimento dos NTCs diretamente sobre um substrato para aplicações específicas. Essencialmente, a síntese consiste na decomposição de hidrocarbonetos (metano, benzeno, xileno, etc.) na presença de um catalisador metálico como ferro, níquel ou cobre em condições adequadas de temperatura pela aplicação de uma rampa de aquecimento. Na FIGURA 4 encontra-se ilustrado o processo de crescimento de NTCs sobre uma NP metálica genérica. Organometálicos como ferrocenos também podem ser utilizados na preparação de NTCs, os quais participam como fonte de carbono e catalisadores metálicos (Schnitzler e Zarbin, 2008).

FIGURA 4 - AS TRÊS ETAPAS DE CRESCIMENTO DE NANOTUBOS DE CARBONO CATALISADAS POR UMA ESPÉCIE METÁLICA (I) FORMAÇÃO DE UMA FOLHA DE GRAFENO SOBRE O CATALISADOR (II) PARA MANTER O CRESCIMENTO DO NTC SOBRE A PARTICULA, A ESTRUTURA SE DOBRA FORMANDO UM CILINDRO (III) CRESCIMENTO CONTÍNUO DAS PAREDES CILINDRICAS.



FONTE: (Nessim, 2010)

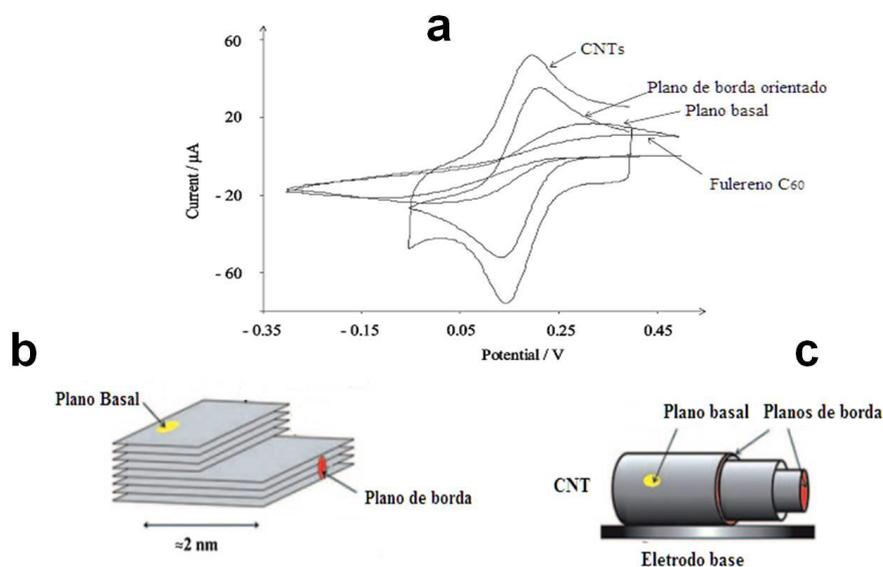
1.2.3 Estrutura e propriedades dos nanotubos de carbono

Os NTCs possuem estrutura composta basicamente de ligações químicas C–C, onde a efetiva sobreposição de orbitais sp^2 resulta em materiais com propriedades mecânicas excepcionais como a altíssima resistência mecânica (Peng *et al.*, 2008), resistência à fratura e elevado módulo de

elasticidade (Demczyk *et al.*, 2002). Além da hibridização, a forma como as extremidades do grafeno se ligam pode refletir diretamente nas características eletrônicas dos NTCs, devido à simetria adotada por cada forma de enrolamento. Essa variação na quiralidade dos NTCs resulta em nanotubos com características condutoras ou semicondutoras (Prasek *et al.*, 2011). Em relação às propriedades de transporte eletrônico, destaca-se a elevada condutividade e a tolerância altas densidades de corrente ($4 \times 10^9 \text{ A cm}^{-2}$), três vezes maior que o cobre por exemplo (Hong e Myung, 2007).

Os NTCs apresentam características importantes na aplicação como sensores eletroquímicos como elevada área superficial (Mosch *et al.*, 2016), amplo intervalo útil de potencial, inércia química com possibilidade de modificação superficial (Merkoçi *et al.*, 2005). Outra característica relevante na utilização destes materiais está relacionada com a localização dos sítios reativos. Observa-se uma relação entre regiões mais reativas como os planos de borda e defeitos estruturais nas paredes grafíticas com o desempenho eletroquímico, promovido por átomos de fronteira, os quais possuem maior eletroatividade e muitas vezes, são assinalados como os responsáveis pela melhora no desempenho eletroquímico de tais materiais. Para elucidar de melhor forma tal afirmação, o trabalho de Banks e colaboradores (Banks *et al.*, 2004) pode ser utilizado como exemplo, em que o perfil redox de moléculas sonda como ferricianeto de potássio e epinefrina foi avaliado na presença de eletrodos de grafite pirolítico basalmente orientados (EGPB, e EGPB modificados com nanomateriais NTCs, fulereno C_{60} e grafite pirolítico com planos de borda verticalmente orientados). Na FIGURA 5 estão indicados os voltamogramas cíclicos obtidos a partir de diferentes eletrodos modificados, em que se verifica um aumento na corrente e concomitante deslocamento de potenciais redox com redução da separação de picos para os materiais contendo planos de borda expostos. O fulereno C_{60} que não apresenta planos de borda teve o mesmo desempenho da estrutura grafítica com planos basais expostos. Em muitos casos, um efeito eletrocatalítico extraordinário dos NTCs é atribuído à influência do confinamento quântico gerado por tais materiais, porém o resultado prático é que a presença de defeitos de borda tem uma contribuição mais significativa na resposta eletroquímica.

FIGURA 5 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS CONTENDO DIFERENTES (NANO)ESTRUTURAS DE CARBONO B) ORIENTAÇÃO DOS PLANOS NA ESTRUTURA GRAFÍTICA



FONTE: (Banks *et al.*, 2004)

Além dos efeitos de borda, a presença de grupos funcionais na superfície dos NTCs pode apresentar influência significativa no perfil eletroquímico. Gong e colaboradores (Gong *et al.*, 2008) avaliaram o efeito de planos de borda e grupos funcionais gerados a partir da oxidação eletroquímica de NTCs. O desempenho de tais materiais como sensores eletroquímicos foi avaliado para diferentes espécies eletroativas e concluiu-se que a presença de grupos funcionais na superfície dos NTCs afeta de forma significativa o potencial redox de algumas espécies, bem como a presença de planos de borda mais expostos. Porém, tais características não são definitivas na melhora do desempenho eletroquímico, que leva em conta o mecanismo adotado pela molécula na superfície eletródica durante o processo de transferência de elétrons.

A relação entre interface e propriedade dos NTCs também foi verificada através de estudos de ativação superficial eletroquímica (Pumera *et al.*, 2008) onde o efeito da aplicação de potenciais entre 1,5 e 2,0 V foi verificado no comportamento da constante de transferência heterogênea de transferência eletrônica (k_{obs}^0). Esse parâmetro eletroquímico é definido como a velocidade de transferência de elétrons de um eletrodo para uma espécie em solução ou vice-versa (De Hemptinne, 1968). O estudo foi realizado pela técnica de voltametria

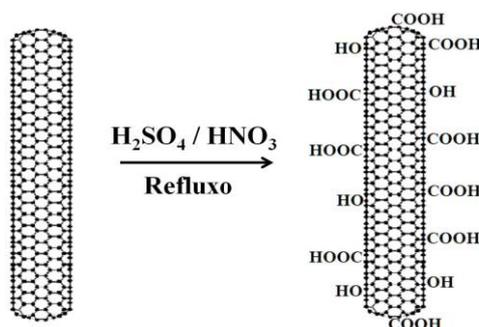
cíclica destes nanotubos na superfície de um ET na presença de $K_3[Fe(CN)_6]$ e os resultados obtidos foram cruzados com os de técnicas como espectroscopia RAMAN, microscopia eletrônica de alta resolução (HR-TEM), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS). Após a aplicação de potencial (1,5 – 2,0 V) por um determinado tempo, que variou de 60 a 300 s, os valores de k_{obs}^0 variaram de $8,34 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ (NTC comercial) para $3,67 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ (NTC eletroquimicamente ativado), ao mesmo tempo em que a capacitância específica variou de $1,18 \text{ F g}^{-1}$ para $4,75 \text{ F g}^{-1}$. A variação destes parâmetros eletroquímicos está em concordância com os valores obtidos pelas outras técnicas de caracterização, as quais indicam a presença de maior número de defeitos estruturais e planos de borda. Tal parâmetro foi avaliado pela espectroscopia RAMAN, onde a diminuição da razão entre as intensidades das bandas G e D foi atribuída ao aumento do número de defeitos nas paredes dos NTCs, e paralelamente a esses dados, a análise por XPS aponta para uma porção maior de grupos oxigenados (carboxilas, carbonilas, hidróxidos, entre outros) e diminuição da porção de grupos C–C. Com tais dados, pôde-se mais uma vez aferir que a melhora nas propriedades eletroquímicas dos NTCs, em muitos casos é causada pelo aumento da quantidade de defeitos e grupos funcionais que proporcionam uma interface mais reativa, do que um efeito de sua dimensão reduzida.

1.2.4 Funcionalização dos nanotubos de carbono

Os NTCs sem modificações estruturais, chamados NTC-*pristine* apresentam algumas limitações para as aplicações químicas, como a baixa dispersão em solventes polares, o que dificulta a aplicação em filmes finos e desenvolvimento de dispositivos. As rotas de modificação dos NTCs podem ser feitas por diferentes estratégias, incluindo métodos químicos de oxidação (Grujicic *et al.*, 2003; Balasubramanian e Burghard, 2005; Rosca *et al.*, 2005), fotoquímicos (Grujicic *et al.*, 2003) e ataque por plasma de oxigênio (Felten *et al.*, 2006). Na FIGURA 6 está ilustrado o esquema da funcionalização da superfície dos NTCs, a qual gera grupos carboxílicos, carbonílicos, hidroxílicos, entre outros. As vantagens dos tratamentos químicos estão relacionadas a fatores como a pureza e uniformidade dos NTCs, onde em algumas rotas de

síntese, como na deposição química em fase vapor, há a necessidade de remoção, por meio de reações de oxidação, de formas alotrópicas de carbono e óxidos metálicos que são gerados durante a síntese (Datsyuk *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2011). A segunda consideração está relacionada à remoção dos “bandos” de NTCs, onde a inserção de grupos carregados na superfície dos NTCs favorecem os processos de dispersão. Do ponto de vista sintético, a oxidação da superfície promove a introdução de grupos carboxílicos e hidroxílicos, os quais são de extrema importância na nucleação de partículas sobre os nanotubos.

FIGURA 6 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA FUNCIONALIZAÇÃO DE NTCs POR ROTA ÁCIDA



FONTE: (Lordi *et al.*, 2001)

A funcionalização dos NTCs possui um reflexo direto na aplicação de métodos eletroanalíticos. Wei e colaboradores (Wei *et al.*, 2011) avaliaram a influência do tratamento químico por plasma na detecção de cádmio e chumbo por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada. Os resultados indicaram um aumento na intensidade de corrente de quatro vezes em relação aos NTC-*pristine*. Nesse caso não houve efeito eletrocatalítico dos grupos oxigenados na detecção dos metais estudados, indicando que tais espécies atuam como pré-concentradores mais efetivos que o CNTs-*pristine*.

1.2.5 Nanotubos de Carbono decorados com nanopartículas metálicas

A preparação destes nanocompósitos envolvendo NTCs e metais (Me) pode ser realizada via processo químico. Compreendem a redução de um sal do precursor metálico na presença de NTCs onde a adesão das nanopartículas

metálicas à superfície gráfica pode ser aferida às interações de van der Waals que, em muitos casos, é suficientemente forte para manter as partículas na superfície dos NTCs. Xue e colaboradores descreveram a produção de diversos nanocompósitos entre NTCs e diferentes metais (prata, platina, ouro e paládio) onde os precursores foram dispersos na presença de NTCs e submetidos a um fluxo de hidrogênio e refluxo. O tamanho das nanopartículas pode ser ajustado pela variação da concentração de íon precursor metálico em relação à quantidade de NTCs. Assim, as partículas apresentaram tamanho médio entre 7 e 18 nm (Xue *et al.*, 2001). Nanopartículas de platina suportadas em NTC foram sintetizadas por Lordi e colaboradores (Lordi *et al.*, 2001) pelo método poliol, em que o precursor metálico $[PtCl_6]^{2-}$ é submetido a refluxo na presença de SWCNTs previamente oxidados e submetido a refluxo por oito horas. O compósito final apresentou 10% de platina incorporada e um tamanho médio de partícula de 2 nm.

Outra metodologia que pode ser empregada na construção de nanocompósitos entre NTC-Metals é a deposição eletroquímica do precursor metálico sobre os NTCs. O método consiste basicamente na aplicação de um potencial suficientemente negativo para a redução dos íons metálicos na superfície dos NTCs previamente imobilizados na superfície do eletrodo de trabalho. As técnicas eletroquímicas mais utilizadas são as potenciostáticas, ou seja, a aplicação de um potencial constante ao ET (Quinn *et al.*, 2005; Tsai, M.-C. *et al.*, 2006), ou voltamétricas (Afkhami *et al.*, 2016). Na eletrodeposição, o ET atua como agente redutor, cedendo elétrons ao precursor metálico e promovendo sua redução. Após a redução dos íons mais próximos ao eletrodo e conseqüente formação dos núcleos, o crescimento das partículas depende da difusão das espécies ao eletrodo. Além disso, parâmetros como o potencial, tempo e concentração do precursor devem ser otimizados de modo a se obter dispersão satisfatória sobre os nanotubos.

A eletrodeposição é uma técnica rápida e simples de execução. Suas desvantagens são a formação de nanopartículas maiores, ou seja, menor controle da monodispersão e a impossibilidade de obtenção de grandes quantidades de material. Já o método químico apresenta maior facilidade de

controle de tamanho e altos rendimentos de síntese do material desejado. Em contrapartida demanda maior tempo de preparo com várias etapas.

1.2.6 Nanocompósitos entre NTC e nanopartículas metálicas como sensores eletroquímicos

A versatilidade do emprego dos nanocompósitos em química eletroanalítica pode ser visto pelo amplo número de trabalhos disponíveis na literatura. De forma ilustrativa, podem ser citados alguns deles como o trabalho de Afkhami e colaboradores (Afkhami *et al.*, 2016), que preparou um nanocompósito NTC-NPAu e o aplicou como sensor na detecção do fármaco diclofenaco utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) em amostras de urina e formulações farmacêuticas. Rafiee e colaboradores (Rafiee *et al.*, 2015) desenvolveram um eletrodo impresso de carbono modificado com um compósito NTC-NPAu onde o eletrodo base modificado com NTCs previamente funcionalizados pela rota ácida foi modificado com NPAu através da aplicação de potencial constante de -400 mV (vs. Ag/AgCl/Cl⁻) por 30 s. As NPAu apresentaram tamanho médio na faixa de 17 a 40 nm. O dispositivo foi testado para a detecção de metanfetamina utilizando as técnicas de impedância e SWV. Hung e colaboradores (Hung e Kerman, 2011) desenvolveram um nanocompósito NTC-NPAu através da modificação de um eletrodo de pasta de carbono modificada com NTCs e eletrodeposição de ouro por 200 s aplicando um potencial fixo de -400 mV (vs. Ag/AgCl/Cl⁻). O material foi testado frente à oxidação de homocisteína.

1.3 DETECÇÃO DE DOPAMINA

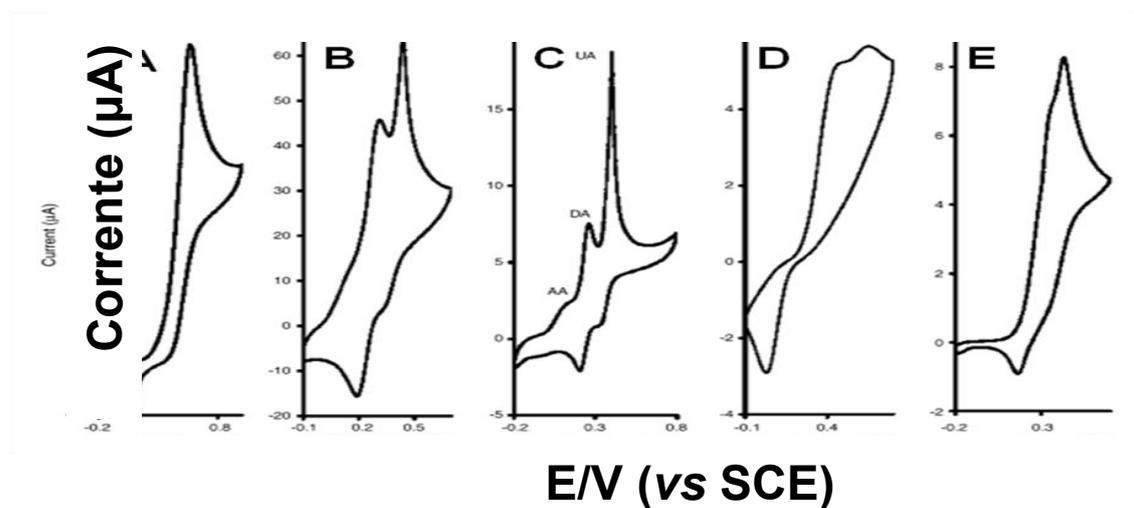
Neste trabalho, o nanocompósito NTC-NPAu sintetizado teve sua potencialidade analítica avaliada frente à determinação de dopamina (DA) na presença de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU). A DA, ou 2-(3,4-dihidroxifenil)etilamina é um importante neurotransmissor do grupo das catecolaminas, e também é o precursor imediato da noradrenalina. Nos fluidos biológicos se apresenta como um cátion, e sua concentração está diretamente relacionada com problemas de saúde como memória, perda de atenção e capacidade de aprendizado (Hefco *et al.*, 2003; Denenberg *et al.*, 2004). Baixos

níveis de dopamina também estão ligados diretamente com distúrbios neurológicos como a esquizofrenia, doença de Parkinson, hiperatividade e falta de atenção (Swanson e Volkow, 2009). A partir de tais informações percebe-se a importância da detecção e monitoramento da DA em fluidos biológicos.

As estratégias analíticas para a detecção de DA incluem espectroscopia UV-Vis (Nagaraja *et al.*, 2001), fluorescência (Wu, H. P. *et al.*, 2007), cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (De Benedetto *et al.*, 2014). Tais metodologias apresentam bons parâmetros analíticos como limite de detecção e faixa linear compatíveis com as concentrações esperadas em fluidos biológicos, porém não apresentam características para aplicação *in vivo* e a possibilidade de monitoramento em tempo real.

A determinação via métodos eletroquímicos de DA normalmente ocorre na presença de altas concentrações de AA. Em fluido cérebro-espinhal a concentração de DA encontra-se na faixa de 0,01 a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto a concentração de AA coexiste na faixa de 0,1 a 1 mmol L^{-1} (Jackowska e Krysinski, 2013). O grande problema encontra-se na sobreposição dos picos de oxidação do AA e DA, dificultando a detecção eletroquímica (Salimi *et al.*, 2006). Salimi e colaboradores estudaram o comportamento eletroquímico da oxidação de DA na presença de AA e AU em diferentes eletrodos de carbono. Os resultados podem ser vistos na FIGURA 7.

FIGURA 7 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE UMA SOLUÇÃO CONTENDO $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE DA, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE AA E $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE AU. OS ELETRODOS DE TRABALHO FORAM A) DIAMANTE DOPADO COM BORO B) GRAFITE PIROLÍTICO C) CARBONO CERÂMICO D) PASTA DE CARBONO E) CARBONO VÍTREO



FONTE: (Salimi *et al.*, 2006)

Percebe-se que, para diferentes superfícies de carbono, o comportamento eletroquímico para a detecção de DA na presença de AA e AU pode ser bastante distinto, levando a sistemas com diferentes seletividades, por exemplo, o AA e o AU não apresentam picos de oxidação no eletrodo de diamante dopado com boro, levando a detecção apenas de DA. Em outros casos, como a detecção eletroquímica utilizando carbono pirolítico, os sinais dos analitos obtidos em pasta de carbono e carbono vítreo são sobrepostos. No eletrodo de carbono cerâmico é possível observar a separação dos três componentes, apresentando-se assim como o melhor sistema para a identificação dos componentes. Tal fenômeno está ligado também à interface, onde cada uma das estruturas alotrópicas apresenta diferenças como tipo de ligações carbono-carbono que pode levar a variações significativas estruturais e eletroquímicas.

O trabalho desenvolvido por Swamy e colaboradores (Swamy e Venton, 2007) descreve a detecção de DA e serotonina em cérebro de camundongos utilizando um microeletrodo de fibra de carbono recoberta com nanotubos de carbono funcionalizados pela rota ácida. A detecção foi acompanhada por cronoamperometria e voltametria cíclica, em que foi possível a detecção de concentrações de 250 nmol L^{-1} para dopamina e 130 nmol L^{-1} para a serotonina.

A detecção de dopamina na presença de AA e AU em fluido cérebro-espinhal sintético foram realizadas por Toledo e colaboradores (De Toledo *et al.*, 2005) utilizando um eletrodo compósito de grafite e poliuretano. Após a otimização do método e, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, foi possível a determinação de DA na faixa de 0,1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com precisão satisfatória.

Nos exemplos acima, é possível observar que a separação de espécies em solução pode dar-se em função do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, que favorece a oxidação ou redução de uma dada espécie em relação à outra. Porém, outra forma de gerar sinal eletroquímico com seletividade é modificar um eletrodo com material biológico, com reconhecimento específico a uma determinada espécie química. Esses eletrodos modificados com biocomponentes são chamados de biossensores.

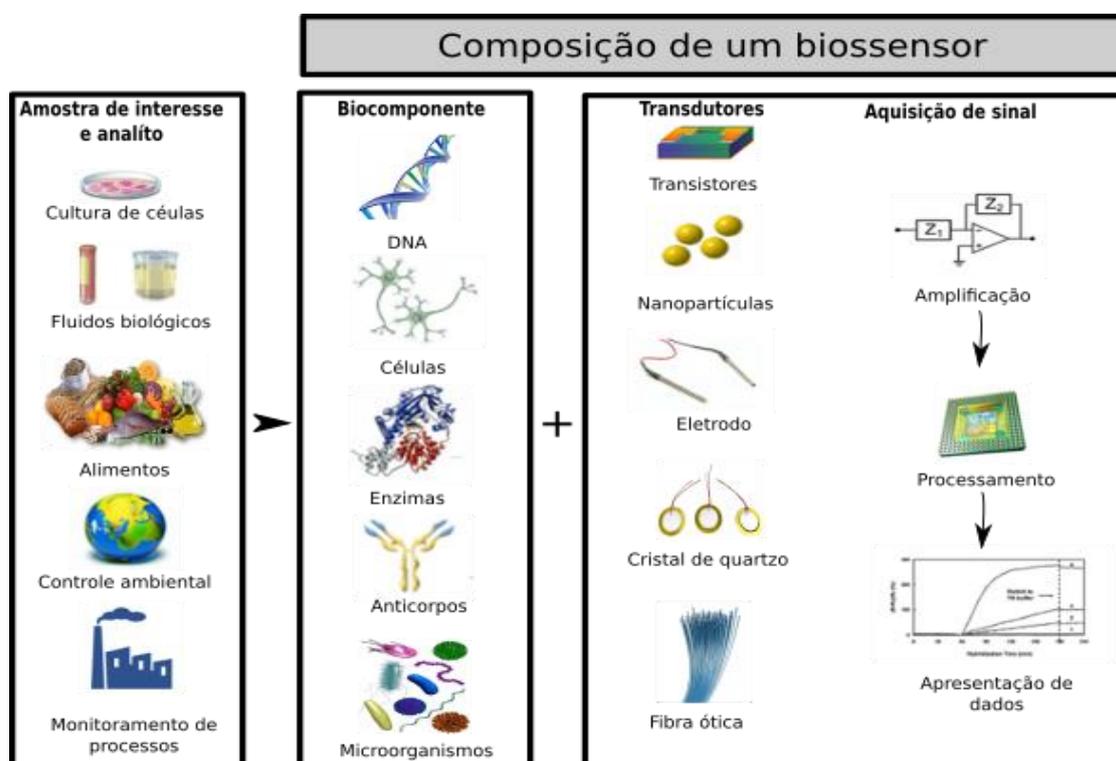
1.4 BIOSSENSORES

Nanopartículas de ouro apresentam baixa toxicidade, ampla faixa útil de potencial eletroquímico, baixa reatividade e biocompatibilidade (Vidotti *et al.*, 2011). Por isso, é o material mais utilizado como plataforma de imobilização de biomoléculas. Neste trabalho, o nanocompósito sintetizado foi avaliado como base para a imobilização da enzima tirosinase e criação de um biossensor para detecção de fenol. A seguir são expostos alguns conceitos e exemplos que envolvem os biossensores, com enfoque especial na detecção eletroquímica.

O desenvolvimento de biossensores é um tópico de interesse em química eletroanalítica devido ao grande número de possibilidades de arranjos para as mais variadas aplicações. Quanto ao conceito, uma definição coerente e bastante utilizada para a descrição de um biossensor é a de Lowe (Lowe, 1985), a qual define: "*Biossensor é uma ferramenta ou sistema analítico que consiste em um material biológico imobilizado em contato íntimo com um dispositivo adequado de transdução*". Do ponto de vista prático, a incorporação de um componente biológico tem como objetivo aumentar o grau de seletividade para um determinado procedimento, levando em conta que as interações biológicas são altamente seletivas. Na FIGURA 8 encontram-se os principais componentes de um biossensor, onde a ideia de construção parte inicialmente de uma amostra, a qual possui um analito que se deseja monitorar. As classes

de amostras a serem utilizadas podem ser muito distintas, desde cultura celular até misturas complexas de processos industriais. A partir da (bio)molécula a ser analisada, escolhe-se o biocomponente a ser imobilizado, como fragmentos de DNA, enzimas, anticorpos, micro-organismos, etc. A detecção da interação pode ser feita através de variação de propriedades óticas (biossensor ótico), elétricas (biossensores elétricos), variação de massa (biossensor gravimétrico), variação de corrente ou potencial proveniente da natureza química das interações (biossensores eletroquímicos). O fator de escolha da melhor forma de transdução de sinal depende da natureza da interação entre o biocomponente imobilizado e a espécie a ser detectada.

FIGURA 8 - ITENS COMPONENTES DE UM BIOSENSOR



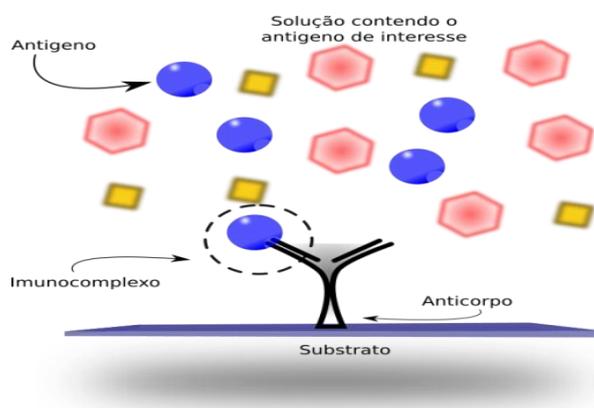
FONTE: Adaptado de (Griehaber, Dorothee *et al.*, 2008)

Com relação às classes de biomoléculas, cada uma gera um grupo específico de biossensores no que diz respeito ao mecanismo de reconhecimento, podendo ser classificados da seguinte maneira:

Imunossensores: compreendem os biossensores que possuem antígeno e/ou anticorpo como elemento de reconhecimento. Os anticorpos, ou

imunoglobulinas (Ig), são proteínas produzidas nos animais como resposta do sistema imunológico à presença de moléculas estranhas ao organismo e são formadas por quatro cadeias de polipeptídeos, duas leves e duas pesadas. As cadeias pesadas compreendem a fração constante (Fc) ou também chamada fração cristalizável. As duas cadeias leves, chamadas frações variáveis (Fab) que são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno e formação do imunocomplexo, que é a ligação antígeno-anticorpo (Ac-Ag). Como resultado final, a estrutura primária do anticorpo tem forma de Y. O esquema básico de funcionamento de um imunossensor está ilustrado na FIGURA 9, o qual pode abranger a detecção de antígenos tumorais (Diaconu *et al.*, 2013), antígenos bacterianos, hormônios e enzimas (Bojorge Ramirez *et al.*, 2009). Como vantagens, usualmente apresentam a faixa de resposta entre 10^{-9} e 10^{-12} mol L^{-1} e seletividade altíssima, proveniente da formação do imunocomplexo. Como desvantagens, a orientação molecular após a imobilização, a susceptibilidade à desnaturação com perda de atividade e a dificuldade de reutilização do biossensor por causa da alta afinidade Ac – Ag.

FIGURA 9 - PRINCIPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM IMUNOSSENSOR

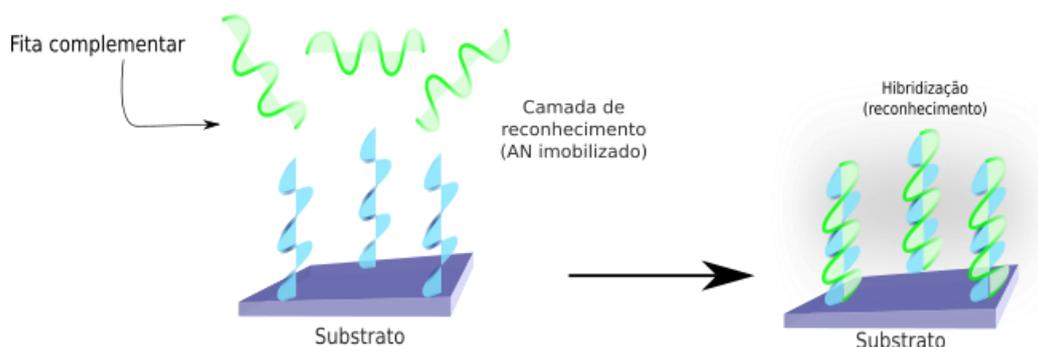


Fonte: O autor.

Genossensores: são sensores que utilizam um fragmento de ácido nucleico (AN) como elemento de reconhecimento (Paleček e Bartošík, 2012). Neste sistema, uma sequência de nucleotídeos, suficientemente grande para gerar a interação com a sequência complementar é imobilizada (probe) em uma superfície responsável pelo reconhecimento (substrato), tal mecanismo de reconhecimento pode ser visto na FIGURA 10. Como vantagens podem ser

citadas a altíssima seletividade, baixos valores de limite de detecção, em muitos casos alcançando dezenas de femtomolar. Como desvantagens, tem-se a preparação de amostras que necessitam da liberação do material genético do ambiente intracelular e fragilidade dos *probes* que pode gerar modificação estrutural (Drummond *et al.*, 2003).

FIGURA 10 - PRINCÍPIO DE RECONHECIMENTO DE UM GENOSENSOR



Fonte: O autor.

Biossensor microbiológico: consiste na utilização de microorganismos como elementos de reconhecimento. A principal vantagem é que um microorganismo pode processar reações ou sequência de reações químicas complexas, que comparativamente, tornariam a produção de um biossensor constituído de biomoléculas inviável. As principais desvantagens são a baixa seletividade, tempo de resposta e faixa linear não atrativa (10^{-2} a 10^{-5} mol L⁻¹) (Microbial sensors, 1993)

1.4.1 Biossensores enzimáticos

As enzimas são proteínas que participam de diversos processos catalíticos nos seres vivos. Seu papel é diminuir a energia de ativação de bioprocessos mantendo a alta seletividade. Podem ser classificadas em grupos, levando em conta o tipo de reação que catalisam como pode ser observado na (TABELA 1).

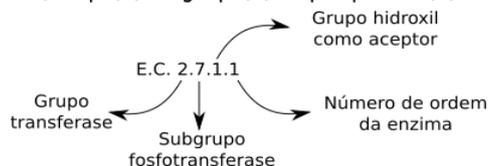
TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS CONFORME O SUBSTRATO PREFERENCIAL

Grupo	Reação catalisada	Exemplo
Oxirredutases	Transferência de Hidrogênio, oxigênio ou elétrons de um substrato a outro.	Desidrogenases, oxirredutases
Transferases	Transferência de um grupo funcional (metila, fosfato, etc.) de um substrato a outro.	Transaminases
Hidrolases	Hidrólise de um substrato	Enzimas digestivas
Isomerases	Mudança conformacional	Fumarase
Liasas	Remoção não hidrolítica ou adição de um grupamento a um substrato	Aldolase
Ligases	Promovem reações de síntese, transformando dois reagentes em um produto.	Sintetase

FONTE: (Martínez cuesta *et al.*, 2015)

Tal separação é amplamente utilizada na classificação E.C (do inglês, *enzyme commission*), o qual tem como objetivo a padronização numérica das enzimas, sendo formado por quatro números sequenciais separados por pontos. O primeiro número refere-se ao grupo de reações que a enzima catalisa, o segundo está ligado ao subgrupo, o terceiro ao grupo químico e o quarto está relacionado com a ordem de descoberta de tal enzima dentro do sub-subgrupo. A aplicação de tal sistematização está descrita na FIGURA 11 onde está exemplificada a classificação da enzima hexoquinase.

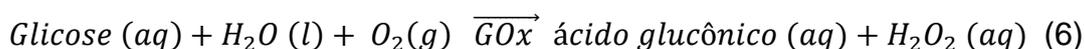
FIGURA 11 - EXEMPLO DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA
E.C. (Grupo).(Subgrupo).(Grupo químico).(Ordem)



FONTE: (Nelson e Cox, 2015)

Por serem moléculas de extrema importância biológica, as enzimas foram os primeiros biocomponentes a serem imobilizados e utilizados com biossensores. Os pioneiros (Clark e Lyons, 1962) utilizaram a enzima glicose

oxidase (GOx) incorporada em uma membrana de acrilamida para monitorar a concentração de O₂ dissolvido no sangue durante procedimentos cardíacos. A reação que foi monitorada é a que está descrita na Equação (6), a seguir:

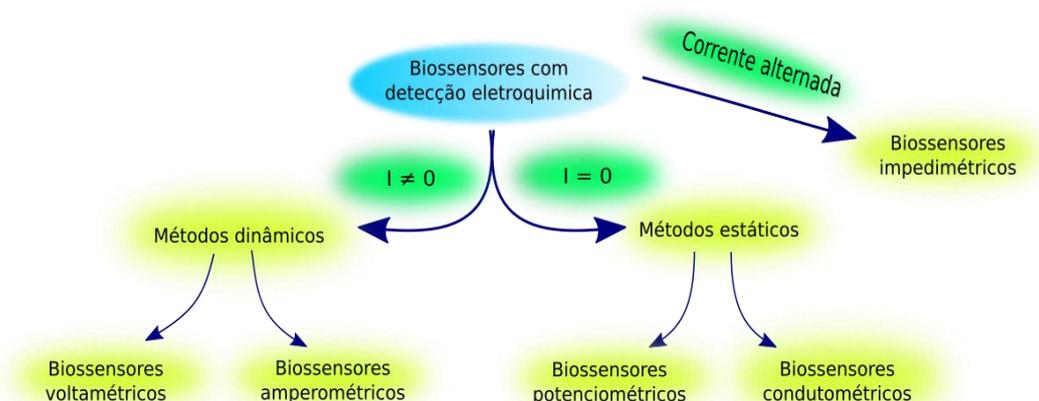


A reação de oxidação da glicose é catalisada por GOx na presença de O₂ e se a concentração de glicose é proporcional a quantidade de oxigênio dissolvido, a diminuição da porção de O₂ reduzido eletroquimicamente no eletrodo também está relacionado com o consumo de glicose biodisponível no sangue. Pode-se dizer que o monitoramento de glicose, amplamente conhecido e utilizado em todo o mundo, nasceu deste trabalho. As razões pelas quais o biossensor enzimático com detecção eletroquímica se consagrou estão relacionadas não somente a fatores comerciais como baixo custo de construção, miniaturização e facilidade de operação, mas também com parâmetros analíticos com limites de detecção e sensibilidade satisfatórios (Tonyushkina e Nichols, 2009).

1.4.2 Biossensores enzimáticos com detecção eletroquímica

A detecção eletroquímica pode ser dividida em diversas modalidades como por via potenciométrica, amperométrica, voltamétrica, ou impedimétrica (Wang, J., 1994; Ahmet Koyun, 2012). Na FIGURA 12, encontram-se as principais modalidades de detecção eletroquímica, onde podemos separar as metodologias em três categorias: a estática, onde não há a passagem de corrente e a medida elétrica de um determinado analito é feita através da variação de propriedades como condutância iônica e potencial em relação a um eletrodo indicador. Já nos métodos dinâmicos, o potencial do eletrodo de trabalho é controlado e a corrente é amostrada, podendo ser aplicado um potencial fixo ou uma rampa de potencial. E por último têm-se as medidas em um circuito contendo corrente alternada, onde as propriedades de impedância são medidas.

FIGURA 12 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS FORMAS DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA APRESENTADAS BIOSSENSORES



FONTE: O autor.

Em seguida tem-se o conceito dessas formas de transdução destes biossensores, a definir:

Potenciometria: A variação de potencial entre o eletrodo indicador (E_{ind}) e a solução contendo espécie de interesse em relação ao eletrodo de referência (E_{ref}) é o mecanismo utilizado neste tipo de biossensor. Normalmente é constituído de enzimas imobilizadas em uma membrana íon seletiva, a qual responde a presença de um íon específico em solução, que é produto da reação enzimática. A medida de potencial ($E_{célula}$), nunca é feita de maneira direta e leva em conta os potenciais do biossensor que é chamado de eletrodo indicador, o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida (E_j) que é o potencial que se desenvolve em uma interface com duas soluções eletrolíticas distintas, como pode ser visto na Equação (7).

$$E_{célula} = E_{ind} - E_{ref} + E_j \quad (7)$$

A variação de potencial do eletrodo indicador, em situação ideal, para uma determinada espécie X^{z+} pode ser descrita através da Equação (8):

$$E_{ind} = L + \frac{0,0592}{z} \log a_x \quad (8)$$

onde L é uma constante e a_x é a atividade do cátion. Levando em conta que E_{ref} e E_j permanecem praticamente constantes durante as medidas potenciométricas (Wang, J., 1994), agrupando todos esses valores em uma constante K , transformando $(-\log X)$ em pX , tem-se a seguinte Equação (9) simplificada:

$$E_{célula} = K - \frac{0,0592}{z} pX \quad (9)$$

No caso do potencial de ânions (A^{z-}), o sinal da célula é invertido, como mostrado na Equação, através do rearranjo da Equação de Nernst (10).

$$E_{célula} = K + \frac{0,0592}{z} pA \quad (10)$$

Possuem ampla faixa de trabalho, pois a variação do potencial responde à concentração logarítmica da espécie e boa sensibilidade e o monitoramento do analito pode ser feito de forma direta ou indireta. Por exemplo, a quantificação de ureia em solução pode ser feita através da medida de variação do pH, como no trabalho de (Lakard *et al.*, 2004). Em um eletrodo base de platina, um filme de polietilenamina foi eletrodepositado juntamente com a enzima urease (E.C. 3.5.1.5.). Esse polímero possui grupos amina que podem ser protonados, e tem faixa linear de trabalho entre pH 3 e 10. Assim, a decomposição da ureia pela via enzimática resulta na produção de amônia, que em meio aquoso produz íons amônio e hidroxila. Assim, a variação do pH do meio está ligada a presença de ureia em solução.

Condutometria: baseiam-se na medida de condutância de uma solução. São pouco difundidos devido à baixa seletividade destes sistemas que apresentam variação de condutância para qualquer íon em solução (Ahmet Koyun, 2012).

Voltametria: técnica eletrolítica na qual uma rampa de potencial é aplicada e a corrente é medida. A aplicação de potencial pode ser feita de maneira linear, cíclica que normalmente são utilizadas na caracterização do

biossensor e as técnicas pulsadas são aplicadas nos ensaios analíticos de modo a obter menores limites de detecção e quantificação (Thévenot *et al.*, 2001).

Amperometria: neste sistema, um valor de potencial é fixado no eletrodo de trabalho, de modo a promover reações de oxidação ou redução do analito e a corrente gerada é diretamente proporcional à quantidade de material que está reduzindo. Os biossensores enzimáticos combinados à detecção amperométrica são muito empregados na detecção de espécies eletroativas. A relação de corrente em função do tempo é dada pela Equação de Cottrell (11) (Wang, J., 1994):

$$i(t) = \frac{n_e F A C D^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (11)$$

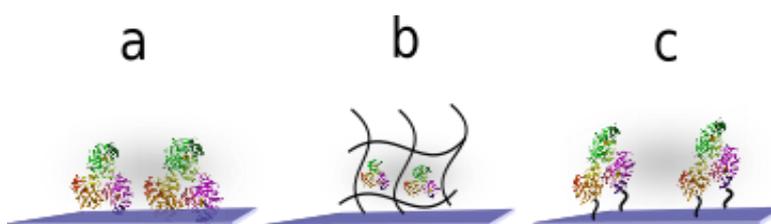
em que i é a corrente (A), n_e é o número de elétrons transferidos, t é o tempo (s), F é a constante de Faraday (96485 A/mol), C é a concentração da espécie (mol cm^{-3}) e D coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$). Muitos trabalhos utilizam a detecção amperométrica com a agitação da solução. Isso faz com que o componente difusional seja minimizada e, por consequência, a queda de corrente por limitação do transporte de massa também.

Impedância: são métodos muito utilizados na caracterização de superfícies. Nos últimos anos, a caracterização pelo uso da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) vem crescendo consideravelmente. A técnica consiste em medir a impedância do sistema eletroquímico, quando um sinal alternado, de corrente ou de potencial, é aplicado em um intervalo de frequências. Através dessa técnica, é possível aferir alguns parâmetros do sistema como resistência de solução (R_s, Ω), resistência à transferência de carga (R_{tc}, Ω), capacitância da dupla camada (C_{dc}, F). A variação da R_{tc} em função da concentração de uma biomolécula pode ser utilizada no mecanismo de funcionamento deste tipo de biossensor (Randviir e Banks, 2013).

1.4.3 Formas de imobilização enzimática

Até aqui, foram abordados os tipos de biocomponentes e a forma de detecção mais comuns dos biossensores, porém a imobilização desses materiais na superfície do eletrodo é extremamente importante para o desempenho final do dispositivo (Datta *et al.*, 2013; Mohamad *et al.*, 2015). Várias características devem ser levadas em conta a fim de produzir um biossensor estável e reprodutivo. A FIGURA 13 mostra as principais formas de imobilização de biomateriais sobre um substrato de transdução eletroquímica que podem ser aplicadas a qualquer classe de biomoléculas (Ahmet Koyun, 2012).

FIGURA 13 - FORMAS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA a) ADSORÇÃO b) IMOBILIZAÇÃO EM REDE POLIMÉRICA c) FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO COVALENTE



FONTE: O autor.

Adsorção física: é o método mais simples de imobilização e baseia-se nas interações do tipo Van der Waals, ou ligações de hidrogênio entre enzima e substrato. Compreende uma ampla gama de suportes como alumina, carvão, grafite, resinas de troca iônica e zeólitas. A simplicidade e tempo de preparo podem ser levados como vantagens deste método, porém o controle de temperatura, pH, força iônica necessário para que não ocorra a lixiviação da enzima para a solução são as desvantagens frequentemente apresentadas por essa forma de imobilização.

Aprisionamento: consiste na imobilização da enzima dentro de uma fibra ou matriz polimérica, permanecendo em um espaço limitado. Eletropolimerização e processos sol-gel podem ser utilizados para obter esse

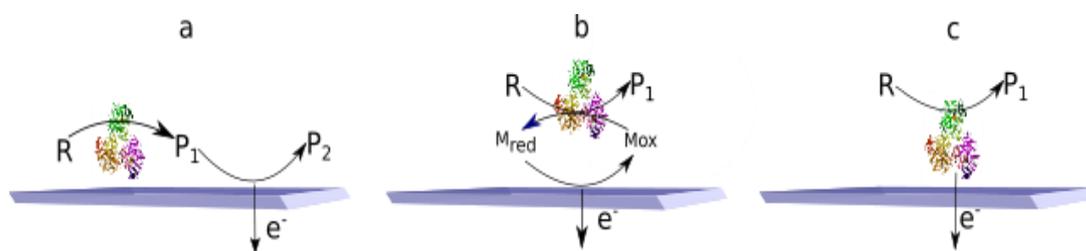
tipo de confinamento. Nesta situação, a perda de atividade e desnaturação é baixa, pois a interação e inércia química do suporte mantém a atividade enzimática. Além disso, problemas de lixiviação do suporte para o substrato são minimizados. Por outro lado, o aprisionamento pode apresentar-se como uma barreira para a interação com o substrato e a polimerização de sítios ativos, o que configura um problema para biossensores onde a orientação do material imobilizado é importante, como no caso dos imunossensores.

Ligação covalente: é o procedimento mais amplamente utilizado, o qual consiste na criação de ligações covalentes entre o suporte e a enzima. Utiliza a reação entre grupos presentes na superfície do eletrodo, como hidroxilas, carboxilas e aminas com porções reativas da enzima, que não afetam sua atividade catalítica como os grupos amino, carboxílicos ou tióis. Os reagentes mais utilizados nesse tipo de imobilização são os aminoalcanotióis, glutaraldeído, 1etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Apresentam bons resultados frente à lixiviação, variação do pH e força iônica. O tempo de preparo, ocorrência de diminuição da atividade enzimática em alguns casos são vistos como desvantagens deste método.

1.4.4 Classificação dos biossensores enzimáticos com detecção amperométrica ou voltamétrica

O princípio de funcionamento dos biossensores com detecção eletroquímica pode ser dividido em três classes, dependendo do mecanismo empregado. Na FIGURA 14 estão indicados os três mecanismos de geração dos biossensores eletroquímicos enzimáticos. Para fins ilustrativos, as imagens indicam um processo de oxidação, mas o mesmo é válido para as reações de redução do substrato.

FIGURA 14 - MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DE BIOCENSORES ENZIMÁTICOS COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE a) PRIMEIRA GERAÇÃO b) SEGUNDA GERAÇÃO E c) TERCEIRA GERAÇÃO



FONTE: O autor.

a) Biossensores de primeira geração: o sinal elétrico, neste caso, é gerado pela promoção de reações redox de reagentes ou produtos da reação enzimática. Ou seja, existe a dependência da presença de moléculas eletroativas como reagentes ou produtos. O primeiro biossensor proposto (Clark e Lyons, 1962) é um exemplo desta classe de biossensores, em que o monitoramento do consumo de oxigênio ou a produção de peróxido de hidrogênio podem ser realizados. Porém, devido o controle rigoroso da concentração de oxigênio e os altos sobrepotenciais de redução destas espécies, podem ser vistos como desvantagens desta classe de biossensores.

b) Biossensores de segunda geração: para diminuir o potencial de detecção do sistema, uma alternativa é o emprego de mediadores redox, os quais podem sofrer reações com substratos ou produtos da reação enzimática, e também podem interagir com a superfície do eletrodo em potenciais mais negativos, quando comparados com a detecção na sua ausência. Normalmente conseguem diminuir drasticamente o potencial de detecção em biossensores enzimáticos. Em contrapartida, reações paralelas não desejáveis podem ocorrer. Os mediadores mais empregados são os íons complexos ferricianeto e ferroceno (Scheller *et al.*, 1991).

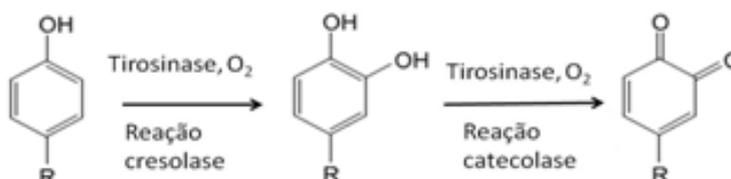
c) Biossensores de terceira geração: A transferência eletrônica ocorre diretamente do centro ativo da enzima para o eletrodo. O processo ocorre em baixos valores de potencial e não empregam mediadores redox. A orientação da

enzima sobre o suporte e a localização do centro ativo da enzima, sendo os mais próximos à superfície os mais suscetíveis a tal processo, são os pontos mais relevantes na construção deste tipo de biossensor (Freire *et al.*, 2003; Taurino *et al.*, 2016).

1.5 TIROSINASE

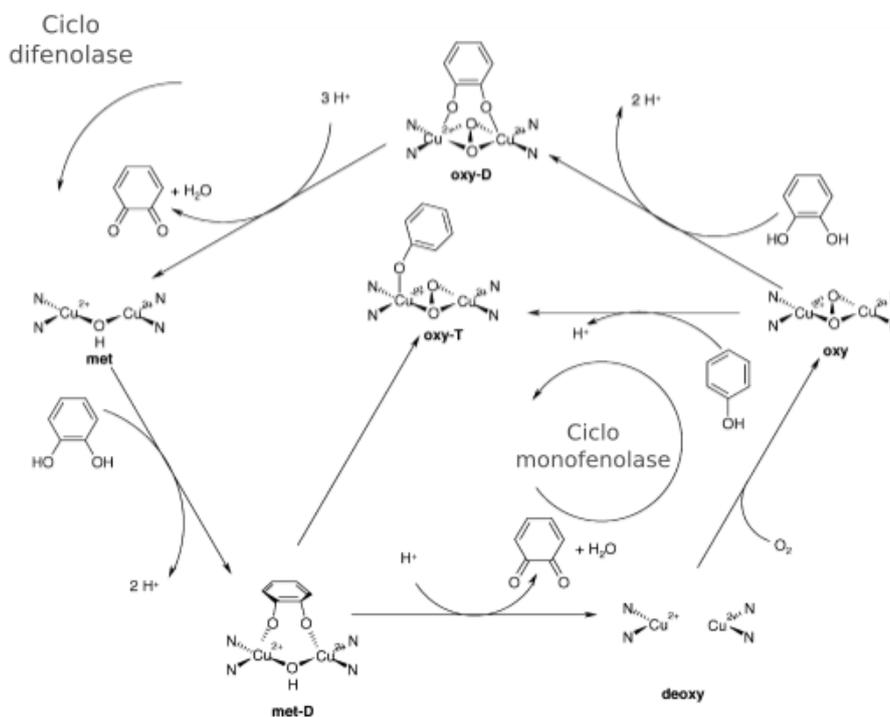
As tirosinases, ou polifenol oxidases (TIR, PPO, EC 1.14.18.1), referem-se a uma classe de enzimas monooxigenases que contém um sítio ativo dinuclear de cobre. Em relação às reações, as quais podem ser vistas na FIGURA 15, as tirosinases podem participar de dois processos catalíticos: (i) inserção de hidroxilas em um fenol formando orto-difenóis, chamada de cresolase ou monofenolase (ii) oxidação dos o-difenóis a o-quinonas, chamada de catecolase ou difenolase. Os substratos desta reação podem ser fenóis para-substituídos (Grieshaber, D. *et al.*, 2008).

FIGURA 15 - REAÇÕES CATALISADAS PELA TIROSINASE



Em relação à estrutura do centro ativo e do ciclo catalítico, que está apresentado na FIGURA 16, centros de cobre ligados a resíduos de histidina, que é a forma descrita como deoxy, constituem a forma inicial do ciclo catalítico. Na presença de oxigênio, ocorre a formação do complexo dinuclear de cobre, que é parte importantíssima do processo, pois a eletronegatividade do oxigênio coordenado torna o centro metálico mais eletrofílico, sendo mais susceptível a coordenação do fenol no ciclo monofenolase e também a oxidação da o-cresol no ciclo difenolase levando, por fim, a formação de o-quinona.

FIGURA 16 - CICLO CATALÍTICO DA TIROSINASE



FONTE: Adaptado de (Kim e Uyama, 2005)

As tirosinases são encontradas em vários reinos, desde o fungi até o animal, com distintas funções. Nos fungos e plantas é responsável pelo escurecimento após alguma lesão. Porém, essa atividade ainda não tem funcionalidade totalmente esclarecida, podendo estar relacionada a um mecanismo de defesa destes seres vivos (Yaropolov et al., 1996). Nos animais, está relacionada à oxidação tirosina, de onde vem o nome Tirosinase, levando a formação de melanina. Normalmente, as enzimas disponíveis comercialmente são provenientes dos fungos *Neurospora crassa* e *Agaricus bisporus* (Kim e Uyama, 2005).

1.5.1 Biossensores contendo tirosinase como elemento de reconhecimento.

O desenvolvimento de biossensores utilizando tirosinase e nanoestruturas apresentam diversos trabalhos descritos. Kochana e colaboradores (Kochana et al., 2015) desenvolveram um sistema contendo um eletrodo de trabalho de grafite pirolítico modificado com NTC / nanopartículas de

óxido de titânio onde a tirosinase foi imobilizada por adsorção. O biossensor proposto foi testado frente à detecção de bisfenol-A em amostras de água, onde o LD do método foi de $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$. Com o objetivo de comparar o desempenho analítico de três diferentes nanoestruturas para o desenvolvimento de biossensores, (Alkasir *et al.*, 2010) utilizando eletrodos impressos de carbono, imobilizaram tirosinase sobre nanopartículas de ouro, nanopartículas de níquel e nanopartículas de ferro através da formação de ligações covalentes entre os grupos amino dos agentes passivantes das nanopartículas e glutaraldeído. Os três sistemas apresentaram resultados analíticos satisfatórios para a detecção de catecol, porém as nanopartículas de ouro obtiveram maior intervalo de resposta linear, menor tempo de resposta e maior reprodutibilidade de sinal após sucessivas adições. Vicentini e colaboradores (Vicentini *et al.*, 2016) imobilizaram tirosinase covalentemente sobre NPAu em um ECV e obtiveram resposta linear entre $2,5 \times 10^{-6}$ e $95,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ por meio de medidas amperométricas com ótima estabilidade do biossensor que apresentou 93% do sinal analítico após 30 dias.

Percebe-se pelo exposto até aqui, que a imobilização de tirosinase sobre nanopartículas de ouro pode trazer benefícios na detecção de espécies fenólicas através da construção de biossensores.

1.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compreendem a classe de moléculas orgânicas formadas pela presença de uma, ou mais hidroxilas ligadas a um anel benzênico. O fenol, ou hidroxibenzeno é um composto orgânico pouco solúvel em água, sendo o mais simples desta classe, o qual tem sua presença no ambiente atribuído à atividade industrial de petroquímica, farmacêutica e papelreira. É considerado um composto altamente tóxico, sendo que o seu descarte sem o devido tratamento, traz riscos ao bem estar humano, animal e aos sistemas aquáticos (Mukherjee *et al.*, 2013). A concentração nociva aos seres humanos e organismos aquáticos encontra-se entre na faixa de $9,9 \times 10^{-5}$ a $2,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sendo os principais sintomas associados à exposição prolongada: fraqueza muscular, tremor, podendo levar ao coma e à morte. (Villegas *et al.*, 2016). Por isso, é considerado um poluente prioritário pela agência de proteção ambiental americana (EPA)

(Epa, 2016) que fixou sua concentração limite na água potável como $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Em relação à terminologia, os compostos fenólicos podem gerar enganos. Muitos artigos referem-se a compostos fenólicos para os antioxidantes como ácido gálico, ácido cafeíco e catequinas. Já outros tratam compostos fenólicos o fenol, catecol e outros que não possuem semelhança no comportamento biológico.

Os métodos de quantificação de compostos fenólicos são bastante consolidados: cromatografia em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG—EM) (Puig e Barceló, 1996; Cheung e Wells, 1997) e cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta- visível (UV-Vis) (Sun, J.-N. *et al.*, 2014; Dolatto *et al.*, 2016). Apesar dos baixos limites de detecção (LD) e sensibilidade proporcionados por tais metodologias, as mesmas requerem uma fase de pré-concentração desses analitos, normalmente microextração em fase sólida (SPME) ou microextração em fase líquida (LPME), as quais requerem tempo e gastos de solventes e materiais de microextração. Além disso, as separações cromatográficas seguidas de detecção apresentam dificuldade de miniaturização dos sistemas e portabilidade.

O método padrão para a determinação de fenóis em águas, o qual pode ser aplicado em qualquer tipo de matriz aquosa, baseia-se na reação entre os compostos fenólicos e a 4-aminoantipirina, em meio básico, utilizando $K_3[Fe(CN)_6]$ como agente oxidante e gerando um composto avermelhado com absorção em 500 nm que pode ser monitorado por espectrofotometria UV-Vis, levando 15 minutos para que a reação se complete, o que torna moroso o emprego de tal metodologia para grandes quantidades de amostra (Rodrigues *et al.*, 2010)

Neste contexto, o desenvolvimento de novos biossensores para a determinação de espécies fenólicas pode trazer algumas vantagens como a rápida resposta, baixo custo, simplicidade de operação, além de sensibilidade e seletividade.

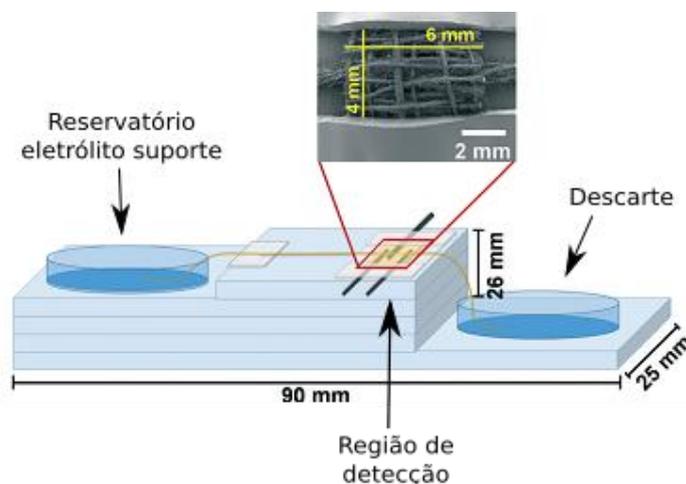
1.7 MICROFLUIDICA

A miniaturização dos sistemas analíticos teve seu início no final da década de 70, quando Terry e colaboradores (Reyes *et al.*, 2002) apresentaram um cromatógrafo a gás portátil, o qual era capaz de fazer pequenas separações de forma rápida juntamente com um detector de condutividade térmica. Apesar do avanço que o trabalho apresentava para a época, houve quase nenhuma relevância para a comunidade científica, que não deu a devida importância para o fato. Sendo assim, as pesquisas na década de 80 foram mais voltadas ao desenvolvimento da parte mecânica dos sistemas, como microbombas e válvulas (Reyes *et al.*, 2002). O retorno das pesquisas e ascensão desta área como ferramenta analítica se deu com o trabalho de Manz (Manz *et al.*, 1990) que desenvolveu um sistema de separação por cromatografia em fase líquida e trataram de batizar o sistema com a sigla TAS (do inglês, *Total Analysis chemical System*). Desde então, a ideia de miniaturização de sistemas se consolidou e se difundiu como uma subárea do conhecimento e interesse da química analítica. A redução das dimensões dos aparatos de uma análise química tem como resultados o menor gasto de reagentes (injeções da ordem de micro a picolitros), maior frequência analítica, menor geração de resíduos e baixo custo com o emprego de substratos comercialmente viáveis em sua produção como vidro (Burns *et al.*, 1998), polímeros (Neuži *et al.*, 2012) e papel (Parolo e Merkoci, 2013).

O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos de baixo custo com detecção eletroquímica é um dos tópicos de interesse do grupo de pesquisa no qual esta tese foi desenvolvida. Sendo assim, um dispositivo de baixo custo que foi construído no grupo foi utilizado para a aplicação do biossensor desenvolvido para a detecção de fenol, o qual é constituído de canais com fios de algodão, proveniente de uma gaze utilizada para fins médicos, por onde ocorre o transporte de eletrólito suporte e da solução contendo os analitos. Neste mesmo sistema, a determinação de acetoaminofeno e diclofenaco utilizando detecção por amperometria de múltiplos pulsos foi estudada (Agustini *et al.*, 2016). O sistema está descrito na FIGURA 17, o qual é composto de um suporte de lâminas de vidro empilhadas com três separações: dois reservatórios plásticos, um de entrada e um de saída com aproximadamente 2 mL de capacidade. A

parte central, chamada de região de detecção, é constituída de três eletrodos de grafite comercial, os quais foram alinhados paralelamente.

FIGURA 17 - SISTEMA MICROFLUIDICO BASEADO EM CANAIS CONSTITUIDOS DE FÍOS DE ALGODÃO



FONTE: Adaptado de (Agustini *et al.*, 2016)

A injeção de amostra é feita anteriormente a região de detecção com o auxílio de uma micropipeta, a qual utiliza $2,0 \mu\text{L}$ de solução em cada injeção. O fluxo de solução é promovido por efeito de capilaridade aliado a diferença de altura entre os dois reservatórios, não havendo a necessidade do emprego de bombas ou qualquer outra força externa para gerar o transporte de solução. O limite de detecção encontrado foi de $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para acetaminofeno e diclofenaco respectivamente. A frequência analítica de 45 injeções por hora foi obtida para esse sistema e o custo de \$0,39 (aproximadamente R\$1,40) por dispositivo construído.

O sistema descrito mostrou-se potencialmente viável para a construção de um dispositivo miniaturizado de baixo custo para análise de fenol utilizando o biossensor proposto. Como forma de miniaturizar e eliminar o sistema de três eletrodos separadamente, a construção do biossensor foi realizada em um eletrodo impresso.

1.8 METODOS DE IMPRESSÃO

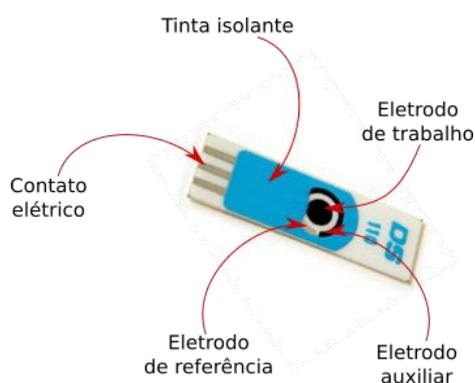
Nas últimas duas décadas, a produção de componentes eletrônicos, sejam eles para circuitos ou sensores nas mais diversas aplicações vem

passando por uma grande transformação no que tange as tecnologias de produção. Dispositivos menores, com melhor desempenho e baixo custo para produção em grande escala são os principais pontos a serem observados na produção. Além disso, os componentes flexíveis são extremamente importantes na produção desses dispositivos e se apresentam como um desafio à substituição dos dispositivos a base de silício. A seguir serão apresentadas as duas técnicas de impressão utilizadas nesta tese.

1.8.1 Eletrodos impressos por *silk-screen*

A incorporação do sistema convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA) (FIGURA 18), utilizados em diversas medidas eletroquímicas em um único suporte, gerando um dispositivo com diversas vantagens: compacto e com dimensões reduzidas ($3,4 \times 1,0 \times 0,05$ cm) portátil, de baixo custo e descartável, o que evita problemas de contaminação e envenenamento de superfície. Essas características tornam o uso de eletrodos impressos (EI) bastante atraente para aplicações eletroanalíticas (Barton *et al.*, 2016; Tsai, J.-Z. *et al.*, 2016).

FIGURA 18 - PARTES CONSTITUINTES DE UM ELETRODO IMPRESSO



FONTE: (Dropsens, 2016)

Em relação à produção destes eletrodos, o método baseia-se na tecnologia *silk-screen*, a mesma utilizada para a produção de estampas em camisetas. Uma tela contendo o desenho a ser impresso é colocada sobre um substrato que pode ser um plástico como polietileno tereftalato (PET), cloreto de polivinila (PVC), cerâmica ou alumina (Nascimento e Angnes, 1998). Após a cura

da tinta condutora, uma camada de tinta isolante é adicionada para delimitar a área dos eletrodos. A versatilidade de produção desses eletrodos encontra-se também na variedade de tintas que podem ser empregadas na construção sua construção (ouro, prata, platina, cobre, nanopartículas, polímeros condutores, etc). Além disso, a superfície desses eletrodos pode ser modificada com diferentes materiais como nanopartículas (Caetano *et al.*, 2012; Oliveira, P. R. D. *et al.*, 2012), polímeros (Bergamini *et al.*, 2013), biomoléculas (Taleat *et al.*, 2014).

A modificação de EI com GOx e uma ftalocianina de cobalto foi utilizada para monitorar o consumo de glicose por diferentes culturas celulares (Pemberton *et al.*, 2011). Cinco eletrodos impressos modificados com GOx/ftalocianina de cobalto foram introduzidos em um meio de cultura e, através do monitoramento cronoamperométrico da corrente gerada em processo de oxidação do peróxido de hidrogênio gerado eletrocatalisado pela ftalocianina de cobre ($E = 0,4 \text{ V}$), foi possível fazer a correlação do consumo de glicose pelo meio de cultura. O monitoramento foi feito por 24 horas e os resultados foram comparados com métodos padrão de dosagem de glicose em meio de cultura, sendo os resultados de ambas as técnicas concordantes.

1.8.2 Impressão a jato de tinta

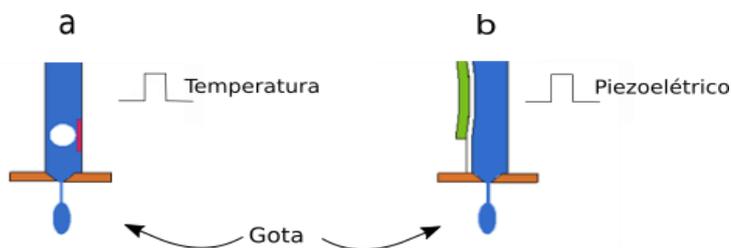
A tecnologia de impressão por jato de tinta (IJT, *inkjet*) vem ganhando atenção nos últimos anos devido as suas características como: baixo custo de produção, baixo consumo de matéria prima, alta resolução, possibilidade produção de tintas para variadas aplicações e operação em baixas temperaturas (Aleeva e Pignataro, 2014). Em comparação a técnica *silk-screen*, a IJT é um método não contato entre substrato e o sistema de ejeção de tinta, o que diminui significativamente a contaminação cruzada entre diferentes camadas aplicadas no substrato.

O princípio de funcionamento de tal técnica é semelhante às impressoras comerciais de jato de tinta, no qual um reservatório, chamado de cartucho, contendo a tinta a ser depositada em um substrato é colocado na impressora e através de um orifício, chamado de *nozzle*, é expelida verticalmente. Existem duas formas de impressão: o modo contínuo e o *Drop on Demand* (DOD). O

modo DOD, consiste na impressão de “gotas por demanda” em uma tradução livre do termo, enquanto o contínuo, como próprio nome remete, produz um jato contínuo de tinta. A impressão DOD vem sendo mais utilizada porque apresenta maior resolução dos padrões impressos. A ejeção da gota a partir do cartucho é realizada através de uma deformação mecânica de um transdutor, que pode ser piezoelétrico ou termoelétrico (FIGURA 19) através da aplicação de um potencial ou aquecimento.

Neste trabalho, a impressora utilizada apresenta o transdutor piezoelétrico o qual é aplicado um pulso de potencial suficiente para modificar o volume do cristal e, por conseqüência, variar o volume da câmara onde a tinta se encontra e dispensar a gota. O transdutor piezoelétrico apresenta a vantagem de poder trabalhar com solventes menos voláteis e mais viscosos, enquanto o térmico necessita da formação de uma bolha de vapor do solvente em questão para que a pressão gerada promova a saída da gota (Phillips, 2010).

FIGURA 19 - TRANSDUTORES PARA IJT NA MODALIDADE DOD: A) TRANSDUTOR TÉRMICO B) PIEZOELÉTRICO

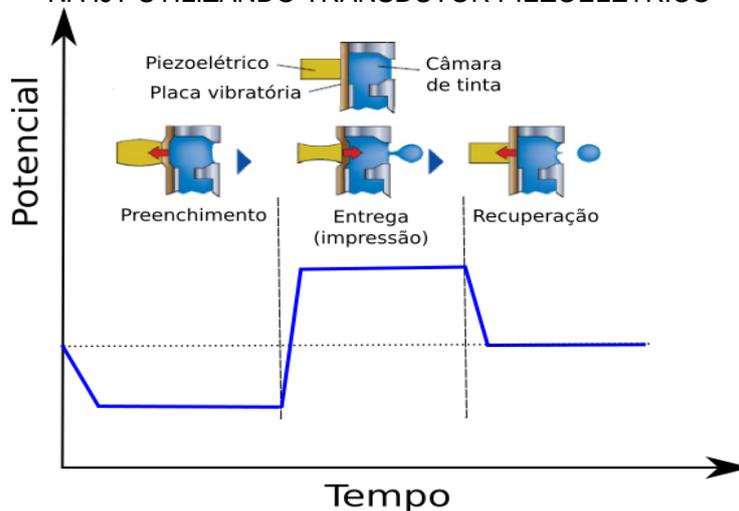


FONTE: o autor.

As etapas de formação da gota são de extrema importância no resultado final da impressão. Na FIGURA 20 estão descritas as três etapas de formação e a função de onda utilizada (linha em azul). Inicialmente, o potencial é diminuído pela retração do cristal, resultando no aumento da capacidade da câmara com a entrada de tinta (etapa é chamada de preenchimento). Em seguida, a etapa da entrega ou impressão propriamente dita, acontece quando um potencial mais alto que o inicial é aplicado ao piezoelétrico que expande e expelle a gota. Em seguida ocorre a recuperação, onde o potencial e o piezoelétrico retornam ao estado inicial. A função de onda aplicada depende de vários fatores como a natureza da tinta, viscosidade e volatilidade (Aleeva e Pignataro, 2014). O

volume da gota pode variar conforme o material e solvente, sendo 10 pL o volume médio encontrado nos sistemas DOD de impressão.

FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE FORMAÇÃO DA GOTA NA IJT UTILIZANDO TRANSDUTOR PIEZOELÉTRICO



FONTE: O autor.

A variedade de tintas que podem ser utilizadas para as mais diversas aplicações tornam a tecnologia IJT bastante atraente para a aplicação em diversos campos, sendo as tintas de metais de transição como ouro (Cui, W. *et al.*, 2010), prata (Kwi Jong *et al.*, 2006), NTC (Qin *et al.*, 2016), grafeno (Kahng *et al.*, 2014; Dodoo-Arhin *et al.*, 2016), polímeros condutores (Yoon *et al.*, 2016), os quais podem ser utilizados para as mais diversas aplicações como: produção de eletrodos de ouro para eletromiografia (Scalisi *et al.*, 2015), eletrodo de pseudoreferência de prata descartáveis (Da Silva *et al.*, 2014), eletrodos para medida de pH (Qin *et al.*, 2016), entre outras. Após a impressão, a tinta depositada precisa passar pelo processo de sinterização ou cura, que pode envolver apenas a evaporação do solvente ou alguma etapa adicional de ativação da superfície, como por exemplo, a remoção de agentes passivantes das NPs e formar um filme contínuo com condutividade adequada.

As tintas de ouro constituem grande interesse para a produção de eletrodos, devido à potencialidade de aplicações na construção de sensores e biossensores. Por isso a produção de tintas que apresentem longa vida e estabilidade são pontos importantes a serem considerados. As composições de tintas que são normalmente encontradas são à base de complexos inorgânicos

(Schoner *et al.*, 2013), nanocompósitos entre polímeros condutores-nanopartículas (PC-NPAu) e a base de nanopartículas (Singh *et al.*, 2010; Aleeva e Pignataro, 2014). A estabilidade dos complexos de ouro resulta em temperaturas de cura mais elevadas, além do tempo de preparo mais longo. Enquanto que a impressão de nanocompósitos PC-NPAu é mais difícil devido à viscosidade e solubilidade desses materiais. O preparo de tintas a base de NPAu se mostra viável para a produção de eletrodos, pois possuem baixa temperatura de sinterização, alta estabilidade, possibilidade adequação da solubilidade com a troca do passivante, além de propiciar dispersões com altas concentrações de ouro. A desvantagem das nanopartículas está relacionada com a possibilidade da agregação das mesmas e entupimento dos *nozzles*. Assim, a dispersão deve apresentar estreita distribuição e tamanho médio 10 vezes menor que o orifício de ejeção, que normalmente tem 20 μm de diâmetro (Cummins e Desmulliez, 2012).

As NPAu produzidas pelo método bifásico se apresentam como um material com propriedades adequadas para a produção de síntese, seja pelo tamanho reduzido e estreita distribuição de tamanho, além da alta estabilidade. Alguns trabalhos relatam a utilização de NPAu produzidos pelo método bifásico para a geração de tintas, porém a utilização de solventes voláteis e pouco viscosos para a formulação de tintas como tolueno e xileno para a impressão DOD, torna difícil a reprodutibilidade de impressão e aplicação em microsistemas (Zhao, N. *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2011; Määttänen *et al.*, 2012). Além disso, a caracterização eletroquímica dos eletrodos e informações de estabilidade da tinta são escassos na literatura.

Tendo em mente a importância do método bifásico na química de nanomateriais, esta tese de doutorado explora tal metodologia de três maneiras diferentes visando aplicações eletroanalíticas, as quais estão separados em diferentes capítulos:

I) Primeiramente a rota bifásica foi utilizada para a produção de um nanocompósito entre nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono. Esse trabalho envolveu a funcionalização de nanotubos de carbono, seguido de determinação do número de sítios ácidos (carboxilatos) presentes na superfície. Estes nanotubos então funcionalizados foram empregados como suporte para o

crescimento de nanopartículas de ouro e devidamente caracterizados. Finalmente o material foi estudado como sensor eletroquímico para a determinação de DA na presença de interferentes ácido ascórbico e ácido úrico.

II) O nanocompósito foi utilizado na construção de um biossensor através da incorporação da enzima tirosinase sobre as NPAu, seguida da determinação de fenóis utilizando um sistema microfluídico baseado em fios têxteis

III) Utilizando a rota clássica de obtenção de nanopartículas de ouro passivadas por dodecanotiol para a produção de eletrodos impressos pela tecnologia jato de tinta. Os eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente e a estabilidade da tinta foi avaliada. Esta etapa foi realizada no estagio sanduíche, no Instituto Catalão de Nanociência e Nanotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Arben Merkoçi.

Para facilitar a compreensão do trabalho, objetivo, parte experimental, resultados e discussão e conclusões parciais de cada etapa foram agrupadas dentro de capítulos separados, seguido de uma conclusão geral sobre o tema abordado.

2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS ENTRE NANOTUBOS DE CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO

2.1 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

Explorar as potencialidades eletroanalíticas de nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método bifásico na construção de (bio)sensores eletroquímicos.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Caracterizar os NTCs comerciais e avaliar os tratamentos químicos utilizados para funcionalização dos NTCs;

ii) Sintetizar e caracterizar nanocompósitos (NTC-NPAu) por diferentes técnicas como Microscopia Eletrônica de Transmissão MET, Difractometria de Raios-X, Microscopia Eletrônica de Varredura MEV, Espectroscopia RAMAN, titulação potenciométrica;

iii) Desenvolver, procedimentos voltamétricos para a determinação e quantificação de DA utilizando o nanocompósito em questão.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos estão especificados no ANEXO 1. As soluções foram preparadas em água ultrapura (milli Q[®]) com resistividade superior a 18 MΩ cm

2.4.1.1 Funcionalização dos nanotubos de carbono

Para a modificação química dos NTCs de múltiplas paredes com diâmetro médio 10 – 40 nm foram utilizados. Patiu-se de 60 mg de nanotubos de carbono que foram submetidos a refluxo em meio ácido composto por uma mistura de 30 mL de H₂SO₄ 3,0 mol L⁻¹ e 90 mL HNO₃ 3,0 mol L⁻¹ por diferentes tempos (1, 3 e 6 horas). Na sequência, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e a dispersão de NTCs foi separada da solução por sucessivas

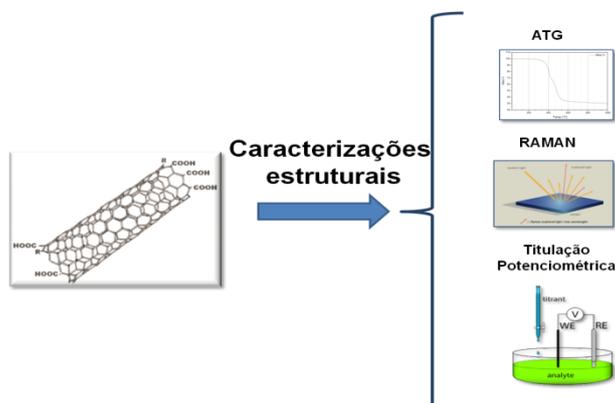
centrifugações a 4000 RPM por 20 minutos, seguida de lavagens com água deionizada até atingir o pH 6,0 o qual foi aferido com auxílio de fita indicadora de pH. Os nanotubos de carbono tratados foram mantidos em estufa a 50° C por 12 horas para secagem efetiva.

Para os NTCs tratados com peróxido de hidrogênio, 60 mg de NTCs foram adicionados a 100 mL de H₂O₂ 30%, e submetidos a refluxo por diferentes tempos (1, 3 e 6 horas). Após isso, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e a dispersão de NTCs foi separada da solução por sucessivas centrifugações a 4000 RPM por 20 minutos, seguida de lavagens com água deionizada até atingir o pH 6,0 o qual foi aferido com auxílio de fita indicadora de pH. Os nanotubos de carbono tratados foram submetidos à estufa a 50° C por 12 horas para secagem efetiva.

2.4.1.2 Titulação dos nanotubos de carbono

O procedimento realizado em triplicata consistiu em pesar 15 mg de NTCs previamente funcionalizados, os quais foram adicionados a 25 mL de uma solução de NaOH 0,001 mol L⁻¹ por 10 minutos sob agitação. A mistura foi filtrada, a solução resultante foi diluída até completar 25 mL de solução, a qual foi titulada potenciométricamente, com o auxílio de um pHmetro utilizando uma solução de HCl 0,001 mol L⁻¹ como titulante. O mesmo procedimento foi feito para uma amostra de NTCs não submetidos ao tratamento. Na FIGURA 21 encontra-se o diagrama esquemático resumindo as caracterizações dos nanotubos funcionalizados. As caracterizações estruturais encontram-se descritas posteriormente.

FIGURA 21 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO RESUMINDO AS ETAPAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS NTCs FUNCIONALIZADOS POR TRATAMENTO ÁCIDO

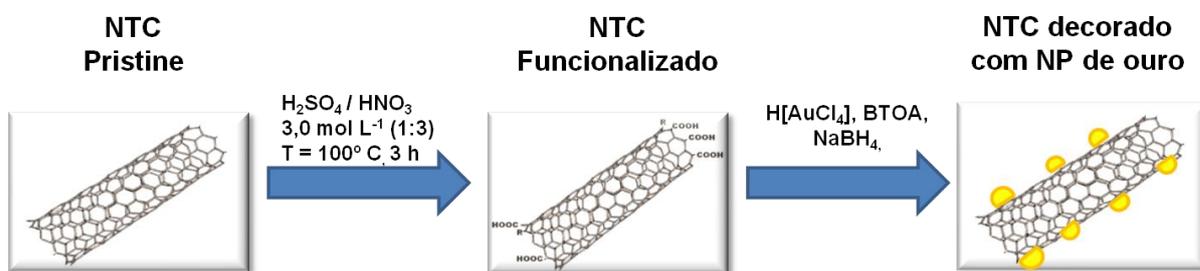


2.4.1.3 Síntese dos nanocompósitos entre NTC-NPAu

Em um balão de fundo redondo contendo 1,0 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol}$), adicionou-se 10 mL de uma solução contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4\text{Br}$ em tolueno ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol}$) e 5 mg de NTCs funcionalizados. Agitou-se a solução em banho de ultrassom por 10 minutos para garantir uma boa dispersão dos nanotubos em tolueno, antes da adição ao balão de reação. A mistura bifásica permaneceu sob agitação por 10 minutos e, adicionou-se gota a gota 1,6 mL de uma solução aquosa $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de NaBH_4 ($6,3 \times 10^{-4} \text{ mol}$) com o auxílio de pipeta *pasteur*. Transcorrida uma hora de reação, as fases foram separadas, sendo a parte orgânica reservada. A suspensão foi centrifugada a 4000 RPM e separou-se o sólido, o qual foi três vezes lavado com etanol e submetido à centrifugação. Secou-se o sólido resultante em estufa a 50°C por 12 horas.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando concentrações de $6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 , totalizando desta forma três compósitos diferentes, que serão chamados de NTC-NPAu01, NTC-NPAu02 e NTC-NPAu03, respectivamente. Na FIGURA 22 encontra-se o diagrama esquemático resumindo as etapas de síntese dos nanocompósitos NTC-NPAu.

FIGURA 22 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO RESUMINDO AS ETAPAS DE SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS NTC-NPAu



2.4.2 Caracterizações estruturais

2.4.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no microscópio JEOL, modelo JEM 1200, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. As amostras foram preparadas adicionando-se com auxílio de uma micropipeta, uma gota da dispersão dos nanocompósitos (0,5 mg em 2mL de água destilada e sonicado por 5 minutos em banho de ultrassom), sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono e deixadas em repouso por duas horas a 35° C em estufa. A voltagem do filamento de tungstênio foi ajustada em 120 kV. Os tratamentos de imagens bem como a estimativa do tamanho médio de partículas foi realizado com o auxílio do software GatanC®.

2.4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no microscópio TESCAN, modelo MIRA III, equipado com filamento FEG e utilizando a voltagem de 10 kV, sem recobrimento com ouro.

2.4.2.3 Espectroscopia RAMAN

As análises de espectroscopia RAMAN foram feitas no Centro de microscopia eletrônica da UFPR, marca Witec® e modelo Alpha 300, utilizando laser verde de comprimento de onda de 532 nm. Os espectros foram normalizados em relação à banda D dos NTCs funcionalizados centrada em 1342 cm⁻¹.

2.4.2.4 Análise termogravimétrica

Os dados de análise termogravimétrica (ATG) foram obtidos em um equipamento SDT Q600 (TA Instruments®) sob uma atmosfera de ar sintético (White Martins), fluxo de 100 mL min⁻¹, com uma taxa de aquecimento de 5° C min⁻¹.

2.4.2.5 Difractometria de raios-x

As caracterizações por DRX foram realizadas utilizando Difrátômetro Shimadzu®, modelo XRD-3A selecionando a radiação Cu K α em voltagem e corrente de 40 KV e 40 mA respectivamente e resolução de 0.02 θ .

2.4.3 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato μ Autolab® Type III, a coleta de dados foi obtida com auxílio do software NOVA versão 1.10. Foram utilizados eletrodos de Ag/AgCl/KCl sat.) como eletrodo de referência, eletrodo de platina como eletrodo auxiliar e eletrodos de carbono vítreo (ECV) modificados com o compósito em questão como eletrodo de trabalho. Os dados coletados foram tratados com o software Origin PRO8®.

2.4.3.1 Preparação dos ECV modificados com o nanocompósito NTC-NPAu

O eletrodo de carbono vítreo (ECV, $\Phi = 1,5$ mm) foi submetido a procedimento de limpeza e ativação, onde foi cuidadosamente polido com suspensões de micropartículas de alumina de 0,3 e 0,05 μ m, respectivamente. Em seguida, o mesmo foi lavado abundantemente com água Milli-Q. e submetido à voltametria cíclica no intervalo de -1,0 a +1,0 V (vs. Ag/AgCl/KCl sat) utilizando H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte, $v = 50$ mV s⁻¹, por 20 ciclos. Após enxague e secagem, os eletrodos foram modificados utilizando uma micropipeta e 3,0 μ L de uma dispersão do nanocompósito 1,0 mg mL⁻¹ em Nafion® 0,05 % em isopropanol e aguardado a total secura da superfície do eletrodo.

2.4.3.2 Detecção de dopamina em presença de ácido ascórbico e ácido úrico

As soluções estoque de dopamina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e ácido ascórbico ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foram feitas em meio de tampão acetato (pH 4,5) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução estoque de ácido úrico ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) foi dissolvida em NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e todas preparadas imediatamente antes do uso para evitar a degradação química.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Síntese e caracterização de nanocompósitos entre nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro

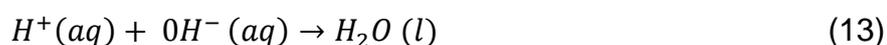
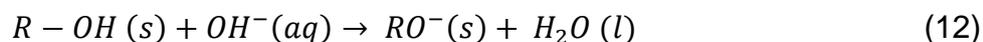
2.5.1.1 Funcionalização dos nanotubos de carbono

Os tratamentos químicos dos NTCs são aplicados devido à necessidade de modificação das características químicas superficiais (aumento da polaridade da superfície e melhor solubilização em solventes polares, aumento do número de imperfeições e maior reatividade) para diferentes aplicações.

Neste trabalho, foram utilizadas duas metodologias para a funcionalização da superfície: o tratamento oxidativo dos NTCs utilizando refluxo ácido ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nesse caso, a estimativa da quantidade de grupos carboxílicos foi realizada por retrotitulação ácido-base ou titulação indireta, já que os grupos carboxílicos normalmente apresentam-se como ácidos fracos com constantes de acidez da ordem de 10^{-4} a 10^{-6} (Skoog *et al.*, 2006) portanto a retrotitulação é indicada principalmente quando a velocidade da reação direta não é compatível com a titulação ou quando a amostra não é solúvel em água, mas é solúvel no reagente da titulação direta ou ainda quando não se tem indicador adequado à titulação. No caso dos NTCs e materiais carbonáceos em geral, a reação de neutralização dos grupos ácidos é lenta, havendo a necessidade de uma etapa de neutralização que pode levar de 8 a 12 horas (Oickle *et al.*, 2010). O indicador utilizado nestas medidas foi um eletrodo de pH (titulação potenciométrica), que apresenta menores desvios quando comparado com a utilização de indicadores colorimétricos, já que o ponto final da titulação depende da visualização do analista. Adicionalmente, neste

caso, é inviável na presença dos NTCs que tornam impossível a verificação do ponto de viragem.

Uma massa conhecida de NTCs foi suspensa em um volume de NaOH, previamente padronizado, a qual pode reagir quantitativamente com os íons H^+ provenientes dos carboxilatos ($pK_a \sim 4$), lactônicos ($pK_a \sim 6$) e fenólicos ($pK_a \sim 10$). Para fins de simplificação, nas equações (12 e 14) estão descritas as reações envolvendo as espécies oxigenadas que são neutralizadas, onde R refere-se a todo radical que não envolve o oxigênio ácido que sofre reação. Com a adição de base em excesso todos os grupos ácidos são neutralizados, como pode se visto na Equação (12). A amostra então é submetida à titulação com HCl e, em um primeiro momento, toda hidroxila não reagente é neutralizada, gerando o primeiro ponto de equivalência da curva (PEq 1) e esta etapa é representada pela Equação (13). Em seguida, a adição de ácido gera a protonação dos grupos ácidos e ao final de tal processo, a variação brusca do pH da solução indica o segundo ponto de equivalência (PEq 2) e a reação está descrita na Equação (14).



O volume de ácido ($V_{n(ROH)}$) e a quantidade de matéria em mol (n) utilizado na protonação dos grupos ácidos pode ser encontrado através da diferença entre os dois pontos de equivalência. Levando em consideração que a estequiometria de neutralização ácido-base é de 1:1 em ambas as protonações:

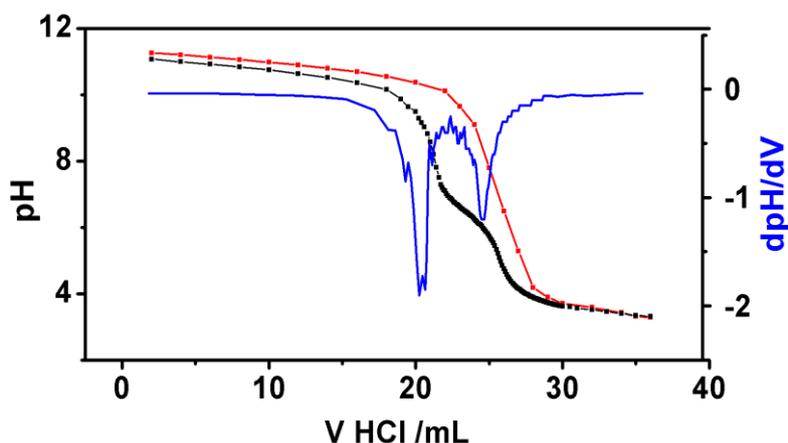
$$V_{n(ROH)} = V_{eq2} - V_{eq1} \quad (15)$$

$$V_{n(ROH)} \times C_{NaOH} = n NaOH = n HCl = n ROH \quad (16)$$

Na FIGURA 23 encontram-se as curvas de titulação para NTCs tratados pelo tratamento com H_2O_2 e a curva do branco, somente com NaOH, onde pode-se perceber os dois pontos de equivalência, bem como a curva da primeira derivada do pH em função do volume de ácido adicionado. É possível inferior

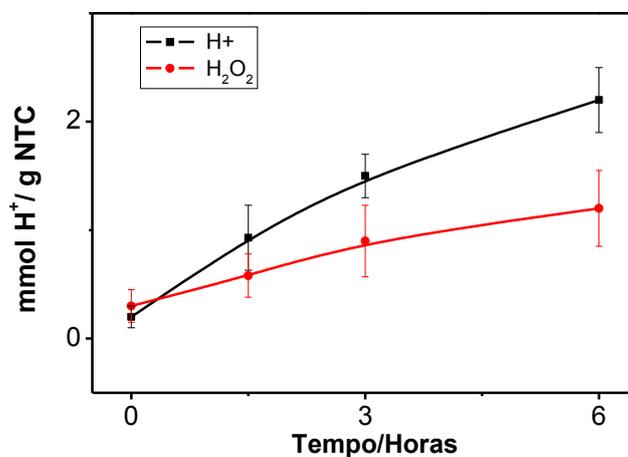
com maior precisão o ponto de equivalência e assim quantificar os grupos ácidos.

FIGURA 23 - CURVA DE TITULAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE NTCs UTILIZANDO HCl COMO TITULANTE (■ SOLUÇÃO DE NaOH, ■ SOLUÇÃO DE NaOH E SUSPENSÃO DE NTCs), ■ PRIMEIRA DERIVADA DO pH EM FUNÇÃO DO VOLUME DE NaOH ADICIONADO.



Visando determinar o melhor procedimento de funcionalização e tempo de reação, as amostras de NTCs foram tituladas antes (*NTC-pristine*) e após o procedimento de oxidação. Na FIGURA 24 encontram-se apresentados os teores de grupamentos ácidos em função do tempo de reação. Pode-se concluir que após três horas de reação, a funcionalização da superfície não apresenta um crescimento significativo, não diferindo em relação a 6 horas de reação.

FIGURA 24 - TEOR DE GRUPOS CARBOXÍLICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TIPO DE TRATAMENTO OXIDATIVO ADOTADO PARA OS NTCs EM MEIO ÁCIDO (NTC H^+) E EM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (NTC H_2O_2)

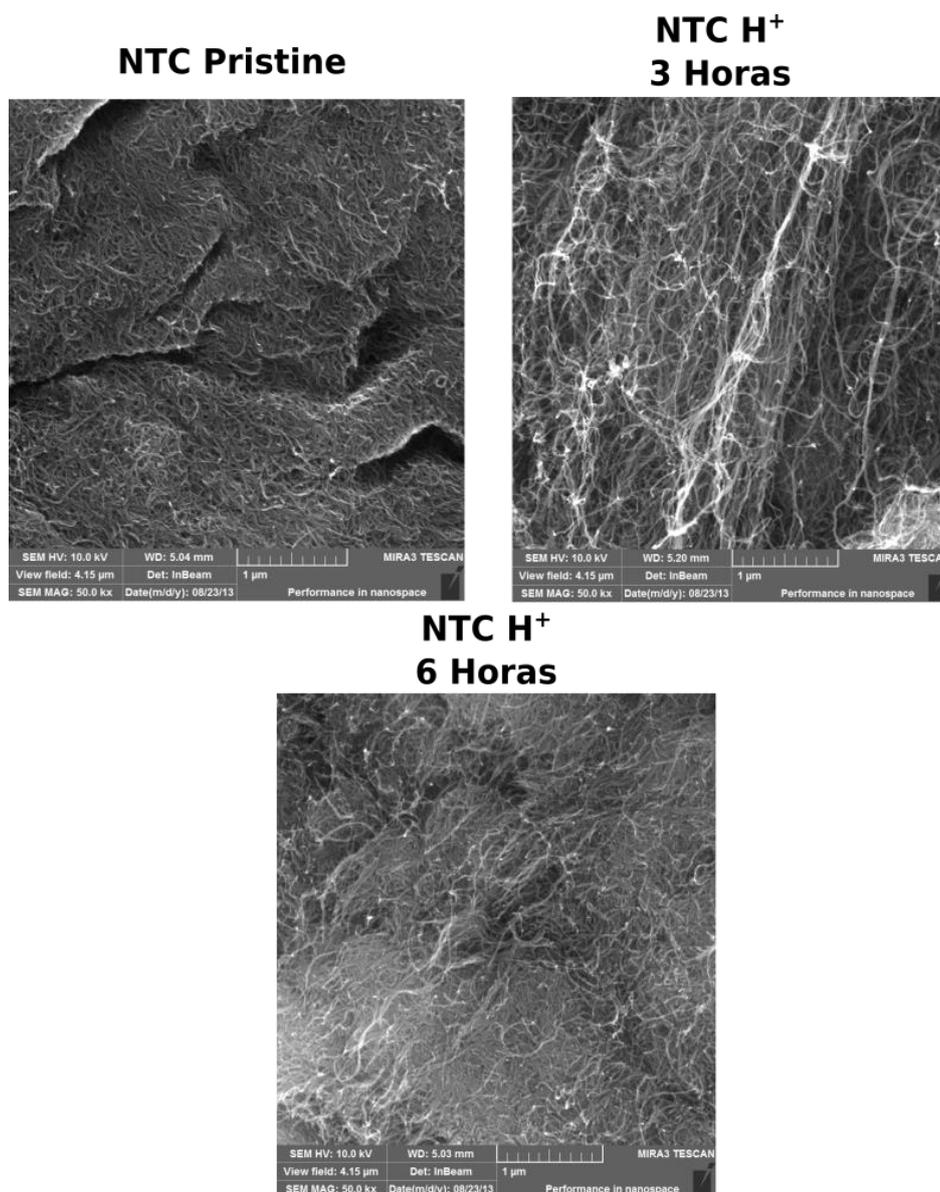


Desta forma, no que tange os teores de acidez, o tratamento ácido apresentou valores superiores ao tratamento com peróxido de hidrogênio. Para três horas de reação o tratamento ácido apresentou valores de $1,5 (\pm 0,2)$ mmol g^{-1} (milimol de H^+ por grama de NTC) para os NTCs funcionalizados, $0,9 (\pm 0,3)$ mmol g^{-1} e $0,3 \pm 0,2$ mmol g^{-1} para NTC-*pristine*. Esses valores estão em concordância com os encontrados em outros trabalhos, onde a quantidade de H^+ encontra-se na faixa entre 1,0 e 3,0 mmol g^{-1} (González-Guerrero *et al.*, 2008; Saleh, 2011). Com os resultados apresentados nesse estudo, os NTCs submetidos ao tratamento ácido (HNO_3 e H_2SO_4) por três horas de refluxo, daqui em diante chamados NTC H^+ , foram escolhidos como método de funcionalização superficial para estudos posteriores.

2.5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura dos NTCs

Imagens de MEV dos NTCs antes e após o tratamento químico de 3 horas foram obtidas (FIGURA 25). É possível observar que a grande diferença morfológica entre os dois nanomateriais é de que, após o tratamento químico por três horas, os NTCs adquirem um aspecto menos compacto, diminuindo a presença de aglomerados e bandos e aumentando a homogeneidade das dispersões em solventes polares. Outra característica adquirida após o tratamento químico é a facilidade e estabilidade de dispersão em água que a introdução de grupos polares na superfície dos NTCs proporciona. As imagens referentes às amostras de 6 horas de tratamento não apresentam diferenças significativas em relação à morfologia apresentada pelas submetidas a três horas de tratamento.

FIGURA 25 - IMAGENS DE MEV DOS NTCs ANTES E APÓS O TRATAMENTO QUÍMICO

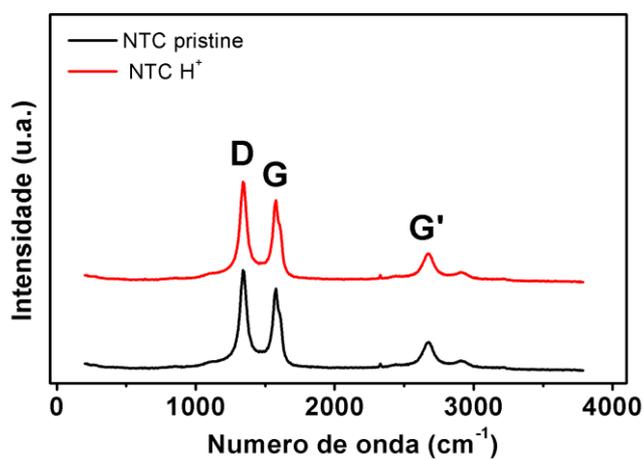


2.5.1.3 Espectroscopia RAMAN dos nanotubos de carbono e análise termogravimétrica

Por meio da análise por espectroscopia vibracional RAMAN foi possível observar a presença de bandas características dos NTCs e atribuir algumas variações estruturais ocorridas em função do tratamento ácido. Pelos dados obtidos nos espectros RAMAN que se encontram na FIGURA 26, nota-se em ambos os materiais a presença das bandas D e G em aproximadamente 1340 e 1570 cm^{-1} respectivamente. A banda G é atribuída às vibrações de estiramento

simétrico da ligação C—C no plano (Anton *et al.*, 2008). Já a banda D é um modo vibracional que se torna ativo no RAMAN devido à relaxação induzida por defeitos estruturais como heteroátomos e vacâncias. Ainda, encontra-se a banda G' em aproximadamente 2650 cm^{-1} característica de materiais grafíticos e relacionada à organização estrutural no plano bidimensional (grafeno) (Saito *et al.*, 2003).

FIGURA 26 - ESPECTRO RAMAN DOS NTCs ANTES E APÓS A FUNCIONALIZAÇÃO EM MEIO ÁCIDO



Uma forma recorrente de acompanhar as variações estruturais em materiais grafíticos é verificar a relação de intensidade das bandas I_D/I_G . Quanto menor é a razão I_D/I_G , maior o grau de cristalinidade do material.

TABELA 2 - ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS CARACTERÍSTICAS DE MATERIAIS CARBONÁCEOS ANTES (NTC-PRISTINE) E APÓS TRATAMENTO ÁCIDO (NTC H⁺)

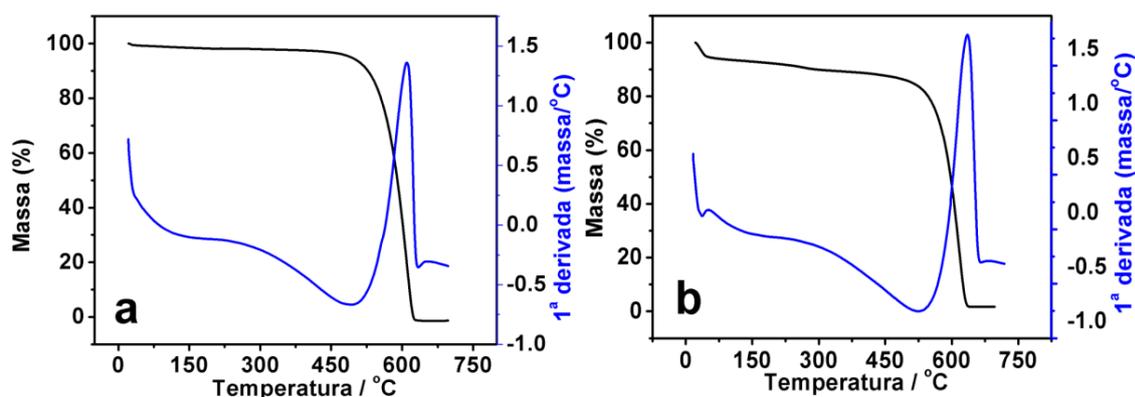
Nanocompósito	Banda D (cm^{-1})	Banda G (cm^{-1})	I_D/I_G
NTC H ⁺	1338	1579	1,13
NTC-pristine	1342	1575	1,09

Acompanhado dos dados resumidos na TABELA 2 percebeu-se que, após o tratamento químico, o material apresenta um menor grau de cristalinidade visto o aumento da razão entre as intensidades das bandas D e G. A oxidação do NTCs promove o aumento no número de defeitos estruturais nas paredes mais externas dos NTCs e como resultado final diminui o caráter cristalino da

amostra. Aumento da relação I_D/I_G normalmente é mais pronunciado em NTCs sintetizados em laboratório, onde há a presença de outras formas alotrópicas, como por exemplo, o carbono amorfo (Oickle *et al.*, 2010; Moraes *et al.*, 2011).

O comportamento de decomposição térmica das amostras antes e após o tratamento químico também foi avaliado por análise termogravimétrica (ATG) em atmosfera contendo ar sintético. Na FIGURA 27 estão apresentadas as curvas de ATG, Verificou-se que, apesar dos perfis semelhantes, o NTC H^+ apresenta decaimento de massa mais acentuado nos primeiros duzentos graus da rampa. Tal variação primeiramente deve-se a dessorção de moléculas de água na superfície do NTC H^+ que possui características mais hidrofílicas que o NTC-*pristine* e por isso tal processo não é evidenciado na amostra antes do tratamento químico. Entre 80°C e 350°C o decaimento refere-se ao processo de oxidação de grupos carboxílicos a CO_2 na superfície gráfica dos NTCs (Osorio *et al.*, 2008).

FIGURA 27 - CURVAS DE TGA/TGD PARA AS AMOSTRAS DE A) NTCs *PRISTINE* E B) SUBMETIDA AO TRATAMENTO OXIDATIVO COM ÁCIDO

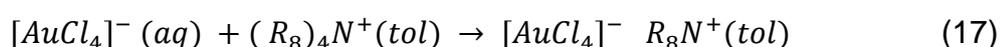


Quanto à temperatura de decomposição dos nanotubos, os materiais apresentaram máximo de termodecomposição em 609° C para o NTC-*pristine* e 616° C para NTC H^+ indicando que o tratamento químico para tais amostras não afeta de forma significativa a estabilidade térmica do material.

2.5.2 Síntese dos nanocompósitos NTC-NPAu

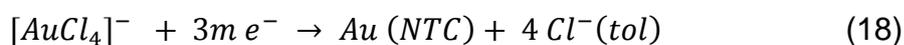
A síntese desses compósitos foi inspirada em uma modificação no método bifásico ou método de Brust (Brust *et al.*, 1994) A reação consiste

basicamente em promover a redução dos íons $AuCl_4^-$ em fase orgânica pelo borohidreto de sódio dissolvido em fase aquosa. De forma mais detalhada, a primeira etapa da reação consiste na transferência dos íons tetracloroaurato da fase aquosa para a fase orgânica através da extração do íon metálico pelo sal quaternário de amônio (TOA), essa transferência de fase pode ser verificada pela perda da coloração amarelo-dourado da solução aquosa, seguida do aparecimento de um alaranjado intenso na fase orgânica. A Equação (17), descrita abaixo indica essa transição de fase:



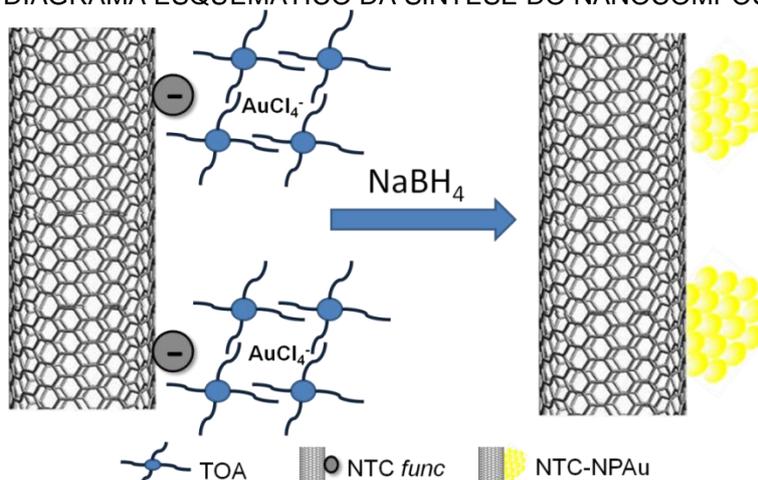
Na presença dos NTCs funcionalizados, os grupos polares devem interagir mais efetivamente com os pares iônicos, de modo que a região próxima a esses grupos permaneçam mais povoada das espécies metálicas devido à atração eletrostática. Durante a redução com o íon borohidreto, a formação de nanopartículas ocorre preferencialmente nas regiões contendo tais grupos funcionais, como pode ser visto no esquema proposto na FIGURA 28. Além disso, as primeiras tentativas de síntese do compósito, utilizando NTCs não tratados, levaram a formação de precipitados de ouro visíveis a olho nu devido à baixa quantidade de grupos polares capazes de nuclear as nanopartículas de forma homogênea na superfície carbonácea (Wu, B. *et al.*, 2011).

A etapa de redução das nanopartículas na superfície dos NTCs também pode ser descrita pela Equação (18):



Levando em consideração a alta área superficial dos NTCs, a necessidade de adição do agente passivante para o controle das partículas torna-se desnecessário devido ao grande número de sítios para nucleação dessas nanopartículas. Do ponto de vista das aplicações eletroquímicas, a presença de agentes passivantes com longas cadeias como o dodecanotiol muitas vezes dificulta a interação entre uma espécie em solução e a superfície da nanopartícula (Gevaerd *et al.*, 2015).

FIGURA 28 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA SÍNTESE DO NANOCOMPÓSITO NTC-NPAu



Fonte: O autor

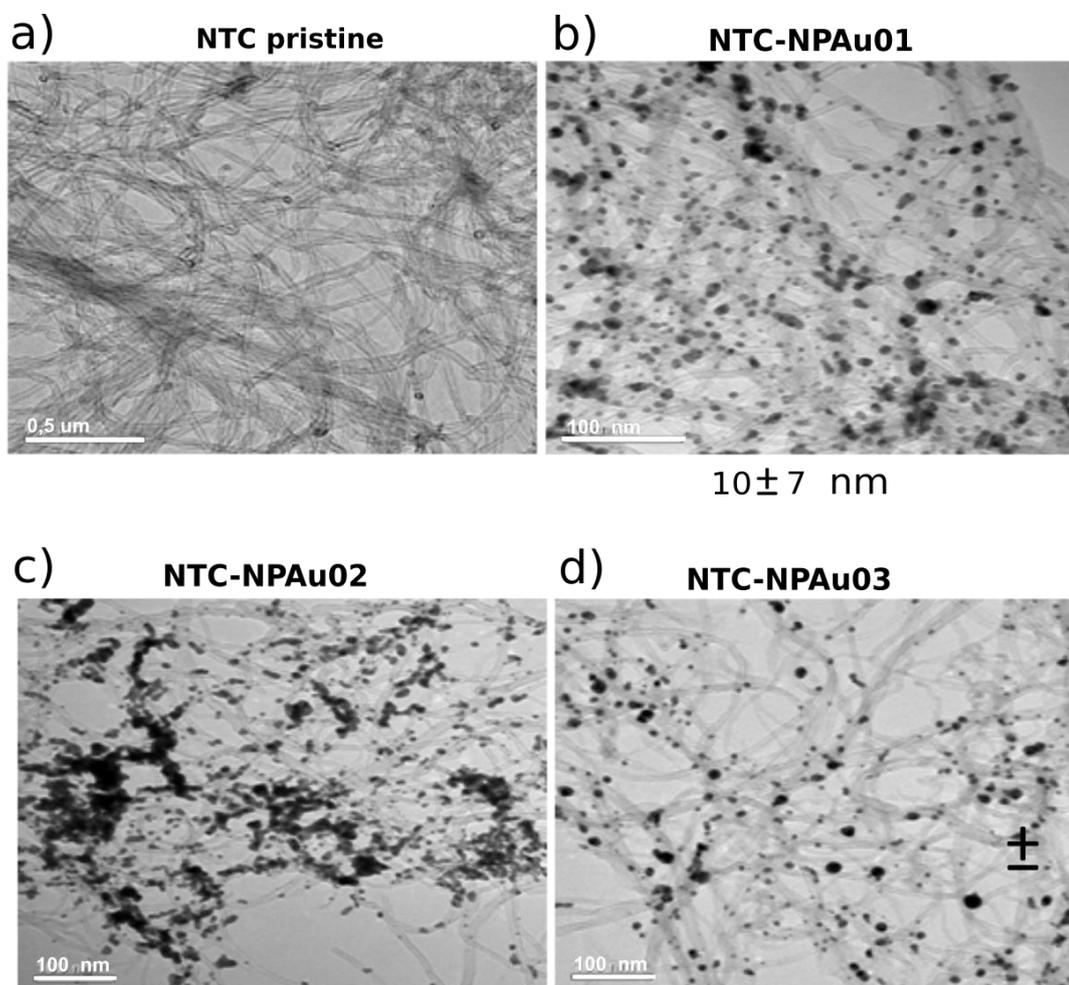
Após a síntese, o material foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Na FIGURA 29 são apresentadas imagens obtidas para os diferentes materiais sintetizados, em que o NTC-*pristine* refere-se aos nanotubos de carbono antes de qualquer reação ou funcionalização. Percebeu-se que esse material é bastante homogêneo e não apresenta nenhum tipo de partícula em sua superfície. Após a reação, há a formação de nanopartículas aderidas a superfície carbonácea, onde são apresentadas as imagens referentes aos nanocompósitos obtidos. O NTC-NPAu01, o qual apresentou uma boa dispersão de tamanho de partículas, através da contagem de 750 partículas para cada compósito, obtendo-se assim, o valor de 10 ± 7 nm como tamanho médio.

Com o objetivo de averiguar a influência da concentração do precursor de ouro na formação das partículas, foi realizada a síntese do nanocompósito, NTC-NPAu02, utilizando o dobro da concentração do ácido tetracloroáurico em relação à rota de obtenção do nanocompósito NTC-NPAu01. Apesar da maior quantidade de metal disponível, pode se observar maior tamanho médio com grande dispersão (32 ± 27 nm), o que indica que a concentração de ouro utilizada inicialmente provê a ocupação todos os sítios de nucleação possíveis.

Para a síntese de um compósito com partículas mais uniformes, utilizou-se uma concentração de íon precursor metálico sendo a metade da concentração da síntese do NTC-NPAu01. Como resultado, houve a formação de partículas menores, com distribuição de tamanho mais estreita (7 ± 4 nm).

Como conclusão desse estudo, as imagens indicam que a menor concentração de ouro estudada leva a formação de compósitos mais uniformes.

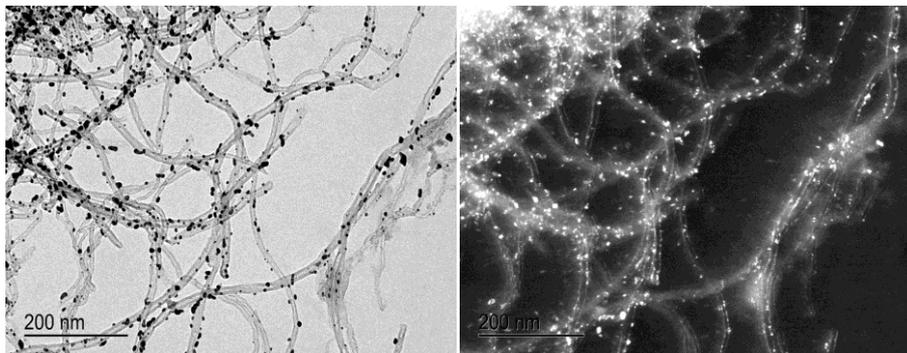
FIGURA 29 - IMAGENS DE MET PARA OS TRÊS COMPÓSITOS SINTETIZADOS E O TAMANHO MÉDIO PARA CADA COMPÓSITO



As imagens de MET são formadas pela interação do feixe de elétrons com a amostra. Grande parte do feixe não sofre desvios, é chamado de feixe transmitido e é responsável pela formação da imagem em campo claro. Porém, uma fração de elétrons que passa pela amostra sofre desvios. A imagem formada em campo escuro refere-se à porção de elétrons que passou pela amostra e foi refratada por um (ou mais de um) planos específicos e pode fornecer informações a respeito da cristalinidade do material (Heimendahl, 1980). No caso deste material, é possível observar que em campo escuro, os pontos de claros correspondem as nanopartículas de ouro atribuídas na imagem

de campo claro. Sugerindo o caráter cristalino dessas nanopartículas (FIGURA 30).

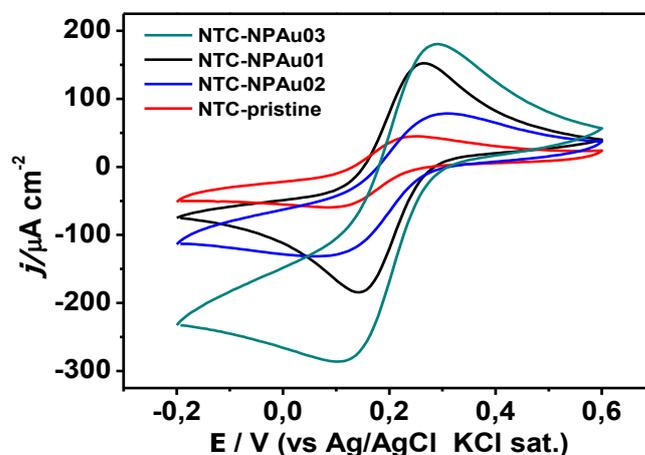
FIGURA 30 - IMAGEM DE CAMPO CLARO E CAMPO ESCURO DO NANOCOMPÓSITO NTC-NPAu 03



2.5.2.1 Comportamento eletroquímico

Um eletrodo de carbono vítreo foi modificado com 3 μL suspensão dos respectivos nanocompósitos em Nafion® 0,05%, que consiste de um polímero perfluorado e sulfonado com alta estabilidade química e eletroquímica (Rubinstein e Bard, 1980), conferindo aderência dos nanomateriais estudados à superfície do ECV. Os comportamentos eletroquímicos frente ao ferricianeto de potássio dos diferentes materiais foram avaliados. Na FIGURA 31 são apresentados os voltamogramas dos ECV modificados, onde se percebe claramente uma variação na intensidade das correntes de pico anódica e catódica. O nanocompósito NTC-NPAu 03 apresentou maior intensidade de corrente.

FIGURA 31 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS DOS DIFERENTES ECV MODIFICADOS. SOLUÇÃO DE $[K_3Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: $NANO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Percebeu-se que além do incremento de corrente observado para os nanocompósitos contendo NPAu em relação ao NTC-*pristine*, as correntes de pico catódica, aumentam consideravelmente e as mesmas podem se vistas na TABELA 3.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CORRENTE DE PICO OBTIDOS NA VOLTAMETRIA CÍCLICA DOS DIFERENTES NANOMATERIAIS EM PRESENÇA DE $K_3[Fe(CN)_6]$

Nanomaterial	ip_a/ip_c
NTC-<i>pristine</i>	0,91
NTC-NPAu01	0,82
NTC-NPAu02	0,61
NTC-NPAu03	0,62

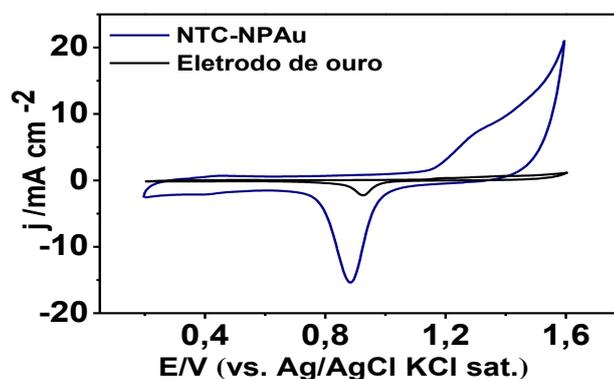
Uma possível explicação para o aumento da corrente catódica para os nanocompósitos contendo NPAu pode estar relacionado com a propriedade de eletrocatalise da redução de oxigênio pelas nanopartículas de ouro (El- Deab e Ohsaka, 2002). A propriedade do ouro em diminui o sobrepotencial desta reação é bastante conhecida, e normalmente os potenciais deste processo encontram-se na mesma região em que a redução de $[Fe(CN)_6]^{4-}$. Para a elucidação desta hipótese, experimentos na ausência de oxigênio são necessários.

Dentre os materiais comparados, o NTC-NPAu03 apresenta a maior corrente para o processo redox a sonda $K_3[Fe(CN)_6]$ indicando que tal

nanomaterial deve ser o mais apropriado para as aplicações como sensor eletroquímico. Tendo em vista todos os dados apresentados, os próximos estudos de caracterizações adicionais e aplicações eletroanalíticas foram feitos com o compósito NTC-NPAu03, que apresentou o melhor desempenho eletroquímico. Daqui em diante o nanocompósito será chamado apenas de NTC-NPAu.

O comportamento eletroquímico do nanocompósito foi investigado por voltametria cíclica em meio ácido. A FIGURA 32 apresenta o voltamograma de um ECV modificado com o nanocompósito NTC-NPAu, onde nota-se a formação de um pico anódico pouco definido em aproximadamente 1,3 V, o qual é atribuído à formação de óxidos e hidróxidos de ouro. Já na varredura catódica, há um pico bem definido na região de 0,9 V que se atribui a redução dos óxidos formados na varredura anódica. A eletroquímica de formação de óxidos de ouro é bem descrita na literatura (Oesch e Janata, 1983). Em relação à estabilidade do material, nota-se que após sucessivas ciclagens o mesmo não apresenta nenhum processo de lixiviação ou inibição do sinal eletroquímico.

FIGURA 32 - VOLTAMETRIA CÍCLICA DO ECV MODIFICADO NTC-NPAu E COMPARAÇÃO COM ELETRODO CONVENCIONAL DE OURO. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, ELETRÓLITO SUPORTE: $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$



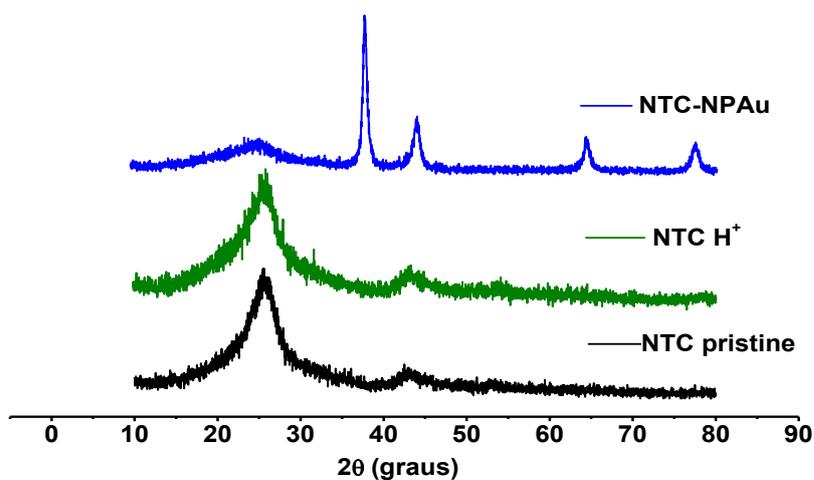
A comparação entre o perfil voltamétrico do nanocompósito e de um eletrodo convencional de ouro foi realizada, onde se percebe que a densidade de corrente para o ECV contendo o nanocompósito em questão é aproximadamente sete vezes maior. Essa diferença pode ser explicada pela alta área superficial das nanopartículas sobre os NTCs que aumenta drasticamente o número de átomos expostos à superfície e conseqüentemente, os átomos passíveis a processos eletroquímicos (Campbell e Compton, 2010).

2.5.2.2 Caracterização por difração de raios-X

Foram realizadas análises de difratometria de raios-X para amostras NTC, NTC H⁺ e NTC-NPAu. Os valores de intensidade de sinal foram normalizados em relação ao pico localizado em $2\theta = 37,9^\circ$, que é referente a difração do plano Au (1 1 1). Os difratogramas encontram-se na FIGURA 33.

Analisando os difratogramas foi possível observar os picos localizados em $2\theta = 26^\circ$ e $43,8^\circ$ referentes aos planos C (0 0 2) e C (1 1 1) das estruturas gráficas que compõe os NTCs (Chew *et al.*). Através do perfil obtido para os NTCs antes e após a funcionalização, observou-se que o tratamento químico não afeta a estrutura cristalina de forma significativa. O padrão de difração dos demais picos ($2\theta = 37,9^\circ$, $44,2^\circ$, $64,4^\circ$ e $77,5^\circ$) são atribuídos a difração do ouro com estrutura cúbica de face centrada, em concordância com perfil JCPDS 04 – 0784 (Sun, Y. G. e Xia, 2002; Oliveira, M. M. e Zarbin, 2008).

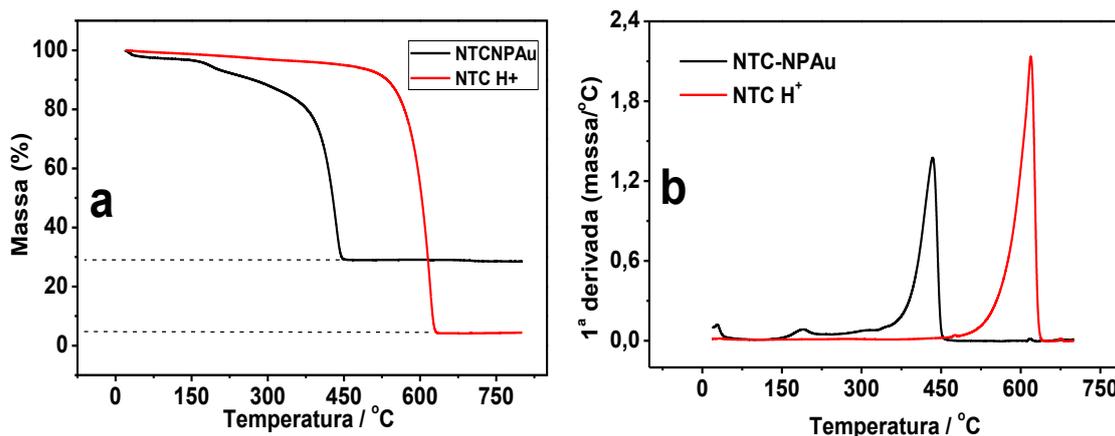
FIGURA 33 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X PARA AS DIFERENTES AMOSTRAS



2.5.2.3 Análise termogravimétrica do nanocompósito NTC-NPAu

O comportamento de decomposição comparativa entre NTC H⁺ e o nanocompósito NTC-NPAu foi acompanhado por análise termogravimétrica em atmosfera de ar sintético e rampa de aquecimento de $5^\circ \text{C min}^{-1}$. Na FIGURA 34 encontram se os gráficos de ATG para os materiais em estudo.

FIGURA 34 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS NTCS H⁺ E O COMPÓSITO NTC-NPAu: a) CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA b) CURVA TERMOGRAVIMÉTRICA DIFERENCIAL



Observou-se que após a introdução das NPAu sobre os NTCs a temperatura de decomposição decai drasticamente, de 615° C para 433° C. Este resultado encontra-se em concordância com outros estudos de termodecomposição dessa classe de nanocompósitos. Lourençon e colaboradores (Lourençon *et al.*, 2011) investigaram a variação da temperatura de decomposição de NTC-*pristine* na ausência e presença de NPAu e perceberam variações similares. Através do cálculo da energia (E_a) de ativação envolvendo a termodecomposição dos NTCs, foram encontrados valores menores de E_a para os compósitos decorados com ouro. Tais resultados podem ser explicados pela capacidade de decomposição catalítica da molécula de O_2 em oxigênio atômico na presença das NPAu e subsequente transferência para o NTC, iniciando o processo de oxidação dos nanotubos de maneira mais efetiva e em temperaturas mais baixas. Esse processo é conhecido como *spillover*.

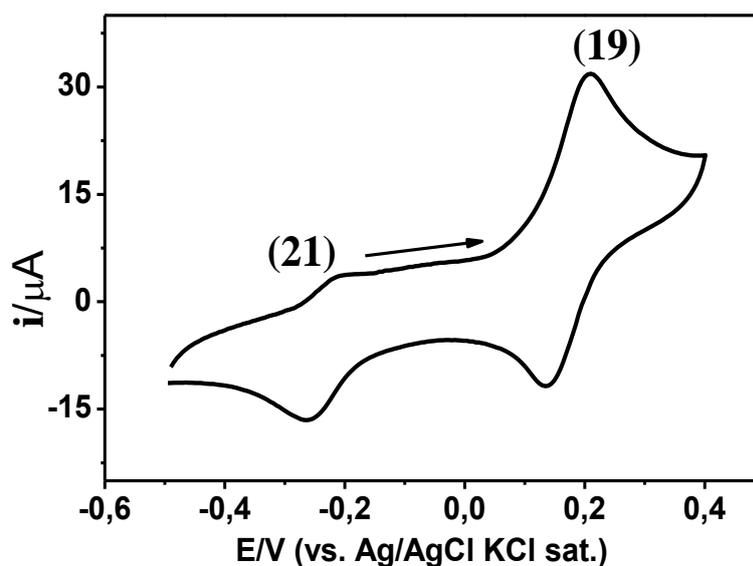
A porcentagem em massa de ouro no nanocompósito foi calculada com base na diferença entre a massa residual do NTC-NPAu e NTC H⁺. O valor encontrado foi de 21%, o qual se encontra em concordância com os valores encontrados para outros nanocompósitos entre NTC e NPAu descritos na literatura (Lourençon *et al.*, 2015).

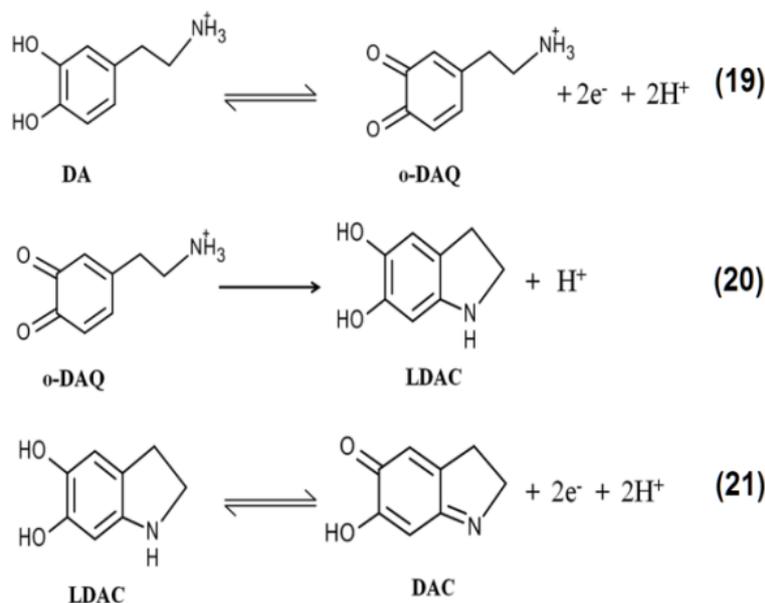
2.5.3 Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para detecção de dopamina utilizando o nanocompósito NTC-NPAu

2.5.3.1 Detecção de Dopamina na presença de ácido úrico e ácido ascórbico

O comportamento eletroquímico da dopamina na presença do nanocompósito NTC-NPAu foi avaliado pela técnica de voltametria cíclica. Na FIGURA 35 é apresentado o voltamograma cíclico de dopamina onde iniciando a varredura de potencial em 0,0 V no sentido anódico, foram encontrados dois pares de picos.

FIGURA 35 - VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DE ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu CONTENDO SOLUÇÃO DE DOPAMINA, $C_{DA} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ E AS RESPECTIVAS REAÇÕES





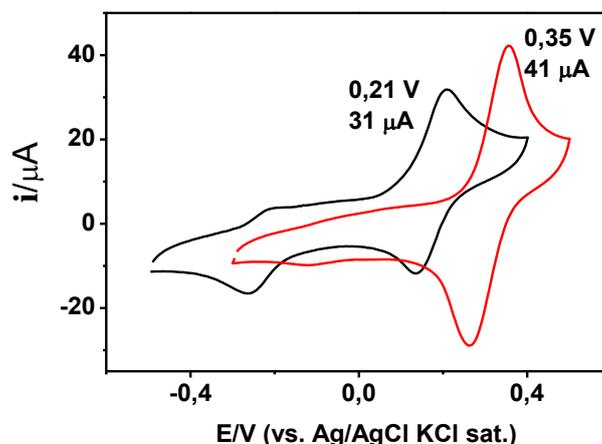
O potencial formal para o primeiro par, $(E_{pa} + E_{pc})/2$, que é de 0,165 V, refere-se à oxidação de DA para dopamina-ortoquinona (o-DAQ) com a perda de dois elétrons (Equação 19). No sentido inverso de varredura, a o-DAQ produzida pode ser eletroquimicamente reduzida à dopamina ou pode sofrer uma reação química de fechamento de anel (Equação 20) levando a formação de leucodopaminacromo (LDAC). A LDAC, por fim, pode ser novamente oxidada frente à aplicação de um potencial e produzir a dopaminocromo (DAC) (Zhao, Y. *et al.*, 2005) e este apresenta o potencial formal do segundo par redox (Equação 21) de -0,23 V.

Um indício da ocorrência do mecanismo proposto pode ser evidenciado pela VC com varredura em sentido contrário ao utilizado na FIGURA 35, onde partindo do potencial inicial de 0,0 V em sentido negativo não há a ocorrência do par redox da Equação (21). Esse fato é concordante com a ausência de o-DAQ gerada eletroquimicamente, que é a responsável pela formação do intermediário LDAC pela oxidação de DA.

2.5.3.2 Estudo do efeito do pH no comportamento voltamétrico da dopamina

O comportamento voltamétrico da dopamina foi avaliado utilizando dois eletrólitos suporte tamponados. Na FIGURA 36 encontram-se os voltamogramas cíclicos da dopamina na mesma concentração.

FIGURA 36 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE UM ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu DOPAMINA (—) TAMPÃO ACETATO 0,1 mol L⁻¹ pH 4,5 (---) TAMPÃO FOSFATO mol L⁻¹ pH 7,0, C_{DA} = 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ v = 50 mV s⁻¹

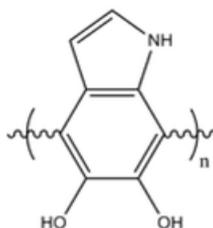


O comportamento eletroquímico da DA apresentou comportamento distinto para os dois tampões testados. Para o tampão acetato, os potenciais redox foram deslocados para potenciais mais positivos, ($\Delta E = 0,16$ V) com aumento de corrente ($\Delta i = 10$ μA) em relação ao tampão fosfato. Além do considerável aumento de corrente de pico, nota-se a diminuição da corrente de pico para o par LDAC /DAC na presença de tampão acetato. Isso ocorre porque a reação de ciclização do substituinte alquilamino da cadeia lateral é dependente da desprotonação do grupamento amino. Em alguns casos, a detecção de DA por VC em meio alcalino torna-se difícil devido à extensão da ocorrência da etapa química, onde a intensidade de pico do par LDAC /DAC torna-se maior que o par DA/o-DAQ (Muguruma *et al.*, 2016). Assim, em tampão acetato, a parcela o-DAQ com grupo amino desprotonado é menor em comparação ao tampão fosfato, levando a menor formação de LDAC. Para efeitos de comparação, a comparação entre sinais em diferentes valores de pH são realizadas no mesmo eletrólito suporte. Porém o tampão fosfato apresenta baixa capacidade tamponante em pH 4,5.

A presença do par LDAC/DAC mostra-se como um obstáculo na determinação eletroquímica de DA, pois a LDAC é o precursor da poli-dopamina (FIGURA 37). Quando esse polímero é formado na superfície do eletrodo, ocorre a inativação dos processos eletroquímicos, o qual pode ser usado para revestimento de superfícies com biocompatibilidade. Wang e colaboradores descrevem a formação de poli-dopamina através da VC em pH 7,4 e

demonstram que a partir de 15 ciclos consecutivos, a corrente de pico para a oxidação de DA cai em 95% (Wang, J.-L. *et al.*, 2014).

FIGURA 37 - ESTRUTURA DA POLI-DOPAMINA

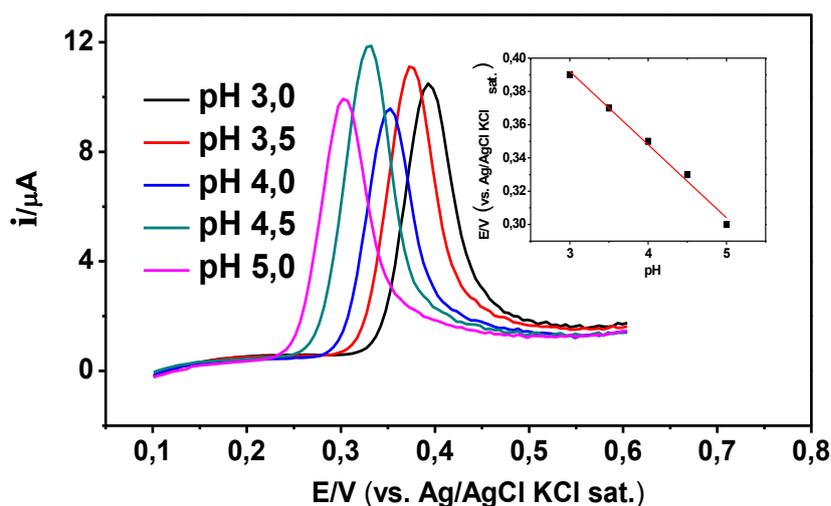


Fonte: O autor.

Devido à maior intensidade de corrente, que indica maior sinal analítico e minimização da formação do par LDAC /DAC, o tampão acetato foi escolhido como eletrólito para as demais análises.

A variação do comportamento eletroquímico da dopamina foi avaliada na faixa de pH de 3,0 a 5,0 utilizando voltametria linear e tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito. Na FIGURA 38 encontram-se os voltamogramas para os diferentes valores de pH verificados.

FIGURA 38 - VOLTAMOGRAMAS LINEARES DE UM ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu NA PRESENÇA DE DOPAMINA EM DIFERENTES VALORES DE pH UTILIZANDO TAMPÃO ACETATO 0,1 mol L⁻¹, C_{DA} = 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ v = 50 mV s⁻¹



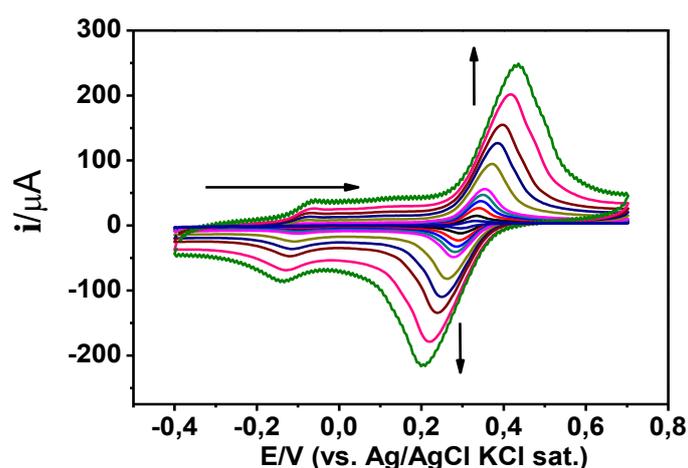
Ao analisar os voltamogramas da FIGURA 38 observa-se que os valores de potenciais são deslocados para regiões mais positivas com a diminuição do pH. O comportamento do pH com i_{pa} não apresentou relação direta.

Normalmente, são esperadas duas classes de grupos carboxilas nas superfícies com estruturas semelhantes ao grafeno, como no caso dos NTCs: os primeiros grupos carboxílicos, chamados de mais ácidos com $pK_a \sim 4$ e os menos ácidos com $pK_a \sim 6$ (Orth *et al.*, 2016). Essa variação pode acontecer devido aos efeitos indutivos de vizinhança. Assim, a protonação/desprotonação desses grupos com a variação do pH na superfície dos NTC-NPAu pode dificultar o comportamento preditivo. A relação entre o potencial de pico de oxidação e pH da solução apresentou variação linear e o coeficiente de 44 mV pH^{-1} . Para os demais estudos, o pH 4,5 foi escolhido como o mais adequado pó apresentar maior intensidade de corrente de pico.

2.5.3.3 Estudo da Velocidade de Varredura

Este estudo foi realizado com o objetivo de investigar o grau de reversibilidade e o processo de transporte de massa do material eletroativo até a superfície do eletrodo. Na FIGURA 39 encontram-se os voltamogramas cíclicos de DA em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 em diferentes velocidades de varredura.

FIGURA 39 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA AS DIFERENTES VELOCIDADES DE VARREDURA (2, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 E 200 mV s^{-1}). $C_{DA} = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, ET: ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu



Através da equação de Randles-Sevcik, descrita na Equação (22), a qual relaciona a corrente de pico (i_p , A) de um determinado processo eletroquímico como proporcional, dentre outros fatores, à área ativa do eletrodo (A , cm^2) e a

raiz quadrada da velocidade de varredura (v , $V s^{-1}$), coeficiente de difusão (D , $cm^2 s^{-1}$) e a concentração da espécie em solução (C_0 , $mol cm^{-3}$). Se em uma medida eletroquímica todos os parâmetros envolvidos na equação são mantidos constantes e a velocidade de varredura é variada, é possível inferir algumas características relacionadas ao transporte de massa de tal processo eletroquímico.

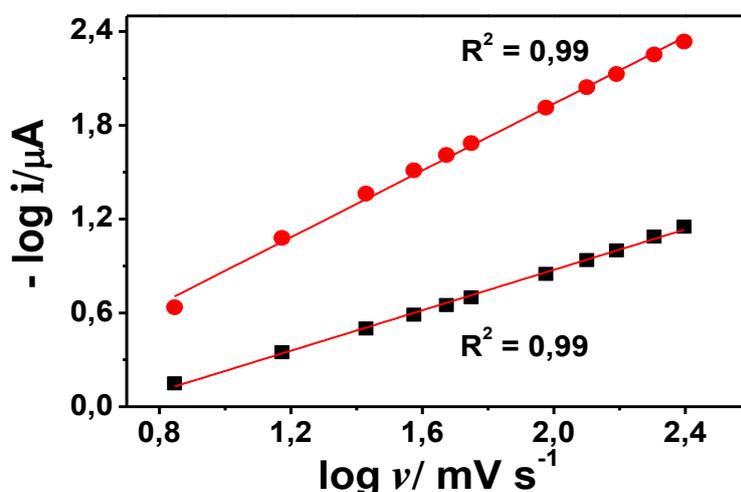
$$i_p = 2,69 \times 10^{-5} n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (22)$$

O potencial formal de oxidação do primeiro par redox da dopamina, inicialmente citado como 0,165 V tem um deslocamento com o aumento da velocidade de varredura, para valores mais positivos para a oxidação e mais negativos para a redução. Pelo critério de variação de potencial de pico, Equação (23), as velocidades de varredura intermediárias apresentaram valores de n próximos de dois. A relação entre corrente de pico catódica e anódica, a qual segue a relação $I_{pa}/I_{pc} = 1$ para um sistema reversível simples, apresentou valores superiores a um indicando que outros processos como fatores cinéticos e/ou reações homogêneas acopladas ao processo de transferência entre a espécie redox e o eletrodo podem ser os responsáveis por tal comportamento (Wang, J., 1994).

$$\frac{E_{pa} - E_{pc}}{n} = 59 mV \quad (23)$$

Os processos de transferência de massa entre a espécie redox e a superfície do eletrodo foi avaliado por gráficos de $\log i_p$ vs $\log v$ obtidos através do estudo da influência da velocidade de varredura, cujos resultados estão apresentados na FIGURA 40.

FIGURA 40 - RELAÇÃO ENTRE $\log i_p$ vs $\log \nu$ (■) REFERE-SE AO PROCESSO ANÓDICO E (●) REFERE-SE AO PROCESSO CATÓDICO DA DOPAMINA

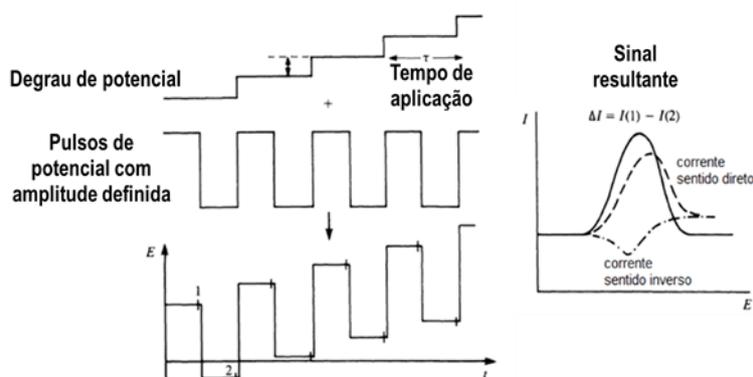


A variação linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura indica que o processo de transferência de massa da solução para a superfície do eletrodo ocorre através de processo misto apresentando inclinação da reta (θ) de 0,64 e 1 para o processo anódico e catódico respectivamente. Valores de θ entre 0,5 e 1 indicam processo misto, ou seja, existe a contribuição de componentes difusionais e adsorptivos no processo. Tal fenômeno pôde ser facilmente observado experimentalmente através da voltametria cíclica de uma solução branco contendo apenas eletrólito suporte, onde após a varredura na presença de dopamina, do pico característico da oxidação de DA é perceptível por aproximadamente 10 ciclos.

2.5.3.4 Estudo da reversibilidade da oxidação da dopamina por voltametria de onda quadrada

Uma das formas de verificação da reversibilidade de uma dada reação eletroquímica sobre um eletrodo é utilizar a voltametria de onda quadrada (Wang, J., 1994). A SWV consiste na aplicação de pulsos de potencial em forma de onda quadrada a uma rampa de potencial (FIGURA 41).

FIGURA 41 - PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA SWV



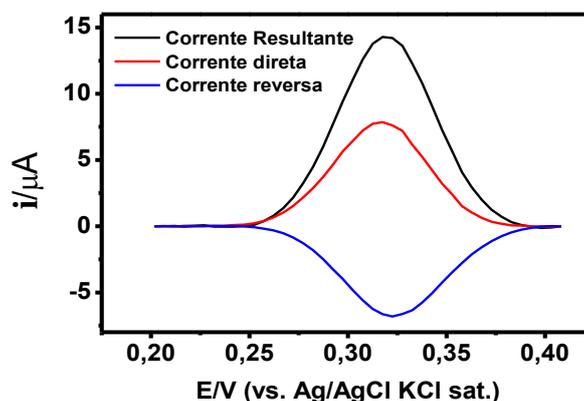
FONTE: (Souza *et al.*, 2003)

Nesta técnica eletroquímica, a corrente resultante (i) é dada como o somatório das correntes: direta (i_d) e a corrente reversa (i_r), descrita pela Equação (24):

$$i_D - i_R = i \quad (24)$$

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para os diferentes modos de varredura estão apresentados na FIGURA 42. Para o sistema contendo uma solução de dopamina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato foi possível observar que a corrente resultante é formada pela corrente direta, porém apresenta grande contribuição da corrente reversa, indicando assim um sistema reversível. Assim, a técnica de SWV pode ser utilizada para resultados mais satisfatórios no desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de DA.

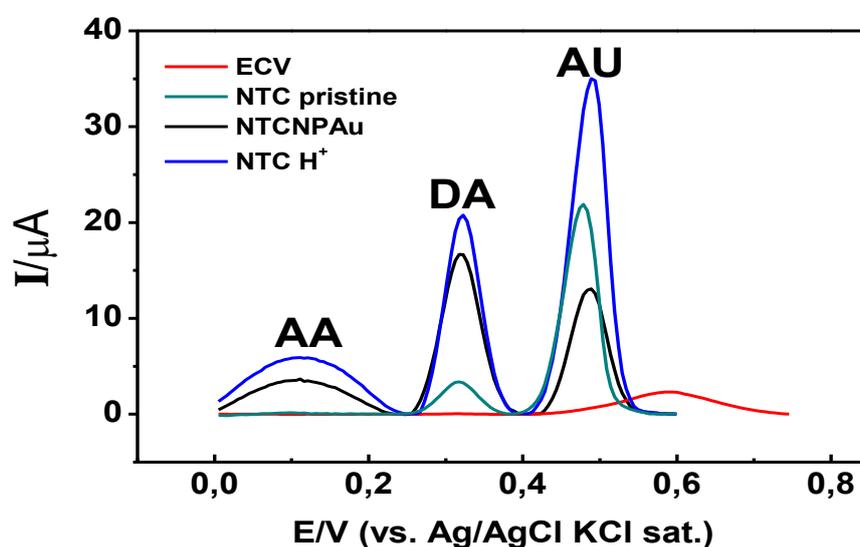
FIGURA 42 - VOLTAMOGRAMA DE ONDA QUADRADA DE UM ECV MODIFICADO COM NTC-NPAu EM SOLUÇÃO DE DOPAMINA $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 4,5 α : 40 mV, E_{step} : 5 mV f : 12 Hz.



2.5.3.5 Determinação eletroquímica de dopamina na presença de ácido ascórbico e ácido úrico utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada

Foi avaliada a potencialidade eletroanalítica do uso do compósito NTC-NPAu para a detecção de Dopamina na presença de ácido ascórbico e ácido úrico. A detecção de dopamina (pK_a 9,9) em amostras biológicas costuma apresentar alguns entraves como a presença de ácido ascórbico (pK_a 4,2 e 11,6), geralmente em concentrações de cem a mil vezes maior que a concentração de dopamina. O ácido úrico (pK_a 5,4 e 10) é outra espécie eletroativa presente em fluidos biológicos, pois é resultantes da degradação de guanina e adenina (Wightman *et al.*, 1988; Venton e Wightman, 2003). Além disso, a sobreposição dos sinais eletroquímicos pode ocorrer, levando a perda de seletividade (O'Neill, 1994; Salimi *et al.*, 2006). Na FIGURA 43 encontram-se os voltamogramas obtidos para uma solução contendo DA na presença de AA e AU.

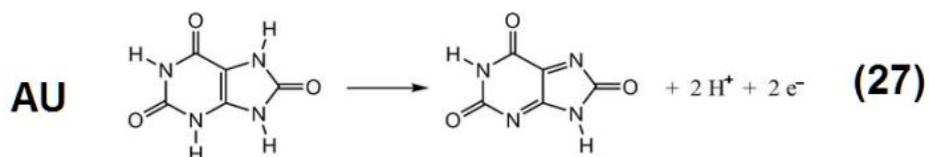
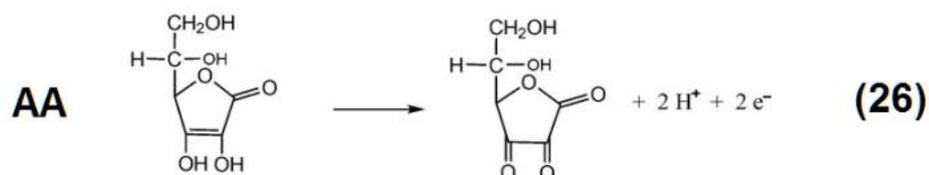
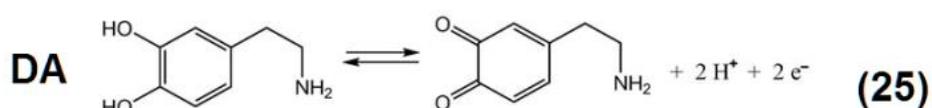
FIGURA 43 - VOLTAMOGRAMA DE ONDA QUADRADA PARA SOLUÇÃO CONTENDO DA $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ NA PRESENÇA DE DE AA E AU $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ EM TAMPÃO ACETATO pH 4,5 a = 20 mV, $f = 12 \text{ Hz}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$



Através dos voltamogramas apresentados na FIGURA 43 foi possível observar que na concentração adicionada, tanto a DA quanto o AA não apresentam sinais eletroquímicos relevantes quando a interface é o carbono vítreo. O AU teve seu potencial deslocado para próximo de 0,6 V, indicando que sua oxidação também é dificultada nesta superfície. Entre os eletrodos

modificados com NTCs e seus derivados, percebeu-se um aumento substancial de corrente para os processos estudados, e em todos os eletrodos modificados o potencial de pico para as espécies foram: 0,11 V para o ácido ascórbico, 0,31 V para DA e 0,48 V para o AU.

Segundo dados da literatura, os processos de oxidação das três espécies podem ser descritos pelas Equações (25, 26 e 27) (Li e Zhang, 2012), onde pode-se concluir que geralmente a oxidação desses componentes é acompanhada da perda de $2\text{H}^+/2\text{e}^-$.



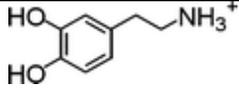
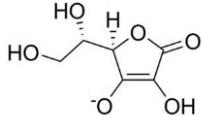
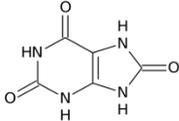
Para que haja uma compreensão dos fenômenos de interface que ocorrem em um sistema eletroquímico relativamente complexo, onde existem três moléculas eletroativas com diferentes comportamentos ácido/base em solução, faz-se necessário tomar nota das formas químicas presentes em solução. A equação de Henderson Hasselback (Wang, J., 1994; Skoog *et al.*, 2006) pode ser empregada para prever a distribuição das espécies ácido-base conjugadas em solução e está descrita na Equação (28), para um ácido genérico HA.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (28)$$

Munidos dos valores de pKa das espécies DA, AA, AU pôde-se encontrar a seguinte distribuição das espécies em pH 4,5 onde a medida eletroquímica foi

realizada. Considerando o pKa referente a primeira protonação, tem-se os resultados resumidos na TABELA 4, onde verificou-se que em relação à carga líquida dessas moléculas em solução, tem-se predominantemente uma espécie catiônica (DA), uma aniônica (AA) e outra neutra (AU).

TABELA 4 - ESPÉCIES PREDOMINANTES NA CÉLULA ELETROQUÍMICA EM pH 4,5

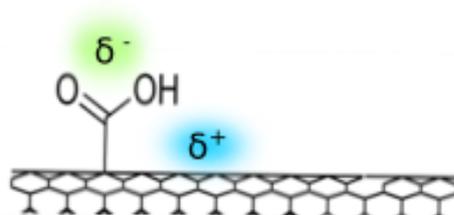
Espécie	pKa	Relação	Forma predominante
DA	10	$[\text{ácido}] = \frac{[\text{base}]}{4 \times 10^{-6}}$	
AA	4,2	$[\text{ácido}] = \frac{[\text{base}]}{2}$	
AU	5,4	$[\text{ácido}] = \frac{[\text{base}]}{0,12}$	

O NTC-*pristine* em comparação aos outros nanomateriais apresentou as menores correntes, indicando que a funcionalização da superfície tem um papel importante na melhora da detecção eletroquímica dessas espécies. Neste caso, o AA apresentou valores de corrente negligenciáveis para a concentração estudada. No entanto, o sinal eletroquímico aparece na forma de um pico largo tanto para o NTC H⁺ como para o NTC-NPAu. Sabe-se que a oxidação do AA ocorre efetivamente em valores de pH acima de 4,0, pois a forma eletroativa é o ascorbato (Compton e Matysik, 1996) e, mesmo este possuindo carga negativa, a oxidação ocorre na superfície do NTC H⁺, provavelmente nas regiões de borda ou de defeitos da rede cristalina do NTC H⁺.

Vale ressaltar também que a funcionalização química da superfície gera os grupos oxigenados, que leva a conceber uma superfície com cargas negativas. Porém, o efeito retirador de elétrons provenientes dos oxigênios de grupos carboxila, carbonila e alcoóis ligados à estrutura de anéis com ressonância de elétrons π dos NTCs (Carey e Sundberg, 1990) precisa ser compensando por regiões de dipolo momentâneo positivo criado por efeito indutivo (FIGURA 44) para haver a eletroneutralidade do sistema. Essas regiões

de dipolos positivos podem ajudar a explicar o comportamento do ascorbato no eletrodo modificado com NTC H⁺.

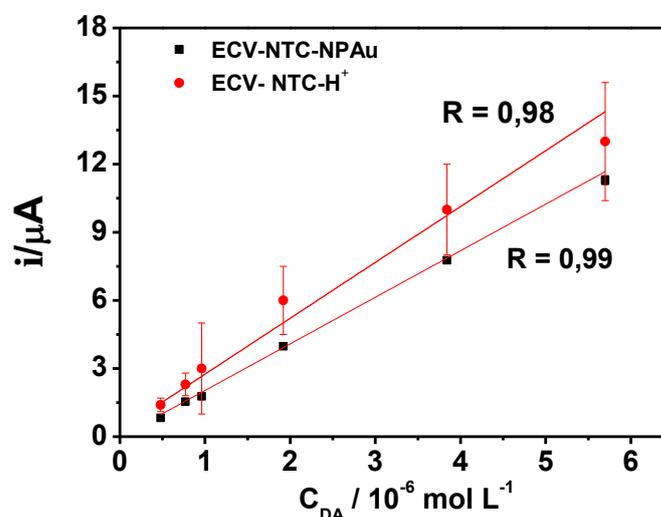
FIGURA 44 - FORMAÇÃO DE DIPOLOS POR EFEITO INDUTIVO



Fonte: O autor

Na detecção de DA, a corrente de pico aumenta consideravelmente do NTC-*pristine* para o NTC H⁺, onde a forma catiônica da DA é predominante na solução. Assim, é provável que a presença de carga positiva na estrutura facilite a chegada deste analito na superfície do eletrodo. Quando a superfície dos NTCs apresenta as NPAu, existe a diminuição da corrente de pico, indicando que a oxidação de DA ocorre de forma menos efetiva na presença das nanopartículas de ouro. Porém durante as sucessivas adições de DA das três espécies no ECV modificado com NTC H⁺, a corrente de pico para DA apresentou uma variação de mais de 10% durante as medidas. A curva analítica de DA para ambos os eletrodos está mostrada na FIGURA 45 onde percebeu-se que as variações de corrente pro composto NTC H⁺ são bastante significativas.

FIGURA 45 - CURVA ANALITICA DE DOPAMINA PARA OS DOIS ELETRODOS MODIFICADOS NA PRESENÇA DE AA E AU $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO pH 4,5



A variação de corrente no nanocompósito NTCH⁺ pode ter relação direta com a adsorção de ácido úrico no eletrodo, o que é relatado na literatura (Gao *et al.*, 2012). Após a medida eletroquímica, o eletrodo de trabalho foi enxaguado vigorosamente com água deionizada e a medida eletroquímica foi repetida na ausência do analito e interferentes. Foi observada corrente de pico para o ácido úrico, o qual teve a diminuição gradativa de sinal com as sucessivas varreduras, indicando a adsorção do mesmo sobre os NTCs e interferindo de forma significativa na detecção de DA. Na TABELA 5 encontram-se os valores de corrente para oxidação de DA na ausência e presença de AA e AU, que podem ajudar a entender o efeito dos interferentes no sinal analítico da dopamina.

TABELA 5 - VARIÇÃO DA i_{pa} DE DA ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE AA E AU $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO pH 4,5

Nanocompósito	AA	AU
NTC H⁺	-2,9 %	-9,8 %
NTC NPAu	-2,4 %	-3,1 %

O ECV modificado com NTC H⁺ apresentou corrente de pico maior que a observada para o compósito NTC-NPAu, porém além da curva analítica com variações de corrente relevantes, a adição de AU apresentou uma diminuição de aproximadamente 10% no sinal analítico da DA, enquanto o ECV modificado com NTC-NPAu apresentou diminuição de 3%. Após a medida eletroquímica, o ET foi enxaguado vigorosamente com água deionizada e a medida eletroquímica foi repetida em uma solução contendo somente o eletrólito suporte. Foi observado corrente de pico para AU, o qual teve a diminuição gradativa de sinal com as sucessivas varreduras, indicando mais uma vez, a adsorção do mesmo sobre os NTC H⁺ e interferindo de forma significativa na detecção de DA.

Por isso, o ECV modificado com NTC-NPAu se mostrou mais promissor no desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a detecção de DA, na presença do interferente dos interferentes estudados. Os demais estudos foram feitos utilizando o nanocompósito NTC-NPAu.

2.5.3.6 Otimização dos parâmetros da técnica para determinação de DA por voltametria de onda quadrada

A técnica de voltametria de onda quadrada, quando utilizada como ferramenta analítica, necessita de um estudo de otimização dos parâmetros que influenciam o sinal obtido de forma quali e quantitativa.

Nos itens a seguir serão discutidos os parâmetros analisados e otimizados na detecção de dopamina por voltametria de onda quadrada. Todas as medidas foram feitas utilizando ET modificados com 3 μL de nanocompósito NTC-NPAu, $C_{\text{DA}} = 9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, eletrólito tampão acetato 0,1 mol L^{-1} em pH 4,5.

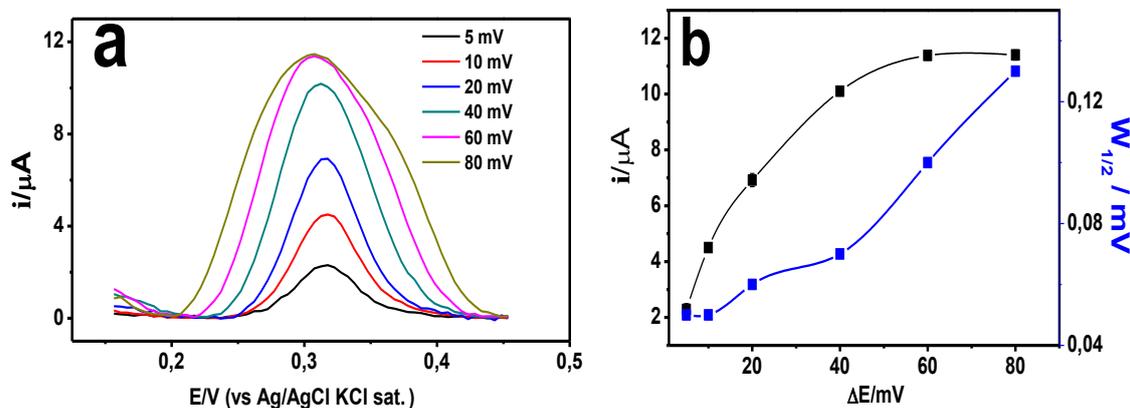
2.5.3.7 Amplitude de pulso de potencial

A amplitude de pulso de potencial (a) é um dos parâmetros importantes a serem avaliados para o desenvolvimento de uma metodologia analítica utilizando a SWV. Para um sistema reversível controlado por difusão, a amplitude de pulso aplicado segue a equação de Parry & Osteryoung (Gosser-Junior, 1993; Christopher M.A. Brett, 1994), descrito na Equação (29), onde a corrente de pico está relacionada com a variação de pulso aplicada.

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A C}{4RT} \left(\frac{D}{RT}\right)^{1/2} \Delta E \quad (29)$$

Em uma solução de DA foram feitas variações da amplitude de pulso entre 5 mV e 80 mV. Os resultados estão descritos na FIGURA 46.

FIGURA 46 - A) VARIAÇÃO DA AMPLITUDE DE PULSO DE PULSO B) COMPARAÇÃO ENTRE A CORRENTE DE PICO E A LARGURA DO PICO A MEIA ALTURA PARA AS DIFERENTES AMPLITUDES DE PULSO DE POTENCIAL APLICADAS f : 12 Hz, E_{step} 5 mV

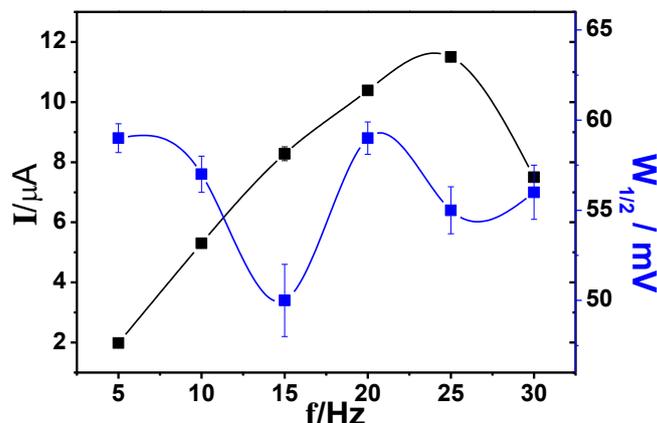


Observou-se que, conforme há o aumento da amplitude de pulso, existe um aumento substancial na corrente de pico de oxidação da dopamina, e a forma de avaliar o melhor valor de α para um sistema é observar a relação entre corrente de pico e largura do pico a meia altura. Isso porque essa relação permite escolher a melhor magnitude de corrente sem que haja distorção ou alargamento do pico. Neste caso, o valor escolhido foi de 40 mV, a qual foi fixada para os demais estudos.

2.5.3.8 Estudo da variação de frequência

Outro parâmetro que se relaciona diretamente com a intensidade do sinal obtido é a frequência (f). Na FIGURA 47 encontra-se a relação entre corrente de pico e largura do pico a meia altura com a variação da frequência.

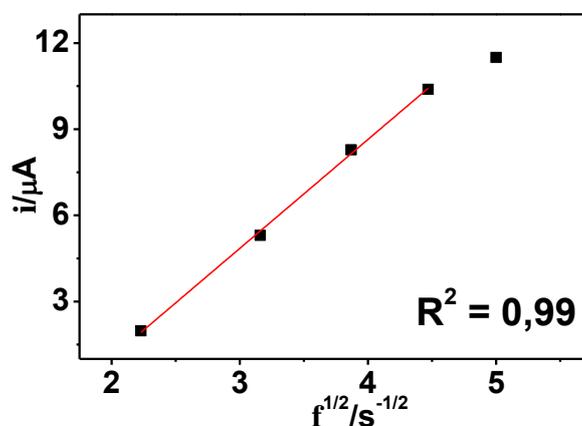
FIGURA 47 - COMPARAÇÃO ENTRE A CORRENTE DE PICO E A LARGURA DO PICO A MEIA ALTURA PARA AS DIFERENTES FREQUÊNCIAS APLICADAS. CONDIÇÕES: α : 40 mV, E_{step} : 5 mV



A variação da frequência apresentou grande influência na intensidade da corrente de pico da oxidação da dopamina e também na largura de pico a meia altura. O valor que apresentou a melhor relação entre corrente e largura de pico foi a frequência de 25 Hz, que foi utilizada nos estudos posteriores.

A reversibilidade do sistema também pode ser conferida pela relação entre corrente e frequência. Na FIGURA 48 encontra-se a curva de corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência.

FIGURA 48 - RELAÇÃO ENTRE CORRENTE DE PICO E FREQUÊNCIA NA OXIDAÇÃO DE DA. ELETRÓLITO: TAMPÃO ACETATO pH 4,5. α : 40 mV, E_{step} : 5 mV



A corrente de pico apresenta uma relação linear com a variação de frequência se o processo é irreversível (Equação (30) onde α é o coeficiente de transferência eletrônica.

$$i_p = \alpha f \quad (30) \qquad i_p = \alpha f^{1/2} \quad (31)$$

Caso o processo seja reversível, a corrente apresenta relação linear com a variação da raiz quadrada da frequência, Equação (31) (Zachowski *et al.*, 1986). No gráfico acima, a relação entre i_p e $f^{1/2}$ é linear, confirmando mais uma vez a reversibilidade da reação da dopamina na superfície do eletrodo.

2.5.3.9 Incremento de potencial

A variação de incremento de potencial (E_{step}) está diretamente ligada à velocidade de varredura como pode ser vista na Equação (32). Neste sistema, o incremento de potencial foi avaliado no intervalo de 1 a 10 mV e não apresentou variações na corrente de pico de oxidação da dopamina. O que está em concordância com um sistema reversível, onde a corrente de pico não apresenta modificações em função do E_{step} . (Souza *et al.*, 2003). O valor escolhido foi de 5 mV.

$$v = \frac{E_{step}}{(f^{-1})} \quad (32)$$

2.5.3.10 Resumo das condições analíticas estudadas

As condições analíticas para a detecção de dopamina utilizando o NTC-NPAu como sensor eletroquímico estão resumidas na TABELA 6 e esses parâmetros otimizados foram utilizados na construção da curva analítica.

TABELA 6 - RESUMO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS OTIMIZADAS PARA A DETECÇÃO DE DOPAMINA

Parâmetro	Valor Testado	Valor escolhido
pH	3,0–5,0	4,5
Amplitude de pulso	5 – 80 mv	40 mV
Frequência	5 – 30 Hz	25 Hz
Incremento de potencial	1 – 5 mV	5 mV

2.5.3.11 Construção da curva analítica

Após a otimização dos parâmetros da técnica de SWV, uma curva analítica foi construída através da adição de concentrações crescentes de DA. O intervalo avaliado foi de $9,6 \times 10^{-8}$ a $1,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de DA na presença de AA e AU $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Na FIGURA 49 encontram-se os voltamogramas para as sucessivas adições de DA e a curva analítica (n = 3) obtida.

A equação da reta encontrada para a curva analítica com coeficiente de correlação de 0,997 é dada pela Equação (33):

$$ip(\mu A) = -0,013 + 2,06 C_{DA} \mu\text{mol L}^{-1} \quad (33)$$

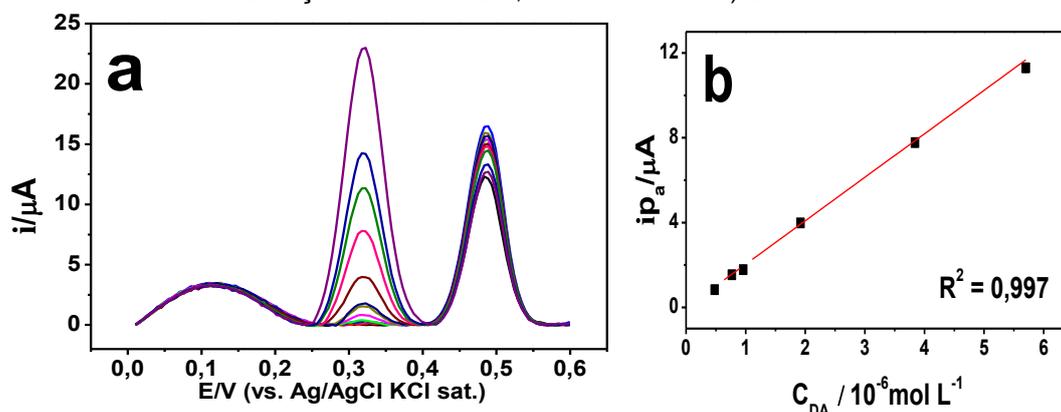
Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para tal sistema foi calculado com base nas Equações (33) e (34):

$$LD = 3,3 \delta/\theta \quad (33)$$

$$LQ = 10 \delta/\theta \quad (34)$$

onde δ refere-se ao desvio padrão da corrente no potencial de pico de oxidação da dopamina ($n=10$), θ refere-se a sensibilidade ou coeficiente angular da curva analítica.

FIGURA 49 - a) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA PARA SUCESSIVAS ADIÇÕES DE DA PRESENÇA DE AA E AU $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. b) CURVA ANALÍTICA



Os valores encontrados para o método proposto foram de $7,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o LQ e LD respectivamente. A curva apresentou um intervalo de resposta linear na faixa de concentração entre $4,8 \times 10^{-7}$ e $5,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e sensibilidade de $2,06 \mu\text{A}^{-1} \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$. Tais valores estão em concordância com outros trabalhos utilizando o mesmo analito, que estão resumidos na TABELA 7.

TABELA 7 - COMPARATIVO DE DESEMPENHO ANALÍTICO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS DADOS DA LITERATURA

Eletrodo	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sens. ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	Técnica	Ref*
Grafite/poliuretana	0,064	5,20 – 50,6	22,0	SWV	a
NTC/Celulose	48	0,3 – 4,0	0,021	SWV	b
ECV/Nafion/catequina	0,011	0,10 – 100	0,016	Amp	c
ECV/NTC/Liq. Iônico	0,10	1,0 – 10	0,26	SWV	d
Este trabalho	0,07	0,48 – 5,70	2,06	SWV	—

*a) (De Toledo *et al.*, 2005) b)(Muguruma *et al.*, 2016) c) (Salimi *et al.*, 2006) d) (Zhao, Y. *et al.*, 2005)

A repetibilidade da metodologia foi testada através da adição de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de DA na presença de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de AA e AU e o desvio padrão relativo (DPR) foi de 3,8% (n =10). Para o estudo de reprodutibilidade (diferentes eletrodos), o DPR encontrado foi de 5,3% (n = 10), indicando o bom desempenho analítico do método proposto. Os resultados obtidos até o presente momento indicam uma aplicação promissora do sensor proposto em amostras de interesse biológico.

2.6 CONCLUSÕES PARCIAIS

A obtenção de nanocompósito entre nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro inspirada na rota bifásica de síntese de nanopartículas de ouro foi realizada com sucesso. O controle de tamanho de partículas foi feito sem a presença de agentes passivantes pela variação da proporção ouro/NTC. Além disso, o tempo de preparo foi menor que o utilizado na rota bifásica.

A determinação de dopamina na presença dos ácidos ascórbico e úrico utilizando o nanocompósito sintetizado foi realizada com sucesso. O nanocompósito apresentou magnitudes de corrente menores que o NTC tratado, porém a interferência do AU foi menos pronunciada no material contendo as NPAu. Os parâmetros de mérito analítico obtidos são comparáveis com outros trabalhos descritos na literatura, com destaque para os baixos limites de detecção e faixa linear comparado a outros eletrodos.

3 UTILIZAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO NTC-NPAU PARA CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR PARA A DETERMINAÇÃO DE FENOL

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Explorar as propriedades eletroanalíticas do nanocompósito NTC-NPAu na produção de biossensor para a detecção de fenol

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Preparação dos eletrodos modificados com o nanocompósitos e tirosinase e caracterização eletroquímica

Os eletrodos impressos utilizados neste trabalho foram produzidos no laboratório do Professor Dr. Craig Banks na Universidade Metropolitana de Manchester, Reino Unido. A impressão foi realizada utilizando as mascaras apropriadas e uma impressora microdek®, modelo 1670RS e as etapas consistiram na deposição de tintas de carbono grafite (para impressão de ET e EA), Ag/AgCl (ER) e tinta dielétrica (Gwent, Liverpool, Reino Unido) sobre um substrato de poliéster. O ET possui área de 0.07 cm^2 (Rana *et al.*, 2017).

Um frasco contendo 29,5 mg de sólido liofilizado (tirosinase) dissolveu-se em 5 mL de tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,0. Após a total solubilização do material, fracionou-se a solução em volumes de 100 μL . As amostras foram acondicionadas em refrigerador a -4° C .

Foram preparados EI modificados com nanocompósito e tirosinase, no qual adicionou-se 3,0 μL de uma dispersão do nanocompósito $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em Nafion® 0,05 % ao eletrodo de trabalho (área = $7,06 \text{ mm}^2$). Em seguida o eletrodo foi imerso em uma solução de cistamina $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação por uma hora. O eletrodo foi enxaguado e seco a 35° C . Adicionou-se uma solução de glutaraldeído 2% (v/v) a superfície do eletrodo por 1 hora e em seguida, lavou-se em água destilada e seco a 35° C . Na etapa de adição de tirosinase utilizou-se o volume de 5,0 μL da solução preparada anteriormente por 8 horas. Após isso, o eletrodo foi enxaguado com uma solução de tampão fosfato pH 7,0 por 10 minutos para remoção de enzimas fracamente adsorvidas.

A caracterização eletroquímica do biossensor foi realizada através da voltametria cíclica utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,5 no intervalo de +0,2 a $-0,4 \text{ V}$ em volume de uma gota ($\sim 20 \text{ }\mu\text{L}$). Como substrato sonda, utilizou-se o catecol para verificação da atividade enzimática do biossensor.

3.2.2 Ensaio usando o microdispositivo

Todos os materiais utilizados na fabricação do μTED foram adquiridos no mercado local (Curitiba, PR, Brasil). Os materiais incluem fita adesiva dupla face, eletrodo impresso de carbono (ET e EA de carbono e ER de prata), placas de vidro e reservatórios poliméricos. Os fios de algodão hidrofílico foram obtidos a partir do tecido das gazes hidrófilas de algodão.

A construção do dispositivo microfluídico eletroanalítico de baixo custo baseado em fios de algodão (μTED) foi realizado sobre placas de vidro 25 mm de largura, 6,5 mm de espessura e com comprimentos de 30, 60 e 90 mm. A montagem pode ser acompanhada pelo esquema da FIGURA 50, onde as partes constituintes do dispositivo são:

- (1) Fixação dos reservatórios de entrada e saída (ambos com capacidade de 4 mL) nas extremidades das placas de vidro;
- (2) Colocação de um pedaço de fita adesiva dupla face perto do reservatório de entrada e outro pedaço perto do reservatório de saída para garantir adesão;
- (3) Acomodação do eletrodo impresso com a fixação de fitas adesivas sobre o eletrodo impresso;
- (4) Fixação do fio de algodão hidrofílico ao longo de todo o dispositivo, desde o reservatório de entrada até o reservatório de saída;
- (5) Colocação de dois pedaços de fita adesiva dupla face sobre o EI para delimitar a área

FIGURA 50: ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO μ TED

Após as etapas descritas anteriormente, com o dispositivo pronto para a utilização, o reservatório de entrada é preenchido com solução do eletrólito suporte, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,5 e por efeito de capilaridade a solução flui em direção ao reservatório de saída, passando pela região de detecção eletroquímica.

Para as medidas eletroquímicas utilizou-se um potenciostato μ -Autolab modelo Type III no modo de detecção cronoamperométrica, onde a corrente foi amostrada a partir da aplicação de um potencial fixado em $-0,3 \text{ V}$ e os sinais transientes foram obtidos através da injeção de $2 \mu\text{L}$ de solução contendo o analito estudado em diferentes concentrações na faixa de 10^{-8} a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de fenol.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Desenvolvimento de um biossensor baseado na imobilização de tirosinase sobre o nanocompósito NTC-NPAu

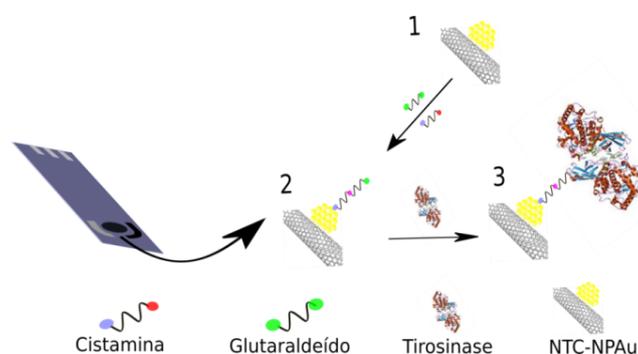
3.3.1.1 Investigação da Imobilização de tirosinase em eletrodo impresso

O EI contendo ET de carbono foi utilizado como suporte para o biossensor e na FIGURA 50 encontra-se esquematizado o processo de imobilização enzimática utilizado na construção do biossensor.

A metodologia da imobilização enzimática foi baseada na geração de ligações covalentes entre as nanopartículas de ouro e a tirosinase. Para tal procedimento, o EI foi modificado por *dropcasting* (FIGURA 51, etapa 1) onde

nanocompósito previamente dissolvido em isopropanol e Nafion® 0,05% (m/v) foi utilizado para garantir adesão dos NTCs ao eletrodo impresso. No procedimento de imobilização enzimática foram utilizados agentes de ligação cistamina, que apresenta grupos tióis de alta afinidade por ouro e glutaraldeído, um di-aldeído, capaz de formar ligações entre os grupos amina presente na cistamina (FIGURA 51, etapa 2) e na outra extremidade é possível ancorar uma enzima pela formação de ligação amida provenientes da tirosinase (FIGURA 51, Etapa 3), proporcionando estabilidade ao material imobilizado (Pauliukaite *et al.*, 2009). Tal procedimento permite direcionar a imobilização enzimática sobre as nanopartículas de ouro, devido à alta afinidade tiol – ouro (Brust *et al.*, 1994). Adicionalmente, o mesmo procedimento de construção do biossensor, utilizando os agentes de ligação cistamina e glutaraldeído e a enzima tirosinase foi realizado para o NTC H⁺ (na ausência de NPAu) e a voltametria cíclica na presença de catecol não apresentou nenhum pico no mesmo intervalo estudo dado para o biossensor NTCNPAu-Tir, indicando que a metodologia de incorporação enzimática está direcionada sobre as nanopartículas de ouro.

FIGURA 51 - PROCEDIMENTO DE CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR

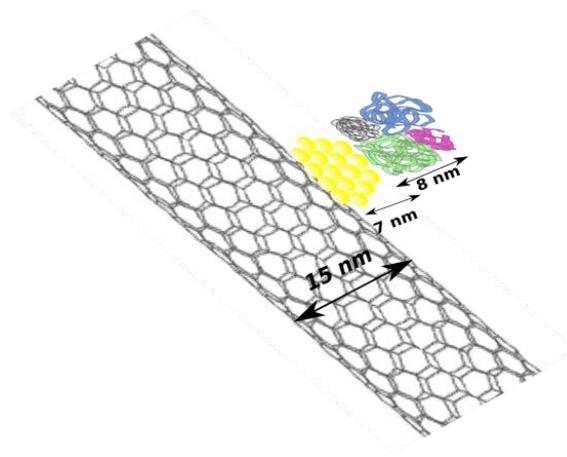


FONTE: O autor.

A respeito da configuração provável que o biossensor adquire, levando em conta o peso molecular de 63,9 kDa da tirosinase (Zhang *et al.*, 1999) pôde-se fazer uma aproximação utilizando dados da proteína albumina (BSA), a qual possui peso molecular próximo ao da Tirosinase, de 66 kDa e dimensões comparáveis a uma NP de 8,4 × 8,4 × 3,1 nm (De *et al.*, 2009). Admitindo que as NPAu tem pelo menos duas dimensões próximas a 7 nm, a relação entre tirosinase e NPAu em termos de tamanho é bastante próxima, sendo pouco

provável que mais de uma macromolécula de tirosinase consiga se ligar a uma nanopartícula de ouro devido ao impedimento estérico causado pela enzima. Estas relações de dimensões estão descritas na FIGURA 52.

FIGURA 52 - RELAÇÃO DE DIMENSÕES RELATIVAS ESPERADAS PARA O SISTEMA NTC-NPAu- Tir

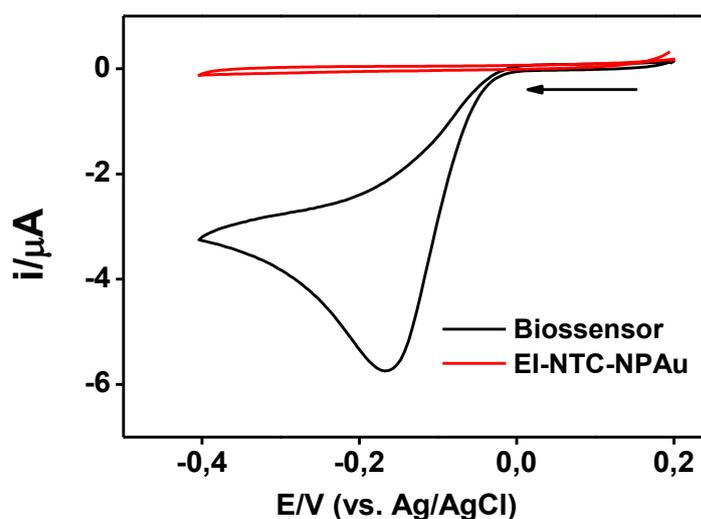


Fonte: O autor

Um dos grandes desafios na produção de biossensores é a manutenção da atividade catalítica da enzima após a imobilização. Na FIGURA 53 encontram-se os voltamogramas cíclicos para um eletrodo contendo o nanocompósito antes e após a modificação com tirosinase na presença de catecol.

Observou-se que, após a incorporação da enzima, há um sinal intenso com $E_{pc} = -168$ mV, que é resultado da redução eletroquímica da o-quinona formada pela ação da tirosinase sobre o catecol. Através de tais dados é possível verificar a manutenção da atividade catalítica da enzima após a imobilização.

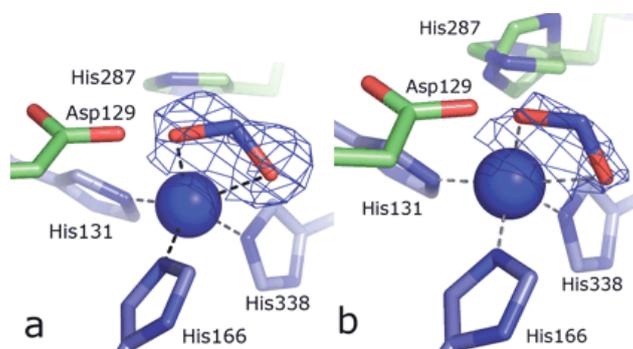
FIGURA 53 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA EI MODIFICADO COM NTC-NPAu ANTES E APÓS A MODIFICAÇÃO COM Tir. $C_{\text{catecol}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO TAMPÃO FOSFATO pH 6,5 E AS REAÇÕES ENVOLVIDAS. $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$



3.3.1.2 Estudo da influência do pH

Em um sistema contendo uma proteína imobilizada, o estudo e manutenção do pH se mostra crucial para o desenvolvimento de um biossensor, onde a enzima apresenta, como característica química, a alta dependência da atividade catalítica com pH. Além disso, ocorre a mudança estrutural devido a processos de protonação e desprotonação dos grupos amino e carboxílicos das estruturas primárias (Nelson e Cox, 2015). No caso das enzimas contendo sítio ativo de cobre (chamadas de T1, T2, T3), adjacente ao centro metálico existe um grupamento histidínico livre ($pK_a \sim 6,5$) que normalmente encontra-se mais distante do centro ativo por conta das ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Porém, após a desprotonação esse grupo (his 287) se aproxima do centro metálico e gera um “efeito tampa” na cavidade catalítica da proteína, como pode ser visto na FIGURA 54. No caso exemplificado a seguir, o modelo é utilizado para uma enzima T2, ou seja, uma enzima contendo o sítio ativo com um átomo de cobre. Porém, a similaridade estrutural das vizinhanças entre as enzimas do tipo T2 e T3 (tirosinase) faz com que seja viável essas aproximações (Yaropolov *et al.*, 1996).

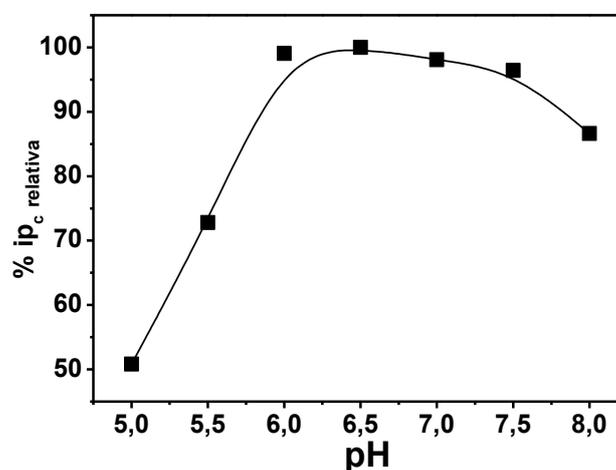
FIGURA 54 - INTERAÇÃO DO GRUPAMENTO HISTIDINICO LIVRE COM O CENTRO METÁLICO a) pH 6,0 b) pH 8,5



FONTE: (Jacobson *et al.*, 2007)

O estudo do pH para o biossensor NTC-NPAu-Tir foi verificado na faixa de 6,0 a 8,0 onde é possível observar a influência do pH na corrente de pico catódica da o-quinona (FIGURA 55). Corroborando com os dados apresentados anteriormente, os valores de pH de 6,0 a 7,0 apresentaram as maiores correntes, sendo que o pH 6,5 foi escolhido para os demais estudos.

FIGURA 55 - INTENSIDADE DE CORRENTE CATÓDICA DO BIOSSENSOR UTILIZADO TAMPÃO FOSTATO 0,1 mol L⁻¹ EM DIFERENTES VALORES DE pH. VALORES OBTIDOS POR VOLTAMETRIA CÍCLICA, $C_{\text{catecol}} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, $v = 5$ mV s⁻¹



Tais dados estão em consonância com os encontrados na literatura, onde normalmente os valores otimizados de pH se encontram na faixa de 6,0 a 8,0 (Alkasir *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011; Kochana *et al.*, 2015; Vicentini *et al.*, 2016) para estes biossensores.

3.3.1.3 Efeito da quantidade de modificador

A quantidade de modificador foi avaliada através da corrente de pico catódica gerada através da redução da quinona e também através de medidas de capacitância dos eletrodos, ambas utilizando voltametria cíclica. No caso das medidas de capacitância, as mesmas foram realizadas na ausência de processos faradaicos, utilizando NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte em um intervalo de potencial de 0,0 a 0,3 V com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} . Os resultados estão descritos na TABELA 8, onde é possível observar que a capacitância do EI varia drasticamente após as sucessivas modificações.

TABELA 8 - MEDIDAS DE CORRENTE DE PICO E CAPACITÂNCIA PARA DIFERENTES ELETRODOS

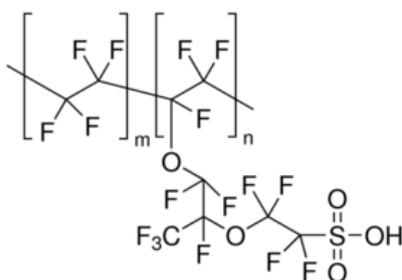
Eletrodo	i_{pc} (μA)	Capacitância ($\mu\text{F cm}^{-2}$)
EI	—	1,48
EI-Nafion®	—	25,3
EI-NTC NPAu	—	74
Biossensor 1 (0,5 μg NTC-NPAu)	2,4	114
Biossensor 2 (1 μg NTC-NPAu)	3,5	195
Biossensor 3 (2 μg NTC-NPAu)	3,8	288

A capacitância é a medida de corrente resultante do acúmulo e acomodação das espécies carregadas na região da dupla camada elétrica (Wang, J., 1994). Para a aplicação de materiais como sensores voltamétricos, eletrodos com altos valores de capacitância não são desejáveis pela perda de resolução que conferem ao perfil voltamétrico, sendo necessária a aplicação de técnicas pulsadas para a minimização desses efeitos. Comparando os dados obtidos para o sistema estudado, o EI apresenta baixa capacitância, como o relatado anteriormente na literatura (Cui, G. *et al.*, 2001), após a adição do polímero perfluorado sulfônico-Nafion®, o qual é utilizado para imobilizar os

nanocompósitos na superfície do EI, há um aumento substancial da capacitância. Esse aumento é conferido pelos grupos sulfônicos presentes na sua estrutura química como podem ser visto na FIGURA 56 (Rubinstein e Bard, 1980), e que também lhe dá capacidade de troca iônica.

Após a adição do NTC-NPAu, o aumento da capacitância é aferido principalmente aos NTCs que possuem conhecidas aplicações como capacitores (Niu *et al.*, 1997). E finalmente com a adição tirosinase, ocorre outro aumento de capacitância, desta vez atribuída aos grupamentos carregados desta macromolécula, esses valores de capacitância estão de acordo com outros trabalhos relatando a capacitância de biossensores contendo tirosinase (Elkaoutit *et al.*, 2008).

FIGURA 56: ESTRUTURA QUÍMICA DO NAFION®



Fonte: O autor.

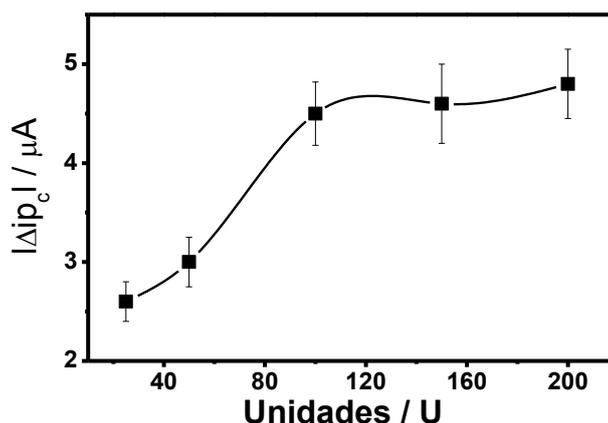
Quando a massa de nanocompósito é variada, ocorre a novo aumento da capacitância, o que é esperado já que uma maior quantidade de material está depositada sobre a mesma área, a capacitância do eletrodo é modificada. Assim, para escolha do melhor compósito, a corrente de pico para redução da o-quinona foi avaliada, onde o EI modificado com 1 µg de NTC NPAu apresentou os melhores resultados de corrente para a redução de o-quinona e juntamente com a capacitância intermediária entre os biossensores estudados, mostrou-se como a melhor modificação superficial.

3.3.1.4 Quantidade de enzima

A quantidade de enzima adicionada sobre o eletrodo contendo 1 µg de nanocompósito foi estudada no intervalo de 25 a 250 U e os resultados estão indicados na FIGURA 57. É possível observar que a partir de 100 U a quantidade

de enzima adicionada ao eletrodo não varia a corrente catódica significativamente, por conta de uma provável saturação dos sítios capazes de imobilizar a enzima. Desta forma, o valor de 100 U foi adotado como padrão para as demais modificações, este valor corresponde a 20 μL da solução tirosinase 5 KU mL^{-1}

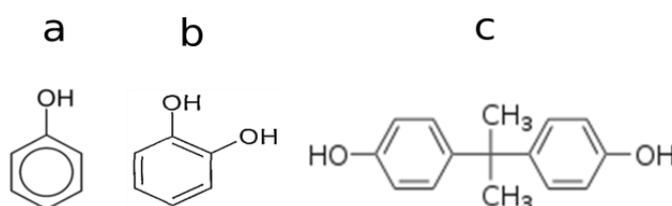
FIGURA 57 - QUANTIDADE DE ENZIMA ADICIONADA



3.3.1.5 Resposta para diferentes substratos

Além dos substratos biológicos clássicos, a DOPA e a tirosina, a aplicação de tirosinase como elemento de reconhecimento de biossensores, pode levar a sua utilização em duas classes distintas de moléculas: espécies fenólicas de importância biológica como os polifenóis (Carralero Sanz *et al.*, 2005; Cortina-Puig *et al.*, 2010) e as espécies de interesse ambiental (Alkasir *et al.*, 2010; Ozoner *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011). Neste trabalho, as espécies bisfenol-A, fenol e catecol tiveram suas respostas eletroquímicas avaliadas no biossensor e suas estruturas encontram-se ilustradas na FIGURA 58.

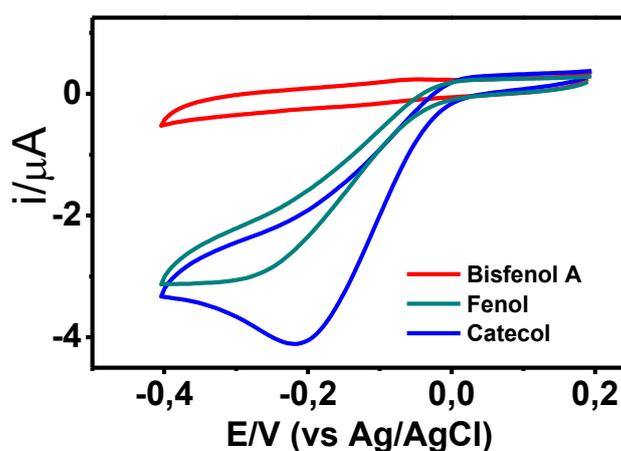
FIGURA 58 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS ESPÉCIES ANALISADAS: a) FENOL b) CATECOL E c) BISFENOL-A



Fonte: O autor.

Percebe-se que para a mesma concentração, o sinal analítico para o catecol é mais intenso em relação ao fenol (FIGURA 59). Isso ocorre porque a velocidade de reação no ciclo monofenolase é bem menor que no ciclo difenolase (Kim e Uyama, 2005). Em relação ao bisfenol-A, sua corrente pouco pronunciada pode estar relacionada com a estrutura química de maior volume, o que dificulta a sua chegada ao sítio ativo.

FIGURA 59 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS PARA AS TRÊS ESPÉCIES ESTUDADAS. $C_{\text{espécies}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSTATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

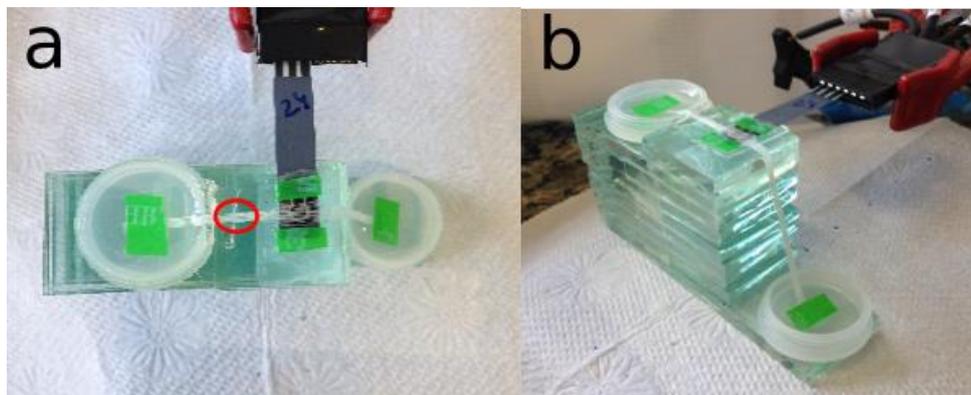


Apesar dos valores de magnitude de corrente mais baixos que o catecol, o apelo ambiental de monitoramento do fenol pela sua toxicidade acentuada (Villegas *et al.*, 2016), demandam métodos de monitoramento e controle mais efetivos com alta sensibilidade e baixo custo. Por isso, o fenol foi utilizado no desenvolvimento do método analítico.

3.3.2 Aplicação do biossensor em um dispositivo para análise por injeção de fluxo

Após a otimização do biossensor, o mesmo foi acoplado a um sistema para medidas em fluxo utilizando fios de algodão como canais de solução. Na FIGURA 60 encontram-se duas imagens do dispositivo utilizado nas medidas.

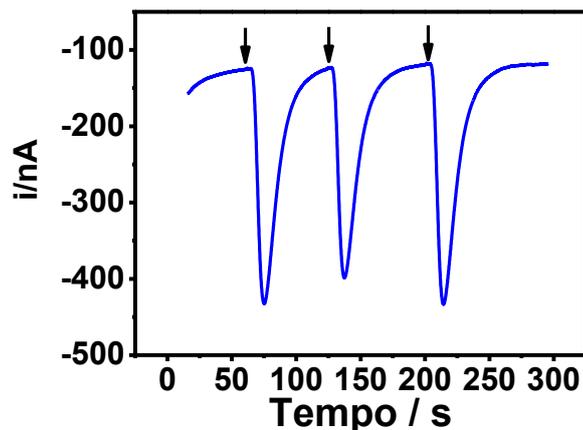
FIGURA 60 - a) VISTA DO μ TED DE UM PLANO SUPERIOR, ONDE O CIRCULO EM VERMELHO INDICA A ÁREA DE INJEÇÃO DA AMOSTRA b) VISTA LATERAL



Como pode ser observado a construção do dispositivo leva materiais de baixo custo como vidro, reservatórios de plástico, fio de algodão e um eletrodo impresso que tem um custo estimado de R\$ 3,50. Com relação as propriedades químicas da gaze, esta é constituída de celulose, um biopolímero rico em grupamentos hidroxila que confere hidrofiliçidade aos fios (Mitchell *et al.*, 2005; Nilghaz *et al.*, 2015). Nenhum tratamento químico foi aplicado aos fios de algodão. A vazão do sistema foi caracterizada no trabalho (Agustini *et al.*, 2016), onde encontrou-se o valor de $1,12 \mu\text{L s}^{-1}$, através da medida da massa de água depositada no reservatório de saída em função do tempo.

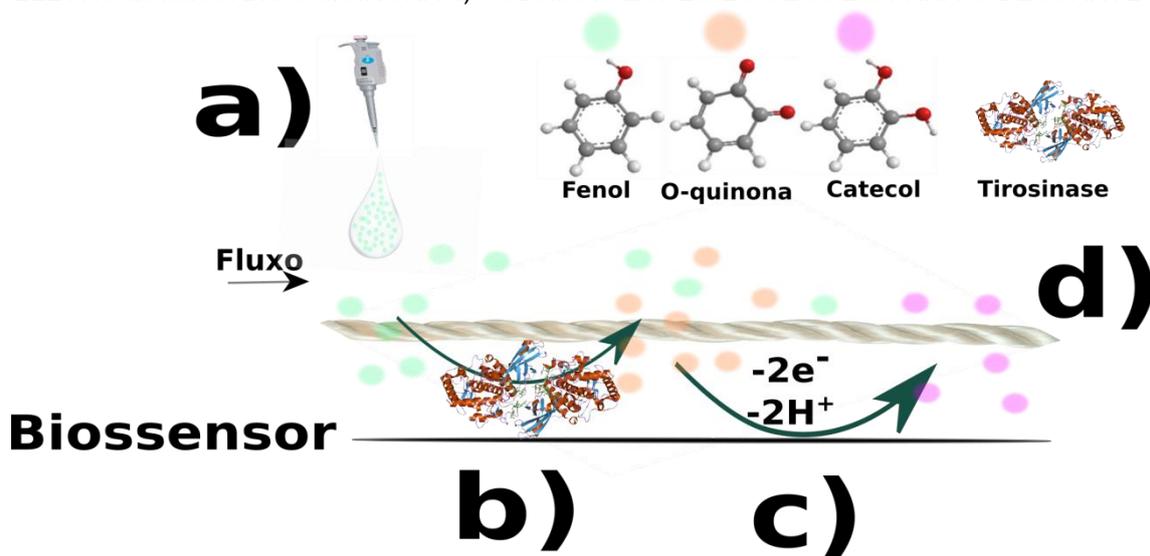
A fim de avaliar o comportamento do biossensor, uma primeira medida foi realizada com adições de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de fenol nos fios de algodão contendo o biossensor utilizando tampão fosfato pH 6,5 como solução transportadora. Os resultados obtidos para a triplicata encontram-se na FIGURA 61 onde cada seta indica o momento em que o analito foi adicionado.

FIGURA 61 - COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO μ TED NA AUSÊNCIA E APÓS ADIÇÃO DE FENOL.



Após a estabilização de corrente, foi feita a adição de fenol em potencial de $-0,3$ V, onde foi possível encontrar uma variação de corrente de aproximadamente 300 nA, que retorna à linha base após 60 segundos, correspondendo ao final da passagem de todo o gradiente de concentração de fenol que difunde pelo percurso analítico. Na FIGURA 62 estão ilustradas as etapas de obtenção do sinal, segundo o funcionamento do dispositivo.

FIGURA 62 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO FUNCIONAMENTO DO μ TED a) ADIÇÃO DE FENOL b) OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DO FENOL GERANDO O-QUINONA c) REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DA O-QUINONA d) TODAS AS ESPÉCIES SEGUEM PARA O DESCARTE



Fonte: O autor.

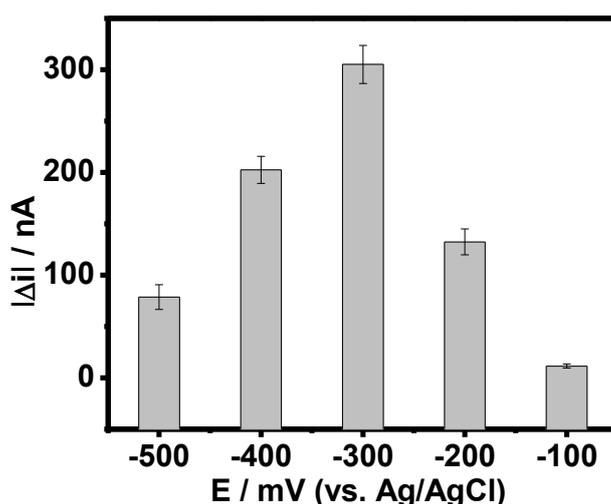
Com o sistema em funcionamento com fluxo de eletrólito suporte tampão fosfato pH $6,5$ ocorre em a) a adição de 1 μ L de solução contendo a solução de

fenol $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a cm do eletrodo de trabalho impresso. Em seguida, a solução contendo o analito se move em direção ao biossensor. b) Ao passar pela região contendo o eletrodo impresso, o fenol é oxidado pela tirosinase levando a formação de o-quinona, c) ocorre a redução eletroquímica de o-quinona na superfície do eletrodo gerando o sinal transiente. d) Após a reação, os componentes são levados ao reservatório de saída e a corrente retorna a linha base. A partir dos dados obtidos, foram feitas otimizações para determinação analítica de fenol, os dados são mostrados a seguir.

3.3.2.1 Potencial aplicado

A sensibilidade das medidas de cronoamperometria são dependentes do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. Os potenciais de detecção de fenol foram testados nos potenciais de -100 a -500 mV utilizando uma solução $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de fenol em tampão fosfato pH 6,5 e os resultados estão apresentados na FIGURA 63. Os valores de corrente e estão apresentados em módulo $|\Delta i|$ com o objetivo de facilitar a observação da variação dos valores.

FIGURA 63 – VARIÇÃO DA CORRENTE DE REDUÇÃO DA O-QUINONA EM DIFERENTES POTENCIAIS APLICADOS. $C_{\text{FENOL}}: 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ EM pH 6,5.



Percebe-se que com a variação do potencial aplicado, as correntes de redução adquirem maior magnitude com máximo de corrente em -300 mV. Em valores potencial abaixo de -300 mV a Δi_p apresenta menores valores devido à variação de corrente da linha base que em potenciais mais negativos tem uma

contribuição capacitiva pronunciada. Pelos dados apresentados, o valor de potencial de -300 mV foi o escolhido para os demais estudos.

No sistema de eletrodo impresso empregado, o ER utilizado é chamado pseudo-eletrodo de referência (p-ER). Estes podem ser acoplados e miniaturizados em diversos dispositivos, aumentando a praticidade e as possibilidades de aplicações analíticas (Beati *et al.*, 2012). A diferença do p-ER para um ER é que a variação de potencial para uma dada reação depende do meio em que ela ocorre. Isso quer dizer que, comparativamente, enquanto em um ER o sistema permanece em um compartimento separado da solução e com o potencial constante em relação ao meio externo, no p-ER, a interação ocorre diretamente com a solução a ser analisada. Isso faz com que o processo que gera a diferença de potencial em um ER seja bem estabelecida, enquanto no p-ER a variação de potencial geralmente não é conhecida (Inzelt, 2013). Normalmente, os potenciais de uma dada reação utilizando o p-RE são comparados com os valores do ER. Na detecção de fenol, a variação de potencial apresentada foi de +180 mV em relação ao ER. Como resultado, a reação que ocorre em -300 mV em relação ao p-RE, se desloca para -120 mV vs. Ag/AgCl/Cl⁻ 3,0 mol L⁻¹. Tal variação está de acordo com os potenciais descritos na literatura, onde a detecção de fenol ocorre entre 100 a -100 mV vs. Ag/AgCl/Cl⁻, 3,0 mol L⁻¹(Tsai, Y.-C. e Chiu, 2007; Janegitz *et al.*, 2012).

3.3.2.2 Resumo dos parâmetros otimizados

Com base nos estudos avaliados e discutidos anteriormente, os parâmetros otimizados encontram-se na TABELA 9. Todos os estudos posteriores adotaram tais parâmetros otimizados.

TABELA 9 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS E OTIMIZADOS NO FUNCIONAMENTO DO BIOSENSOR.

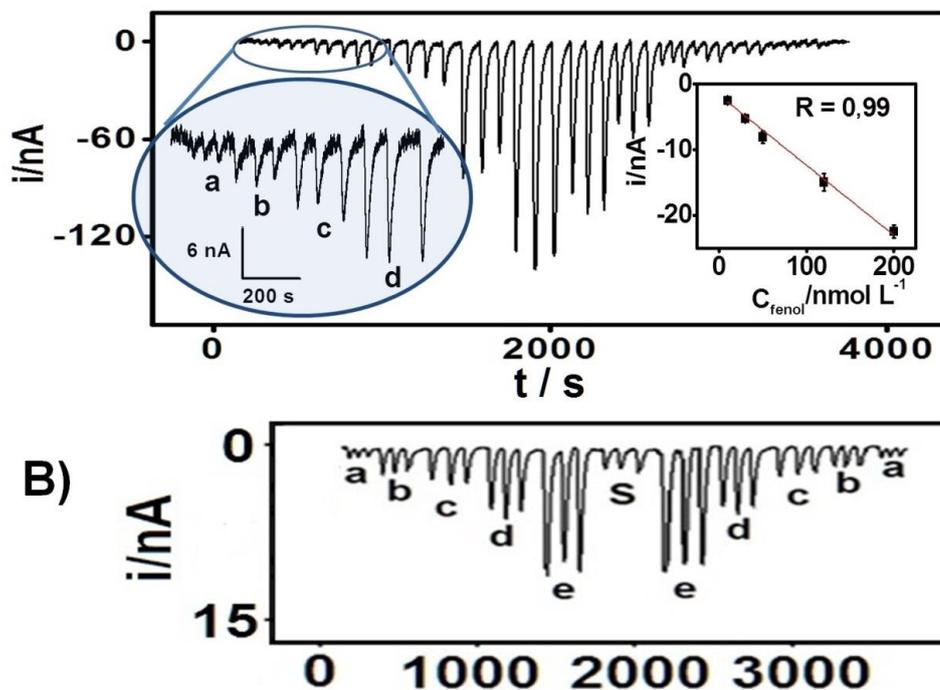
Parâmetro avaliado	Intervalo avaliado	Valor escolhido
Quantidade de modificador (μg)	0,5 – 2,0	1,0
pH	5,0 – 8,0	6,5
Quantidade de Enzima (U)	25 – 200	100
Potencial de Detecção (mV)	-100 a -500	-300

3.3.2.3 Curva analítica

Após a otimização dos parâmetros que influenciam na resposta do μTED , a curva analítica foi construída para avaliar a região de resposta do biossensor. Na FIGURA 64 encontram-se os resultados obtidos para adições crescentes de fenol desde 10 a 800 nmol L^{-1} .

A região linear encontrada para a detecção de fenol foi de 10 nmol L^{-1} a 200 nmol L^{-1} e tem como equação da curva $|\Delta i_{\text{pCl}}| / \text{nA} = 1,63 + 0,131 C_{\text{fenol}} / \mu\text{mol L}^{-1}$ com LD de 2,91 nmol L^{-1} e LQ de 8,92 nmol L^{-1} através das equações (32) e (33). A sensibilidade, que é a inclinação da curva analítica, tem o valor de de 131 $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$. Os valores de desvio padrão para repetibilidade de 7,3% ($n = 5$) e 12% ($n = 5$) para os testes de reprodutibilidade. A frequência analítica para sucessivas adições de 50 nmol L^{-1} de fenol foi de 54 injeções por hora

FIGURA 64 – a) SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FENOL ENTRE 10 E 800 nmol L⁻¹. AREA DESTACADA EM AZUL CORRESPONDE AOS SINAIS OBTIDOS PARA AS CONCENTRAÇÕES DE (a) 10; (b) 30; (c) 50; e (d) 120 nmol L⁻¹ E A RESPECTIVA CURVA ANALITICA. ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO 0,1 mol L⁻¹ EM pH 6,5.



Na TABELA 10 encontram-se alguns parâmetros analíticos na determinação de fenol via eletroquímica utilizando biossensores descritos na literatura e a comparação com este trabalho. Os valores encontrados são bastante satisfatórios no que diz respeito aos limites de detecção e faixa linear, apresentando comparativamente, uma sensibilidade intermediária em relação aos biossensores analisados.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em sua resolução 357 de 2005 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, recomenda os seguintes valores de fenóis totais (Conama, 2012):

a) 3 ppb para água doce *Classe I* – que pode ser utilizada para consumo e abastecimento para consumo humano após tratamento convencional;

b) 10 ppb para águas de *Classe III* – Agricultura e abastecimento humano após tratamento avançado;

c) 60 ppb para água salgada *Classe I* – preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral;

Levando em consideração que a detecção de fenóis pelo biossensor encontra-se na faixa de 0,9 – 23 ppb com LD de 0,43 ppb, o sistema proposto nesse trabalho, teoricamente (sem levar em consideração interferentes e efeitos de matriz) seria capaz de desenvolver tais determinações.

TABELA 10 - COMPARATIVO ENTRE BIOSSENSORES ELETROQUIMICOS NA DETERMINAÇÃO DE FENOL

Eletrodo	Técnica	LD (nM)	Sens. ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	Faixa Linear (μM)	Ref.
Grafite-EDC-NHS-Tir	FIA-Amp	3	321	0,01 – 5,0	(Ortega <i>et al.</i> , 1993)
Au -MPA-Tir	FIA-Amp	0,8	1300	0,2 – 200	(Campuzano <i>et al.</i> , 2003)
ECV-EDS-NHS-Tir	FIA-Amp	260	8	0,5 – 30	(Peña <i>et al.</i> , 2001)
Au-HA-quit-Tir	Amp	10	1,77	0,07 – 5,0	(Lu <i>et al.</i> , 2010)
ECV-NTCs-nafion-Tir	Amp	130	303	1 – 19	(Tsai, Y.-C. e Chiu, 2007)
BDD-AuNP-Tir	SWV	70	1800	0,10 – 11	(Janegitz <i>et al.</i> , 2012)
ECV-Grafeno-Aminoac Tir	Amp	0,35	4,08	0,001 – 21	(Qu <i>et al.</i> , 2013)
Este trabalho	μTED Amp	2,91	131	0,01 – 0,2	–

3.3.2.4 Afinidade enzima-substrato

A constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) fornece informação importante sobre a atividade catalítica e afinidade entre enzima imobilizada e o substrato. Esses valores podem ser obtidos pela Equação (35) de Lineweaver-Burk adaptada.

$$\frac{1}{i_s} = \frac{1}{i_{max}} + \frac{K_M^{app}}{i_{max}} \times \frac{1}{C_{fenol}} \quad (35)$$

Onde i_s refere-se a corrente no estado estacionário, i_{max} é a corrente máxima obtida pela saturação com o substrato. Podem ser obtidos experimentalmente

pela curva de $1/i_p$ versus $1/C_{\text{fenol}}$. No caso do biossensor estudado, a equação de reta encontrada foi a descrita a seguir (36):

$$\frac{1}{i_s} = 0,001 + 0,00437 \times \frac{1}{C_{\text{fenol}}} \quad (36)$$

Assim, K_M^{app} pode ser obtida pela multiplicação entre coeficiente angular da reta e i_{max} . O valor encontrado para o biossensor está descrito na TABELA 11 em comparação com outros valores descritos na literatura.

TABELA 11 – VALORES DE K_M^{app} PARA DIFERENTES BIOSSENSORES

Biossensor	K_M^{app} μM	Ref
Au–MPA–Tir	146	(Campuzano <i>et al.</i> , 2003)
ECV–NTCs– Nafion®–Tir	52	(Tsai, Y.-C. e Chiu, 2007)
BDD– NPAu–Tir	13	(Janegitz <i>et al.</i> , 2012)
Este trabalho	4,9	—
Au–HA–quit–Tir	1,3	(Lu <i>et al.</i> , 2010)

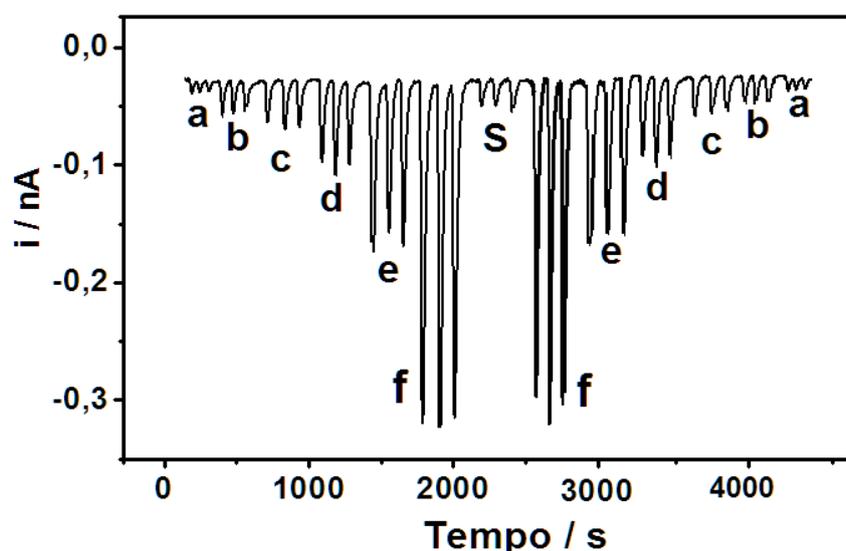
O valor de K_M^{app} para o biossensor desenvolvido encontra-se dentro da faixa reportada em outros trabalhos. Vale ressaltar que apesar do fenol ser um substrato passível de oxidação pela tirosinase, os valores de K_M^{app} apresentado para esta reação são bem inferiores aos apresentados para o catecol. Por exemplo, para um sistema similar contendo NPAu e NTCs (Vicentini *et al.*, 2016), onde os valores de afinidade enzima e substrato chegam a ser mil vezes maior. Isso está de acordo com o fato da reação de oxidação ser energeticamente desfavorável, onde a energia desprendida para a inserção de oxigênio em uma molécula estabilizada por efeito de ressonância é bem maior do que a oxidação do o-difenol. (Yaropolov *et al.*, 1996; Kim e Uyama, 2005).

3.3.2.5 Aplicação do biossensor em amostra real

Após investigar o potencial analítico do μ TED, foram realizados testes de adição e recuperação em amostras de água potável, proveniente da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), as quais foram coletadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR– Brasil, e enriquecidas com fenol. O procedimento consistiu em preparar uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,5 em água potável e em seguida diluir uma solução estoque de fenol $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, também preparada em água potável.

A FIGURA 65 encontra-se a curva de adição de diferentes concentrações de solução padrão de fenol em tipicada (a até f) e em seguida a adição de uma amostra fortificada contendo $0,02 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de fenol em água potável (S). Em seguida, adições decrescentes de fenol foram feitas para avaliar o comportamento do biossensor após a introdução da amostra real e uma possível desnaturação enzimática.

FIGURA 65 – ADIÇÕES DE FENOL E INTERPOLAÇÃO DE UMA AMOSTRA REAL. CONCENTRAÇÕES DE FENOL (nmol L^{-1}): a) 10 b) 20 c) 40 d) 80 e) 100 f) 200 e S) AMOSTRA DE ÁGUA ENRIQUECIDA COM 20 nmol L^{-1} DE FENOL



Foram obtidos sinais transientes para a amostra muito semelhantes aos sinais das adições padrão, indicando que adição da amostra real não interfere significativamente na intensidade do sinal eletroquímico. Após a adição da

amostra, a adição decrescente de fenol indica que não houve variação significativa do sinal analítico. Os estudos de adição e recuperação foram realizados em 3 níveis e os valores encontram-se na TABELA 12.

TABELA 12 - VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA AMOSTRAS DE ÁGUA FORTIFICADAS COM FENOL.

Valor Adicionado (nmol L ⁻¹)	Valor Recuperado (nmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
20	22 ± 6	110 ± 30
60	58 ± 9	96 ± 10
100	89 ± 13	89 ± 13

Os resultados obtidos para a determinação de fenol em amostras enriquecidas demonstraram que existe uma boa concordância entre os valores adicionado e recuperado, com taxas entre 89 e 110%. Quanto aos valores de DPR encontrados, os mesmos estão em concordância para valores na faixa de análise de traços no qual esse método configura, sendo aceitáveis erros na faixa 15 a 30%.

Segundo dados (Sanepar, 2016), os principais componentes encontrados na água de torneira são: fluoretos (0,7 ppm – $3,68 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), cloro residual (1,2 ppm – $1,69 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), alumínio (0,08 ppm – $2,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), ferro e manganês (0,05 ppm – $8,95 \times 10^{-7}$ mol) e microcistina (1 ppb) e pH 6,6. Possivelmente, a variação de valores pode estar relacionada à presença destes componentes da matriz.

3.3.2.6 Efeito suicida

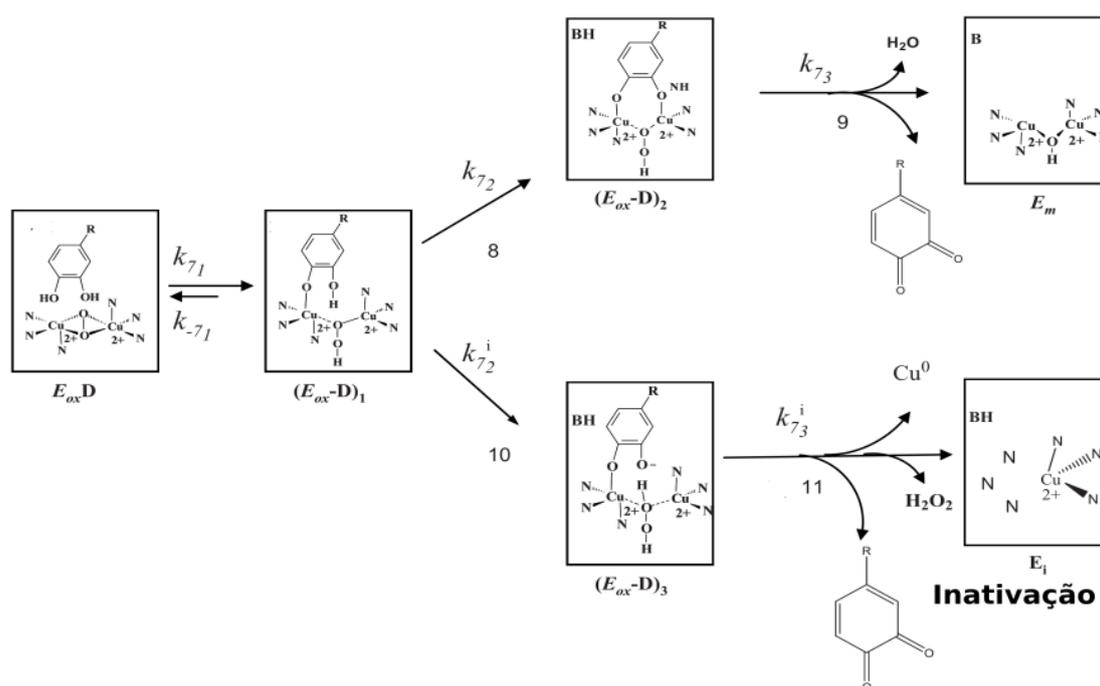
Em um biossensor, a determinação do tempo de vida útil no qual o sistema encontra-se analiticamente útil é de extrema importância. Este talvez tenha sido o maior desafio apresentado na construção deste biossensor. Normalmente, no dia após as primeiras medidas o biossensor apresentou valores de corrente muito inferiores em um período de 24 ou 48 horas, quando acondicionados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 6,5 a 4° C.

Esse comportamento de inativação pode ser explicado pelo chamado “efeito suicida” que a tirosinase apresenta. Basicamente, se refere a uma inativação gerada pelo próprio substrato, mais pronunciado no catecol. Isso pode ocorrer devido a diferentes caminhos reacionais durante o ciclo catalítico: a) O

produto final se liga a algum sítio específico vital para a atividade enzimática b) um intermediário reativo pode atacar a estrutura da enzima e gerar inativação por ataque a estrutura proteica c) a estrutura enzimática ataca a si mesma e se autodesnatura d) perda de estabilidade estrutural devido às condições reacionais aplicadas (Hagbreen *et al.*, 2004).

No caso da tirosinase, a descoberta do mecanismo exato de inativação por substrato é complexo de se determinar, por tratar-se de uma enzima com dupla atividade catalítica (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010). Porém, estudos indicam que a perda de atividade ocorre no ciclo difenolase, quando há a transferência de hidrogênio ao grupamento HO_2^- (etapa destacada em vermelho) ao invés do nitrogênio do grupo histidina (etapa destacada em verde). A formação de peróxido resulta na formação de Cu^0 que é descoordenado do sítio ativo (azul e roxo) e inativa a enzima.

FIGURA 66 – MECANISMO DE INATIVAÇÃO POR SUBSTRATO PROPOSTO.



Fonte: Adaptado de (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2010)

Em razão de tal fenômeno, a utilização do biossensor limita-se a um dia. Estudos foram feitos com eletrodos preparados 1, 3, 5 e 10 dias antes da utilização e mantidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,5 a -4°C

e todos mostraram boa estabilidade com DPR menores que 10% para todos os tempos de preparos testados.

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A imobilização de tirosinase na superfície do NTC-NPAu foi realizada com sucesso. Os resultados eletroquímicos obtidos indicam a manutenção da atividade enzimática da tirosinase após a imobilização. A caracterização do material foi feita de forma satisfatória e os melhores parâmetros para a aplicação analítica foram estudados.

O biossensor proposto foi acoplado a um dispositivo microfluídico baseado em fios de algodão, onde a detecção de fenol foi realizada com região linear entre 10 e 100 nmol L⁻¹. O sistema foi aplicado na análise de água potável fortificada com fenol e apresentou ótimos valores de recuperação.

O efeito suicida do substrato sobre a enzima limita sua reutilização, tornando o dispositivo descartável, não sendo recomendado seu uso em um dia posterior ao início da utilização.

4 DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE OURO PRODUZIDOS PELA TECNOLOGIA INKJET DE IMPRESSÃO.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Desenvolvimento de uma tinta a base de nanopartículas de ouro, bem como a sua caracterização dos eletrodos impressos produzidos por IJT.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Toda a parte experimental deste capítulo foi realizada no Instituto Catalão de Nanociência e Nanotecnologia, sob orientação do Dr. Arben Merkoçi.

4.2.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro

As NPAu foram sintetizadas pelo método Brust, onde 864 mg $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ ($2,5 \times 10^{-3}$ mol) foram dissolvidos em 20 mL de água em um balão de 500 mL sob agitação. Em seguida, 3,0 g de TOAB ($9,3 \times 10^{-3}$ mol) dissolvido em 160 mL de tolueno foi adicionado ao balão. A mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, 88 μL de 1-dodecanotiol ($3,6 \times 10^{-4}$ mol) foi adicionado ao sistema e mantido sob agitação por mais 10 minutos. A formação das NPAu se deu com a adição rápida de 50 mL de solução de NaBH_4 $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Com a adição do agente redutor, a solução passa de laranja para roxo intenso o que indica a formação das NPAu. Em seguida o sistema foi mantido sob agitação por 3 horas, e decorrido esse tempo, a fase orgânica foi separada da fase aquosa e lavada com 3 alíquotas de 10 mL de água destilada. A fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida para eliminar o solvente. Ao final, o sólido restante no balão foi adicionado 50 mL de etanol com as partículas suspensas. A mistura foi filtrada utilizando membrana PTFE com $0,2 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro. O sólido foi lavado com alíquotas de etanol e água e em seguida foi mantido em estufa a 50°C por 12 horas, raspado e acondicionado em frasco âmbar.

4.2.2 Fabricação da tinta.

A produção da tinta a base de nanopartículas de ouro – (Au-ink) foi realizada pesando 280 mg do sólido NPAu e dissolvendo essa massa em 2 mL

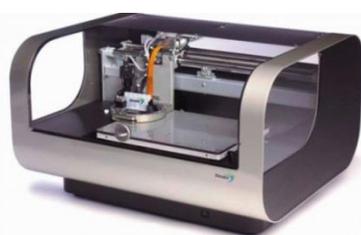
de terpineol. A mistura foi mantida sobre agitação a 100° C por 15 minutos para facilitar a suspensão das NPAu no solvente. Em seguida, a dispersão foi filtrada a quente em uma membrana de PTFE de tamanho de poro 0,2 µm e injetada em um cartucho DMC-116110 com 16 *nozzles* piezoelétricos. A tinta foi mantida em refrigeração a -4° C antes e após o uso.

4.2.3 Impressão

As impressões realizadas neste trabalho foram feitas com a impressora (marca: FujiFilm®, modelo: DIMATIX DMP-2800,) a qual encontra-se ilustrada na FIGURA 67. A voltagem de disparo utilizada nos *nozzles* foi de 21 ± 3 V e uma função de onda foi otimizada para esse processo, a qual será detalhada posteriormente. Foram utilizados 3 *nozzles* durante a impressão. As gotas utilizadas possuem volume de 10 pL. O *dropspace*, espaço entre duas gotas consecutivas, utilizado foi 60 µm. A temperatura aplicada nos cabeçais de impressão foi de 50° C e 60° C no substrato de impressão. A distância entre o substrato e os *nozzles* foi de 400 µm. Os padrões de impressão foram criados utilizando o software livre inkscape® versão 0.91.

A poliimida Kapton® foi utilizada como substrato, a qual foi submetida a limpeza com detergente e lavagem com água destilada e isopropanol seguida de secagem em fluxo de ar sintético. Os eletrodos impressos de ouro EI-Au foram submetidos à sinterização a 190° C por 10 minutos para a formação do filme de ouro utilizando uma placa de aquecimento.

FIGURA 67 – IMPRESSORA SIMILAR A UTILIZADA NESTE TRABALHO



Realizou-se a impressão de um dispositivo multidetecção, contendo quatro eletrodos de trabalho de ouro, um eletrodo auxiliar de ouro e o circuito elétrico pseudo-referência de prata, que posteriormente foi quimicamente oxidado a AgCl. Primeiramente foi realizada a impressão da tinta comercial de

prata (especificada no ANEXO 2). Antes de iniciar o processo de impressão dos eletrodos de prata, 1,5 mL da tinta condutora foram sonicados por 5 minutos, filtrada através de um filtro de seringa de 0,2 μm de poro, e então injetada dentro do cartucho DMC-116110 com 16 *nozzles* piezoelétricos. A função de onda modelo “Dimatix Model Fluid 2 Waveform” foi utilizada com a voltagem de cada *nozzle* piezoelétrico variando entre 20 ± 2 V. Após a impressão da prata, os eletrodos de ouro foram impressos, segundo o protocolo descrito anteriormente, gerando eletrodos de área 0,785 cm^2 .

O material impresso foi submetido à sinterização a 190° C por 10 minutos. Após o filme de ouro formado, a demilitação da área de trabalho foi feita com a aplicação de uma camada de polímero poli-dimetilsiloxano (PDMS) sobre o eletrodo. A preparação do PDMS consiste em misturar monômero e catalisador na proporção 9:1 e agitar vigorosamente a mistura. Quando a mistura encontra-se homogênea, faz-se a aplicação sobre os eletrodos. Em seguida, o material é submetido à estufa a 60° C por uma hora. A região a ser exposta é delimitada pela remoção do PDMS formado com a ajuda de um bisturi apropriado.

A formação do filme de AgCl sobre o eletrodo de prata foi realizado segundo o procedimento proposto por (Da Silva *et al.*, 2014), através da adição de água sanitária (NaClO 40 g L^{-1}) sobre o eletrodo de prata por 5 minutos. Após isso o dispositivo foi lavado com água destilada e utilizado nas medidas.

4.2.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas para os EI-Au foram desenvolvidas com um μ -Autolab Type III. As medidas de caracterização eletroquímica foram feitas em meio de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} em janela de potencial de 0.0 V até +1,8 V vs. Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1} KCl), platina como EA e o EI-Au como ET. As medidas de caracterização foram realizadas em eletrodos de dimensões 5,5 \times 2,0 cm (comprimento \times largura). A área eletroativa foi delimitada com uma fita adesiva. A Voltametria cíclica foi realizada em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} utilizando KNO_3 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte em intervalo de -0,2 a 0,4 V.

4.2.5 Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e varredura

As medidas de MEV foram realizadas em um microscópio marca, Quanta®, modelo 650. Onde os eletrodos foram afixados com uma fita dupla face de carbono. As telas de cobre com filme de carbono foram utilizadas para depositar 1 μL de dispersão de tinta. As medidas de MET foram efetuadas em um microscópio de alta resolução marca Tecnai® e modelo G2 F20.

4.2.6 Análise de resistividade

Foi utilizado um equipamento JANDEL Universal Probe, com espaçamento de 1.0 mm entre as pontas. Uma pressão de 5g/ponta (10 mPa) foi utilizada. A velocidade de descida das pontas foi estabelecida em 0,8 mm s^{-1} . Os eletrodos foram impressos em dimensões de 1,0 \times 1,0 cm com espessura de aproximadamente 120 nm (medido pela estimativa das imagens de MEV) A resistividade foi obtida pela aplicação de uma corrente de 10 nA. As medidas foram obtidas após estabilização da voltagem (5 minutos depois do contato com as pontas) e realizadas em triplicata

4.2.7 Perfilometria

A espessura dos filmes de ouro foi realizada através de medidas de perfilometria utilizando o equipamento de marca Ambios® e modelo XP.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Tinta de nanopartículas de ouro

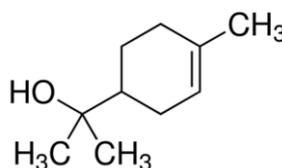
A produção de tintas para produção de eletrodos pela tecnologia de IJT é um tópico com crescente interesse na comunidade científica devido ao número de possibilidades e configurações para o desenvolvimento de dispositivos que a metodologia deslumbra.

A escolha das NPAu pelo método bifásico é feita devido as possibilidades que o método apresenta como síntese a temperatura ambiente,

partícula com estreita distribuição de tamanho e alta estabilidade (Brust *et al.*, 1994; Perala e Kumar, 2013). Os trabalhos relatando o uso de NPAu pelo método bifásico não trazem informações detalhadas sobre as formulações e procedimentos utilizados, até mesmo porque muitos deles são patenteados.

Com relação ao solvente utilizado na preparação das tintas, o mesmo deve preencher alguns requisitos para a impressão pelo método DoD. São eles: baixa volatilidade, alta viscosidade, inércia química, baixa toxicidade e proporcionar a solubilização das partículas de interesse. Nesse contexto, o α -terpineol foi utilizado como o solvente, pois apresenta todas as características necessárias. Na FIGURA 68 encontram-se a estrutura química dessa molécula.

FIGURA 68 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TERPINEOL.

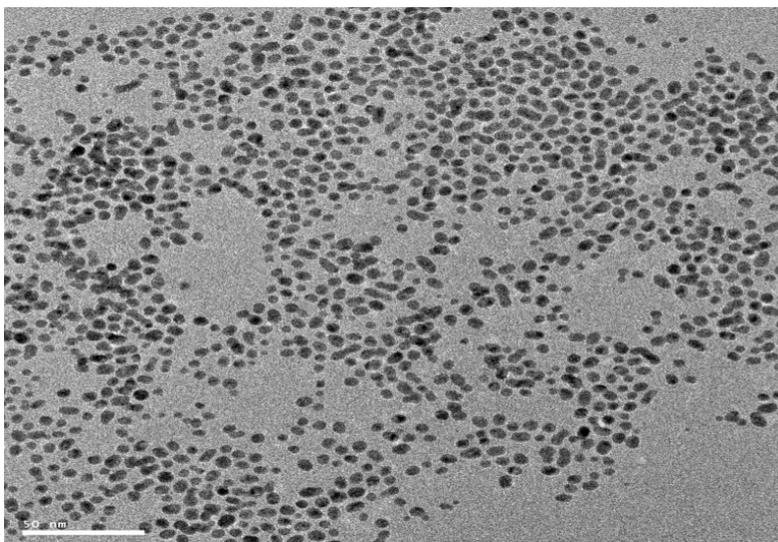


A concentração da tinta foi otimizada aquecendo o solvente a 100° C e dissolvendo uma quantidade de sólido NPAu. A maior concentração (140 mg mL⁻¹) onde não houve formação de corpo de fundo foi considerada na preparação da tinta.

Para a impressão utilizando a tecnologia IJT algumas recomendações físico-químicas devem ser levadas em conta como: tamanho de partícula deve ser 10 vezes menor que o diâmetro do nozzle para evitar entupimento. Sendo o diâmetro do orifício de saída do cartucho de 21,5 μ m, o maior tamanho de partícula suportado é de 2,15 μ m, a viscosidade da tinta deve estar entre 2 – 30 cP, onde valores superiores de viscosidade podem ser ajustados por aplicação de temperatura no cabeçote de impressão, diminuindo a resistência do fluido ao fluxo.

Na FIGURA 69, encontra-se uma imagem de TEM para a nanopartícula sintetizada, a qual apresentou tamanho médio de 7 ± 3 nm após a contagem de 500 nanopartículas. Tal distribuição de tamanho é adequada para a impressão sem que haja problemas de entupimento.

FIGURA 69 – IMAGEM DE TEM DAS NPAu SINTETIZADAS PELO MÉTODO BIFÁSICO. A BARRA REFERE-SE A 50 nm.



4.3.2 Otimização da impressão

Após a preparação da NPAu, a tinta foi produzida e injetada no cartucho para a otimização da impressão. Na FIGURA 70 encontra-se uma imagem do cartucho pronto para o uso.

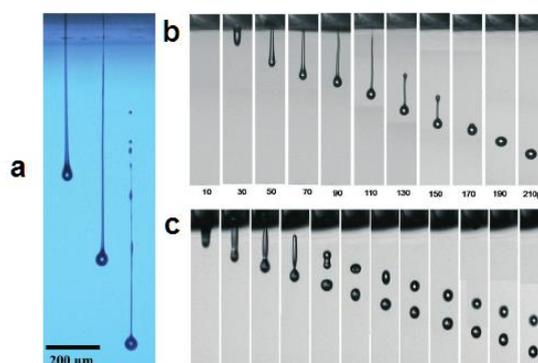
FIGURA 70 – CARTUCHO PREENCHIDO COM A TINTA DE NANOPARTICULAS DE OURO PRODUZIDAS PELO MÉTODO BIFÁSICO



Após a inserção do cartucho de tinta, alguns parâmetros precisam ser ajustados, como a função de onda aplicada, voltagem de disparo das gotas, temperatura do cabeçal e a temperatura do substrato. Todos esses parâmetros são ajustados por método de tentativa e erro. Uma câmera de alta frequência de aquisição monitora as gotas exatamente na saída dos *nozzles* de impressão e a

partir da forma, trajetória da gota, as modificações nos parâmetros são feitas. Na FIGURA 71 encontra-se a imagem da ejeção de gotas de tinta pela metodologia IJT. A impressão ideal deve gerar uma gota que não apresente efeito de cauda pronunciado (FIGURA 71 a) ou formação de gota adjacente ou também chamada de satélite (FIGURA 71 c). Idealmente, a ejeção deve formar gotas uniformes e sem adjacências em um curto espaço de tempo, geralmente menor que 300 μs como mostrado na FIGURA 71 b.

FIGURA 71 – GOTAS GERADAS DURANTE O PROCESSO DE IMPRESSÃO: a) GOTA COM EFEITO DE CAUDA PRONUNCIADO b) SEQUÊNCIA DE FORMAÇÃO DE UMA GOTA IDEAL c) FORMAÇÃO DE GOTA SATÉLITE.



Fonte: Adaptado de (Martin *et al.*, 2008)

Resumindo os parâmetros de impressão, serão discutidos a seguir a sua importância no processo de impressão e ao final um resumo da otimização de impressão:

Voltagem de disparo: Como discutido no item (1.8.2.) a impressão depende da voltagem aplicado ao cristal piezoelétrico nos estágios de preenchimento, entrega e recuperação. As voltagens são testadas quanto à forma, intensidade e estabilidade. Na FIGURA 72, encontra-se a comparação entre a função de onda padrão ou inicial e a função de onda otimizada, que difere principalmente na porção de recuperação, a qual precisa da aplicação de pequenos pulsos crescentes de potencial.

FIGURA 72 – FUNÇÃO DE ONDA INICIAL E OTIMIZADA PARA A IMPRESSÃO DA TINTA DE NPAu



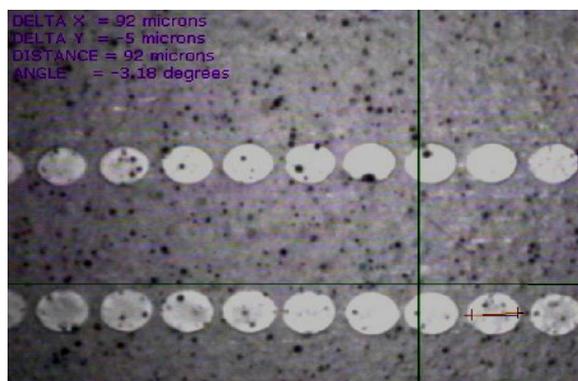
Temperatura do cabeçal: Aplicação de temperatura no cabeçal de impressão diminui a viscosidade da tinta e contribui para a aplicação de menores voltagens de disparo.

Temperatura no substrato: A aplicação de temperatura no substrato tem como objetivo aumentar a fluidez da gota em contato com o substrato, mas também visa diminuir os efeitos “Coffee-ring” na sinterização. Esse efeito é definido como a formação de um gradiente de concentração nas bordas quando em uma gota se evapora o solvente. Tal efeito é um obstáculo na produção de filmes por evaporação (Yunker *et al.*, 2011).

Dropspace: É a distância entre duas gotas consecutivas. A otimização desse parâmetro permite utilizar a distância mais apropriada para a formação de um filme sem descontinuidades. Através da aplicação de valores relativamente altos de separação entre as gotas é possível verificar o tamanho das gotas formadas no substrato. A Imagem apresentada na FIGURA 73 mostra a impressão de Au-ink contendo 100 µm de espaçamento. A partir do software de imagem da câmera Fiducial, que registra a superfície do substrato, é possível medir o tamanho das gotas, que apresentou 90 µm. O tamanho da gota depende da

interação tinta-substrato, quanto maior a interação, maior o raio da gota e melhor o ângulo de contato (Singh *et al.*, 2010)

FIGURA 73 – IMAGEM DA CAMERA FIDUCIAL PARA Au-ink contendo 100 μm DE ESPAÇAMENTO ENTRE GOTAS CONSECUTIVAS.



Tais parâmetros acima discutidos encontram-se resumidos na TABELA 13. Através da aplicação desses parâmetros, foi possível a obtenção de uma impressão estável.

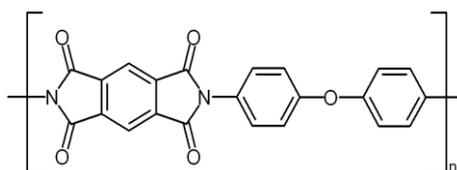
TABELA 13 – PARAMETROS AVALIADOS E OS VALORES ESCOLHIDOS NA IJT.

Parâmetro	Intervalo testado	Valor escolhido
T cabeçal (° C)	25 – 50	50
T substrato (° C)	25 – 60	50
Voltagem de Disparo (V)	14 – 30	21 – 23
Dropspace (µm)	15 – 80	60

4.3.3 Sinterização

Definidas as condições de impressão, os eletrodos foram impressos, utilizando como substrato a poli-imida Kapton® (FIGURA 74). Esse polímero é indicado como substrato quando os processos de sinterização passam por temperaturas relativamente altas (até 400 C). Além disso, bastante flexível e possui inércia química (Dupont, 2016).

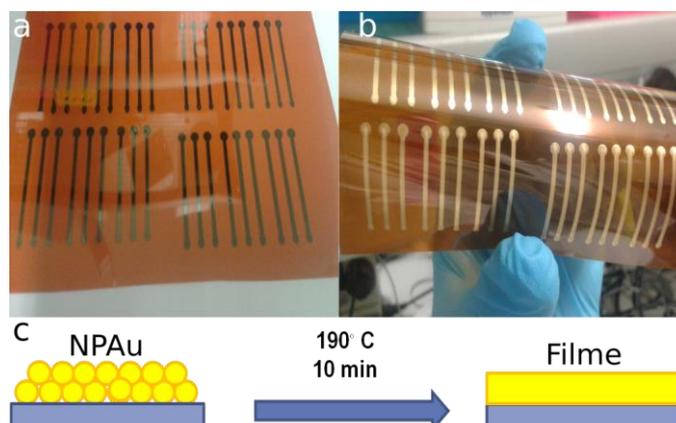
FIGURA 74 – ESTRUTURA QUÍMICA DA POLIIMIDA



Fonte: o autor.

Após a impressão os eletrodos foram submetidos ao processo de sinterização, onde a partir de aplicação de uma fonte de calor, as NPAu perdem a camada passivante e coalescem, formando um filme contínuo. Na FIGURA 75 encontram-se a imagem do processo de sinterização. Em um primeiro momento, eletrodos de dimensões maiores foram preparados (5,5 × 2 cm) a fim de testar a estabilidade de impressão por longos períodos de tempo (verificar falhas e possíveis entupimentos). E também para utilizá-los em caracterizações, onde a quantidade de material utilizada é relativamente grande.

FIGURA 75 – a) ELETRODOS ANTES DA SINTERIZAÇÃO b) APÓS A SINTERIZAÇÃO c) MECANISMO DE FORMAÇÃO DO FILME DE OURO.

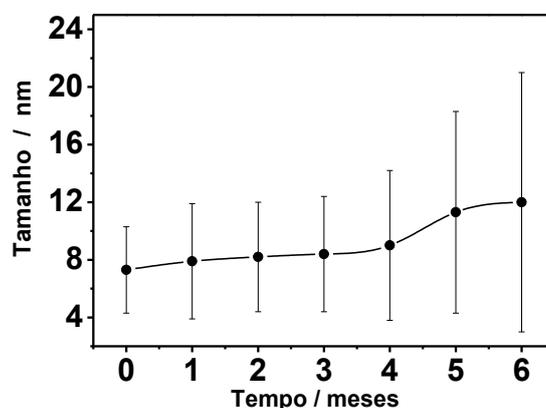


A formação do filme de ouro via aquecimento utilizando Au-ink ocorre em temperaturas inferiores ao ponto de fusão do ouro (190°C vs. 1063°C) (Lide, 2004), o que simplifica o processo de produção dos eletrodos que pode ser feito a baixas temperaturas e sem a necessidade de atmosfera controlada.

4.3.4 Estabilidade da tinta

A tinta formada por NPAu passivadas por dodecanotiol apresentaram alta estabilidade e o tamanho de partícula foi acompanhado pelo período de 6 meses para monitorar qualquer processo de coalescência das partículas e os resultados estão apresentados na FIGURA 76. O acompanhamento do tamanho foi realizado por MET, onde 500 partículas foram contadas para cada mês de vida da tinta.

FIGURA 76 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NPAu COM A VARIAÇÃO DO TEMPO.



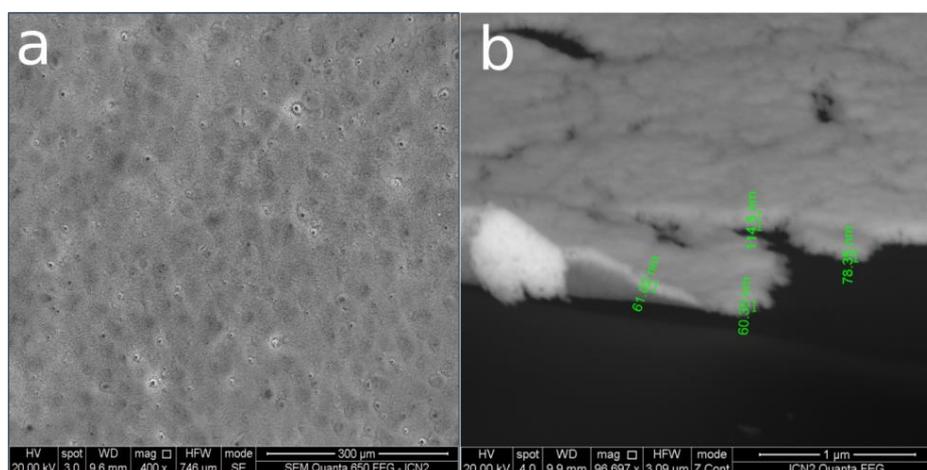
O monitoramento do tamanho das partículas indica que a Au-ink possui ótima estabilidade principalmente nos quatro primeiros meses, sendo que estatisticamente possuem o mesmo tamanho médio. Após quatro meses de fabricação, as partículas apresentam aumento de tamanho médio de partícula e da distribuição de tamanhos. Porém, mesmo com tal variação, a utilização da tinta ainda é viável, pois não apresenta tamanho suficiente para gerar entupimento dos *nozzles*.

4.3.5 Caracterização dos eletrodos

4.3.5.1 Caracterização morfológica e espessura de filme

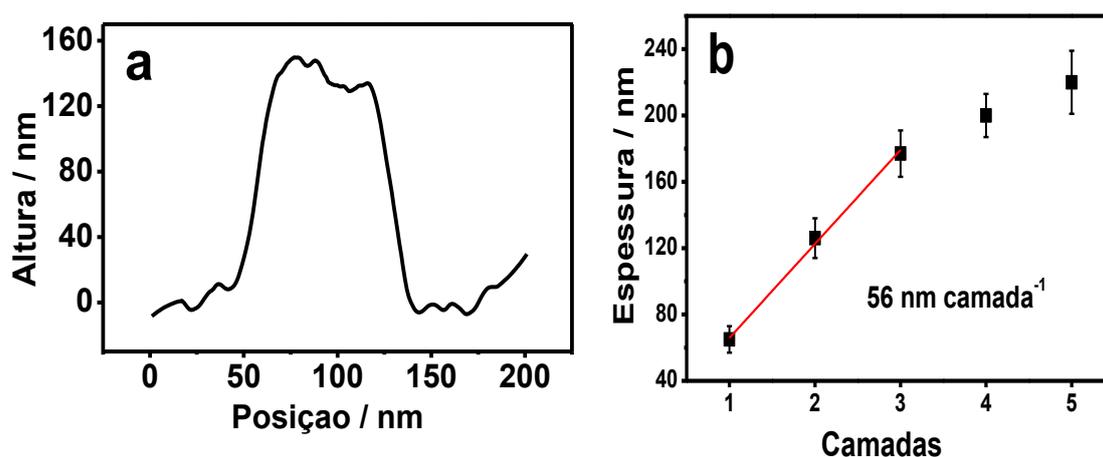
O material impresso foi analisado por MEV para obtenção de morfologia do filme de ouro (FIGURA 77), onde duas camadas de NPAu foram depositadas. Na FIGURA 77a é possível observar a presença de um filme contínuo de ouro na superfície do substrato. A FIGURA 77b é composta por uma amostra do filme e substrato cortados transversalmente com bisturi. Foi possível estimar a espessura do filme, através da medida de MEV, onde o filme apresentou duas espessuras diferentes, uma entre 60 e 70 nm e outra entre 110 – 130 nm. Supostamente, a menor espessura se refere à deposição de uma camada de tinta e a segunda faixa de espessura está ligada a impressão de duas camadas de tinta.

FIGURA 77 – IMAGENS DO FILME DE OURO IMPRESSO EM MAGNITUDES DE: a) 400 X e b) 96.697 X



Tais valores se confirmaram pelas medidas de perfilometria realizados nos filmes, onde uma linha composta por uma única gota foi impressa, e também linhas com contendo diferentes números de camadas de impressão foram preparadas para comparação. Os resultados estão descritos na FIGURA 78.

FIGURA 78 – RESULTADOS DE PERFILOMETRIA: a) CURVA TOPOGRÁFICA PARA IMPRESSÃO DE DUAS CAMADAS DE Au-ink b) VARIAÇÃO DA ESPESSURA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CAMADAS.



Os resultados de perfilometria indicam que a impressão de Au-ink gera um filme de 56 nm por camada. Levando em conta o tamanho médio das NPAu de 7 nm, a estimativa é de cada camada impressa deposita aproximadamente 8 nanopartículas por camada. Filmes acima de três camadas apresentam aumento da espessura devido ao extravasamento de tinta para além da linha de impressão.

4.3.5.2 Medidas de capacitância e resistividade

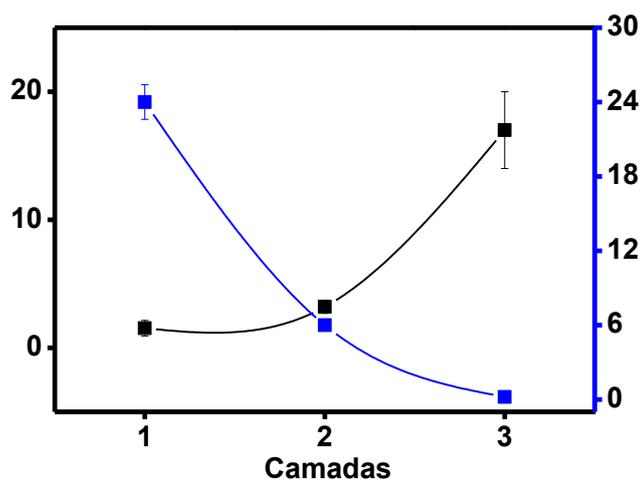
A escolha do número de camadas a ser utilizado na produção de eletrodos foi baseada em duas medidas elétricas fundamentais para o desempenho eletroquímico do material: a capacitância e a resistividade. Os dados encontram-se na FIGURA 79.

A capacitância foi medida através da obtenção da carga gerada durante a voltametria cíclica. Utilizou-se como eletrólito suporte KNO_3 0,1 mol L^{-1} e janela de potencial de 0,0 a 0,2 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ saturado) sem a presença de nenhum processo faradaico em velocidade de 10 mV s^{-1} . Foi possível perceber

que o aumento do número de camadas, leva a um aumento da capacitância. Com o aumento de material sobre a mesma área, os processos capacitivos tendem a se intensificar, pois esta propriedade varia proporcionalmente a área do eletrodo (Christopher M.A. Brett, 1994; Wang, J., 1994).

A resistividade apresenta um decaimento com o aumento do número de camadas aplicadas sobre o substrato. Isso ocorre devido ao aumento da área condutora. O ouro apresenta resistividade de $2,48 \mu\Omega \text{ cm}$ (Lide, 2004) e a impressão de duas camadas apresentou o valor de resistividade de $5,1 \mu\Omega \text{ cm}$, o que é considerado satisfatório para a produção de eletrodos por esta tecnologia, que geralmente apresentam resistividade entre $4 - 50 \mu\Omega \text{ cm}$ (Cummins e Desmulliez, 2012; Aleeva e Pignataro, 2014).

FIGURA 79 - DADOS DE RESISTIVIDADE E CAPACITÂNCIA PARA DIFERENTES CAMADAS.



Neste caso, o valor que agrega as melhores condições de capacitância e resistividade encontra-se no material com duas camadas. Por isso, para os demais estudos, os eletrodos foram impressos com duas camadas.

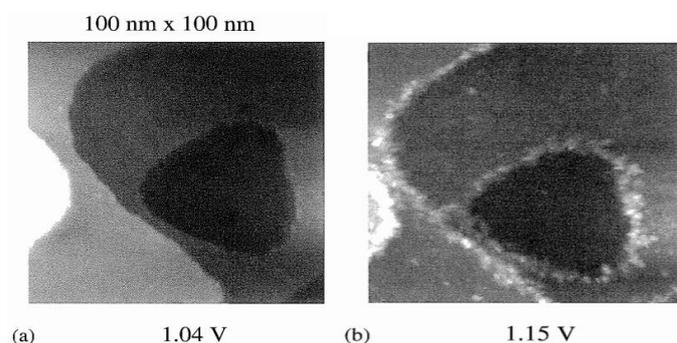
4.3.5.3. Comportamento eletroquímico

A caracterização eletroquímica de metais nobres utilizando a voltametria em meio ácido é útil em duas situações: a primeira delas, de caráter mais técnico, está relacionada com a limpeza da superfície e melhora em alguns processos electrocatalíticos (Wang, Y. *et al.*, 2016). A segunda remete a presença de

defeitos na estrutura cristalina e a dinâmica desta estrutura com a aplicação do potencial. Tais processos estão relacionados com formação de óxidos (Au_xO_y) e hidróxidos de ouro ($\text{Au}(\text{OH})_n$). São de caráter complexo, onde existe a combinação de processos de oxidação na formação de diferentes espécies em potenciais próximos, acoplados com etapas químicas. (Oesch e Janata, 1983).

O trabalho de (Schneeweiss *et al.*, 1997) é bastante esclarecedor sobre os processos eletroquímicos na superfície dos eletrodos de ouro. Foi realizada a oxidação eletroquímica de um eletrodo de ouro monocristalino (1 1 1) em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e a superfície do eletrodo foi monitorada pela técnica de microscopia de varredura por tunelamento quântico (STM), onde a resolução chega a ordem de $0,1 \text{ nm}$. A aplicação de potencial sobre o eletrodo ocorreu em duas situações distintas: logo antes e exatamente no potencial de “pico” anódico referente à formação dos óxidos de ouro. Na FIGURA 80 encontram-se as imagens de STM, onde o gradiente de intensidade das cores indicam os planos espaciais da superfície (FIGURA 80a). Após a aplicação do potencial suficiente para a oxidação da superfície (FIGURA 80b), percebe-se a presença de pontos mais claros, especificamente nas regiões de borda. Esses pontos são atribuídos à formação de óxidos de ouro, os quais são espécies não condutoras. Assim, os autores concluíram que a presença de defeitos na superfície dos cristais são os pontos chave no início da oxidação da superfície e a formação de óxidos em regiões planares possui um fator cinético atrelado.

FIGURA 80 – IMAGENS GERADAS POR STM PARA UM ELETRODO DE OURO (1 1 1): a) ANTES DA OXIDAÇÃO b) DEPOIS DA OXIDAÇÃO



Fonte: (Schneeweiss *et al.*, 1997)

As magnitudes de corrente em eletrodos com o passar do tempo também está ligada diretamente a presença de processos *place-exchange* (FIGURA 81),

onde os átomos de ouro da superfície tendem a inverter suas posições com o oxigênio para diminuir a energia superficial, levando também ao aumento de rugosidade com o passar dos ciclos (Burke e Nugent, 1998).

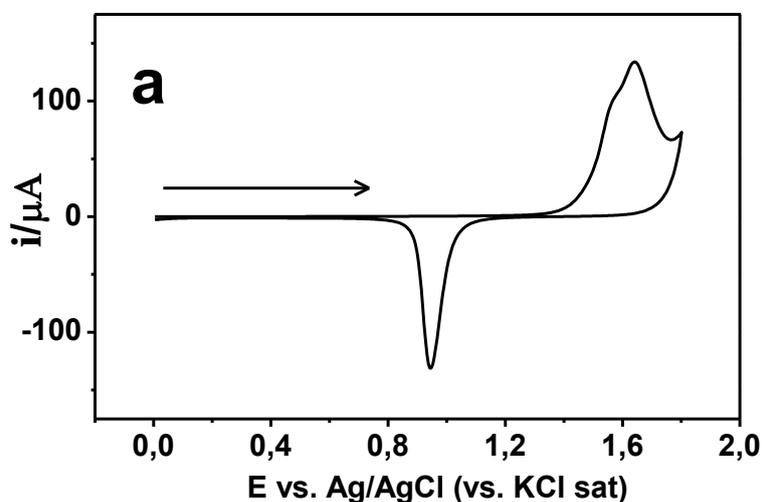
FIGURA 81 – INVERSÃO DE POSIÇÕES ENTRE DIPOLOS DURANTE A VARREDURA ANÓDICA.

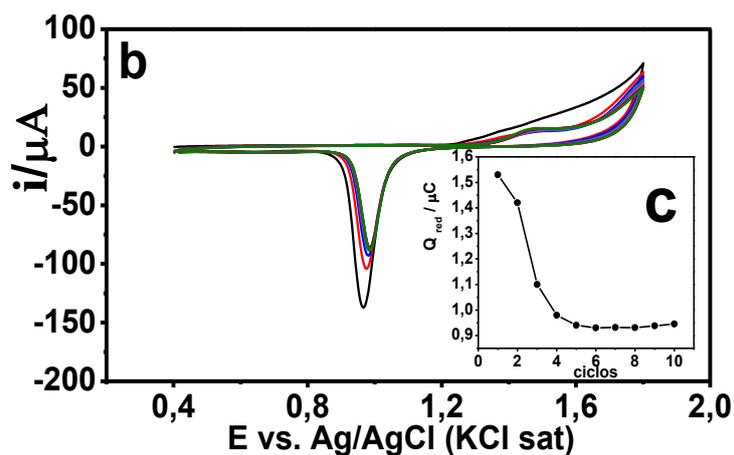


Fonte: O autor.

Munido de tais informações, o comportamento eletroquímico do EI-Au foi testado através de medidas de voltametria cíclica em meio ácido (FIGURA 82 a e b). A varredura em sentido positivo apresentou um pico largo em 1,6 V e um pico de redução bem definido (0,96 V) na varredura em sentido negativo.

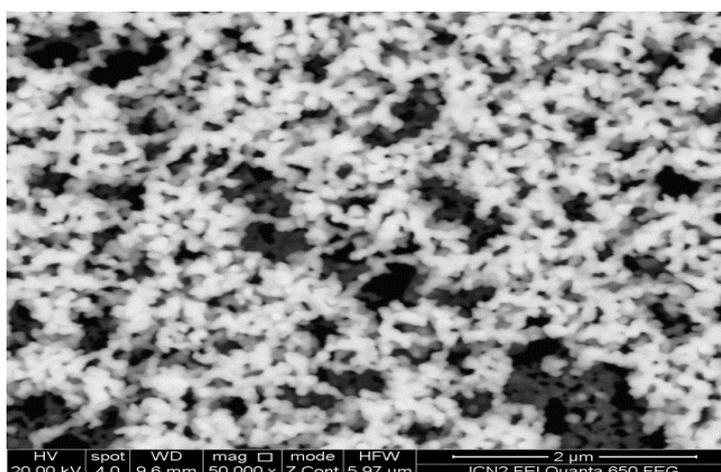
FIGURA 82 – COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO EI-Au EM H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ a) PRIMEIRO CICLO b) CICLOS CONSECUTIVOS c) VARIAÇÃO DE CARGA DO PROCESSO CATÓDICO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CICLOS.





O EI-Au apresentou uma corrente de pico anódica notória no primeiro ciclo, seguido de um decaimento acentuado e variação no pico anódico. A atribuição desses resultados é dada aos fenômenos discutidos anteriormente. Após a sinterização, a formação do filme de ouro provavelmente não é contínuo, apresentando átomos com número de coordenação incompletos em uma grande extensão. O que é concordante com as imagens de MEV em alta resolução para a superfície do eletrodo, a qual se encontra na FIGURA 83 onde é possível perceber que o eletrodo possui estrutura de alta rugosidade.

FIGURA 83 – IMAGEM DE MEV NO MODO BSE PARA O ELETRODO EI-Au



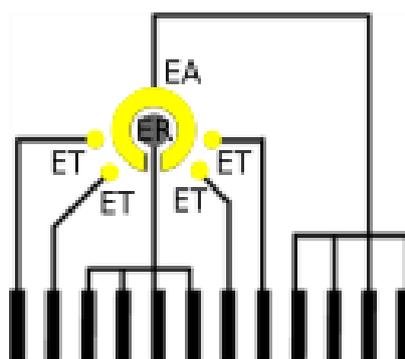
Com a aplicação de potenciais anódicos, essas espécies que possuem maior energia devem ser prontamente oxidadas, seguida de processos *place-exchange*, onde a acomodação dessa superfície gera um estado de menor energia. Em seguida, as formas de óxido que possuem cinética de formação

mais lenta, que são os átomos mais estabilizados da superfície continuam o processo de oxidação. A variação da carga do processo catódico em função do número de ciclos também indica tais processos. Inicialmente a carga de redução é relativamente grande, com decaimento nos primeiros ciclos e em seguida retomando o crescimento ao longo da ciclagem (FIGURA 82 c).

4.3.6 Repetibilidade e reprodutibilidade

Com o objetivo de verificar a versatilidade da tecnologia IJT, dispositivos para multidetecção foram produzidos. Para isso, os contatos elétricos, circuito e o ER foram impressos utilizando uma tinta comercial de prata, a qual foi otimizada no trabalho de (Da Silva *et al.*, 2014). A tinta de nanopartículas de prata (Ag-ink) foi impressa primeiramente e em seguida o cartucho foi retirado e a impressão dos eletrodos de ouro foi realizada. Após a impressão, o dispositivo foi colocado em uma chapa de aquecimento a 190° C para a sinterização. Ambas as tintas necessitam do processo de sinterização para a formação do filme metálico (120° C para Ag e 190° C para Au). Na FIGURA 84, está ilustrado o dispositivo utilizado.

FIGURA 84 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO ELETRODO IMPRESSO PARA MULTIDETECÇÃO PROPOSTO.

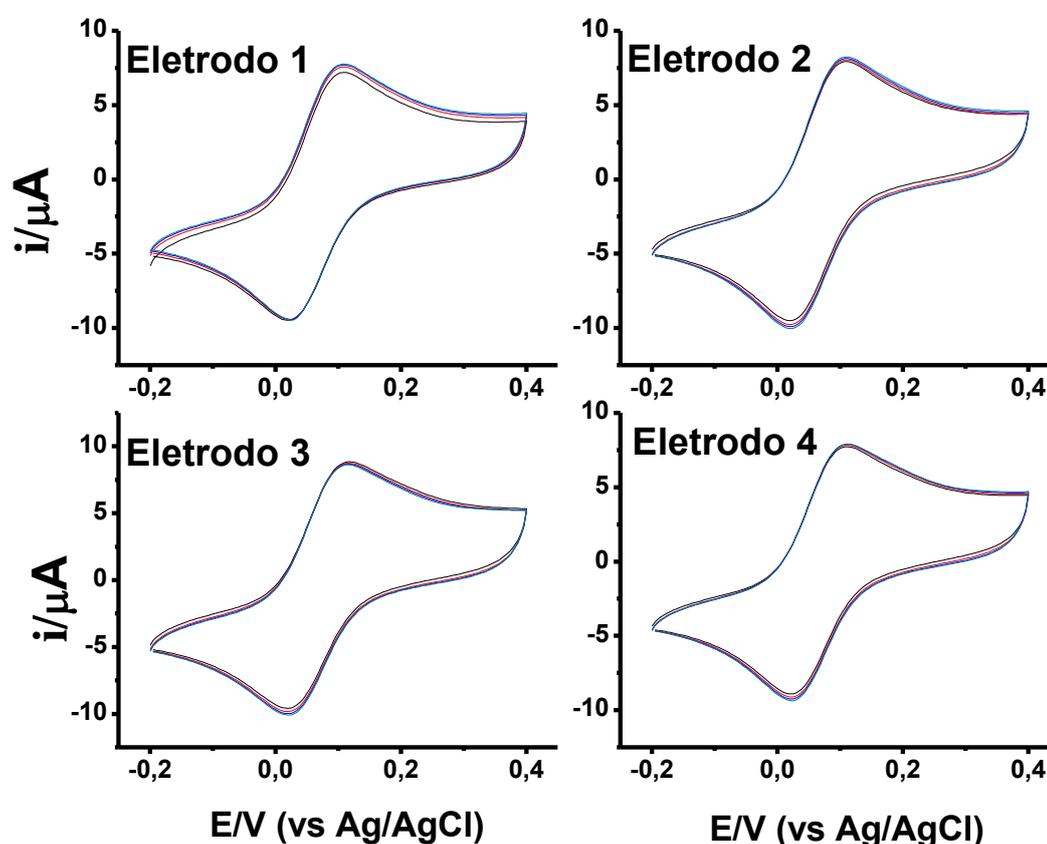


A formação do filme de AgCl sobre o eletrodo de prata foi realizado segundo o procedimento proposto por (Da Silva *et al.*, 2014), através da adição de água sanitária sobre o eletrodo de prata. A variação da coloração indicou a formação do filme. A reação de formação do p-ER de Ag/AgCl pode ser descrita pela Equação (37), onde a prata metálica é oxidada pelo íon hipoclorito:



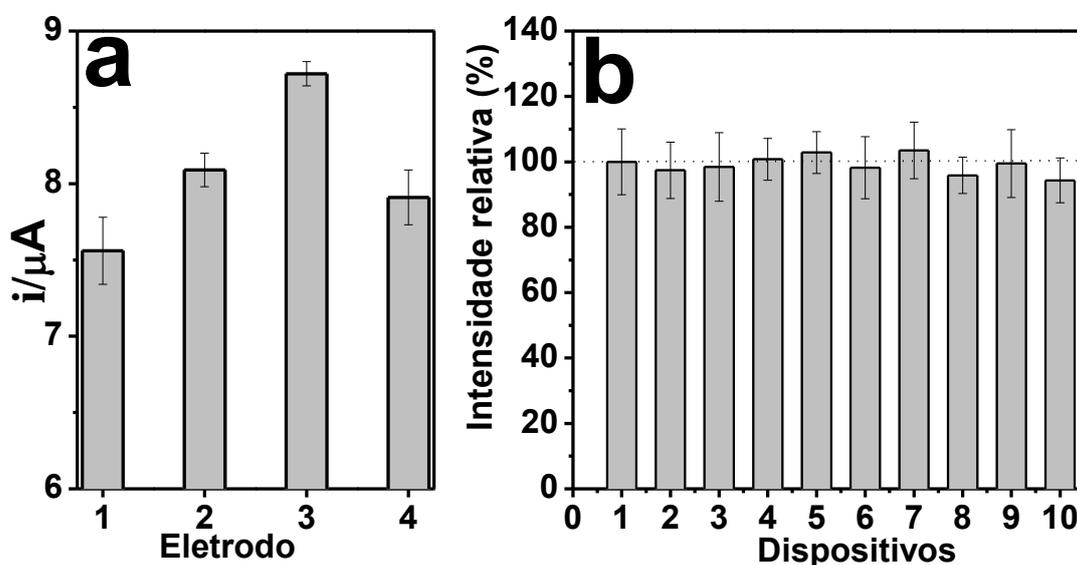
Os eletrodos produzidos foram testados quanto a reprodução dos resultados em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ como molécula sonda. Na FIGURA 85 encontram-se os resultados para um mesmo dispositivo.

FIGURA 85 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ELETRODOS NO MESMO DISPOSITIVO



Com relação ao perfil voltamétrico, todos os eletrodos apresentaram um perfil semelhante com $i_{p_a} = 110 \pm 8 \text{ mV}$ e $i_{p_c} = 29 \pm 7 \text{ mV}$, indicando a estabilidade da impressão do p-ER e conexão com os quatro eletrodos de trabalho. A variação das magnitudes de corrente foi analisada pela i_{p_a} em 110 mV os resultados encontram-se na FIGURA 86.

FIGURA 86 – VARIAÇÃO DA CORRENTE DE PICO a) PARA UM MESMO DISPOSITIVO b) DIFERENTES DISPOSITIVOS



Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade de impressão, foram construídos 10 dispositivos. Em relação a variação de corrente para medidas consecutivas em um mesmo eletrodo, estes apresentaram desvios menores que 3,0 % ($n = 4$), indicando boa repetibilidade. A medida de corrente para um mesmo analíto em diferentes eletrodos (reprodutibilidade) nas mesmas condições foi normalizada em relação a média dos valores obtidos para os 10 dispositivos (i_{p_a} $7,74 \pm 0,78 \mu\text{A}$) foi de 10% para o mesmo dispositivo. Ao analisar a reprodutibilidade para um universo amostral maior, de 10 dispositivos que implicam em 40 eletrodos ($n = 40$) a variação entre as médias de cada e dispositivo encontrada foi de 10 % (FIGURA 86 b). Esse desvio pode ser explicado pela presença da etapa de delimitação da área, onde recobre-se a superfície do eletrodo de trabalho com o polímero PDMS e após a cura, o mesmo é delimitado e retirado, podendo lixiviar alguma quantidade de material da superfície do EI-Au. O ideal para esse sistema seria a introdução da tinta isolante também por impressão, sem que haja a necessidade de recobrimento dos eletrodos.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste trabalho, uma tinta a base de nanopartículas de ouro foi produzida utilizando um solvente não tóxico. A otimização de impressão que leva em conta vários fatores, foi realizada e eletrodos de ouro foram produzidos através da sinterização das nanopartículas de ouro. A caracterização eletroquímica deste material e a produção de um dispositivo de multideteção foi realizada com sucesso, fator que difere dos trabalhos existentes na literatura, onde normalmente a impressão é seguida de aplicações sem maiores informações do material impresso. Os desvios de reprodutibilidade dos dispositivos podem ser melhorados com a introdução da tinta isolante via deposição por impressão, criando um dispositivo 100% impresso. Tais resultados indicam a potencialidade de aplicação analítica de tais eletrodos. A aplicação destes dispositivos na produção de biossensores vem sendo desenvolvida em parceria com o grupo NANO do Instituto Catalão de Nanociência Nanotecnologia e foram impossibilitados de serem divulgados nesta tese por motivos de proteção intelectual contratual.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tese de doutorado chega ao fim com seus objetivos alcançados. A abordagem eletroanalítica das nanopartículas produzidas pelo método bifásico foi realizada com sucesso. Primeiramente pela obtenção de um nanocompósito por rota inédita, e também através da detecção de dopamina na presença de ácido ascórbico e úrico, onde foi possível observar as potencialidades que o material possui na construção de sensores eletroquímicos.

O desempenho deste nanocompósito na construção de biossensores mostrou-se bastante interessante do ponto de vista analítico e um novo dispositivo de baixo custo baseado em fios de algodão e o biossensor contendo a enzima tirosinase foi construído e aplicado na detecção de fenol. O biossensor apresentou limites de detecção na escala ultratraço. E bons resultados na detecção em amostras de água potável. Assim, esse sistema ilustra a possibilidade de aplicações que o μ TED apresenta, onde o arranjo de biomoléculas/ formas de detecção possíveis levam a inúmeras configurações.

A aplicação das NPAu passivadas por dodecanotiol pelo método bifásico na produção de tintas foi realizado com sucesso. O ouro, material unânime na produção de biossensores, abre uma gama de aplicações em sistemas de multidetecção, produção de eletrodos interdigitados, entre outros.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. N. Carbon Paste Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1576-1576, 1958.

AFKHAMI, A.; BAHIRAEI, A.; MADRAKIAN, T. Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 168-176, 2016.

AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 2, p. 345-352, 2016.

AHMET KOYUN, E. A., YELIZ KOCA İPEK. Biosensors and Their Principles. 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/a-roadmap-of-biomedical-engineers-and-milestones/biosensors-and-their-principles>. Acesso em: 17 de Julho de 2016.

ALEEVA, Y.; PIGNATARO, B. Recent advances in upscalable wet methods and ink formulations for printed electronics. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 32, p. 6436-6453, 2014.

ALKASIR, R. S. J.; GANESANA, M.; WON, Y.-H.; STANCIU, L.; ANDREESCU, S. Enzyme functionalized nanoparticles for electrochemical biosensors: A comparative study with applications for the detection of bisphenol A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 43-49, 2010.

AMBROSI, A.; CHUA, C. K.; BONANNI, A.; PUMERA, M. Electrochemistry of Graphene and Related Materials. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 14, p. 7150-7188, 2014.

ANTON, N. S.; SANTOSH, P.; KAPILA, P. H.; ROBERT, W. C.; SUMANASEKERA, G. U. Side-by-side comparison of Raman spectra of anchored and suspended carbon nanomaterials. **Nanotechnology**, v. 19, n. 19, p. 195708, 2008.

BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Chemically functionalized carbon nanotubes. **Small**, v. 1, n. 2, p. 180-192, 2005.

BANKS, C. E.; MOORE, R. R.; DAVIES, T. J.; COMPTON, R. G. Investigation of modified basal plane pyrolytic graphite electrodes: definitive evidence for the electrocatalytic properties of the ends of carbon nanotubes. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1804-1805, 2004.

BARTON, J.; GARCÍA, M. B. G.; SANTOS, D. H.; FANJUL-BOLADO, P.; RIBOTTI, A.; MCCAUL, M.; DIAMOND, D.; MAGNI, P. Screen-printed electrodes for environmental monitoring of heavy metal ions: a review. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 2, p. 503-517, 2016.

BEATI, A. A. G. F.; REIS, R. M.; ROCHA, R. S.; LANZA, M. R. V. Development and Evaluation of a Pseudoreference Pt//Ag/AgCl Electrode for Electrochemical Systems. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 14, p. 5367-5371, 2012.

BERGAMINI, M. F.; SANTOS, D. P.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical behavior and voltammetric determination of pyrazinamide using a poly-histidine modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 690, p. 47-52, 2013.

BOJORGE RAMÍREZ, N.; SALGADO, A. M.; VALDMAN, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 227-249, 2009.

BRUST, M.; KIELY, C. J. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 202, n. 2-3, p. 175-186, 2002.

BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; WHYMAN, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 7, p. 801-802, 1994.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold: II the electrocatalytic behaviour of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 39-50, 1998// 1998.

BURNS, M. A.; JOHNSON, B. N.; BRAHMASANDRA, S. N.; HANDIQUE, K.; WEBSTER, J. R.; KRISHNAN, M.; SAMMARCO, T. S.; MAN, P. M.; JONES, D.; HELDSINGER, D.; MASTRANGELO, C. H.; BURKE, D. T. An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device. **Science**, v. 282, n. 5388, p. 484-487, 1998.

CAETANO, F. R.; GEVAERD, A.; CASTRO, E. G.; BERGAMINI, M. F.; ZARBIN, A. J. G.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Electroanalytical application of a screen-printed electrode modified by dodecanethiol-stabilized platinum nanoparticles for dapsone determination. **Electrochimica Acta**, v. 66, p. 265-270, 2012.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241-259, 2010.

CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, M. A.; DE VILLENA, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer-based tyrosinase biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 494, n. 1, p. 187-197, 2003.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry**. New York: Plenum Press, 1990.

CARRALERO SANZ, V.; MENA, M. L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, n. 1, p. 1-8, 2005.

CASTRO, E. G.; SALVATIERRA, R. V.; SCHREINER, W. H.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Dodecanethiol-Stabilized Platinum Nanoparticles Obtained by a Two-Phase Method: Synthesis, Characterization, Mechanism of Formation, and Electrocatalytic Properties. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 2, p. 360-370, 2010.

CHEUNG, J.; WELLS, R. J. Analysis of phenolic compounds in effluent by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with direct on-column benzylation: sensitive negative ion chemical ionisation gas chromatography-mass spectrometry detection of phenyl benzyl ethers. **Journal of Chromatography A**, v. 771, n. 1, p. 203-211, 1997.

CHEW, L. M.; XIA, W.; DÜDDER, H.; WEIDE, P.; RULAND, H.; MUHLER, M. On the role of the stability of functional groups in multi-walled carbon nanotubes applied as support in iron-based high-temperature Fischer–Tropsch synthesis. **Catalysis Today**,

CHRISTOPHER M.A. BRETT, A. M. O. B. **Electrochemistry: Principles, methods and applications**. 1. Coimbra: Oxford, 1994.

CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.

CLIMENT, V.; FELIU, J. M. Thirty years of platinum single crystal electrochemistry. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, n. 7, p. 1297-1315, 2011.

COMPTON, R. G.; MATYSIK, F.-M. Sonovoltammetric behavior of ascorbic acid and dehydroascorbic acid at glassy carbon electrodes: Analysis using pulsed sonovoltammetry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 218-222, 1996.

CONAMA. Resoluções do CONAMA. 2012.

CORBIERRE, M. K.; LENNOX, R. B. Preparation of Thiol-Capped Gold Nanoparticles by Chemical Reduction of Soluble Au(I)–Thiolates. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 23, p. 5691-5696, 2005.

CORMA, A.; GARCIA, H. Supported gold nanoparticles as catalysts for organic reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 2096-2126, 2008.

CORTINA-PUIG, M.; MUÑOZ-BERBEL, X.; CALAS-BLANCHARD, C.; MARTY, J.-L. Diazonium-functionalized tyrosinase-based biosensor for the detection of tea polyphenols. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 1, p. 187-193, 2010.

CUI, G.; YOO, J. H.; LEE, J. S.; YOO, J.; UHM, J. H.; CHA, G. S.; NAM, H. Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes. **Analyst**, v. 126, n. 8, p. 1399-1403, 2001.

CUI, W.; LU, W.; ZHANG, Y.; LIN, G.; WEI, T.; JIANG, L. Gold nanoparticle ink suitable for electric-conductive pattern fabrication using in ink-jet printing technology. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 358, n. 1–3, p. 35-41, 2010.

CUMMINS, G.; DESMULLIEZ, M. P. Y. Inkjet printing of conductive materials: a review. **Circuit World**, v. 38, n. 4, p. 193-213, 2012.

DA SILVA, E. T. S. G.; MISERERE, S.; KUBOTA, L. T.; MERKOÇI, A. Simple On-Plastic/Paper Inkjet-Printed Solid-State Ag/AgCl Pseudoreference Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 21, p. 10531-10534, 2014.

DATSYUK, V.; KALYVA, M.; PAPAGELIS, K.; PARTHENIOS, J.; TASIS, D.; SIOKOU, A.; KALLITSIS, I.; GALIOTIS, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 6, p. 833-840, 2008.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

DE BENEDETTO, G. E.; FICO, D.; PENNETTA, A.; MALITESTA, C.; NICOLARDI, G.; LOFRUMENTO, D. D.; DE NUCCIO, F.; LA PESA, V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, p. 266-270, 2014.

DE HEMPTINNE, X. The mechanism of heterogeneous electron transfer. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 77, n. 1-2, p. 21-32, 1968.

DE, M.; MIRANDA, O. R.; RANA, S.; ROTELLO, V. M. Size and geometry dependent protein-nanoparticle self-assembly. **Chemical Communications**, n. 16, p. 2157-2159, 2009.

DE TOLEDO, R. A.; SANTOS, M. C.; CAVALHEIRO, E. T. G.; MAZO, L. H. Determination of dopamine in synthetic cerebrospinal fluid by SWV with a graphite-polyurethane composite electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 6, p. 1161-1166, 2005.

DEMZYK, B. G.; WANG, Y. M.; CUMINGS, J.; HETMAN, M.; HAN, W.; ZETTL, A.; RITCHIE, R. O. Direct mechanical measurement of the tensile strength and elastic modulus of multiwalled carbon nanotubes. **Materials Science and Engineering: A**, v. 334, n. 1-2, p. 173-178, 2002.

DENENBERG, V. H.; KIM, D. S.; PALMITER, R. D. The role of dopamine in learning, memory, and performance of a water escape task. **Behavioural Brain Research**, v. 148, n. 1-2, p. 73-78, 2004.

DIACONU, I.; CRISTEA, C.; HÂRCEAGĂ, V.; MARRAZZA, G.; BERINDAN-NEAGOE, I.; SÂNDULESCU, R. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p. 128-138, 2013.

DIAZ, A. F.; CASTILLO, J. I.; LOGAN, J. A.; LEE, W.-Y. Electrochemistry of conducting polypyrrole films. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 129, n. 1, p. 115-132, 1981.

DODOO-ARHIN, D.; HOWE, R. C. T.; HU, G.; ZHANG, Y.; HIRALAL, P.; BELLO, A.; AMARATUNGA, G.; HASAN, T. Inkjet-printed graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. **Carbon**, v. 105, p. 33-41, 2016.

DOLATTO, R. G.; MESSERSCHMIDT, I.; FRAGA PEREIRA, B.; MARTINAZZO, R.; ABATE, G. Preconcentration of polar phenolic compounds from water samples and soil extract by liquid-phase microextraction and determination via liquid chromatography with ultraviolet detection. **Talanta**, v. 148, p. 292-300, 2016.

DROPSSENS. 2016. Disponível em: <http://www.dropsens.com>. Acesso em: 22/07/2016.

DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1192-1199, 2003.

DUPONT. Plastics, polimers and resins. 2016. Disponível em: http://www2.dupont.com/Kapton/en_US/news_events/article20131115.html . Acesso em: 21/06/2016.

EL- DEAB, M. S.; OHSAKA, T. An extraordinary electrocatalytic reduction of oxygen on gold nanoparticles-electrodeposited gold electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 4, p. 288-292, 2002.

ELKAOUTIT, M.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; TEMSAMANI, K. R.; DOMÍNGUEZ, M.; HIDALGO-HIDALGO-DE-CISNEROS, J. L. Structural characteristics and cyclic voltammetric behaviour of Sonogel-Carbon tyrosinase biosensors. A detailed comparative study of three immobilization matrixes. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 157-163, 2008.

EPA. Toxics Release Inventory Program. 2016. Disponível em: <https://www.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/tri-chemical-list-ry-2014-including-toxic-chemical-categories>. Acesso em: 26/07/2016.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 147, p. 145-181, January 1, 1857 1857.

FELTEN, A.; BITTENCOURT, C.; PIREAUX, J. J. Gold clusters on oxygen plasma functionalized carbon nanotubes: XPS and TEM studies. **Nanotechnology**, v. 17, n. 8, p. 1954, 2006.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 230-243, 2003.

FRENZ, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature**, v. 241, p. 20, 1973.

GAO, C.; GUO, Z.; LIU, J.-H.; HUANG, X.-J. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1948-1963, 2012.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nat Mater**, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.

GEVAERD, A.; CAETANO, F. R.; OLIVEIRA, P. R.; ZARBIN, A. J. G.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Thiol-capped gold nanoparticles: Influence of capping amount on electrochemical behavior and potential application as voltammetric sensor for diltiazem. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 673-678, 2015.

GONG, K.; CHAKRABARTI, S.; DAI, L. Electrochemistry at Carbon Nanotube Electrodes: Is the Nanotube Tip More Active Than the Sidewall? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 29, p. 5446-5450, 2008.

GONZÁLEZ-GUERRERO, A. B.; MENDOZA, E.; PELLICER, E.; ALSINA, F.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; LECHUGA, L. M. Discriminating the carboxylic groups

from the total acidic sites in oxidized multi-wall carbon nanotubes by means of acid–base titration. **Chemical Physics Letters**, v. 462, n. 4–6, p. 256-259, 2008.

GOSSER-JUNIOR, D. K. **Cyclic Voltammetry: Simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: 1993. 2.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, Mar 2008.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GRUJICIC, M.; CAO, G.; RAO, A. M.; TRITT, T. M.; NAYAK, S. UV-light enhanced oxidation of carbon nanotubes. **Applied Surface Science**, v. 214, n. 1–4, p. 289-303, 2003.

HAGHBEEN, K.; SABOURY, A. A.; KARBASSI, F. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1675, n. 1–3, p. 139-146, 2004.

HEFCO, V.; YAMADA, K.; HEFCO, A.; HRITCU, L.; TIRON, A.; NABESHIMA, T. Role of the mesotelencephalic dopamine system in learning and memory processes in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 475, n. 1–3, p. 55-60, 2003.

HEIMENDAHL, M. V. **Electron microscopy of materials : an introduction**. New York, N.Y.: Academic Press, 1980.

HONG, S.; MYUNG, S. Nanotube Electronics: A flexible approach to mobility. **Nat Nano**, v. 2, n. 4, p. 207-208, 2007.

HOSTETLER, M. J.; WINGATE, J. E.; ZHONG, C.-J.; HARRIS, J. E.; VACHET, R. W.; CLARK, M. R.; LONDONO, J. D.; GREEN, S. J.; STOKES, J. J.; WIGNALL, G. D.; GLISH, G. L.; PORTER, M. D.; EVANS, N. D.; MURRAY, R. W. Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size. **Langmuir**, v. 14, n. 1, p. 17-30, 1998.

HUNG, V. W.-S.; KERMAN, K. Gold electrodeposition on carbon nanotubes for the enhanced electrochemical detection of homocysteine. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 4, p. 328-330, 2011.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.

INZELT, G. Pseudo-reference Electrodes. In: INZELT, G.; LEWENSTAM, A., *et al* (Ed.). **Handbook of Reference Electrodes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p.331-332.

JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3753-3771, 2013.

JACOBSON, F.; PISTORIUS, A.; FARKAS, D.; DE GRIP, W.; HANSSON, Ö.; SJÖLIN, L.; NEUTZE, R. pH Dependence of Copper Geometry, Reduction Potential, and Nitrite

Affinity in Nitrite Reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 9, p. 6347-6355, 2007.

JANEGITZ, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 25, p. 128-133, 2012.

JENSEN, G. C.; KRAUSE, C. E.; SOTZING, G. A.; RUSLING, J. F. Inkjet-printed gold nanoparticle electrochemical arrays on plastic. Application to immunodetection of a cancer biomarker protein. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 11, p. 4888-4894, 2011.

KAHNG, Y. H.; KIM, M.-K.; LEE, J.-H.; KIM, Y. J.; KIM, N.; PARK, D.-W.; LEE, K. Highly conductive flexible transparent electrodes fabricated by combining graphene films and inkjet-printed silver grids. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 124, p. 86-91, 2014.

KAMAT, P. V. Meeting the Clean Energy Demand: Nanostructure Architectures for Solar Energy Conversion. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 7, p. 2834-2860, 2007/02/01 2007.

KIM, Y.-J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 15, p. 1707-1723, 2005.

KLEIJN, S. E. F.; LAI, S. C. S.; KOPER, M. T. M.; UNWIN, P. R. Electrochemistry of Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 14, p. 3558-3586, 2014.

KOCHANA, J.; WAPIENNIK, K.; KOZAK, J.; KNIHNICKI, P.; POLLAP, A.; WOŹNIAKIEWICZ, M.; NOWAK, J.; KOŚCIELNIAK, P. Tyrosinase-based biosensor for determination of bisphenol A in a flow-batch system. **Talanta**, v. 144, p. 163-170, 2015.

KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, n. 6042, p. 162-163, 1985.

KWI JONG, L.; BYUNG HO, J.; TAE HOON, K.; JAEWOO, J. Direct synthesis and inkjetting of silver nanocrystals toward printed electronics. **Nanotechnology**, v. 17, n. 9, p. 2424, 2006.

LAKARD, B.; HERLEM, G.; LAKARD, S.; ANTONIOU, A.; FAHYS, B. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1641-1647, 2004.

LI, J.; ZHANG, X. Fabrication of Poly(Aspartic Acid)-Nanogold Modified Electrode and Its Application for Simultaneous Determination of Dopamine, Ascorbic Acid, and Uric Acid. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 03, p. 9, 2012.

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics** 84 2004. 2475.

LIZ-MARZAN, L. M. Gold nanoparticle research before and after the Brust-Schiffrin method. **Chemical Communications**, v. 49, n. 1, p. 16-18, 2013.

LORDI, V.; YAO, N.; WEI, J. Method for Supporting Platinum on Single-Walled Carbon Nanotubes for a Selective Hydrogenation Catalyst. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 3, p. 733-737, 2001.

LORENÇON, E.; FERREIRA, D. C.; RESENDE, R. R.; KRAMBROCK, K. Amphiphilic gold nanoparticles supported on carbon nanotubes: Catalysts for the oxidation of lipophilic compounds by wet peroxide in biphasic systems. **Applied Catalysis A: General**, v. 505, p. 566-574, 2015.

LORENCON, E.; LACERDA, R. G.; LADEIRA, L. O.; RESENDE, R. R.; FERLAUTO, A. S.; SCHUCHARDT, U.; LAGO, R. M. Thermal behavior of carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 105, n. 3, p. 953-959, 2011.

LOWE, C. R. AN INTRODUCTION TO THE CONCEPTS AND TECHNOLOGY OF BIOSENSORS. **Biosensors**, v. 1, n. 1, p. 3-16, 1985.

LU, L.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; HUAN, S.; SHEN, G.; YU, R. A novel tyrosinase biosensor based on hydroxyapatite–chitosan nanocomposite for the detection of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, n. 2, p. 146-151, 2010.

MÄÄTTÄNEN, A.; IHALAINEN, P.; PULKKINEN, P.; WANG, S.; TENHU, H.; PELTONEN, J. Inkjet-Printed Gold Electrodes on Paper: Characterization and Functionalization. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 2, p. 955-964, 2012.

MACDIARMID, A. G. Polyaniline and polypyrrole: Where are we headed? **Synthetic Metals**, v. 84, n. 1, p. 27-34, 1997/01/01 1997.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, n. 1, p. 244-248, 1990.

MARTIN, G. D.; HOATH, S. D.; HUTCHINGS, I. M. Inkjet printing - the physics of manipulating liquid jets and drops. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 105, n. 1, p. 012001, 2008.

MARTÍNEZ CUESTA, S.; RAHMAN, SYED A.; FURNHAM, N.; THORNTON, JANET M. The Classification and Evolution of Enzyme Function. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 6, p. 1082-1086, 2015.

MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; LLOPIS, X.; PÉREZ, B.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 826-838, 2005.

Microbial sensors.. **Biosensors**. Boston, MA: Springer US, 1993. p.146-152.

MITCHELL, R.; CARR, C.; PARFITT, M.; VICKERMAN, J.; JONES, C. Surface chemical analysis of raw cotton fibres and associated materials. **Cellulose**, v. 12, n. 6, p. 629-639, 2005.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques

for immobilized enzymes. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015.

MORAES, R. A.; MATOS, C. F.; CASTRO, E. G.; SCHREINER, W. H.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. The Effect of Different Chemical Treatments on the Structure and Stability of Aqueous Dispersion of Iron- and Iron Oxide-Filled Multi-Walled Carbon Nanotubes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2191-2201, 2011.

MOSCH, H. L. K. S.; AKINTOLA, O.; PLASS, W.; HÖPPENER, S.; SCHUBERT, U. S.; IGNASZAK, A. Specific Surface versus Electrochemically Active Area of the Carbon/Polypyrrole Capacitor: Correlation of Ion Dynamics Studied by an Electrochemical Quartz Crystal Microbalance with BET Surface. **Langmuir**, v. 32, n. 18, p. 4440-4449, 2016.

MUGURUMA, H.; INOUE, Y.; INOUE, H.; OHSAWA, T. Electrochemical Study of Dopamine at Electrode Fabricated by Cellulose-Assisted Aqueous Dispersion of Long-Length Carbon Nanotube. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 22, p. 12284-12292, 2016.

MUKHERJEE, S.; BASAK, B.; BHUNIA, B.; DEY, A.; MONDAL, B. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 1, p. 61-73, 2013.

MUÑOZ-MUÑOZ, J. L.; GARCIA-MOLINA, F.; VARON, R.; GARCIA-RUIZ, P. A.; TUDELA, J.; GARCIA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. **IUBMB Life**, v. 62, n. 7, p. 539-547, 2010.

NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A.; SUNITHA, K. R. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v. 55, n. 6, p. 1039-1046, 2001.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, p. 614-629, 1998.

NEFF, V. D. Electrochemical Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 125, n. 6, p. 886-887, 1978.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Leningher Principios de Bioquímica**. Barcelona: Omega, 2015.

NESSIM, G. D. Properties, synthesis, and growth mechanisms of carbon nanotubes with special focus on thermal chemical vapor deposition. **Nanoscale**, v. 2, n. 8, p. 1306-1323, 2010.

NEUŽI, P.; GISELBRECHT, S.; LÄNGE, K.; HUANG, T. J.; MANZ, A. Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 8, p. 620-632, 2012.

NILGHAZ, A.; BAGHERBAIGI, S.; LAM, C.; MOUSAVI, S.; CORCOLES, E.; WICAKSONO, D. Multiple semi-quantitative colorimetric assays in compact embeddable

microfluidic cloth-based analytical device (μ CAD) for effective point-of-care diagnostic. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 19, n. 2, p. 317-333, 2015.

NIU, C.; SICHEL, E. K.; HOCH, R.; MOY, D.; TENNENT, H. High power electrochemical capacitors based on carbon nanotube electrodes. **Applied Physics Letters**, v. 70, n. 11, p. 1480-1482, 1997.

O'NEILL, R. D. Microvoltammetric techniques and sensors for monitoring neurochemical dynamics in vivo. A review. **Analyst**, v. 119, n. 5, p. 767-779, 1994.

OESCH, U.; JANATA, J. Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. **Electrochimica Acta**, v. 28, n. 9, p. 1237-1246, 1983.

OICKLE, A. M.; GOERTZEN, S. L.; HOPPER, K. R.; ABDALLA, Y. O.; ANDREAS, H. A. Standardization of the Boehm titration: Part II. Method of agitation, effect of filtering and dilute titrant. **Carbon**, v. 48, n. 12, p. 3313-3322, 2010.

OLIVEIRA, M. M.; UGARTE, D.; ZANCHET, D.; ZARBIN, A. J. G. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, n. 2, p. 429-435, 2005.

OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Carbon Nanotubes Decorated with both Gold Nanoparticles and Polythiophene. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 48, p. 18783-18786, 2008.

OLIVEIRA, P. R. D.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 171-172, p. 795-802, 2012.

ORTEGA, F.; DOMÍNGUEZ, E.; JÖNSSON-PETTERSSON, G.; GORTON, L. Biosensors and Flow Injection Analysis Amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds using a tyrosinase graphite electrode in a flow injection system. **Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 289-300, 1993.

ORTH, E. S.; FERREIRA, J. G. L.; FONSACA, J. E. S.; BLASKIEVICZ, S. F.; DOMINGUES, S. H.; DASGUPTA, A.; TERRONES, M.; ZARBIN, A. J. G. pKa determination of graphene-like materials: Validating chemical functionalization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 467, p. 239-244, 2016.

OSORIO, A. G.; SILVEIRA, I. C. L.; BUENO, V. L.; BERGMANN, C. P. H₂SO₄/HNO₃/HCl—Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 5, Part 1, p. 2485-2489, 2008.

OZONER, S. K.; YALVAC, M.; ERHAN, E. Flow injection determination of catechol based on polypyrrole-carbon nanotube-tyrosinase biocomposite detector. **Current Applied Physics**, v. 10, n. 1, p. 323-328, 2010.

PALEČEK, E.; BARTOŠÍK, M. Electrochemistry of Nucleic Acids. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3427-3481, 2012.

PAROLO, C.; MERKOCI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 2, p. 450-457, 2013.

PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; FATIBELLO-FILHO, O.; BRETT, C. M. A. Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite–Epoxy Composite Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 13, p. 5364-5372, 2009.

PEMBERTON, R. M.; XU, J.; PITTSOON, R.; DRAGO, G. A.; GRIFFITHS, J.; JACKSON, S. K.; HART, J. P. A screen-printed microband glucose biosensor system for real-time monitoring of toxicity in cell culture. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2448-2453, 2011.

PEÑA, N.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. **Talanta**, v. 55, n. 1, p. 179-187, 2001.

PENG, B.; LOCASCIO, M.; ZAPOL, P.; LI, S.; MIELKE, S. L.; SCHATZ, G. C.; ESPINOSA, H. D. Measurements of near-ultimate strength for multiwalled carbon nanotubes and irradiation-induced crosslinking improvements. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 10, p. 626-631, 2008.

PERALA, S. R. K.; KUMAR, S. On the Mechanism of Metal Nanoparticle Synthesis in the Brust–Schiffrin Method. **Langmuir**, v. 29, n. 31, p. 9863-9873, 2013.

PHILLIPS, T., 2010. Disponível em: < <http://imieurope.com/inkjet-blog/2016/2/8/industrial-inkjet-printing> Acesso em: 04/06/2016.

POPOV, A. A.; YANG, S.; DUNSCH, L. Endohedral Fullerenes. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 8, p. 5989-6113, 2013.

PRASEK, J.; DRBOHLAVOVA, J.; CHOMOUCKA, J.; HUBALEK, J.; JASEK, O.; ADAM, V.; KIZEK, R. Methods for carbon nanotubes synthesis-review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 40, p. 15872-15884, 2011.

PUIG, D.; BARCELÓ, D. Analytical Methods for Monitoring Industrial Effluents and Waste Determination of phenolic compounds in water and waste water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 362-375, 1996.

PUMERA, M.; SASAKI, T.; IWAI, H. Relationship between Carbon Nanotube Structure and Electrochemical Behavior: Heterogeneous Electron Transfer at Electrochemically Activated Carbon Nanotubes. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 3, n. 12, p. 2046-2055, 2008.

QIN, Y.; KWON, H.-J.; SUBRAHMANYAM, A.; HOWLADER, M. M. R.; SELVAGANAPATHY, P. R.; ADRONOV, A.; DEEN, M. J. Inkjet-printed bifunctional carbon nanotubes for pH sensing. **Materials Letters**, v. 176, p. 68-70, 2016.

QU, Y.; MA, M.; WANG, Z.; ZHAN, G.; LI, B.; WANG, X.; FANG, H.; ZHANG, H.; LI, C. Sensitive amperometric biosensor for phenolic compounds based on graphene–silk peptide/tyrosinase composite nanointerface. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 85-88, 2013.

QUINN, B. M.; DEKKER, C.; LEMAY, S. G. Electrodeposition of Noble Metal Nanoparticles on Carbon Nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 17, p. 6146-6147, 2005.

RAFIEE, B.; FAKHARI, A. R.; GHAFFARZADEH, M. Impedimetric and stripping voltammetric determination of methamphetamine at gold nanoparticles-multiwalled carbon nanotubes modified screen printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 218, p. 271-279, 2015.

RANA, S.; MITTAL, S. K.; SINGH, N.; SINGH, J.; BANKS, C. E. Schiff base modified screen printed electrode for selective determination of aluminium(III) at trace level. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 17-27, 2017.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098-1115, 2013.

REYES, D. R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.-A.; MANZ, A. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2623-2636, 2002.

RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M. D.; SILVA, M. D. C. H. D. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, v. 33, p. 1370-1378, 2010.

ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M.; AKASAKA, T. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. **Carbon**, v. 43, n. 15, p. 3124-3131, 2005.

ROSEN, M.; SCHULDINER, S. The H⁺/H₂ equilibrium potential dependence on H₂ partial pressure on gold electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 18, n. 10, p. 687-690, 1973.

RUBINSTEIN, I.; BARD, A. J. Polymer films on electrodes. 4. Nafion-coated electrodes and electrogenerated chemiluminescence of surface-attached tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+). **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 21, p. 6641-6642, 1980.

SAITO, R.; GRÜNEIS, A.; GE, G. S.; BRAR, V. W.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M. S.; JORIO, A.; CANÇADO, L. G.; FANTINI, C.; PIMENTA, M. A.; FILHO, A. G. S. Double resonance Raman spectroscopy of single-wall carbon nanotubes. **New Journal of Physics**, v. 5, n. 1, p. 157, 2003.

SALEH, T. A. The influence of treatment temperature on the acidity of MWCNT oxidized by HNO₃ or a mixture of HNO₃/H₂SO₄. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 17, p. 7746-7751, 2011.

SALIMI, A.; MAMKHEZRI, H.; HALLAJ, R. Simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and neurotransmitters with a carbon ceramic electrode prepared by sol-gel technique. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 823-832, 2006.

SANEPAR. Registros sobre a composição da água distribuída. 2016. Disponível em: <http://www.sanepar.com.br/sanepar>. Acesso em: 15/05/2016.

SARDAR, R.; SHUMAKER-PARRY, J. S. 9-BBN Induced Synthesis of Nearly Monodisperse ω -Functionalized Alkylthiol Stabilized Gold Nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 7, p. 1167-1169, 2009.

SCALISI, R. G.; PALEARI, M.; FAVETTO, A.; STOPPA, M.; ARIANO, P.; PANDOLFI, P.; CHIOLERIO, A. Inkjet printed flexible electrodes for surface electromyography. **Organic Electronics**, v. 18, p. 89-94, 2015.

SCHELLER, F. W.; SCHUBERT, F.; NEUMANN, B.; PFEIFFER, D.; HINTSCHE, R.; DRANSFELD, I.; WOLLENBERGER, U.; RENNEBERG, R.; WARSINKE, A.; JOHANSSON, G.; SKOOG, M.; YANG, X.; BOGDANOVSKAYA, V.; BÜCKMANN, A.; ZAITSEV, S. Y. Second generation biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 6, n. 3, p. 245-253, 1991.

SCHNEEWEISS, M. A.; KOLB, D. M.; LIU, D.; MANDLER, D. Anodic oxidation of Au(111). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 75, n. 11, p. 1703-1709, 1997.

SCHNITZLER, M. C.; ZARBIN, A. J. G. The effect of process variables on the characteristics of carbon nanotubes obtained by spray pyrolysis. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 4, p. 585-597, 2008.

SCHONER, C.; TUCHSCHERER, A.; BLAUDECK, T.; JAHN, S. F.; BAUMANN, R. R.; LANG, H. Particle-free gold metal-organic decomposition ink for inkjet printing of gold structures. **Thin Solid Films**, v. 531, p. 147-151, 2013.

SINGH, M.; HAVERINEN, H. M.; DHAGAT, P.; JABBOUR, G. E. Inkjet Printing—Process and Its Applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 6, p. 673-685, 2010.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; GRASSI, M. T. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

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

SUN, J.-N.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Multiple functional ionic liquids based dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance chromatography for the determination of phenolic compounds in water samples. **Talanta**, v. 125, p. 329-335, 2014.

SUN, Y. G.; XIA, Y. N. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2176-2179, 2002.

SWAMY, B. E. K.; VENTON, B. J. Carbon nanotube-modified microelectrodes for simultaneous detection of dopamine and serotonin in vivo. **Analyst**, v. 132, n. 9, p. 876-884, 2007 2007.

SWANSON, J. M.; VOLKOW, N. D. Psychopharmacology: concepts and opinions about the use of stimulant medications. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 50, n. 1-2, p. 180-193, 2009.

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9, p. 865-891, 2014.

TAN, Y.; KAN, J.; LI, S. Amperometric biosensor for catechol using electrochemical template process. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 152, n. 2, p. 285-291, 2011.

TAURINO, I.; SANZÒ, G.; ANTIOCHIA, R.; TORTOLINI, C.; MAZZEI, F.; FAVERO, G.; DE MICHELI, G.; CARRARA, S. Recent advances in Third Generation Biosensors based on Au and Pt Nanostructured Electrodes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 151-159, 2016.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification¹. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121-131, 2001.

THOSTENSON, E. T.; REN, Z.; CHOU, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001.

TONYUSHKINA, K.; NICHOLS, J. H. Glucose Meters: A Review of Technical Challenges to Obtaining Accurate Results. **Journal of diabetes science and technology (Online)**, v. 3, n. 4, p. 971-980, 2009.

TSAI, J.-Z.; CHEN, C.-J.; SETTU, K.; LIN, Y.-F.; CHEN, C.-L.; LIU, J.-T. Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 1175-1182, 2016.

TSAI, M.-C.; YEH, T.-K.; TSAI, C.-H. An improved electrodeposition technique for preparing platinum and platinum–ruthenium nanoparticles on carbon nanotubes directly grown on carbon cloth for methanol oxidation. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 9, p. 1445-1452, 2006.

TSAI, Y.-C.; CHIU, C.-C. Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 125, n. 1, p. 10-16, 2007.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55-75, 1951.

UNTEREKER, D. F.; LENNOX, J. C.; WIER, L. M.; MOSES, P. R.; MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 81, n. 2, p. 309-318, 1977.

VENTON, B. J.; WIGHTMAN, R. M. Psychoanalytical electrochemistry: Dopamine and behavior. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 414A-421A, 2003.

VICENTINI, F. C.; GARCIA, L. L. C.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; JANEGITZ, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 17-23, 2016.

VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. Biosensors based on gold nanostructures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 3-20, 2011.

VILLEGAS, L. G. C.; MASHHADI, N.; CHEN, M.; MUKHERJEE, D.; TAYLOR, K. E.; BISWAS, N. A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. **Current Pollution Reports**, p. 1-11, 2016.

WANG, J.-L.; LI, B.-C.; LI, Z.-J.; REN, K.-F.; JIN, L.-J.; ZHANG, S.-M.; CHANG, H.; SUN, Y.-X.; JI, J. Electropolymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents. **Biomaterials**, v. 35, n. 27, p. 7679-7689, 2014.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. New York: VCHP, 1994. 9.

WANG, Y.; SUN, Y.; LIAO, H.; SUN, S.; LI, S.; AGER III, J. W.; XU, Z. J. Activation Effect of Electrochemical Cycling on Gold Nanoparticles towards the Hydrogen Evolution Reaction in Sulfuric Acid. **Electrochimica Acta**, v. 209, p. 440-447, 2016.

WEI, Y.; LIU, Z.-G.; YU, X.-Y.; WANG, L.; LIU, J.-H.; HUANG, X.-J. O₂-plasma oxidized multi-walled carbon nanotubes for Cd(II) and Pb(II) detection: Evidence of adsorption capacity for electrochemical sensing. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 12, p. 1506-1509, 2011.

WELCH, C. M.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 601-619, 2006.

WIGHTMAN, R. M.; MAY, L. J.; MICHAEL, A. C. Detection of dopamine dynamics in the brain. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 769A-779A, 1988/07/01 1988.

WU, B.; KUANG, Y.; ZHANG, X.; CHEN, J. Noble metal nanoparticles/carbon nanotubes nanohybrids: Synthesis and applications. **Nano Today**, v. 6, n. 1, p. 75-90, 2011.

WU, H. P.; CHENG, T. L.; TSENG, W. L. Phosphate-modified TiO₂ nanoparticles for selective detection of dopamine, levodopa, adrenaline, and catechol based on fluorescence quenching. **Langmuir**, v. 23, n. 14, p. 7880-7885, 2007.

XUE, B.; CHEN, P.; HONG, Q.; LIN, J.; TAN, K. L. Growth of Pd, Pt, Ag and Au nanoparticles on carbon nanotubes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 2378-2381, 2001.

YAROLOV, A. I.; KHARYBIN, A. N.; EMNÉUS, J.; MARKO-VARGA, G.; GORTON, L. Electrochemical properties of some copper-containing oxidases. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 40, n. 1, p. 49-57, 1996.

YEH, Y.-C.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1871-1880, 2012.

YOON, S.; SOHN, S.; KWON, J.; PARK, J. A.; JUNG, S. Double-shot inkjet printing for high-conductivity polymer electrode. **Thin Solid Films**, v. 607, p. 55-58, 2016.

YUNKER, P. J.; STILL, T.; LOHR, M. A.; YODH, A. G. Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 308-311, 2011.

ZACHOWSKI, E. J.; WOJCIECHOWSKI, M.; OSTERYOUNG, J. The analytical application of square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 183, p. 47-57, 1986.

ZHANG, X.; VAN LEEUWEN, J.; WICHERS, H. J.; FLURKEY, W. H. Characterization of Tyrosinase from the Cap Flesh of Portabella Mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 374-378, 1999/02/01 1999.

ZHAO, N.; CHIESA, M.; SIRRINGHAUS, H.; LI, Y.; WU, Y.; ONG, B. Self-aligned inkjet printing of highly conducting gold electrodes with submicron resolution. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 6, p. 064513, 2007.

ZHAO, Y.; GAO, Y.; ZHAN, D.; LIU, H.; ZHAO, Q.; KOU, Y.; SHAO, Y.; LI, M.; ZHUANG, Q.; ZHU, Z. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 51-57, 2005.

ZUMAN, P. J. Heyrovsky and the developments leading to square wave and pulse polarography. **Analyst**, v. 117, n. 12, p. 1803-1809, 1992.

ANEXO 1

TABELA 14 - ESPECIFICAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.

Reagente	Marca	Pureza
HNO ₃	VE TEC	65%
H ₂ SO ₄	VE TEC	98%
H[AuCl ₄]	Sigma-Aldrich®	30%
Nanotubos de Carbono MWCNTs-(10 - 40 nm)	Dropsens®	-
[K ₃ Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich®	99%
NaBH ₄	Sigma-Aldrich®	>96%
N(C ₈ H ₁₇) ₄ Br	Sigma-Aldrich®	98%
Tirosinase 25KU	Sigma-Aldrich®	≥1000 unidades/mg
Glutaraldeído	Sigma-Aldrich®	25%
Cloridrato de Cistamina	Sigma-Aldrich®	98%
CH ₃ COOH	Neon®	99,8%
(CH ₃ COO)Na	VE TEC®	99%
Nafion®	Sigma-Aldrich®	5%
Etanol	Synth®	96%
Na ₂ HPO ₄	VE TEC®	98%
NaH ₂ PO ₄	VE TEC®	99%
Cloridrato de Dopamina	Sigma-Aldrich®	>99%
Ácido Ascórbico	Impex®	99%
Ácido Úrico	Sigma-Aldrich®	>99%
NaOH	Sigma-Aldrich®	99%
Ag-ink	Sigma Aldrich®	20% Ag
Terpineol	Sigma-Aldrich®	98%
Poli-imida	Dupont®	0,1 mm
PDMS kit	Sigma - Aldrich	3160 cPs

ANEXO 2

Disciplinas cursadas

Código/ Disciplina	Créditos	Período	Conceito
CQ 820 / Eletroquímica Avançada	4	1/2012	B
CQ 781 /Prática de Docência em Química	1	1/2013	A
CQ 794 /Seminários C	1	1/2013	A
CQ-823 Mét. Anal. Aplicados à Det. de Traços	4	1/ 2013	B
CQ 736 B Met. Cient. e Redação acadêmico-científica	4	2/2015	B
Q795A - Seminários D	1	2/ 2015	A
CQ 736 B -Eletroquímica E Interfaces	4	2/2012	B

Artigos Publicados:

GEVAERD, A, **CAETANO, F.R.**, OLIVEIRA, P.R., ZARBIN, A.J.G., BERGAMINI, M.F., MARCOLINO-JUNIOR, L.H. *Thiol-capped gold nanoparticles: Influence of capping amount on electrochemical behavior and potential application as voltammetric sensor for diltiazem*. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 220: p. 673-678, 2015.

PEREIRA, P. A. R.; TEIXEIRA, MARCOS F. S.; **CAETANO, F. R.** ; BERGAMINI, MÁRCIO F. ; MARCOLINO-JÚNIOR, LUIZ H. *A Simple and Rapid Estimation of Totals Polyphenols Based On Carbon Paste Electrode Modified With Ruthenium Oxo-Complex*. Electroanalysis, v. 27, p. 2371- 2376, 2015.