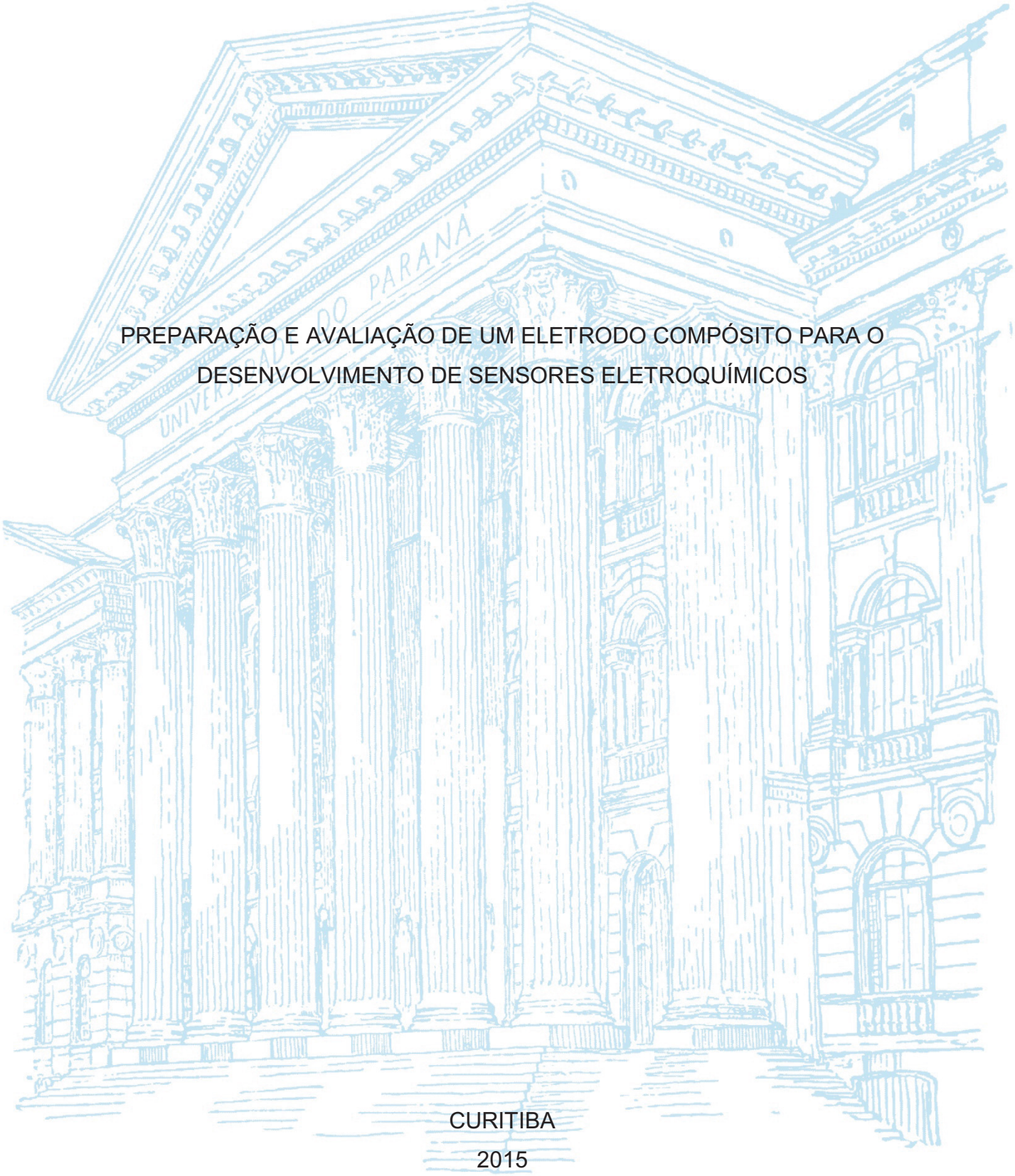
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCYELLE CALEGARI



PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO PARA O DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

CURITIBA

2015

FRANCYELLE CALEGARI

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO PARA O DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio F. Bergamini

Coorientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Jr.

CURITIBA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

C148p Calegari, Francyelle
Preparação e avaliação de um eletrodo compósito para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos / Francyelle Calegari. – Curitiba, 2015.
109 p. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

Orientador: Márcio F Bergamini.
Coorientador: Luiz H. Marcolino Jr.

1. Eletrodos compósitos. 2. Eletrodos químicamente modificados. 3. Biossensores. 4. Sistema de análise por injeção em fluxo. 5. Hidroclorotiazida. I. Universidade Federal do Paraná. II. Bergamini, Márcio F. III. Marcolino Jr, Luiz H. IV. Título.

CDD: 543

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

TERMO DE APROVAÇÃO

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM ELETRODO COMPÓSITO PARA O DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

por

FRANCYELLE CALEGARI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: _____
Prof. Dr. Marcio Fernando Bergamini
Dep. de Química – UFPR

_____
Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter
Instituto de Química - UFU

_____
Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 22 de setembro de 2015.

Aos meus pais e a Taty, meus grandes incentivadores.

Dedico com amor.

“Saber muito não lhe torna mais inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como você aplica esta informação”

Carl Segan

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química pela estrutura ofertada aos alunos. A CAPES pela bolsa concedida.

Aos Professores orientadores, Dr. Márcio Fernando Bergamini e Dr. Luiz Humberto Marcolino Júnior, não só pela orientação, mas também por todas as oportunidades, incentivo e por todos esses anos de trabalho juntos.

Aos Professores Dr. Gilberto Abate e Dr. Marco Tadeu Grassi pelas contribuições e sugestões a este trabalho durante o exame de qualificação. Aos Professores Dr. Eduardo Mathias Richter e novamente Dr. Gilberto Abate, membros desta banca.

Em especial, gostaria de agradecer aos colegas e amigos do LabSenE: Lis, Ava, Paulo, Michelle, Maurício, Deonir, Fábio, Viviane, Cris, Bárbara, Priscila, Emmanuelle, Amanda, Letícia Ochiai, Eduardo, Letícia, Jéferson, Arthur, Gustavo, Geovani e Cintia, agradeço por todas as contribuições, muito obrigada!

Gostaria de agradecer a minha família, Rosemeire, João e Tatyane. Muito obrigada por todo apoio, carinho e companheirismo, vocês são os meus melhores amigos, eu amo vocês!

Por ultimo, mas não menos importante, à Bibi, minha companhia durante horas e horas de trabalho.

RESUMO

No presente trabalho, desenvolveu-se um material compósito formado a partir de negro de fumo (NF) e poli(etileno-co-acetato de vinila) (EVA), visando explorar as características do negro de fumo com as vantagens da utilização de compósitos rígidos. Assim, diferentes proporções dos materiais NF e EVA foram avaliadas, variando-se a porcentagem de NF entre 30 e 75 % (m/m). Os materiais compósitos preparados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura e voltametria cíclica. Os estudos voltamétricos indicaram que a melhora na resposta do eletrodo é proporcional à quantidade de NF presente, o que foi verificado pelos cálculos dos parâmetros: % de área eletroativa, capacitância e constante heterogenia de transferência de elétrons. Assim, a melhor composição para os eletrodos compósitos foi 25EVA:75NF (m/m). A potencialidade analítica do dispositivo proposto foi demonstrada a partir da sua aplicação como um sensor amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) para determinação de ácido ascórbico. Além disso, o eletrodo 25EVA/75NF também foi utilizado como uma plataforma para a construção de um eletrodo quimicamente modificado sensível à glicose. Em adição, o eletrodo compósito, aliado ao sistema de detecção amperométrico em sistema FIA, foi utilizado para o desenvolvimento de um método analítico para a determinação do fármaco hidroclorotiazida (HCTZ). A HCTZ foi determinada em amostras de urina sintética e em uma formulação farmacêutica (clorana®), medicamento utilizado no tratamento de hipertensão. O procedimento analítico foi desenvolvido para a quantificação do fármaco com limite de detecção em 5,34 x 10^{-7} mol L^{-1}. Os resultados obtidos para a quantificação de HCTZ em formulações farmacêuticas se apresentaram concordantes com os valores obtidos por meio do método oficial descrito na farmacopeia com 95% de confiança, de acordo com testes estatísticos.

Palavras chaves: Negro de fumo, poli(etileno co-vinil)acetato, eletrodos compósitos, eletrodos químicamente modificados, biossensores, sistema de análise por injeção em fluxo, hidroclorotiazida.

ABSTRACT

In the present work was developed a composite material formed from carbon black (CB) and poly (ethylene-co-vinyl acetate) (EVA), which explores the carbon black characteristics with the advantages of using rigid composites. Thus, different proportions of CB and EVA materials were used, varying the percentage of CB between 30 and 75% (m/m). The new composites materials were characterized by Scanning Electron Microscopy and Cyclic Voltammetry. Voltammetric studies indicated that the improvement in sensor response is proportional to the amount of CB present in the electrode material, verified by the parameters: % of electroactive area, capacitance and the heterogeneous electron-transfer rate constant. The 25EVA/75CB electrodes showed the best results from the voltammetric characterization, who answered satisfactorily in the presence of analytes with well-known electrochemical behavior. The analytical capability of the proposed device was evaluated by testing it like an amperometric sensor in a flow injection system (FIA) for the determination of ascorbic acid (AA). Furthermore, the application of the composite electrode 25EVA/75CB was explored as a platform for the construction of a chemically modified electrode sensible to glucose. In addition, the composite electrode coupled with the amperometric FIA system was used to develop an analytical method for the determination of hydrochlorothiazide (HCTZ). The HCTZ was determined in synthetic urine samples and in a pharmaceutical formulation (clorana®), commonly used in the treatment of hypertension. The analytical procedure was developed to quantify the HCTZ with a detection limit of 5.34×10^{-7} mol L^{-1}. The results for the quantification of HCTZ in drugs presented agreement with the results obtained with the official method described in the Brazilian pharmacopoeia with 95% confidence, according to statistical tests.

Key words: Carbon black, poly(ethylene co-vinyl)acetate, composite electrodes, chemically modified electrodes, biosensors, flow injection analysis, electroanalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de publicações nos últimos 19 anos; Banco de dados: Science Direct; Palavras Chave: “Composite Electrode”. 21

Figura 2 – Representação das diferentes formas alotrópicas do carbono: A) Fibras (Vieira *et al.*, 2003); B) Nanotubos; C) Carbono vítreo (Gonçalves *et al.*, 2006); D) Fulereno; E) Grafite (Dresselhaus *et al.*, 1996); F) Diamante (Elsherif *et al.*, 2012).... 22

Figura 3 – Ilustração de um aglomerado de negro de fumo. 28

Figura 4 – Representação estrutural do copolímero poli(etileno-co-acetato de vinila). 29

Figura 5 – Configuração geral de um sistema FIA. (1) corresponde à bomba peristáltica; (2) o injetor comutador contendo, (A) a alça de amostragem; (3) consiste no reator ou caminho analítico, (4) corresponde ao detector e (L) o descarte. 34

Figura 6 – Fórmula estrutural do ácido ascórbico. 35

Figura 7 – Representação da oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase (Leskovac *et al.*, 2005). 37

Figura 8 – Representação estrutural da hidroclorotiazida (HCTZ). 39

Figura 9 – Representação do molde de teflon utilizado para a confecção do material compósito. 48

Figura 10 – Esquema ilustrativo do procedimento experimental utilizado para o preparo dos diferentes eletrodos compósitos. 48

Figura 11 – A) Configuração da célula eletroquímica utilizada: (1) suporte de poliuretana; (2) eletrodo de referência (3) contra eletrodo e (4) eletrodo de trabalho e B) Representação do sistema FIA utilizado: (P) bomba peristáltica; (I) injetor comutador manual; (S) entrada da amostra; (L) alça de amostragem; (C) entrada da solução transportadora; (D) célula eletroquímica adaptada; (W) descarte de soluções e reagentes e (R) sistema de reconhecimento e armazenamento de dados. 50

Figura 12 – Micrografias eletrônicas de transmissão da amostra de negro de fumo... 56

Figura 13 – Difratograma de raios X da amostra de negro de fumo..... 57

Figura 14 – Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl utilizando os eletrodos de composição: (—) 25EVA/75NF, (—) 40EVA/60NF, (—) 50EVA/50NF, (—) 60EVA/40NF e (—) 70EVA/30NF, ν = 50 mV s^{-1}. 58

Figura 15 – A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$, utilizando os eletrodos: (—) 25EVA/75NF, (—) 40EVA/60NF, (—) 50EVA/50NF, (—) 60EVA/40NF e (—) 70EVA/30NF, ν = 50 mV s^{-1} e B) Zoom do gráfico para visualização dos voltamogramas utilizando os eletrodos contendo 30-60% (NF, m/m). 60

Figura 16 – Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$ demostrando o efeito da velocidade de varredura sobre o perfil voltamétrico e a dependência das correntes anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura, utilizando os eletrodos: A) 25EVA/75NF e B) 40EVA/60NF, variando a velocidade de varredura de 10 a 200 mV s^{-1}. 61

Figura 17 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo compósito 25EVA/75NF em solução de (—) NaOH 0,10 mol L^{-1}; (—) tampão amônio 0,1 mol L^{-1} (pH 11,0); (—) H_2SO_4 0,10 mol L^{-1}; (—) tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) e (—) tampão acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,0). ν = 50 mV s^{-1}..... 65

Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies dos compósitos com 30, 40, 50, 60 e 75% (Negro de Fumo, m/m). Magnificação 100x. 68

Figura 19 – Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies dos compósitos com 30, 40, 50, 60 e 75% (Negro de Fumo, m/m), após abrasão com lixa d'água 600 seguida por abrasão com lixa d'água 1200. Magnificação 2000x. 69

Figura 20 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo 25EVA/75NF em solução tampão fosfato 0,10 mol L-1 (pH 7) na (—) ausência e na (—) presença de ácido ascórbico 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1}. ν = 50 mV s^{-1}..... 70

Figura 21 – Representação da reação de oxidação eletroquímica do ácido ascórbico. 71

Figura 22 – A) Cronoamperograma obtido utilizando o eletrodo 25EVA/75NF em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) após adições consecutivas e de concentrações crescentes de ácido ascórbico (5,0 x 10^{-5}; 1,0 x 10^{-4}; 2,5 x 10^{-4}; 4,0 x 10^{-4}; 6,5 x 10^{-4}; 9,0 x 10^{-4} e 1,2 x 10^{-3} mol L^{-1}) e B) Curva analítica correspondente..... 71

Figura 23 – A) Sinais transientes obtidos por meio da injeção de 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de ácido ascórbico aplicando os valores de potencial: (a) 700, (b) 600, (c) 500 e (e) 400 mV utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF e B) Efeito da variação do potencial aplicado na sensibilidade do eletrodo compósito..... 72

Figura 24 – A) Sinais transientes obtidos para sucessivas injeções de 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de ácido ascórbico variando os volumes de alça de amostragem: (a) 25, (b) 50, (c) 100,

(d) 200 (e) 300 e (f) 400 μL utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF e B) Efeito da variação do volume de alça de amostragem na sensibilidade do eletrodo compósito. 74

Figura 25 – A) Sinais transientes obtidos após a injeção de soluções de ácido ascórbico nas concentrações: (a) 5,0 x 10^{-5}, (b) 1,0 x 10^{-4}, (c) 2,5 x 10^{-4}, (d) 5,0 x 10^{-4}, (e) 7,5 x 10^{-4} e (f) 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}; B) Curva de calibração correspondente. 75

Figura 26 – Sinais transientes obtidos a partir de injeções contendo concentrações conhecidas de AA: (a) 5,0 x 10^{-5}; (b) 1,0 x 10^{-4}; (c) 2,5 x 10^{-4}; (d) 5,0 x 10^{-4}; (e) 7,5 x 10^{-4} mol L^{-1} e Injeções contendo amostra comercial: (S1) 2,6 x 10^{-4} mol L^{-1}. 77

Figura 27 – Voltamogramas cíclicos decorrentes da aplicação de 25 ciclos no eletrodo 25EVA/75NF. Solução contendo $K_3Fe(CN)_6$ 2,50 mmol L^{-1} e $FeCl_3$ 2,50 mmol L^{-1} em KCl 0,10 mol L^{-1} e HCl 0,10 mol L^{-1} (pH 2,5), ν = 10 mV s^{-1}. 79

Figura 28 – Voltamograma cíclico obtido em meio de KCl 0,10 mol L^{-1} com o eletrodo 25EVA/75NF-PB. ν = 50 mV s^{-1}. PW: Branco da Prússia ($Fe^{II}Fe^{II}$), PB: Azul da Prússia ($Fe^{II}Fe^{III}$) e BG: Verde de Berlim ($Fe^{III}Fe^{III}$). 80

Figura 29 – Voltamogramas cíclicos decorrentes da aplicação de 50 ciclos no eletrodo 25EVA/75NF-PB em solução de KCl 0,10 mol L^{-1}. ν = 50 mV s^{-1}. 81

Figura 30 – Dependência das correntes anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura, utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF-PB variando a velocidade de varredura de 10 a 150 mV s^{-1}. 81

Figura 31 – Comportamento voltamétrico do eletrodo 25EVA/75NF-PB na (—) ausência e na (—) presença de uma solução de 0,50 mmol L^{-1} de H_2O_2 em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7). ν = 50 mV s^{-1}. 82

Figura 32 – A) Resposta cronoamperométrica do eletrodo 25EVA/75NF-PB frente a adições de alíquotas de 10 μL de uma solução de H_2O_2 0,010 mol L^{-1} em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) sob agitação constante. Potencial de trabalho: -400 mV. B) Curva analítica correspondente. 83

Figura 33 – Representação esquemática do mecanismo de ação para determinação de H_2O_2 ou glicose a partir do eletrodo compósito 25EVA/75NF. 83

Figura 34 – Curva analítica referente a resposta amperométrica obtida pelo eletrodo 25EVA/75NF-PB-GOx. 84

Figura 35 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo compósito 25EVA/75NF em solução de tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 9,5 na ausência (—) e na presença (—) de HCTZ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. ν = 50 mV s^{-1}. 85

Figura 36 – Representação da reação de oxidação da HCTZ (Abdel Razak, 2004). .. 85

Figura 37 – Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de HCTZ 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em solução de tampão BR 0,040 mol L^{-1} em diferentes valores de pH utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF. ν = 50 mV s^{-1}..... 86

Figura 38 – Dependência da corrente e do potencial de pico de anódico em função do pH da solução de eletrólito suporte (Solução tampão BR)..... 86

Figura 39 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 a 150 mV s^{-1}) utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF em solução tampão B-R 0,040 mol L^{-1} pH 7,5 na presença de 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1} HCTZ. Detalhe: Dependência linear das correntes de pico anódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura. 87

Figura 40 – Efeito da variação do potencial aplicado na sensibilidade do sistema, eletrodo compósito 25EVA/75NF..... 88

Figura 41 – A) Efeito da variação do volume de alça de amostragem e da B) vazão do sistema na sensibilidade do eletrodo compósito (25EVA/75NF)..... 89

Figura 42 – A) Sinais transientes obtidos após a injeção de soluções de hidroclorotiazida nas concentrações: (a) 1,0 x 10^{-5}, (b) 2,0 x 10^{-5}, (c) 5,0 x 10^{-5}, (d) 1,0 x 10^{-4} e (e) 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}; B) Curva de calibração correspondente. 90

Figura 43 – A) Sinais transientes obtidos após 10 injeções consecutivas de HCTZ 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} B) Variação da intensidade do sinal transiente durante a medida. 91

Figura 44 – Sinais transientes obtidos a partir de injeções contendo concentrações conhecidas de HCTZ: (a) 1,0 x 10^{-5}; (b) 2,0 x 10^{-5}; (c) 5,0 x 10^{-5}; (d) 1,0 x 10^{-4} e (e) 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e Injeções das soluções preparadas a partir da solução de urina sintética fortificada: (U1) 1,0 x 10^{-5}; (U2) 5,0 x 10^{-5} e (U3) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. 92

Figura 45 – Sinais transientes obtidos a partir de injeções contendo concentrações conhecidas de HCTZ: (a) 2,0 x 10^{-5}; (b) 5,0 x 10^{-5}; (c) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e Injeções contendo amostra comercial: (A1) 2,6 x 10^{-4} mol L^{-1}. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de eletrodos compósitos baseados em Polímero/ Material Carbonáceo..... 26

Tabela 2 – Informações sobre os principais reagentes utilizados. 42

Tabela 3 – Composição da urina sintética. 45

Tabela 4 – Dados de área superficial por BET. 55

Tabela 5 – Valores calculados de capacitância para os diferentes eletrodos compósitos EVA/NF utilizando voltametria cíclica em meio de KCl 0,10 mol L^{-1}..... 59

Tabela 6 – Valores calculados de % de área eletroativa para os diferentes eletrodos EVA/NF utilizando VC em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$..... 62

Tabela 7 – Valores calculados de constantes de velocidade heterogênea de transferência de elétrons para os diferentes eletrodos compósitos EVA/NF utilizando voltametria cíclica em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$. 64

Tabela 8 – Valores de intervalo útil de potencial em diferentes soluções de análise utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF..... 66

Tabela 9 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas para determinação de AA em sistema FIA. 75

Tabela 10 – Parâmetros analíticos calculados para a determinação de AA em sistema FIA. 76

Tabela 11 – Resultados obtidos para da determinação de AA em amostras comerciais utilizando o sistema FIA. 77

Tabela 12 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas para determinação de HCTZ em sistema FIA..... 90

Tabela 13 – Parâmetros analíticos calculados para a determinação de HCTZ em sistema FIA. 91

Tabela 14 – Resultados obtidos de adição/recuperação de HCTZ em amostras de urina sintética..... 93

Tabela 15 – Resultados obtidos para da determinação de HCTZ em amostras comerciais utilizando o sistema FIA..... 94

Tabela 16 – Comparação do método proposto com outros métodos descritos na literatura para a determinação de HCTZ..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5AEBCNPE – Eletrodo de Pasta de Carbono modificado com folhas de grafeno (do inglês – Modified Graphene oxide sheet Paste Electrode)

AA – Ácido ascórbico

AdSWV – Voltametria Adsortiva de Redissolução (do inglês – Adsorptive stripping square-wave)

BET – Brunauer, Emmett e Teller

C – Capacitância

CV – Voltametria Cíclica (do inglês – Cyclic voltammetry)

DRX – Difratometria de Raios X

EDDB – Eletrodo de diamante dopado com boro

EI – Eletrodos impresso

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês – Electrochemical impedance spectroscopy)

ECS – Eletrodo de calomelano saturado

ISE – Eletrodo íon seletivo (do inglês – ion-selective electrode)

EPC – Eletrodo de pasta de carbono

EQM – Eletrodo Quimicamente Modificado

EVA – Poli(etileno-co-acetato de vinila)

FeHCF – Hexacianoferrato de ferro

FIA – Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo (do inglês – Flow Injection Analysis)

FAD – Flavina-adenina dinucleótido

FLT – Faixa Linear de Trabalho

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês – Glassy Carbon Electrode)

GOx – Enzima Glicose Oxidase

HCF – Hexacianoferratos

HCTZ – Hidroclorotiazida

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês High performance liquid chromatography)

k0 – Constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MWCNT – Nanotubos de carbono de parede múltipla (do inglês – Multiwalled carbon nanotubes)

NF – Negro de fumo

PB – Azul da Prússia (do inglês – Prussian blue)

PVC – Policloreto de polivinila

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês – Square wave voltammetry)

ta-C:N thin-film electrode – Eletrodo de Diamante Dopado com Boro modificado com filme de carbono tetraédrico amorfo (do inglês – Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon (ta-C:N) film prepared on highly boron-doped electrode)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Eletrodos baseados em materiais compósitos de carbono 21
1.2 Eletrodos Quimicamente Modificados 30
1.3 Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) 32
1.4 Sondas eletroanalíticas 35
1.5 Hidroclorotiazida 38
2 OBJETIVOS 41
2.1 OBJETIVOS GERAIS 41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 41
3 MATERIAIS E METODOS 42
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES 42
3.1.1 Soluções 43
3.1.2 Solução de ferricianeto de potássio 43
3.1.3 Soluções de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio 44
3.1.4 Solução de glicose 44
3.1.5 Solução de Hidroclorotiazida 44
3.1.6 Urina sintética 44
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO NEGRO DE FUMO E DO COMPÓSITO EVA/NF 45
3.2.1 Caracterização do negro de fumo (NF) por Difratometria de Raios X (DRX) 45
3.2.2 Caracterização do negro de fumo (NF) por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 46
3.2.3 Caracterização do negro de fumo (NF) por BET 46
3.2.4 Caracterização do material EVA/NF por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 46
3.2.5 Caracterização voltamétrica dos eletrodos compósitos EVA/NF 46
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 47
3.3.1 Preparação do material compósito e construções dos eletrodos 47
3.3.2 Construção de um biossensor sensível à glicose 49
3.3.3 Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) 50
3.4 APLICAÇÕES ANALÍTICAS 51

3.4.1 Determinação de ácido ascórbico (AA) 51
3.4.2 Determinação de glicose 52
3.4.3 Determinação de hidroclorotiazida (HCTZ) 52
3.5 MÉTODOS COMPARATIVOS 53
3.5.1 Método comparativo para a determinação de ácido ascórbico (AA) 53
3.5.2 Método comparativo para a determinação de hidroclorotiazida 54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO NEGRO DE FUMO (NF) 55
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS COMPÓSITOS 57
4.2.1 Efeito da composição do eletrodo compósito no comportamento voltamétrico 57
4.2.2 Intervalo útil de potencial em diferentes eletrólitos suportes 64
4.2.3 Caracterização morfológica dos eletrodos compósitos 66
4.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE ANALITICA DO ELETRODO COMPÓSITO EVA/NF 70
4.3.1 Determinação amperométrica de ácido ascórbico utilizando análise por injeção em fluxo (FIA) 70
4.3.2 Desempenho do eletrodo compósito EVA/NF como um biossensor para determinação de glicose 78
4.4 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE HIDROCLOROTIAZIDA COM O ELETRODO EVA/NF EM SISTEMA FIA 85
4.4.1 Comportamento voltamétrico da Hidroclorotiazida (HCTZ) 85
4.4.2 Efeito das condições de trabalho para o sistema FIA 88
4.4.3 Determinação de HCTZ em amostras de urina sintética fortificada e amostras comerciais 92
4.4.4 Considerações gerais sobre o método proposto 95
5 CONCLUSÕES 96
REFERÊNCIAS 97

1 INTRODUÇÃO

Um sensor, em linhas gerais, pode ser descrito como um dispositivo que permite a obtenção de informações sobre o meio no qual está inserido (Lowinsohn and Bertotti, 2006). Várias classificações são possíveis envolvendo sensores químicos, as quais podem se fundamentar no tamanho, tipo de aplicação, ou no mecanismo de transdução da interação entre a espécie a ser determinada e o sítio de reconhecimento do sensor, tais como piezoelétrico, óptico, térmico, condutométrico, entre outros (Lowinsohn and Bertotti, 2006). Sensores com transdução eletroquímica funcionam como dispositivos capazes de fornecer informações sobre a espécie que se deseja determinar, através da medida de alguma propriedade elétrica (corrente, potencial, carga, entre outras) (Stradiotto *et al.*, 2003).

Sensores amperométricos são baseados na polarização do eletrodo de trabalho, através da aplicação de um potencial fixo e pré-determinado, proporcionando a oxidação ou redução de espécies eletroativas presentes em solução. A corrente resultante destes processos é então medida e apresenta uma relação direta com a concentração dos analitos. Quando a perturbação é realizada empregando-se uma varredura de potencial, tem-se um sensor voltamétrico (Stradiotto *et al.*, 2003, Grundler, 2007). Esses dispositivos são amplamente utilizados, pois podem ser construídos a partir de materiais de baixo custo e acessíveis. Além disso, são extremamente sensíveis e se apresentam como uma alternativa viável em comparação a outros procedimentos envolvendo técnicas espectrométricas e de separação (Navratil and Barek, 2009).

Os sensores amperométricos/voltamétricos desenvolvidos nos últimos anos permitem ao operador não só realizar análises com instrumentos mais econômicos, com respostas sensíveis e seletivas, mas também facilidade de uso e simplicidade na medida da resposta (Couto *et al.,* Freire *et al.*, 2003, Trojanowicz, 2009). O desenvolvimento de eletrodos tem atendido a demanda deste mercado proporcionando dispositivos extremamente versáteis em suas aplicações tanto na forma de eletrodo convencional quanto na forma de eletrodo modificado, podendo ser empregado diversos tipos de modificadores, como os

polioxomolibdatos (Liu *et al.*, 2005), compostos fenazínicos (Barsan *et al.*, 2008), nanoparticulas metálicas (Amatatongchai *et al.*, 2015), materiais carbonáceos (M.A. Tehrani *et al.*, 2013), entre outros. Além disso, os sistemas compostos por sensores com detecção amperométrica podem ser facilmente adaptados à passagem de um fluxo de solução, oferecendo várias vantagens, incluindo a capacidade de analisar pequenos volumes de amostras, tempo de análise mais rápido, adequação de procedimentos de automação e repetibilidade (Hansen and Miró, 2007, Trojanowicz, 2009, Salgado-Figueroa *et al.*, 2015). Características relevantes para os desafios propostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, as quais necessitam de metodologias que operem em condições críticas de trabalho, que sejam capazes de determinar espécies de interesse em baixos níveis de concentração e com elevada frequência analítica.

Na busca por eletrodos de trabalho que possam ser empregados como sensores eletroquímicos se faz comum o uso de eletrodos compósitos, principalmente a base de carbono. Historicamente, o primeiro material compósito de carbono publicado na literatura foi proposto por Adams em 1958, no desenvolvimento do trabalho intitulado “Eletrodos de pasta de carbono” (Adams, 1958). A idéia original de Adams era desenvolver um eletrodo gotejante de carbono, o qual seria utilizado para a oxidação de compostos orgânicos em potenciais mais positivos, região de potencial onde os eletrodos à base de mercúrio não podem ser empregados. Apesar da proposta inicial de misturar pó de grafite com um líquido não condutor não ter sido bem sucedida, ocasionou no surgimento de uma nova classe de materiais eletródicos, os compósitos, que vem revolucionando os dispositivos utilizados em técnicas eletroanalíticas (Švancara *et al.*, 2009).

Os materiais compósitos empregados atualmente na construção de eletrodos apresentam características interessantes como a facilidade na preparação e regeneração da superfície, elevada resistência mecânica, durabilidade e relativo baixo custo de produção, além da possibilidade de inserção de modificadores durante a preparação do compósito, o que pode aprimorar a seletividade e a sensibilidade resultante do dispositivo (Tallman and Petersen, 1990). Isto permite que estes dispositivos apresentem maior robustez, tornando-os apropriados para o uso de metodologias mais simplificadas e com

adaptações no tamanho e arranjo dos eletrodos (Janáky and Visy, 2013), principalmente tratando-se de eletrodos compósitos rígidos, largamente empregados em sistemas com a passagem de fluxo (Navratil and Barek, 2009). Além das vantagens citadas, os eletrodos compósitos não apresentam algumas características indesejáveis dos eletrodos metálicos, como a formação de óxidos na sua superfície, além do custo de preparação quando se usam metais nobres, como ouro, platina, etc (Adams, 1969).

1.1 Eletrodos baseados em materiais compósitos de carbono

A busca por novos materiais com propriedades superiores (mecânicas, elétricas, físicas e/ou químicas) tem impulsionado o desenvolvimento de novos materiais compósitos para a construção dos mais diversos tipos de transdutores e sensores eletroquímicos. Consultando a base de dados *Science Direct*, pode-se evidenciar a extensão da produção científica no desenvolvimento de materiais compósitos para a construção de eletrodos. Utilizando as palavras "composite electrode" é possível encontrar milhares de artigos científicos publicados envolvendo esse tema. Muitas destas pesquisas descrevem principalmente novos materiais, métodos de fabricação e a aplicação desses dispositivos para a determinação de diferentes espécies em diversos tipos de amostras e sistemas, Figura 1.

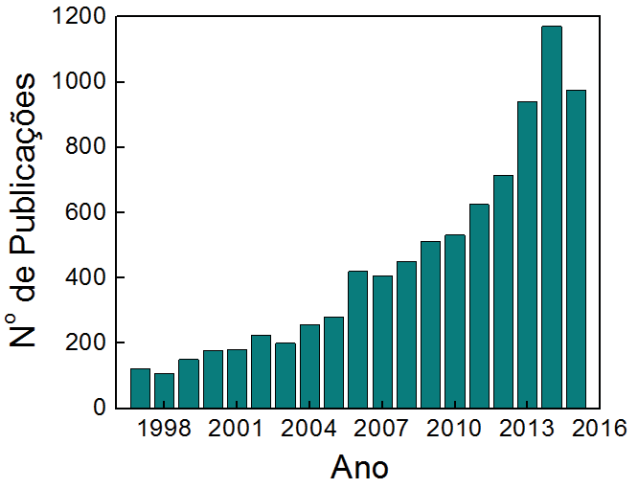


Figura 1 – Número de publicações nos últimos 19 anos; Banco de dados: Science Direct; Palavras Chave: "Composite Electrode".

Eletrodos compósitos foram definidos como “um material que consiste em pelo menos uma fase condutora misturada com pelo menos uma fase isolante” (Tallman and Petersen, 1990). As propriedades dos compósitos dependem, dentre vários aspectos, da natureza de cada componente, suas quantidades relativas e sua distribuição no material. Os eletrodos construídos a partir de compósitos, além da possibilidade da incorporação superficial do modificador, apresentam a possibilidade de modificação interna, ou seja, a incorporação de outros materiais que podem promover novas características físicas, químicas e biológicas (Tallman and Petersen, 1990).

No que se refere à fase condutora, um grande número de novos eletrodos vem sendo investigados utilizando materiais carbonáceos. O grande interesse ocorre devido às propriedades diferenciadas do carbono, como, diferentes alótropos, diferentes tipos de grafitização, variedade de dimensionalidade (de 0 a 3D) e existir em diferentes formas (pó, fibras, espumas, etc), fazendo com que seja um material com inúmeras possibilidades de aplicação (Frackowiak and Beguin, 2001). Entre esses materiais estão grafite, grafeno, nanotubos de carbono, negro de fumo, fibras de carbono, entre outros. A Figura 2 representa algumas das diferentes formas de carbono comumente encontradas.

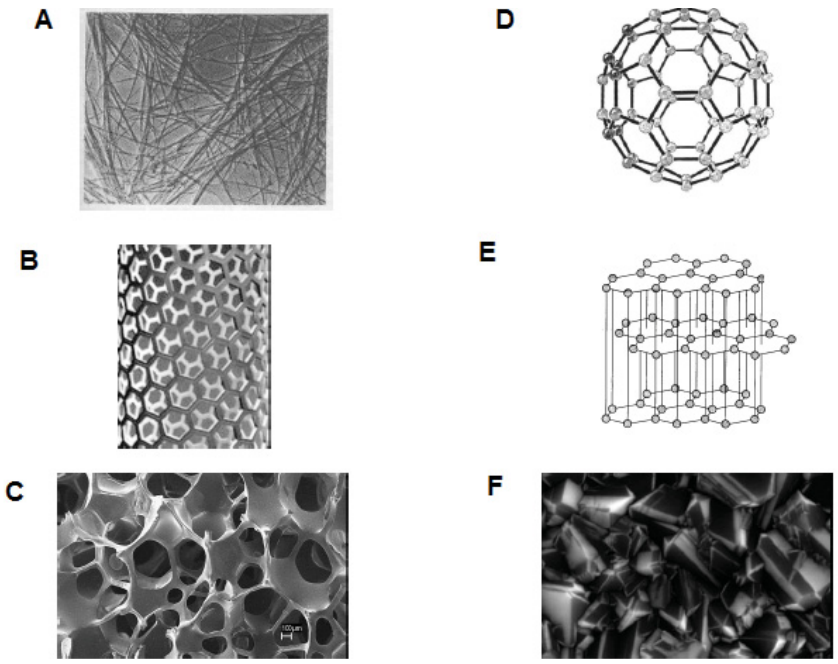


Figura 2 – Representação das diferentes formas alotrópicas do carbono: A) Fibras (Vieira *et al.*, 2003); B) Nanotubos; C) Carbono vítreo (Gonçalves *et al.*, 2006); D) Fulereno; E) Grafite (Dresselhaus *et al.*, 1996); F) Diamante (Elsherif *et al.*, 2012).

Além da fase condutora usada na preparação dos eletrodos compósitos, pode-se destacar a utilização de polímeros como fase isolante (aglutinante). A principal vantagem da substituição dos aglutinantes líquidos reside na formação de um compósito sólido, o qual apresentará estabilidade em solventes não aquosos, possibilidade em aplicações em fluxo e elevada resistência mecânica (Navratil and Barek, 2009, Janáky and Visy, 2013). Assim, o emprego de eletrodos compósitos preparados com polímeros permite desenvolver dispositivos de formas e tamanhos diferenciados e a possibilidade de incorporação de uma variedade de modificadores. Dentro do contexto apresentado, uma breve revisão sobre trabalhos publicados utilizando materiais compósitos constituídos, principalmente, de materiais carbonáceos e polímeros é apresentada a seguir.

Albertús *et al.* (Albertús *et al.*, 1997), pioneiros no desenvolvimento de eletrodos compósitos sólidos a base de polímeros, descreveram a preparação de um eletrodo constituído da mistura de pó de grafite e policloreto de polivinila (PVC). O desempenho do eletrodo foi avaliado por voltametria cíclica em solução contendo íons hexacianoferrato (III), catecol e hidroquinona. O compósito PVC/grafite exibiu características favoráveis com relação à resistência mecânica, custo, simplicidade de preparação e facilidade de renovação da superfície do eletrodo.

Barsan *et al.* (Barsan and Brett, 2009), propuseram um compósito preparado a partir da mistura de acetato de celulose e pó de grafite. O dispositivo proposto foi capaz de determinar seletivamente, através de um processo eletrocatalítico, a oxidação de ascorbato utilizando um potencial 0,0 V *vs.* SCE. Além disso, a superfície do compósito foi modificada quimicamente com um filme polimérico de vermelho neutro (fenazina) e utilizado para a construção de um biossensor para detecção amperométrica de glicose. Os autores enfatizaram que o eletrodo proposto pode ser construído de diversos tamanhos e formas devido à versatilidade do acetato de celulose utilizado na preparação do compósito.

Serafín *et al.* (Serafín *et al.*, 2013), estudaram um eletrodo compósito constituído por nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*multi-walled)* e Teflon®, no qual foi incorporado uma enzima e um mediador redox, respectivamente, peroxidase e ferroceno. O Dispositivo foi

utilizado para a construção de um biossensor multienzimático, no qual foram co-imobilizadas as enzimas creatininase, creatinase e sarcosina oxidase. O dispositivo foi empregado como detector amperométrico na detecção de creatinina em soro humano. Apesar da complexidade do sensor desenvolvido, os autores relataram que o método proposto na análise de amostras biológicas apresentaram resultados satisfatórios quando comparados com o método espectrofotométrico comumente utilizado. Além disso, o biossensor apresentou ótima seletividade e rapidez na determinação de creatinina nas amostras.

Freitas *et al.* (Freitas and Fatibello-Filho, 2010), desenvolveram um compósito preparado com pó de grafite, parafina sólida e um pó constituído de fosfato de cobre(II) imobilizado em uma resina de poliéster. Os dispositivos propostos foram investigados quanto a sua melhor composição (quantidade de modificador), reprodutibilidade de superfície, intervalo útil de potencial e seu desempenho analítico. O eletrodo quimicamente modificado desenvolvido foi empregado para a determinação simultânea de hidroxitolueno butilado (BHT – do inglês *butylated hydroxytoluene*) e hidroxianisol butilado (BHA – do inglês *butylated hydroxyanisole*). Os analitos foram determinados por voltametria de onda quadrada, proporcionando uma separação de 430 mV entre os picos referentes aos processos de oxidação, o que não era possível antes da modificação do EPC. Os autores relatam vantagens como menor custo e tempo de análise em comparação a outros métodos descritos na literatura.

Abbaspour *et al.* (Abbaspour *et al.*, 2010), propuseram um eletrodo compósito formado por carbono/PVC modificado com um ionofóro (compostos lipofílicos que formam complexo com o íon de interesse) para ser utilizado na determinação potenciométrica de cromo(III), em amostras de água e multivitamínicos. O sensor seletivo para cromo(III) apresentou uma resposta linear entre 8,4 x 10^{-8} e 1,0 x 10^{-2} mol L^{-1}, limite de detecção de 6,8 x 10^{-8} mol L^{-1} e um tempo de resposta de 10 s. Além disso, o uso de PVC no preparo do eletrodo compósito fez com que fosse possível seu emprego em meios parcialmente não aquosos. Foi relatada uma maior sensibilidade e menor tempo de resposta para o sensor proposto quando comparado a outros eletrodos apresentados na literatura.

Sheng *et al.* (Sheng *et al.*, 2014), descreveram a preparação de um eletrodo compósito a base de polietileno tereftalato (PET) e nanotubos de

carbono de paredes múltiplas (*multi-walled)*. O material compósito foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e a partir de imagens de MEV. A potencialidade analítica do dispositivo foi testada a partir de seu emprego como um detector em um sistema de eletroforese capilar para a determinação de compostos fenólicos em amostras de casca de amendoim. O eletrodo apresentou uma resposta estável e uma boa reprodutibilidade, segundo os autores.

Zheng *et al.* (Zheng *et al.*, 2013), desenvolveram um eletrodo sólido a base de grafite e polimetacrilato de metila (PMMA). O novo material foi caracterizado por voltametria cíclica (CV, do inglês – *Cyclic voltammetry*) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês – *Electrochemical impedance spectroscopy),* e aplicado na determinação de o-sec-butilfenol. Os autores descreveram que o dispositivo desenvolvido se mostrou extremamente reprodutível e robusto, em comparação ao eletrodo de pasta de carbono.

Cesarino *et al.* (Cesarino *et al.*, 2010), relataram o preparo do compósito poliuretana/grafite modificado com uma sílica organofuncionalizada com benzotiazol-2-tiol. O eletrodo desenvolvido foi utilizado para determinar Cu^{2+} em amostras comerciais de combustível etanol por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial. As condições ótimas para o desenvolvimento do método foram estudadas, e com uma etapa de pré-concentração de 20 min foi possível determinar íons Cu(II) com um limite de detecção de $3{,}90 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}. O método proposto foi comparado com a técnica espectroscopia de absorção atômica de chama, e os resultados se apresentaram concordantes de acordo com testes estatísticos. Os autores ainda relatam que o uso de poliuretana como agente aglutinante produziu um compósito rígido, estável em etanol, permitindo a aplicação do método em soluções etanólicas (70%).

De Oliveira *et al.* (de Oliveira *et al.*, 2008), desenvolveram um material compósito a partir da mistura de grafite em pó e borracha de silicone em diferentes proporções. Os materiais eletródicos foram caracterizados morfologicamente por MEV e eletroquimicamente por CV em meio ao par redox ferri/ferrocianeto de potássio, otimizando uma proporção de 70 % (grafite, m/m) no dispositivo final. Foi avaliada a potencialidade analítica do eletrodo em diferentes meios de análise, básicos, ácidos e neutros, além de ser utilizado como um sensor voltamétrico para a determinação de hidroquinona, tendo os

resultados obtidos validados pelo método HPLC. Os autores ressaltam que o eletrodo desenvolvido se mostra promissor para posteriores aplicações, principalmente para o desenvolvimento de um eletrodo quimicamente modificado, devido a sua elevada sensibilidade e reprodutibilidade das respostas obtidas.

Fagan-Murphy *et al.* (Fagan-Murphy and Patel, 2014), estudaram o preparo de um compósito formado a partir de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e resina epóxi. O material eletródico foi utilizado para a construção de eletrodos super-comprimidos, possíveis de serem moldados em várias geometrias e tamanhos, proporcionando a produção de uma variedade de dispositivos para análise em diversos sistemas, como em ambientes biológicos. Os estudos apresentados pelos autores mostraram que a forma comprimida do eletrodo (1,0 mm de espessura e 3,2 mm de diâmetro) aumentou expressivamente o desempenho eletroquímico do mesmo, devido à redução de sua resistência interna e aumento de sua capacitância. O eletrodo formado por nanotubos de carbono/resina epóxi foi empregado para a determinação amperométrica de serotonina, atingindo limites de detecção de 450 nmol L^{-1}.

A Tabela 1 apresenta um pequeno resumo dentre as inúmeras possibilidades de combinação existentes de eletrodos compósitos baseados em materiais carbonáceos e polímeros.

Tabela 1 – Exemplos de eletrodos compósitos baseados em Polímero/ Material Carbonáceo.

Eletrodo	Analito	Técnica	Ref.
Nafion / Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Morfina e ondansentrona	AdSWV	(Nigović *et al.*, 2014)
Nafion / Grafite	Paration e metil paration	Amperometria	(Kumaravel and Chandrasekaran, 2010)
Poliestireno / Grafite	Paracetamol	DPV	(Khaskheli *et al.*, 2013)
Cloreto de poli-dialildimetilamônio / Grafeno e Grafite	Ácido úrico	Amperometria e DPV	(Yu *et al.*, 2013)

Resina epóxi / Grafeno	Ácido carnósico e carnosol	Amperometria	(Tang *et al.*, 2013)
Resina epóxi / Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Ibuprofeno	CV, DPV, SWV e Amperometria	(Motoc *et al.*, 2013)
Polipirrol / Grafeno	Ácido fólico	DPV	(Wang *et al.*, 2014)

Dentre os mais diversos materiais empregados na construção de eletrodos compósitos, pouquíssimas informações são encontradas na literatura sobre o compósito formado do poli(etileno-co-acetato de vinila) (EVA) como fase aglutinante, e o carbonáceo negro de fumo (NF), utilizado como fase condutora.

O negro de fumo (NF), uma das formas mais simples do carbono, é constituído por partículas finamente divididas, obtido pela combustão incompleta de hidrocarbonetos gasosos e/ou líquidos, ou pela decomposição térmica (pirólise). A diferença entre estes dois processos, respectivamente, é a presença ou não de oxigênio no meio, e são responsáveis por quase 95 % do negro de fumo produzido no mundo, sendo o processo de combustão incompleta o principal (Donnet and Voet, 1976). Embora existam relatos mais antigos de sua utilização, o NF começou a ser produzido industrialmente a partir da década de 70, principalmente por indústrias de tintas e pigmentos. Atualmente o NF também é produzido pelo processamento de pneus inservíveis e outros produtos a base de carbono recicláveis, para a produção do chamado NF ecológico (Zucolotto *et al.*, 2004).

O NF possui elevada área superficial (entre 6 e 1200 $m^2\ g^{-1}$) e é formado basicamente por nanopartículas de carbono (entre 10 nm a 500 nm) presentes na forma de agregados (menor unidade indivisível), unidade primária, que se ligam através de forças de Van der Waals, em formações maiores, formando os chamados aglomerados (Donnet and Voet, 1976). A Figura 3 mostra uma ilustração de um aglomerado de NF. A estrutura interna desses aglomerados apresenta algumas características quasicristalinas muito semelhantes ao grafite (Donnet and Voet, 1976). Ademais, o negro de fumo apresenta outros aspectos como elevada condutividade elétrica, inércia química, elevada capacidade de adsorção e quando misturado com polímeros pode elevar substancialmente a

resistência mecânica desses materiais, por formarem uma morfologia fibrosa (capacidade de reforço) (Carmona and Ravier, 2002, Zucolotto *et al.*, 2004).

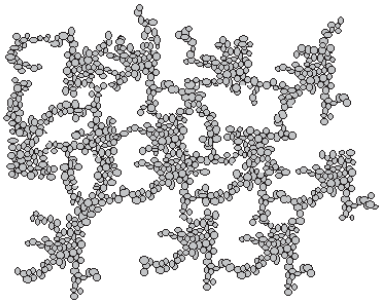


Figura 3 – Ilustração de um aglomerado de negro de fumo.

Devido as suas características físico-químicas, o negro de fumo é comumente utilizado na construção de células de combustível, no desenvolvimento de baterias a base de lítio e sódio e atualmente vem sendo explorado como material eletródico no desenvolvimento de sensores (Carmona and Ravier, 2002).

Arduini *et al.* (Arduini *et al.*, 2012) testaram a utilização do NF como modificador em eletrodos impressos (EI). A modificação dos EI preparados no respectivo grupo de pesquisa foi realizado por duas metodologias: por “drop coating”, que consiste em gotejar uma suspensão contendo o NF (dimetilformaldeído:água (1:1)) na superfície do eletrodo de trabalho; e a partir da mistura entre a tinta de grafite e pequenas quantidades de NF, 5 e 10 %, mistura utilizada como tinta na impressão dos eletrodos. Os autores atribuíram uma melhora significativa no desempenho eletroquímico do dispositivo devido ao aumento da quantidade de NF presente. Análises de CV em solução de ferricianeto de potássio apontaram uma melhora no sinal eletroquímico para o par Ferri/Ferro para o EI contendo sua superfície recoberta com a suspensão de NF, atribuído pelos autores como o eletrodo com maior quantidade de NF como modificador. Para demonstrar sua capacidade em análises eletroanalíticas, o dispositivo proposto foi utilizado para o desenvolvimento de um método para a determinação amperométrica de peróxido de hidrogênio, o qual demonstrou desempenho analítico superior quando comparado ao EI não modificado.

Vicentini *et al.* (Vicentini *et al.*, 2015) estudaram diferentes estratégias para modificar um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com negro de fumo. Os

autores descrevem três diferentes soluções contendo o NF para serem utilizadas na formação de um filme na superfície do GCE por “drop coating”; 1ª solução contendo somente água destilada, 2ª solução contendo uma proporção unitária de fosfato ácido de dihexadecil e água destilada e a 3ª solução contendo quitosana. Os dispositivos foram testados por CV em solução contendo o par Ferri/Ferro, o qual apresentou seu melhor perfil eletroquímico nas análises realizadas com o eletrodo modificado com a solução de NF em quitosana. Os autores atribuem a melhor aderência e estabilidade ao filme de NF formado na superfície do GCE à presença de quitosana, porém a melhora no sinal obtido pelo eletrodo ocorre, pois desta maneira, pode-se proporcionar uma maior contribuição do NF como material condutor. Para evidenciar a potencialidade analítica do eletrodo desenvolvido, métodos para a determinação de dopamina e paracetamol foram desenvolvidos, sendo os valores de sensibilidade, faixa linear de trabalho e limites de detecção obtidos comparáveis com outros valores descritos na literatura.

Apesar de promissor, a utilização do negro de fumo como material eletródico na fabricação de novos eletrodos limita-se, na maioria das vezes, como fase condutora no preparo de eletrodos de pasta (Arduini *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2011), ou em sua utilização como um modificador. Assim, ainda são escassas as informações na literatura sobre a utilização do NF, como fase condutora única, no preparo de eletrodos compósitos rígidos. Ademais, o emprego do negro de fumo como material condutor apresenta como vantagens elevada condutividade elétrica, baixo custo e fácil acesso.

O poli(etileno-co-acetato de vinila), Figura 4, também conhecido como EVA, copolímero da família das poliolefinas é um termoplástico formado pelo encadeamento de polietileno e poli(acetato de vinila) (Létant *et al.*, 2011).

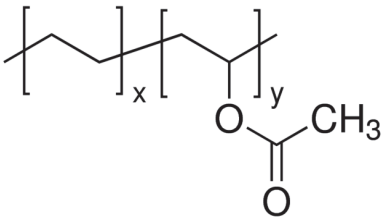


Figura 4 – Representação estrutural do copolímero poli(etileno-co-acetato de vinila).

O copolímero EVA apresenta como principais propriedades, alta elasticidade, inércia química, grande resistência elétrica, alta resistência térmica e mecânica. Sua aplicação vai desde material isolante em revestimentos de cabos de alta tensão (resistente a intempéries) à fabricação de calçados (indústrias calçadistas). Além disso, também é utilizado como protetor contra corrosão, devido as suas propriedades diferenciadas, possibilitando inclusive a utilização desse material para a construção de eletrodos compósitos rígidos para aplicação em solventes não aquosos e em sistemas com fluxo de solução (Garcia *et al.*, 2003, Létant *et al.*, 2011, Kuila *et al.*, 2012), principalmente para o desenvolvimento de eletrodos íon seletivos (ISE) (Santos *et al.*, 2004).

Garcia *et al.* (Garcia *et al.*, 2003) descreveram o preparo de uma membrana íon seletiva na superfície de um eletrodo tubular composto por grafite e resina epóxi para a determinação potenciométrica de íons K^+. A membrana seletiva imobilizada na superfície do eletrodo compósito, formada pelo ionóforo nonactina preso em uma matriz de EVA, pode ser facilmente empregada em um sistema de análise por injeção em fluxo. O eletrodo íon seletivo sólido desenvolvido foi capaz de determinar íons potássio (II) em uma faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} em amostras farmacêuticas. O sistema potenciométrico-FIA permitiu uma frequência analítica de 120 amostras por hora com uma precisão de 3,6 %.

Bouklouze *et al.* (Bouklouze *et al.*, 1993) utilizaram o EVA para o preparo de membranas íon seletiva para estudar diferentes ionóforos no desenvolvimento de um eletrodo sensível a íons bário (II). Os autores descreveram que o uso do EVA no desenvolvimento do eletrodo íon seletivo proporcionou um baixo custo e elevada vida útil, devido a sua elevada estabilidade mecânica e inércia química.

1.2 Eletrodos Quimicamente Modificados

A utilização do termo Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) foi inserida por Murray e Moses (Moses and Murray, 1977), na década de 70, para definir eletrodos com espécies quimicamente ativas devidamente imobilizadas na superfície desses dispositivos. Essas substâncias apresentam uma tentativa

de controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo/solução para promover características desejáveis ao eletrodo, como, melhora da transferência eletrônica entre o eletrodo e uma espécie presente em solução, pré-concentrar uma espécie de interesse, distinguir compostos que possuam características redox similares ou ainda atuar como uma barreira entre a superfície do eletrodo e certas espécies químicas que possam adsorver na superfície do mesmo, prejudicando sua resposta (Moses and Murray, 1977, Freire *et al.*, 2003).

No processo de evolução de como modificar um eletrodo, diversos procedimentos de preparação foram descritos, os métodos mais importantes utilizados podem ser simplificados em: adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos compósitos, com um modificador pouco solúvel em água para sua adsorção neste tipo de substrato (Pereira *et al.*, 2002).

Dentre as formas de modificação citadas, a utilização de filmes poliméricos para o recobrimento da superfície eletródica merece destaque, pois, diferente de outras técnicas de modificação, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Além disso, devido a grande variedade de polímeros disponíveis, a aplicação de cada um pode gerar características particulares, possibilitando explorar suas propriedades de acordo com a necessidade, como diferentes analitos e amostras, meios de análise e etc (Pereira *et al.*, 2002). Desta forma, filmes poliméricos têm sido utilizados para diversas finalidades no desenvolvimento de EQM, para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas (Gorton *et al.*, 2002), imobilizar biocomponentes (Turkmen *et al.*, 2014), como mediadores (Azad and Ganesan, 2011) e até mesmo fornecer biocompatibilidade (Ratner, 1995).

Dentre as diversas espécies utilizadas na construção de EQM o uso dos hexacianoferratos (HCF) são comumente empregados no recobrimento de eletrodos como filmes poliméricos. Os HCF consistem em uma classe de materiais inorgânicos que, devido a sua alta reversibilidade eletroquímica, proporcionam aos eletrodos modificados, elevada estabilidade, sensibilidade e até mesmo seletividade (Ricci and Palleschi, 2005).

O hexacianoferrato de ferro (FeHCF) ou azul da Prússia (PB), tem sido utilizado para explorar a potencialidade de modificação de diversos eletrodos base, como, eletrodos de grafite (Liu *et al.*, 2014), eletrodos de carbono vítreo (Lin *et al.*, 2015), entre outros, sendo seu comportamento voltamétrico bem caracterizado na literatura. Do ponto de vista de desenvolvimento de sensores, existem diversas possibilidades de aplicação para os dispositivos construídos empregando os HCF, como, por exemplo, a construção de biossensores a partir da imobilização de enzimas para a determinação indireta de glicose, baseadas na redução de peróxido de hidrogênio produzido na reação enzimática (Karyakin *et al.*, 1994, Lin *et al.*, 2015).

A elevada atividade do PB com relação à redução de peróxido de hidrogênio faz com que os filmes de PB sejam usualmente considerados como uma enzima Peroxidase artificial. Além do mais, os filmes de PB também apresentam elevada compatibilidade quando combinado as enzimas da classe das oxidases, como a Glicose Oxidase (GOx), a enzima mais estudada para a atuação em biossensores de glicose (Karyakin *et al.*, 1994). As oxiredutases catalisam reações de oxirredução utilizando o oxigênio molecular como aceitador de elétrons, gerando como subproduto o peróxido de hidrogênio (Drauz *et al.*, 2012).

1.3 Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Um procedimento analítico convencional envolve diversas etapas como, amostragem e preservação da amostra, dissolução, separação/pré-concentração, reações químicas e transporte até o detector, sendo estas determinantes para obtenção de resultados precisos e exatos (Skoog *et al.*, 2006). Desta forma, um procedimento analítico sem o uso de automação, demanda tempo e conta com praticamente total manuseio do operador. Esses obstáculos tornam-se cada vez mais limitantes à medida que a análise de um elevado número de amostras é necessária (Zagatto *et al.*, 1999).

A busca por métodos analíticos com elevada frequência de amostragem, baixo consumo de amostra/reagentes e um mínimo de interferência humana teve seu início com o trabalho proposto por Skeggs em 1957 (Skeggs, 1966). Vinte

anos após o advento, os avanços das técnicas automatizadas apresentaram um crescimento significativo a partir do trabalho proposto por Jaromir Ruzicka juntamente com pesquisadores brasileiros, a saber, Henrique Bergamin Filho, Elias Ayres Guidetti Zagatto, Francisco José Krug e Boaventura Freire dos Reis (Santos and Masini, 2010).

Dentro deste contexto, os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) proposto na década de 70 no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, se mostraram um grande aliado na determinação de amostras consecutivas, superando grande parte dos problemas apresentados pelos procedimentos totalmente manuais, uma vez que todas as etapas envolvidas são realizadas em um sistema fechado (Ružicka and Hansen, 1988). Além disso, a técnica também se destaca pelo baixo tempo de análise gasto, por não necessitar de que as reações químicas envolvidas na análise atinjam o equilíbrio químico, uma vez que o tempo disponível para o desenvolvimento das reações é rigorosamente controlado através da vazão da solução transportadora, para todas as amostras e padrões (Hansen and Miró, 2007). O funcionamento de um sistema FIA baseia-se em três características principais (Ružicka and Hansen, 1988):

(i) A injeção de uma alíquota, com volume discreto e definido, da solução contendo amostra por meio de um fluxo contínuo gerado por uma solução transportadora é conduzida por um caminho analítico até a sua chegada ao detector, sofrendo dispersão ao longo do caminho;
(ii) O tempo necessário que a amostra, e outros reagentes que estejam sendo injetados no sistema, são transportados até o detector é extremamente reprodutível e preciso, fazendo com que o sistema apresente uma dispersão controlada;
(iii) A formação do gradiente de concentração gerado no momento da injeção da amostra, ao passar pelo detector, promove a formação de um sinal transiente com sinal rigorosamente reprodutível.

Os componentes básicos desse tipo de sistema são esquematizados na Figura 5 (Ružicka and Hansen, 1988).

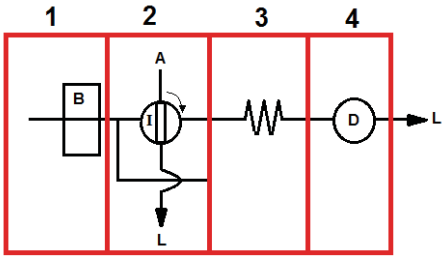


Figura 5 – Configuração geral de um sistema FIA. (1) corresponde à bomba peristáltica; (2) o injetor comutador contendo, (A) a alça de amostragem; (3) consiste no reator ou caminho analítico, (4) corresponde ao detector e (L) o descarte.

Além da conformação básica descrita, outros sistemas operacionais podem ser promovidos durante o percurso, como por exemplo, a adição ou diluição de reagentes, aquecimento, agitação, mistura, entre outros, sendo um sistema bastante versátil e adaptável. Portanto, o uso dos sistemas FIA é justificado não só pela sua simplicidade e facilidade de manuseio, mas também pela versatilidade, uma vez que, além da adição de diversas operações, também se faz possível à utilização de diferentes detectores como, por exemplo, detectores espectrofotométricos, condutométricos, potenciométricos, amperométricos, entre outros, gerando uma grande possibilidade de aplicações (Hansen and Miró, 2007).

O modo de operação dos detectores eletroquímicos mais comumente utilizados em sistemas FIA são os amperométricos, por fornecerem alta sensibilidade, respostas rápidas e a possibilidade de monitoramento contínuo, necessário para aplicações em condições hidrodinâmicas das espécies de interesse (Trojanowicz, 2009).

De Oliveira *et al.* (Oliveira *et al.*, 2012) combinaram o sistema de detecção amperométrico com o sistema FIA para a desenvolvimento de um método simples e rápido para a determinação de isoniazida em amostras de urina humana. O eletrodo impresso de carbono utilizado nas análises, modificado com hexacianoferrato de prata, pode determinar o fármaco em uma faixa de concentração entre 5,0 x 10^{-6} e 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} atingido uma frequência analítica de 24 injeções por hora.

Amatatongchai *et al.* (Amatatongchai *et al.*, 2015) desenvolveram um método sensível e seletivo para determinação amperométrica de íons sulfitos utilizando o sistema FIA. O sistema de detecção composto por um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito, formado por de nanotubos de

carbono, nanoparticulas de ouro e cloreto de poli-dialildimetilamônio, determinou SO_3^{2-} em amostras comerciais de bebidas em uma faixa de concentração entre 2 e 200 mg L^{-1}, com uma frequência analítica de 23 amostras por hora.

Boni *et al.* (Boni *et al.*, 2011) propuseram um sensor biomimético, eletrodo de carbono vítreo modificado com ftalocianina de cobalto, para a determinação de dipirona utilizando um sistema FIA. A frequência analítica do método proposto foi de 36 amostras por hora.

1.4 Sondas eletroanalíticas

É comum no desenvolvimento de "novos" eletrodos o uso de espécies que possuem comportamento eletroquímico bem estabelecido e discutido na literatura, e, além disso, que existam procedimentos analíticos relatados para sua determinação. Essas informações são importantes para avaliar o perfil de resposta de um dispositivo ou mesmo o desempenho analítico em determinada aplicação, as espécies utilizadas para essa finalidade podem ser chamadas de sondas eletroanalíticas. Dentre as diversas espécies que podem ser usadas como sondas, destacam-se os íons ferricianeto, ácido ascórbico e a glicose.

O ácido L-ascórbico (AA), ou, como é popularmente conhecido, vitamina C, Figura 6, é um poderoso antioxidante e reage com espécies reativas de oxigênio ou radicais livres.

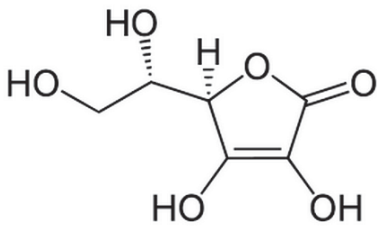


Figura 6 – Fórmula estrutural do ácido ascórbico.

O AA ajuda a proteger o sistema imunológico e a reduzir os níveis de colesterol, além de ser considerado vital para os seres humanos. As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico fazem com que o mesmo seja muito utilizado em indústrias de alimentos como conservante, evitando a ação do tempo e preservando o sabor e a cor natural dos alimentos (Padayatty *et al.*,

2003). Vários métodos analíticos são empregados na determinação de AA em formulações farmacêuticas, alimentos e bebidas. Dentre estes métodos destacam-se os titulométricos (Farmacopéia Brasileira - vol. 2, 2010), HPLC (Ferin *et al.*, 2013), fluorimétricos (Rong *et al.*, 2015), espectrofotométricos (Adam *et al.*, 2012), entre outros.

A determinação de ácido ascórbico a partir de técnicas eletroanalíticas vem sendo muito explorada atualmente (Maouche *et al.,* Zhang *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2014), não por ser um analito que ainda apresente muitos desafios em sua detecção, mas por apresentar um comportamento eletroquímico extensivamente descrito na literatura. Assim, o desenvolvimento de metodologias para determinação de AA demonstra não só a capacidade do eletrodo em determinar o fármaco em si, mas também a potencialidade analítica para aplicação do dispositivo proposto.

Wang *et al.* (Zhang *et al.*, 2013) estudaram diferentes abordagens para a eletrodeposição de um filme de hexacianoferrato de níquel e hidróxidos duplos lamelares de Ni-Al (Argila aniônica de fórmula geral $[M^{2+}_{(1-x)}M^{3+}_{x}(OH)_2](A^{n-})_{x/n}.zH_2O$; M = íon metálico e A^{n-} = ânion interlamelar) na superfície de um eletrodo de ouro. O eletrodo proposto foi caracterizado por CV em solução contendo o par redox Ferri/Ferro e por imagens de MEV. Os autores testaram a potencialidade analítica do eletrodo na detecção amperométrica de AA, obtendo uma faixa linear de 0,1 a 3,5 mmol L^{-1} com limite de detecção de 21 mmol L^{-1}. O método foi utilizado na análise de tabletes de vitamina C.

Ping *et al.* (Ping *et al.*, 2012) de maneira análoga, desenvolveram um eletrodo compósito preparado a partir de um líquido iônico e nanotubos de carbono de paredes múltiplas. O eletrodo compósito, depois de caracterizado por CV e MEV foi utilizado para a determinação AA por voltametria de pulso diferencial em uma faixa linear de 3,0 µmol L^{-1} a 4,2 mmol L^{-1} e com limite de detecção de 1,0 µmol L^{-1}. O método desenvolvido foi utilizado para a determinação do fármaco em amostras alimentícias (frutas,vegetais e bebidas), os resultados apresentaram concordância com valores obtidos pelas análises realizadas por uma instituição de inspeção local.

A D-glicose, ou apenas glicose, como também é conhecida, é o carboidrato mais abundante na natureza. A determinação de glicose em amostras fisiológicas de seres humanos esta diretamente ligada às diabetes, as

quais são um grupo de doenças metabólicas que afetam cerca de 150 milhões de pessoas em todo o mundo. Deste modo, o monitoramento frequente do nível de glicose em amostras fisiológicas é de grande relevância, uma vez que pode confirmar a eficácia do tratamento empregado, prevenir complicações em longo prazo e evitar situações de emergência (American Diabetes, 2010). Assim, o desenvolvimento de novas propostas para a determinação de glicose de maneira rápida, prática e de baixo custo são de extrema importância (Grassino *et al.*, 2012), e comumente são realizadas por quimiluminescência (Zargoosh *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012) e técnicas eletroanalíticas (Hassan *et al.*, 2014, Lin *et al.*, 2015), principalmente.

A determinação de glicose por técnicas eletroquímicas pode ser realizada a partir da modificação de eletrodos com enzimas (Zhu *et al.*, 2012). O desenvolvimento de biossensores sensíveis à glicose vem sendo utilizado para testar o desempenho de possíveis substratos para imobilização de biomoléculas (Ricci and Palleschi, 2005, Barsan *et al.*, 2008). A enzima Glicose Oxidase (GOx), por ter seu mecanismo de reação e relatos de sua utilização bastantes explorados na literatura é comumente utilizada, ademais, em comparação a outras enzimas, apresenta baixo custo, estabilidade e alta solubilidade em diferentes meios (Grassino *et al.*, 2012).

No mecanismo de ação da GOx para determinação do seu substrato (glicose), o mediador receptor de elétrons, transferidos pelo cofator $FADH_2$, são moléculas de oxigênio. Portanto, como representado na Figura 7, a determinação de glicose por técnicas eletroquímicas ocorre de maneira indireta, uma vez que a reação se baseia na detecção de peróxido de hidrogênio (Zhu *et al.*, 2012).

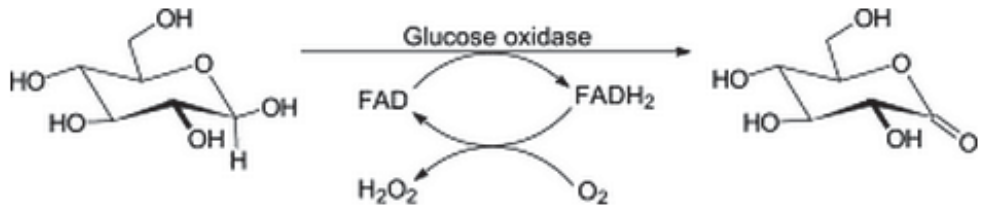


Figura 7 – Representação da oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase (Leskovac *et al.*, 2005).

Barsan *et al.* (Barsan and Brett, 2009) testaram um eletrodo compósito celulose/grafite como substrato para a construção de um biossensor, o qual, inicialmente teve sua superfície eletroquimicamente modificada com um mediador redox, o filme polimérico fenazínico de vermelho neutro. Após a eletropolimerização do vermelho neutro, foi imobilizada na superfície do eletrodo a enzima Glicose Oxidase e o biossensor construído foi utilizado para a detecção amperométrica de glicose em uma faixa linear entre 2,5 x 10^{-4} a 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} com um limite de detecção de 2,03 x 10^{-5} mol L^{-1}. Os autores relatam que o biossensor desenvolvido apresentou resultados promissores, uma vez que a sensibilidade (31,5 μA cm^{-2} mmol L^{-1}) calculada para o dispositivo é bastante elevada quando comparada com outros biossensores baseados em eletrodos compósitos de carbono descritos na literatura.

Além do formato mais tradicional apresentado para determinação de glicose, também é explorado o desenvolvimento de dispositivos sem a presença de um componente biológico. Eletrodos metálicos (prata, ouro, cobre, etc.) vêm sendo empregados para este fim, pois possuem elevada condutividade elétrica e a formação de seus óxidos tem sido utilizada para catalisar estas reações (Park *et al.*, 2006, Wang, 2008, Yang *et al.*, 2010, Salazar *et al.*, 2015).

1.5 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCTZ), ou 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiodiazina-7-sulfomida-1,1-dióxido, é uma droga diurética pertencente a classe das tiazidas, que atua através da inibição da capacidade dos rins de reterem água e outros eletrólitos corporais. Os diuréticos são amplamente utilizados como agentes terapêuticos para o tratamento da hipertensão arterial e de outras desordens que resultam da retenção dos líquidos do organismo (Martín *et al.*, 1999, Alghamdi, 2014). A estrutura molecular da HCTZ é mostrada na Figura 8.

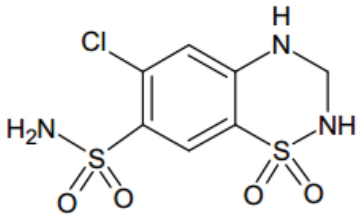


Figura 8 – Representação estrutural da hidroclorotiazida (HCTZ).

A HCTZ é considerada o diurético tiazídico mais utilizado na prática clínica brasileira (BRITO *et al.*, 2009, VERONEZ and SIMÃ?ES, 2009, Baldoni, 2010), sendo indicada para o tratamento de edema e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), e inclusive é prescrito como primeira opção de tratamento em casos de HAS leve e moderado (Andrade and Nobre, 2010). Entretanto o uso de doses elevadas do medicamento contendo a HCTZ pode ocasionar efeitos metabólicos negativos, tais como alterações no perfil lipídico, hipocalemia e dificuldade de liberação de insulina pelas células betas do pâncreas, e consequentemente aumento nos níveis glicêmicos (Pater *et al.*, 2004, Andrade and Nobre, 2010). Portanto, o monitoramento de HCTZ em amostras fisiológicas é de grande importância. Vários métodos analíticos são empregados na determinação da HCTZ em formulações farmacêuticas, urina e plasma sanguíneo (Martín *et al.*, 1999). Dentre os métodos mais comuns, destacam-se a utilização das técnicas: cromatografia (Tutunji *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2010), espectrofotometria (Farmacopéia Brasileira - vol. 2, 2010, Merey *et al.*, 2014) quimiluminescência (Yao *et al.*, 2011), entre outros.

Na literatura também são encontrados trabalhos descrevendo a determinação de HCTZ utilizando técnicas eletroquímicas, principalmente por técnicas voltamétricas (Martín *et al.*, 1999, Tajik *et al.*, 2013).

Alghamdi (Alghamdi, 2014), determinaram HCTZ por voltametria de redissolução anódica utilizando um eletrodo de carbono vítreo. O método contendo uma etapa de pré-concentração de 20 s foi utilizado para a determinação do fármaco em amostras enriquecidas de urina e plasma humano, atingindo recuperações médias de 90 % ± 1,22 e 88 % ± 0,71, respectivamente.

Mansano e Sartori (Mansano and Sartori, 2015) utilizaram um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação simultânea de HCTZ e amlodipina (AML), ambos compostos hipertensivos, em amostras de urina sintética utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. As análises foram

realizadas em tampão Britton-Robinson (pH 5), com uma separação de 0,360 V entre os picos de oxidação dos fármacos AML e HCTZ, nas faixas de concentração entre 1,0 x 10^{-7} a 2,1 x 10^{-6} mol L^{-1} e 2,0 x 10^{-6} a 2,2 x 10^{-5} mol L^{-1} e limites de detecção de 5,6 x 10^{-8} mol L^{-1} e 1,6 x 10^{-7} mol L^{-1}, respectivamente. O método foi testado em amostras de urina humana, entretanto, como a concentração de ácido úrico presente na urina é cerca de 100 vezes maior que a concentração de AML, o mesmo apresentou interferência no pico de oxidação do fármaco, e, portanto não foi possível a aplicação do método em urina humana para a determinação de ambos os fármacos.

Rezaei e Damiri (Rezaei and Damiri, 2008) propuseram um método para determinação de HCTZ empregando voltametria adsortiva de redissolução. Para a detecção do fármaco foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT quimicamente tratados, empregando uma etapa de pré-concentração de 8 minutos. O método proposto foi empregado na análise de amostras farmacêuticas e urina sintética com 2 faixas lineares de concentração entre 2,0 a 20,0 nmol L^{-1} e 0,2 a 100 μmol L^{-1} com limite de detecção de 0,8 nmol L^{-1}.

Como mostrado anteriormente, existem diversas metodologias para a determinação de HTZ utilizando técnicas eletroquímicas, entretanto, não foram encontrados relatos na literatura descrevendo a determinação do fármaco por um sistema FIA combinado com detecção amperométrica. A determinação de HCTZ aliada a sistemas FIA se faz relevante, pois possibilita o monitoramento de um elevado número de amostras em tempos de análise extremamente curtos, essencial para amostras de medicamentos e de fluídos biológicos (urina e plasma sanguíneo), que necessitam deste tipo de abordagem. Assim, neste trabalho pretende-se desenvolver um método para determinação de HCTZ utilizando um sistema FIA com detecção amperométrica empregando o eletrodo compósito EVA/NF.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Construir e avaliar um eletrodo compósito preparado a partir de negro de fumo (NF) e o co-polímero poli(etileno-co-acetato de vinila) (EVA) visando a preparação de sensores voltamétricos/amperométricos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Preparar compósitos a base de negro de fumo e poli(etileno co-acetato de vinila), em diferentes composições;

(ii) Avaliar estes eletrodos quanto as suas características físicas e ao desempenho frente à caracterização voltamétrica;

(iii) Verificar a possibilidade de utilizá-lo em aplicações analíticas, para substâncias de interesse como ácido ascórbico e glicose.

(iv) Avaliar o desempenho do eletrodo proposto como um detector amperométrico para a determinação de hidroclorotiazida empregando um sistema FIA.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

A Tabela 2 apresenta os dados sobre os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho, todos de grau analítico (P.A.) e utilizados sem purificação prévia. As soluções e diluições foram feitas em água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore, com resistividade maior que 18,2 MΩ cm. As medidas de pH das soluções foram realizadas em pHmetro Metrohm, Modelo 780, com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}.

Tabela 2 – Informações sobre os principais reagentes utilizados.

Reagente	Fórmula Química	Marca	Pureza
Black Pearls ® 570 (Negro de fumo)	C	Monarch	99%
poli(etilenon co-acetato de vinila)	$(C_2H_4)n$-$(C_4H_6O_2)m$	ExxonMobil™	
Acetato de sódio anidro	CH_3COONa	Vetec	99,0 – 101,0%
Ácido acético	CH_3COOH	Isofar	99,7%
Ferricianeto de Potássio	$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma	99,0%
Cloreto de Potássio	KCl	Merck	99,0%
Dihidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	Carlo Erba	99,5%
Hidrogenofosfato dipotássico	K_2HPO_4	Synth	98,0%
Cloreto de amônio	NH_4Cl	Biotec	99,5%
Hidróxido de amônio 28,0 a 30,0%	NH_4OH	Synth	
Hidróxido de sódio	NaOH	Cromato	99,5%

Cloreto de sódio	NaCl	Quimex	99,0%
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	Reagem	99,5%
Citrato de sódio	$Na_3C_6H_5O_7$	Impex	99,0%
Peróxido de hidrogênio 35%	H_2O_2	Neon	

3.1.1 Soluções

A solução tampão acetato com concentração analítica de 0,10 mol L^{-1} pH 4,0 foi preparada dissolvendo-se quantidades apropriadas de acetato de sódio e ácido acético em água, completando-se o volume do balão volumétrico.

A solução tampão fosfato com concentração analítica de 0,10 mol L^{-1} pH 7,0 foi preparada dissolvendo-se quantidades apropriadas de dihidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato dipotássico em água.

A solução tampão fosfato salina pH 7, com concentração analítica de 0,10 mol L^{-1} de tampão fosfato e 0,05 mol L^{-1} de NaCl, pH 7,0, foi preparada dissolvendo-se quantidades apropriadas de dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dipotássico e cloreto de sódio em água.

A solução tampão amônio com concentração analítica de 0,10 mol L^{-1} pH 11,0 foi preparada dissolvendo-se quantidades apropriadas de cloreto de amônio e de hidróxido de amônio 28 % em água.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) com concentração analítica de 0,040 mol L^{-1} foi preparada em diferentes pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5). Foram dissolvidas quantidades apropriadas de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico em um balão de 1000 mL. O pH das soluções foi ajustado com solução de NaOH 2,0 mol L^{-1}.

3.1.2 Solução de ferricianeto de potássio

Pesaram-se quantidades apropriadas de ferricianeto de potássio e cloreto de potássio, os quais foram dissolvidos em água para resultar em soluções 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$ em 0,10 mol L^{-1} de KCl.

3.1.3 Soluções de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio

Foram pesados quantidades apropriadas de ácido ascórbico, que posteriormente foram dissolvidos em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH 7,0, para resultar em soluções estoque de 0,010 mol L^{-1}.

Foram medidos volumes apropriados de peróxido de hidrogênio, que posteriormente foram diluídos em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH 7,0, para resultar em soluções estoque de 0,010 mol L^{-1}.

3.1.4 Solução de glicose

As soluções estoque de glicose foram preparadas dissolvendo-se quantidades apropriadas em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH 7,0, para resultarem em soluções de concentração de 0,010 mol L^{-1}. O preparo das soluções sempre foi realizado um dia antes da sua utilização para permitir que os anômeros α e β da D-glucose chegassem ao equilíbrio.

3.1.5 Solução de Hidroclorotiazida

As soluções de estoque de hidroclorotiazida foram preparadas dissolvendo-se quantidades apropriadas do fármaco em meio de solução tampão Britton-Robinson 0,040 mol L^{-1} pH 9,5 juntamente com 30 % (v/v) de acetona, para resultarem em soluções de concentração de 0,010 mol L^{-1}.

3.1.6 Urina sintética

A urina humana sintética (Caetano *et al.*, 2012) foi prepara dissolvendo-se quantidades apropriadas dos reagentes (Tabela 3) em água destilada.

Tabela 3 – Composição da urina sintética.

Reagente	Fórmula química	g L^{-1}	Marca	Pureza
Cloreto de Sódio	$NaCl$	3,51	Quimex	99,0 %
Carbonato de Sódio anidro	$NaHCO_3$	2,27	Synth	99,5 %
Fosfato de Sódio dibásico anidro	NaH_2PO_4	1,18	Vetec	99,0 %
Sulfato de Potássio	K_2SO_4	4,18	Impex	99,0 %
Cloreto de Amônio	NH_4Cl	1,34	Biotec	99,5 %
Citrato de amônio dibásico	$(NH_4)_2HCitrato$	0,41	Neon	99,0 %
Cloreto de Magnésio	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,67	Vetec	96,0 %
Cloreto de Cálcio	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1,16	Vetec	96,0 %
Uréia	$(NH_2)_2CO$	13,7	Vetec	99,0 %
D-Glicose	$C_6H_{12}O_6$	0,047	Reagen	99,5 %
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,014	Reagen	99,5 %

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO NEGRO DE FUMO E DO COMPÓSITO EVA/NF

3.2.1 Caracterização do negro de fumo (NF) por Difratometria de Raios X (DRX)

A caracterização estrutural do negro de fumo foi realizada através da técnica de difração de raios X, onde uma pequena quantidade do material foi depositada em um substrato de alumínio (porta amostra). Para a realização das análises utilizou-se um aparelho Shimadzu XRD-6000, com radiações Kα (λ = 1,5418 Å), operando com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA, com velocidade de varredura de 2º/minuto. Os difratogramas obtidos abrangem um intervalo de 3 a 80º (2θ). Essas análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

3.2.2 Caracterização do negro de fumo (NF) por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Análises morfológicas foram realizadas empregando a técnica MET utilizando o microscópio eletrônico de transmissão marca JEOL, modelo JSM 6360-LV. Essas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.2.3 Caracterização do negro de fumo (NF) por BET

O equipamento utilizado na determinação da área específica pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) foi o Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System Report, modelo NOVA 1200. As determinações foram efetuadas no laboratório do LACTEC. Uma amostra de grafite em pó (sigma-aldrich) também foi analisada.

3.2.4 Caracterização do material EVA/NF por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica dos materiais compósitos foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pequenos pedaços do material foram colocados em um suporte adequado, os quais foram submetidos às análises obtendo-se assim as imagens das amostras. As análises foram realizadas utilizando o Microscópio eletrônico de varredura marca JEOL, modelo JSM-6360LV. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.2.5 Caracterização voltamétrica dos eletrodos compósitos EVA/NF

A caracterização voltamétrica foi realizada em um potenciostato/galvanostato μAUTOLAB tipo III controlado pelo Software NOVA versão 10.0, empregando uma célula convencional (10 mL) de três eletrodos

(Contra-eletrodo: Platina; Eletrodo de referência: Ag/AgCl KCl 3,0 mol L^{-1}; Eletrodo de trabalho: Eletrodo compósito EVA/NF).

Foram realizados estudos em soluções de cloreto de potássio 0,10 mol L^{-1} e de ferricianeto de potássio (3,0 mmol L^{-1} em KCl 0,10 mol L^{-1}) para investigar o efeito da composição do compósito em seu comportamento eletroquímico. Para um estudo mais detalhado, foram utilizadas diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1}). Nessas condições foi observado o comportamento voltamétrico obtido para cada composição, além do cálculo de parâmetros pertinentes (área eletroativa, capacitância e constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons).

Após a verificação da composição mais adequada do material compósito, o mesmo foi avaliado em diferentes eletrólitos suporte para determinar os intervalos úteis de potencial. Foram utilizadas as seguintes soluções: H_2SO_4 0,10 mol L^{-1}, tampão acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4), tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7), tampão amônio 0,10 mol L^{-1} (pH 11) e NaOH 0,10 mol L^{-1}. Todas as soluções foram desaeradas previamente por borbulhamento com gás nitrogênio (N_2), e mantidas em atmosfera inerte durante as medidas. Foi utilizada a velocidade de varredura 50 mV s^{-1} e o potencial aplicado foi varrido no sentido catódico a partir de 0,00 V.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Preparação do material compósito e construções dos eletrodos

Foram preparados compósitos com diferentes proporções da mistura negro de fumo e poli(etileno co-acetato de vinila), variando a porcentagem de NF de 25 a 75 % (NF, m/m). Inicialmente uma solução contendo 10% (m/v) de EVA em tolueno, previamente mantida sob repouso por 24 horas, foi colocada em um sistema de aquecimento sob agitação constante para então ser adicionado à quantidade apropriada de NF. Após a homogeneização, a mistura foi escoada em um molde de teflon, de aproximadamente 1,0 cm de altura contendo orifícios de diferentes diâmetros (0,2 – 0,6 cm) no formato de pequenos cilindros (Figura 9).

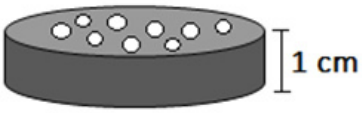


Figura 9 – Representação do molde de teflon utilizado para a confecção do material compósito.

O contato elétrico foi feito por um fio de cobre maleável colocado em uma extremidade do cilindro de material compósito, juntamente com uma tinta condutora de prata, melhorando o contato elétrico entre a peça do material compósito e o fio de cobre. A extremidade oposta foi embutida em ponteiras de micropipetas de 1000 μL e, após o tempo necessário para a secagem da tinta condutora (24 h), as ponteiras foram preenchidas com um adesivo epóxi, com a finalidade de isolar o material no interior do suporte. Após a sua construção a extremidade do eletrodo, contendo apenas resina epóxi, foi cortada e a superfície eletródica polida com duas lixas de granulometria de 360 e 1200. A Figura 10 mostra um esquema ilustrando o procedimento realizado para o preparo dos eletrodos compósitos.

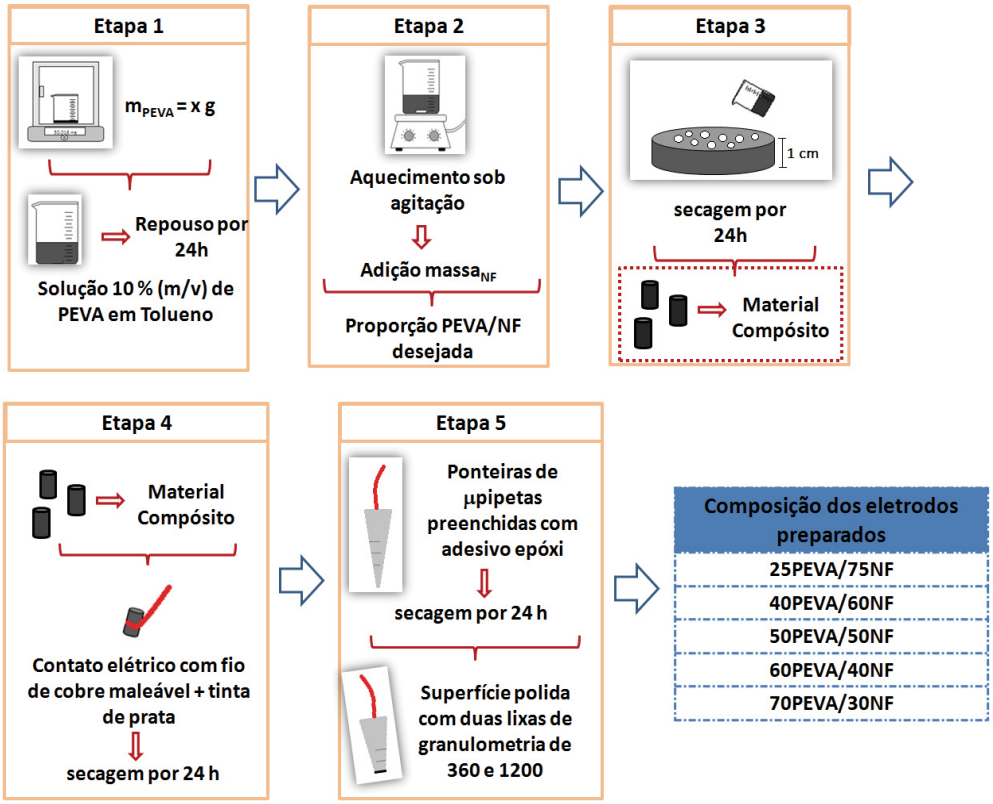


Figura 10 – Esquema ilustrativo do procedimento experimental utilizado para o preparo dos diferentes eletrodos compósitos.

3.3.2 Construção de um biossensor sensível à glicose

Os experimentos envolvidos para o desenvolvimento do biosensor foram realizados utilizando um potenciostato μAUTOLAB tipo III controlado pelo Software GPES versão 4.9, empregando uma célula eletroquímica (10 mL) de três eletrodos (Contra-eletrodo: Platina; Eletrodo de referência: Eletrodo de calomelano saturado (ECS); Eletrodo de trabalho: Eletrodo compósito EVA/NF). Os experimentos foram realizados em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7).

Primeiramente foi realizada a modificação da superfície com um filme polimérico de azul da Prússia, baseado em métodos descritos na literatura (Karyakin *et al.*, 1994, Barsan *et al.*, 2008). A eletrodeposição do filme de PB sob a superfície eletródica foi realizada empregando o método potenciodinâmico (voltametria cíclica). O experimento procedeu a partir da ciclagem consecutiva de 25 ciclos, em um intervalo de potencial entre -0,10 e 0,50 V *vs*. ECS no sentido anódico em solução contendo 2,5 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$ juntamente com 2,5 mmol L^{-1} de $FeCl_3$, em meio de KCl 0,10 mol L^{-1} e HCl 0,10 mol L^{-1}, com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}.

O filme de PB foi depositado na superfície do eletrodo compósito e testado para a determinação de peróxido de hidrogênio utilizando a técnica de cronoamperometria ao potencial fixo. Primeiramente foram realizados experimentos investigando o potencial aplicado no eletrodo EVA/NF-PB, variado entre - 100 mV a - 600 mV *vs.* ESC, utilizando a técnica de cronoamperometria. Após a escolha do potencial adequado, foram construídas curvas analíticas para diferentes concentrações de H_2O_2 e a partir dos resultados foi possível o cálculo das figuras de mérito (região de resposta linear, sensibilidade, limites de quantificação e detecção).

A modificação da superfície do eletrodo EVA/NF-PB foi realizada baseando-se em métodos descritos na literatura (Karyakin *et al.*, 1994, Barsan *et al.*, 2008). A glicose Oxidase foi imobilizada por *crosslinking* (formação de ligações covalentes cruzadas) na superfície eletródica utilizando o glutaraldeído (GA) como agente de ligação cruzada. A solução de GA foi preparada a partir da diluição do mesmo em água destilada, resultando em uma solução 2,5 % (v/v).

Uma solução enzimática foi preparada com 1 % (m/v) de Glicose Oxidase e 4% (m/v) de Albumina de soro bovino em solução tampão fosfato salina (Tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} + NaCl 0,05 mol L^{-1}, pH 7). Com o auxilio de uma micropipeta, uma alíquota de 10,0 µL da solução enzimática preparada foi então misturada com 5,0 µL da solução de GA. Desta mistura, 10 µL foi gotejado (*drop casting*) sobre a superfície do eletrodo. O eletrodo EVA/NF-PB-GOx foi seco à temperatura ambiente durante 4 h no mínimo.

3.3.3 Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O sistema FIA utilizado consistiu em uma configuração de linha única, constituído por uma bomba peristáltica (Ismatec S.A. IPS12), um injetor comutador e uma célula eletroquímica adaptada para fluxo (contendo três eletrodos: eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e contra eletrodo), tubos conectores de Tygon (d.i.=0,5 mm), percurso analítico de 30 cm e uma unidade de detecção e armazenamento dos dados (potenciostato µAUTOLAB tipo III gerenciado pelo software NOVA versão 10.0). A célula eletroquímica utilizada e uma representação do sistema utilizado são mostrados na Figura 11.

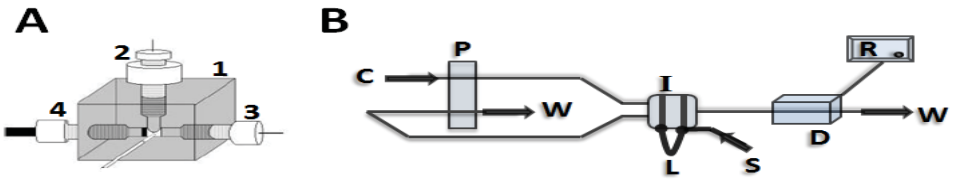


Figura 11 – A) Configuração da célula eletroquímica utilizada: (1) suporte de poliuretana; (2) eletrodo de referência (3) contra eletrodo e (4) eletrodo de trabalho e **B)** Representação do sistema FIA utilizado: (P) bomba peristáltica; (I) injetor comutador manual; (S) entrada da amostra; (L) alça de amostragem; (C) entrada da solução transportadora; (D) célula eletroquímica adaptada; (W) descarte de soluções e reagentes e (R) sistema de reconhecimento e armazenamento de dados.

A célula eletroquímica, Figura 11-A, utilizada no presente trabalho foi construída em um suporte de poliuretana, no qual são fixados os eletrodos de referência Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}, contra eletrodo de platina e o eletrodo de trabalho, o eletrodo compósito EVA/NF. O funcionamento do sistema ocorre pelo movimento peristáltico da solução transportadora e amostras até a célula

eletroquímica, através das tubulações do sistema, proporcionando um fluxo paralelo em relação à superfície eletródica. Para um melhor desempenho do sistema FIA foram estudados os parâmetros como: potencial aplicado, volume da amostra injetada (ou volume da alça de amostragem) e vazão do sistema.

3.4 APLICAÇÕES ANALÍTICAS

As aplicações analíticas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato μAUTOLAB tipo III controlado pelo Software NOVA versão 10.0.

3.4.1 Determinação de ácido ascórbico (AA)

A determinação de AA em sistema convencional foi realizada por cronoamperometria ao potencial fixo sob agitação constante empregando uma célula eletroquímica (10 mL) de três eletrodos (Contra-eletrodo: Platina; Eletrodo de referência: Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}; Eletrodo de trabalho: Eletrodo compósito EVA/NF). Os experimentos foram realizados em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7,0) e sob o eletrodo compósito foi aplicado um potencial de 600 mV (*vs.* Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}).

A partir de uma curva de calibração externa calculada a partir dos resultados obtidos do experimento, foi possível determinar a concentração de AA na amostra comercial de suco de laranja. Os resultados obtidos foram verificados por um método comparativo, utilizando titulometria(Farmacopéia Brasileira, 2010).

A determinação de AA em sistema FIA foi realizada após os parâmetros experimentais inerentes ao sistema serem estudados e fixados (potencial aplicado (600 mV), volume da alça de amostragem (100 μL) e vazão de 4,3 mL min^{-1}). Foi realizada a construção da curva analítica e obtenção das figuras de mérito. O método desenvolvido foi empregado para análise de uma amostra comercial de suco de laranja.

A determinação de AA na amostra comercial de suco de laranja ocorreu pela injeção em triplicata em sistema FIA. A solução contendo a amostra

comercial foi previamente diluída em solução tampão fosfato 0,010 mol L^{-1} pH 7,0. As injeções das amostras de suco foram realizadas intercaladas com as injeções de solução padrão de AA.

3.4.2 Determinação de glicose

A determinação de glicose em sistema convencional foi realizada por cronoamperometria ao potencial fixo sob agitação constante empregando uma célula eletroquímica (10 mL) de três eletrodos (Contra-eletrodo: Platina; Eletrodo de referência: Eletrodo de calomelano saturado (ECS) e Eletrodo de trabalho: Eletrodo compósito EVA/NF-PB-GOx). Os experimentos foram realizados em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) e sob o eletrodo compósito foi aplicado um potencial de 400 mV (*vs.* ECS).

Com base nos resultados obtidos foi possível a obtenção de curvas analíticas e figuras de mérito (região de resposta linear, sensibilidade, limites de quantificação e detecção).

3.4.3 Determinação de hidroclorotiazida (HCTZ)

A determinação de HCTZ em sistema FIA foi realizado após os parâmetros experimentais inerentes ao sistema serem fixados (potencial aplicado (900 mV), volume da alça de amostragem (100 μL) e vazão de 5,3 mL min^{-1}). Depois de verificado as melhores condições de análise, foram construídas curvas analíticas com diferentes concentrações de HCTZ e a partir destas curvas foi possível o cálculo das figuras de mérito (região de resposta linear, sensibilidade, limites de quantificação e detecção e frequência analítica).

O método desenvolvido foi aplicado em uma amostra comercial farmacêutica e em amostras de urina humana sintética fortificadas com HCTZ.

As soluções contendo a amostra farmacêutica foram adequadamente preparadas em três concentrações diferentes (entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) e injetadas em triplicata no sistema FIA otimizado. As injeções das amostras farmacêuticas foram realizadas intercaladas com as injeções de solução padrão de HCTZ.

As soluções contendo a amostra de urina sintética fortificadas com HCTZ foram adequadamente preparadas em três concentrações diferentes (entre 1,0 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}) e injetadas em triplicata no sistema FIA otimizado. As injeções das amostras contendo a urina sintética foram realizadas intercaladas com as injeções de solução padrão de HCTZ.

As amostras de urina sintética fortificadas foram preparadas pela diluição em tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 7,5 partindo de uma solução de urina sintética fortificada com HCTZ 0,02 mol L^{-1}.

3.5 MÉTODOS COMPARATIVOS

3.5.1 Método comparativo para a determinação de ácido ascórbico (AA)

A determinação volumétrica de ácido ascórbico foi realizada utilizando uma titulação redox com triodeto como titulante (iodimetria). Todas as titulações descritas foram realizadas em triplicata. Uma solução de tiossulfato de sódio foi padronizada (~0,100 mol L^{-1}). Para tal, uma massa conhecida de dicromato de potássio foi dissolvida em água destilada juntamente com uma solução de 10% de KI e acidificada com solução de ácido sulfúrico concentrado, a mistura foi titulada com uma solução de tiossulfato de sódio empregando amido como indicador (descoloração). A solução de tiossulfato de sódio foi utilizada para padronizar uma solução de iodo (triiodeto) (~ 0,0500 mol L^{-1}). Uma quantidade da solução (10,00 mL) de tiossulfato foi diluída em água juntamente com 1,00 mL de uma solução de goma de amido 1% e titulada com a solução de iodo até aparecimento da coloração azul. A seguir, foi realizada a titulação da amostra comercial de suco contendo ácido ascórbico com a solução de iodo. A solução contendo a amostra foi acidificada com uma solução de HCl concentrado e adicionado 1,00 mL da solução de amido 1% e titulada com a solução previamente padronizada de iodo até o aparecimento da cor azul.

3.5.2 Método comparativo para a determinação de hidroclorotiazida

Para efeito de comparação, amostras preparadas a partir do medicamento clorana® foram determinadas pelo método espectrofotométrico de absorção no ultravioleta (Farmacopéia Brasileira - vol. 2, 2010). Assim, uma massa definida do medicamento (equivalente a 30 mg de HCTZ) foi pesada, e a após a sua pulverização, a mesma foi dissolvida em 50 mL de NaOH 0,1 mol L^{-1} e agitada por 20 min. (agitação magnética). Após a agitação, a mistura preparada foi transferida para um balão de 100 mL e o volume foi completado com NaOH 0,1 mol L^{-1}. A solução preparada foi filtrada e o filtrado foi diluído em água até a concentração de 0,0015% (p/v). As soluções padrão de HCTZ foram preparadas nas mesmas condições, utilizando os mesmos solventes. As absorbâncias das soluções foram medidas em 273 nm, utilizando água para calibração do branco no equipamento.

A partir de uma curva de calibração externa calculada a partir dos resultados obtidos do experimento, foi possível determinar a concentração de HCTZ no medicamento analisado pelo método comparativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO NEGRO DE FUMO (NF)

Informações estruturais e morfológicas sobre o negro de fumo são importantes para conhecer as características do material utilizado na preparação dos compósitos, considerando que o NF pode ser obtido de diferentes fabricantes e apresentar desempenho muito variável em função das características citadas, estudos foram conduzidos realizando-se medidas de BET, MET e DRX.

Analisou-se a área superficial do NF utilizando-se a técnica de Brunauer-Emmet-Teller (BET). Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de área superficial para o NF utilizado no preparo do material compósito e de uma amostra de grafite comercial, para fim de comparação.

Tabela 4 – Dados de área superficial por BET.

Amostra	Área superficial (m^2 g^{-1})
Negro de Fumo	103
Grafite	9,10

Os valores encontrados para área superficial no negro de fumo estão de acordo com o reportado pela literatura, que pode variar de 6 até 1200 m^2 g^{-1} (Zucolotto *et al.*, 2004). As propriedades finais do negro de fumo, como área superficial e estrutura, dependem muito de variáveis utilizadas em seu processo de produção, como: tempo de reação, temperatura e controle, ou não, no resfriamento das amostras produzidas (Jha, 2008). Com base na Tabela 4 pode-se observar também que a área superficial do NF é significativamente maior que a do grafite. Assim, pode-se considerar que a utilização do NF como fase condutora para o preparo de materiais promove um aumento significativo na área superficial do eletrodo, melhorando seu desempenho eletroanalítico (Arduini *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2011).

As imagens de MET obtidas para o negro de fumo estão apresentadas na Figura 12, onde se observa a menor unidade indivisível de negro de fumo,

também denominado agregado (Donnet and Voet, 1976). A estrutura interna desses agregados, ainda pouco compreendida pela literatura, apresenta algumas características quasicristalinas muito semelhantes ao grafite. Donnet e Voet identificaram que os planos basais característicos do grafite, presentes também no NF, apesar de paralelos, apresentam a diferença de serem angularmente distorcidos (Donnet and Voet, 1976). Além disso, os autores também verificaram uma diferença no espaçamento entre as camadas dos planos basais em relação a uma amostra de grafite puro (Donnet and Voet, 1976).

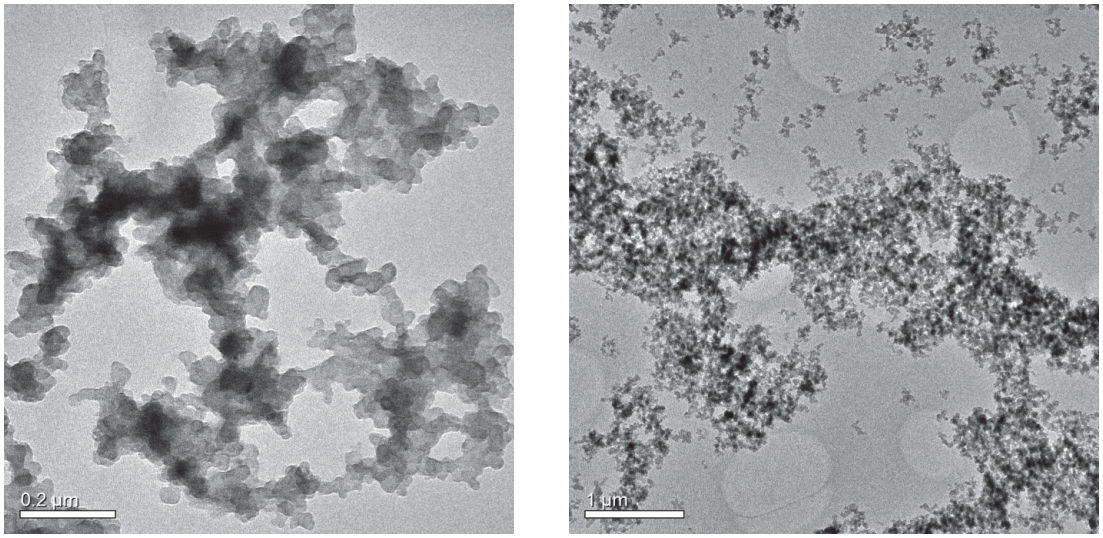


Figura 12 – Micrografias eletrônicas de transmissão da amostra de negro de fumo.

A Figura 13 apresenta o difratograma de Raios X da amostra onde podem ser verificados os picos referentes aos planos (022) e (101) do grafite (Swanson and Tatge, 1953), valores esperados em 26,38º e 44,39º, respectivamente. A posição e a largura dos picos mostrados na Figura 13 indicam que os carbonos presentes nos aglomerados de NF apresentam uma estrutura do tipo “coque” com intercamadas carbonaceas desordenadas (Ungár *et al.*, 2002). Biscoe e Warren identificaram a estrutura desses aglomerados como intermediárias entre uma estrutura cristalina e amorfa (Biscoe and Warren, 1942). Os outros picos não identificados no difratograma são referentes ao porta amostra de alumínio utilizado nas análises (38,47º; 44,72º; 65,10º e 78,23º).

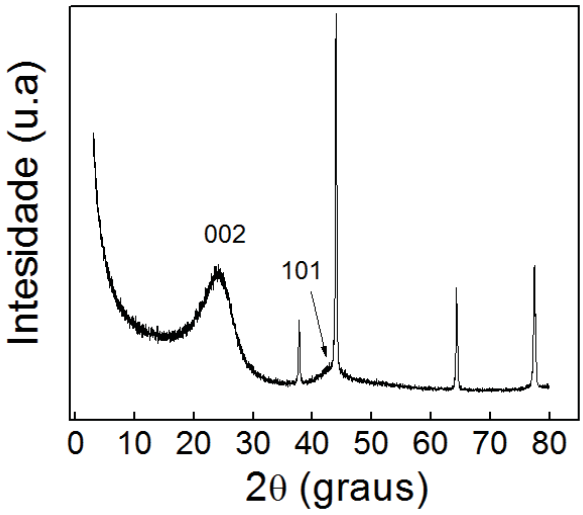


Figura 13 – Difratograma de raios X da amostra de negro de fumo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS COMPÓSITOS

4.2.1 Efeito da composição do eletrodo compósito no comportamento voltamétrico

A composição do material eletródico é um parâmetro primordial na obtenção e qualidade da resposta voltamétrica. Assim, a primeira etapa deste trabalho constituiu na adequação da melhor proporção EVA/NF em termos de capacitância, reversibilidade e porcentagem de área eletroativa dos eletrodos.

Os eletrodos compósitos preparados em diferentes composições contendo de 30-75% (NF, m/m), foram avaliados em relação ás capacitâncias calculadas a partir das curvas voltamétricas em solução de eletrólito suporte, KCl 0,10 mol L^{-1}. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos para os diferentes eletrodos.

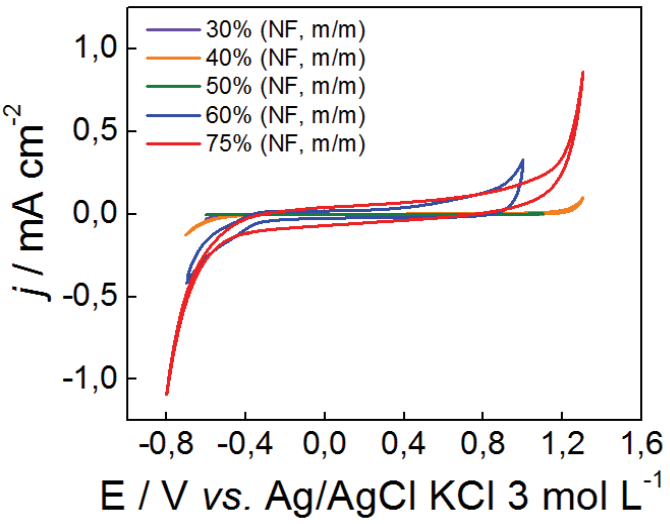


Figura 14 – Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl utilizando os eletrodos de composição: (—) 25EVA/75NF, (—) 40EVA/60NF, (—) 50EVA/50NF, (—) 60EVA/40NF e (—) 70EVA/30NF, ν = 50 mV s^{-1}.

Com base na amostragem de corrente dos voltamogramas cíclicos para uma dada velocidade de varredura, pode-se calcular a capacitância referente aos eletrodos testados. A capacitância, em linhas gerais, está relacionada com a capacidade de um sensor/eletrodo armazenar carga e é comum que um eletrodo que apresenta elevada capacitância apresenta menor resistência elétrica as reações que envolvam transferência de elétrons, o que é crucial para o desempenho de um eletrodo ou sensor eletroquímico. O cálculo foi realizado da seguinte maneira (Brett and Brett, 1993):

$$dQ/_{dt} = C\ dE/_{dt}$$

Ou seja:

$$\Delta j/_{2} = C\,\nu$$

Onde:

- Δj é a diferença entre as densidades de correntes anódica e catódica, em A;
- C é a capacitância, em F cm^{-2};
- ν é a velocidade de varredura, em V s^{-1}.

Os valores de densidade de corrente (*j*) utilizados para os cálculos foram medidos em uma região de potencial onde não ocorrem reações faradáicas. A

Tabela 5 mostra a influência da composição do compósito nos valores de capacitância calculados.

Tabela 5 – Valores calculados de capacitância para os diferentes eletrodos compósitos EVA/NF utilizando voltametria cíclica em meio de KCl 0,10 mol L^{-1}.

Composição % (m/m)	Capacitância (μF cm^2)
25EVA/75NF	903,9
40EVA/60NF	206,1
50EVA/50NF	46,9
60EVA/40NF	39,3
70EVA/30NF	28,9

Pode-se notar, na Tabela 5, um aumento nos valores de capacitância juntamente com o acréscimo da porcentagem de NF na composição do material eletródico. Valores considerados coerentes com os voltamogramas apresentados na Figura 14, nos quais podem ser observados maiores valores de densidade de corrente para o eletrodo que contém 75 % de negro de fumo. Assim, esta tendência é atribuída à presença majoritária de fase condutora no material, uma vez que a deficiência de material condutor no compósito ocasiona em valores extremamente baixos de capacitância, como observado para o eletrodo com maior quantidade de fase isolante, 70EVA/30NF. O mesmo foi observado por Fagan-Murphy e Patel (Fagan-Murphy and Patel, 2014), os eletrodos que apresentaram maiores valores de capacitância, apresentaram, também, o melhor desempenho eletroquímico. Klatt *et al.* (Klatt *et al.*, 1975) associaram o aumento da corrente de fundo ao aumento da porcentagem de grafite em um eletrodo compósito Teflon®/grafite.

Os eletrodos preparados com diferentes proporções EVA/NF também foram avaliados utilizando voltametria cíclica em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$, variando a velocidade de varredura entre 10 e 200 mV s^{-1}. Os voltamogramas obtidos para as reações de redução e oxidação do par redox ferri/ferrocianeto, apenas para a velocidade de 50 mV s^{-1}, são apresentados na Figura 15.

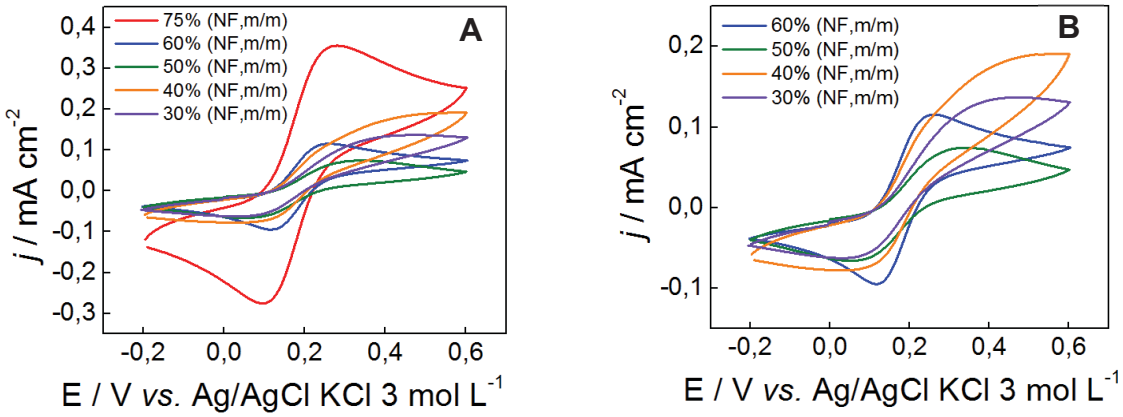


Figura 15 – A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$, utilizando os eletrodos: (—) 25EVA/75NF, (—) 40EVA/60NF, (—) 50EVA/50NF, (—) 60EVA/40NF e (—) 70EVA/30NF, ν = 50 mV s^{-1} e B) Zoom do gráfico para visualização dos voltamogramas utilizando os eletrodos contendo 30-60% (NF, m/m).

Pode ser observado que a presença de uma maior quantidade de NF no material compósito melhora a qualidade das respostas voltamétricas obtidas pelos eletrodos, as quais apresentaram um comportamento característico do sistema redox ferri/ferrocianeto (Brett and Brett, 1993). Por conseguinte, podem ser verificados, na Figura 15-A e 15-B, perfis voltamétricos com picos de corrente com uma melhor definição para os eletrodos contendo 60 e 75 % (NF, m/m). Adicionalmente, o compósito contendo 75 % (NF, m/m) apresentou densidade de corrente significativamente maior que a menor densidade de corrente obtida com outras composições.

As composições com 30, 40 e 50 % (NF, m/m) não apresentaram perfis voltamétricos característicos para o sistema redox ferri/ferrocianeto provavelmente por não conterem NF suficiente para promover uma condutividade elétrica adequada ao material compósito, pois, uma vez que o EVA é isolante, resulta em compósitos com elevada resistência elétrica (Navarro-Laboulais *et al.*, 1994). Portanto, foi possível a análise da intensidade de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura somente para os eletrodos contendo 60 e 75 % (NF, m/m), Figura 16. Os resultados mostram uma dependência linear de $I_{pa,c}$ com $\nu^{1/2}$ no intervalo de 10 a 200 mV s^{-1}, indicando que a corrente é controlada por um processo de difusão linear (Brett and Brett, 1993).

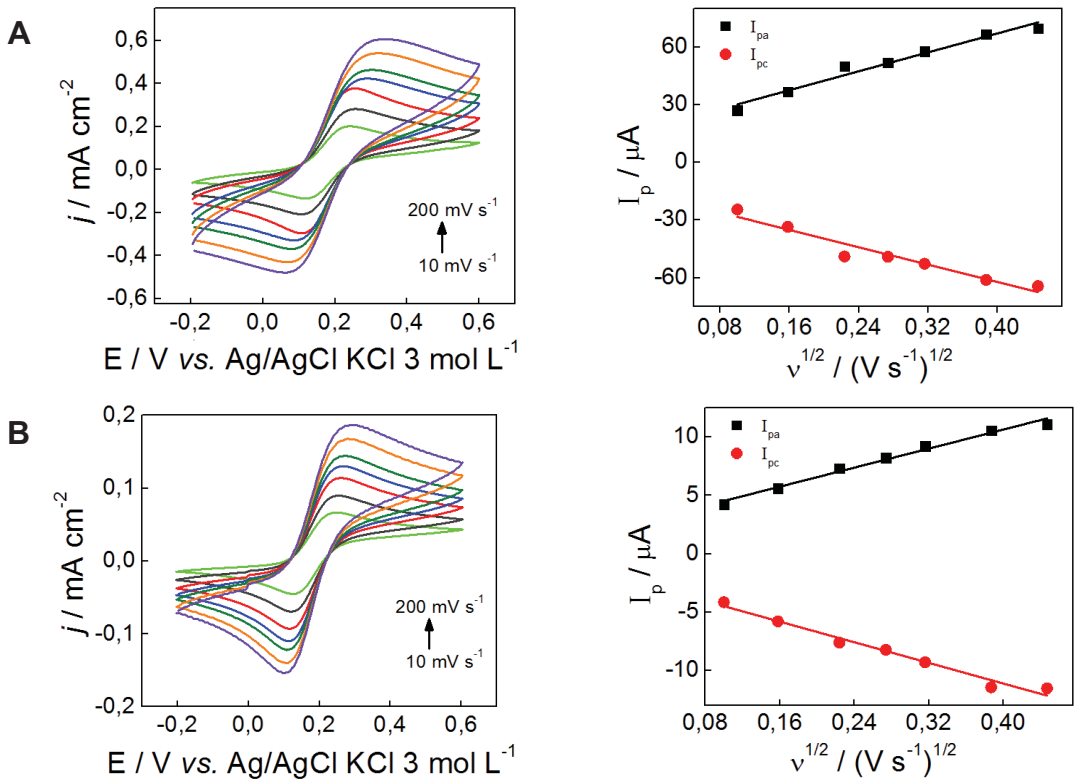


Figura 16 – Voltamogramas cíclicos registrados em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$ demostrando o efeito da velocidade de varredura sobre o perfil voltamétrico e a dependência das correntes anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura, utilizando os eletrodos: A) 25EVA/75NF e B) 40EVA/60NF, variando a velocidade de varredura de 10 a 200 mV s^{-1}.

A partir dos dados obtidos pelas análises de voltametria cíclica em meio de íons ferricianeto, foi possível o cálculo da porcentagem de área eletroativa dos eletrodos utilizando a equação de Randles-Sevčik, que relaciona a dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Brett and Brett, 1993):

$$I_P = (2{,}69\ 10^5)\ n^{3/2}\ A\ D^{1/2}\ C\ \nu^{1/2}$$

Onde:

- I_P é a corrente de pico, em A;
- n é o número de elétrons;
- A é a área do eletrodo, em cm^2;
- D é o coeficiente de difusão, em $cm^2\ s^{-1}$;
- C é a concentração, em mol cm^{-3};
- ν é a velocidade de varredura, em V s^{-1}.

A área eletroativa aparente foi calculada utilizando o coeficiente de difusão (D) para o sistema redox ferri/ferrocianeto, 6,20 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} (Harris, 2003). A Tabela 6 descreve os valores calculados de porcentagem de área eletroativa em relação à área geométrica para os eletrodos compósitos estudados. Os eletrodos preparados com 30 e 40 % de material condutor não apresentaram uma resposta voltamétrica adequada, como pode ser verificado na Figura 15-B, para que fosse possível o cálculo das respectivas áreas eletroativas.

Tabela 6 – Valores calculados de % de área eletroativa para os diferentes eletrodos EVA/NF utilizando VC em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Composição % (m/m)	Área Eletroativa (%)
25EVA/75NF	63,13 ± 2
40EVA/60NF	48,37 ± 20
50EVA/50NF	21,90 ± 10
60EVA/40NF	-
70EVA/30NF	-

Como esperado para eletrodos compósitos (Tallman and Petersen, 1990), as áreas eletroativas calculadas são inferiores as áreas geométricas, pois o material contém, além da fase condutora (NF), uma fase isolante (EVA). O eletrodo que proporcionou a maior porcentagem de área eletroativa foi o 25EVA/75NF, o qual contém a maior quantidade de fase condutora estudada. Além disso, o eletrodo contendo 75% (NF, m/m) apresentou menor valor de desvio padrão nos cálculos, indicando boa homogeneidade da superfície eletródica. Apesar da quantidade de material condutor influenciar positivamente o desempenho voltamétrico dos eletrodos estudados, quantidades acima de 75 % (NF, m/m) não foram investigadas devido à perda da rigidez do compósito, característica atribuída principalmente pela presença do EVA no material.

Outro parâmetro importante para caracterizar as propriedades eletroquímicas de um eletrodo é a constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons (k_o). A constante k_o é calculada através de dados obtidos de voltamogramas cíclicos de um sistema redox, com um processo de

transferência simples o qual apresenta comportamento voltamétrico fortemente influenciado pela natureza superficial do eletrodo, funcionando como uma espécie de sensor do estado desta superfície (Kissinger and Heineman, 1996). A forma dos picos e os parâmetros numéricos obtidos das medidas voltamétricas, são relacionados a partir do parâmetro *Λ*, uma medida quantitativa da reversibilidade (razão cinética/transporte) (Brett and Brett, 1993):

$$\Lambda = k_0\, D^{-1/2}\, \sigma^{-1/2}$$

A variação entre a diferença dos potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p) juntamente com o grau de reversibilidade é expresso por *Ψ*, o qual pode ser relacionado com o valor de *Λ*, através da seguinte equação:

$$\Psi = \Lambda\ \pi^{1/2}$$

Como os valores de *Ψ* são tabelados, torna-se possível a dedução de k_0:

$$\Psi = k_0\, D^{-1/2}\, \sigma^{-1/2}\, \pi^{1/2}$$

E *σ* é expresso pela equação:

$$\sigma = \left(\frac{n\,F}{R\,T}\right)\nu$$

Os resultados calculados para k_0, apresentados na Tabela 7, mostram que o comportamento do sistema redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ sobre os eletrodos compósitos podem ser classificados como quase reversíveis (um sistema é considerado quase reversível quando $10^{-1} > k_0 > 10^{-5}$ cm s^{-1}) (Brett and Brett, 1993), indicando que processos eletroquímicos com mecanismos semelhantes a estes podem ser investigados utilizando os dispositivos desenvolvidos (Matsushima *et al.*, 2012) com desempenho adequado.

Tabela 7 – Valores calculados de constantes de velocidade heterogênea de transferência de elétrons para os diferentes eletrodos compósitos EVA/NF utilizando voltametria cíclica em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl contendo 3,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Composição % (m/m)	k_0 (cm s^{-1})
25EVA/75NF	$4{,}02 \times 10^{-4} \pm 4.98 \times 10^{-5}$
40EVA/60NF	$3{,}22 \times 10^{-4} \pm 1{,}76 \times 10^{-5}$
50EVA/50NF	$1{,}51 \times 10^{-4} \pm 1{,}95 \times 10^{-5}$
60EVA/40NF	$1{,}15 \times 10^{-4}$
70EVA/30NF	$1{,}18 \times 10^{-4}$

As composições contendo 60 e 75% (NF, m/m), as quais proporcionaram a maior porcentagem de área eletroativa, apresentaram os maiores valores calculados da constante k_0. Em comparação com outros eletrodos a base de carbono descritos na literatura, o eletrodo proposto apresentou valores de k_0 semelhantes ao encontrado para o eletrodo de pasta de carbono ($1{,}0 \times 10^{-4}$ cm s^{-1}), superior ao encontrado para o eletrodo de gráfite pirolítico - plano basal (10^{-6} cm s^{-1}), e inferior ao eletrodo de grafite pirolítico - plano edge (10^{-3} cm s^{-1}) (Kissinger and Heineman, 1996). Uma vez que os valores de k_0 geralmente são utilizados para comparar a reatividade de eletrodos, os valores encontrados para os eletrodos EVA/NF demonstraram que o compósito apresenta potencialidade para ser utilizado como material eletródico (Kissinger and Heineman, 1996). Além disso, pode-se atribuir que a qualidade da resposta voltamétrica tem alta relação com a composição do material eletródico, principalmente devido presença de fase condutora no material, e, portanto, o eletrodo compósito com melhor desempenho por meio da caracterização voltamétrica apresentada foi o 25EVA/75NF.

4.2.2 Intervalo útil de potencial em diferentes eletrólitos suportes

O desempenho do eletrodo compósito 25EVA/75NF foi avaliado em diferentes eletrólitos suporte para verificar o intervalo útil de potenciais. Foram investigadas soluções de H_2SO_4 0,10 mol L^{-1}, tampão acetato 0,10 mol L^{-1} (pH

4,0), tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7), tampão amônio 0,10 mol L^{-1} (pH 11,0) e NaOH 0,10 mol L^{-1}. Os resultados são apresentados na Figura 17.

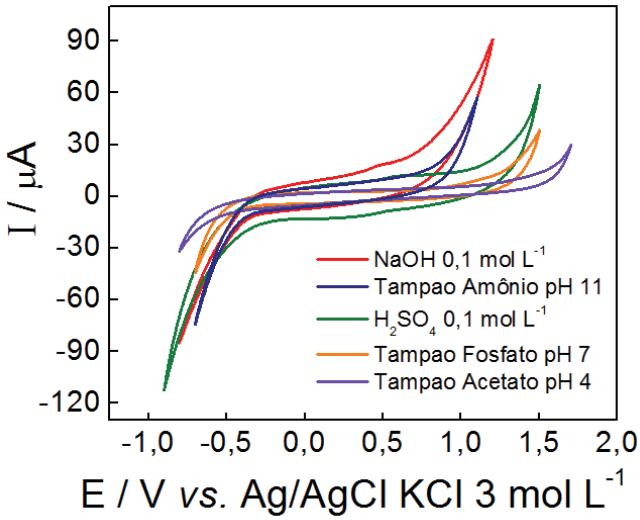


Figura 17 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo compósito 25EVA/75NF em solução de (—) NaOH 0,10 mol L^{-1}; (—) tampão amônio 0,1 mol L^{-1} (pH 11,0); (—) H_2SO_4 0,10 mol L^{-1}; (—) tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) e (—) tampão acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,0). ν = 50 mV s^{-1}.

A Tabela 8 resume os resultados obtidos em termos de valores numéricos, na qual é possível verificar uma ampla faixa de potencial útil para o eletrodo contendo 75% (NF, m/m) em todos os diferentes eletrólitos suporte estudados. Pode-se observar que em soluções com pH mais elevados, a oxidação da água ocorre em potenciais menos positivos, diminuindo significativamente o intervalo útil de potencial de atuação do eletrodo, apresentando um valor absoluto mínimo de 1,70 V em meio de NaOH 0,10 mol L^{-1}. Esta limitação, entretanto não inviabiliza o uso em região de potencial positivo, região na qual pode ser observado um desempenho considerável do eletrodo em todos os meios investigados, principalmente para soluções com caráter mais ácido, vantagem importante do compósito 25EVA/75NF como material eletródico em relação ao mercúrio. Para soluções com valores de pH 4,0 e 7,0 foi verificado um desempenho semelhante aos demais valores de pH (Adams, 1969).

Tabela 8 – Valores de intervalo útil de potencial em diferentes soluções de análise utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF.

Eletrólito	Intervalo de Potencial* (V)
H_2SO_4 (0,10 mol L^{-1})	-0,90 a 1,50
Tampão Acetato pH 4	-0,80 a 1,70
Tampão Fosfato pH 7	-0,70 a 1,50
Tampão Amônio pH 11	-0,70 a 1,10
NaOH (0,10 mol L^{-1})	-0,60 a 1,10

*vs. Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}

4.2.3 Caracterização morfológica dos eletrodos compósitos

As imagens de Micrografias Eletrônicas de Varredura (MEV) da superfície dos compósitos contendo 30 a 75 % (NF, m/m), antes e após abrasão, com lixa d'água 600, seguido de polimento com lixa d'água 1200 são apresentadas nas Figuras 18 e 19. Na Figura 18 são apresentadas as micrografias das superfícies dos compósitos sem a etapa de polimento. Pode-se notar que as superfícies das composições 30 e 40 % (NF, m/m) apresentam aspecto rugoso e com relativa uniformidade no material. A composição contendo 50 % (NF, m/m) apresenta-se ainda mais uniforme, com menor rugosidade que as anteriores. Já os compósitos preparados com 60 e 75% (NF, m/m) apresentam-se mais uniformes, com rugosidade crescente com a composição e com aspecto bastante áspero.

A Figura 19 mostra as micrografias das superfícies dos compósitos após o polimento. As composições de 30 e 40 % (NF, m/m) apresentaram-se ainda ásperas, apesar do polimento. Para a composição de 50 % (NF, m/m) a superfície apresentou-se bastante lisa. Nas composições de 60 e 75 % (NF, m/m) as superfícies começam a se mostrar mais rugosas, apesar do polimento, principalmente a superfície do compósito com 75 % (NF, m/m). Mendes *et al.* (Mendes *et al.*, 2002) descreveram resultados semelhantes para um eletrodo compósito poliuretana/grafite, atribuindo uma maior rugosidade as superfícies

cujo o compósito apresentava maior porcentagem de material condutor (grafite), característica relacionada com a melhor performance dos eletrodos compósitos estudados. Pacios *et al.* (Pacios *et al.*, 2008) também relacionaram a rugosidade da superfície eletródica com a melhora da resposta eletroquímica obtida por eletrodos compósitos a base de nanotubos de carbono, uma vez que a rugosidade está relacionada com o aumento da área superficial do eletrodo.

Segundo a teoria de percolação os autores estabelecem que 62 % de grafite seria a composição ótima para sistemas compósitos a base de resina epoxy/grafite aplicados no preparo de eletrodos (Navarro-Laboulais *et al.*, 1994, Trijueque *et al.*, 1999). Analogamente, foi possível observar que a partir de 60 % de fase condutora no preparo dos eletrodos compósitos, foi possível obter um material com condução elétrica apropriada para a construção de eletrodos. Portanto, para compósitos com quantidade de fase condutora em baixa concentração, de 30 a 50 % de NF, pode-se considerar que as partículas de NF estão separadas o suficiente para não apresentam um “contato” físico entre si, logo não há condução elétrica adequada. À medida que se aumenta a quantidade de NF, entre 60 e 75%, aglomerados de fase condutora começam a surgir, até que se forme um caminho condutor que atravesse o compósito em todas as direções, formando então um material considerado percolado.

Assim, com base nos resultados da caracterização voltamétrica (capacitância, % de área eletroativa e reversibilidade) e MEV, optou-se por utilizar o eletrodo compósito 75 % (NF, m/m) para todos os experimentos seguintes. O eletrodo compósito com 60 % (NF, m/m) não foi utilizado devido à baixa homogeneidade do material.

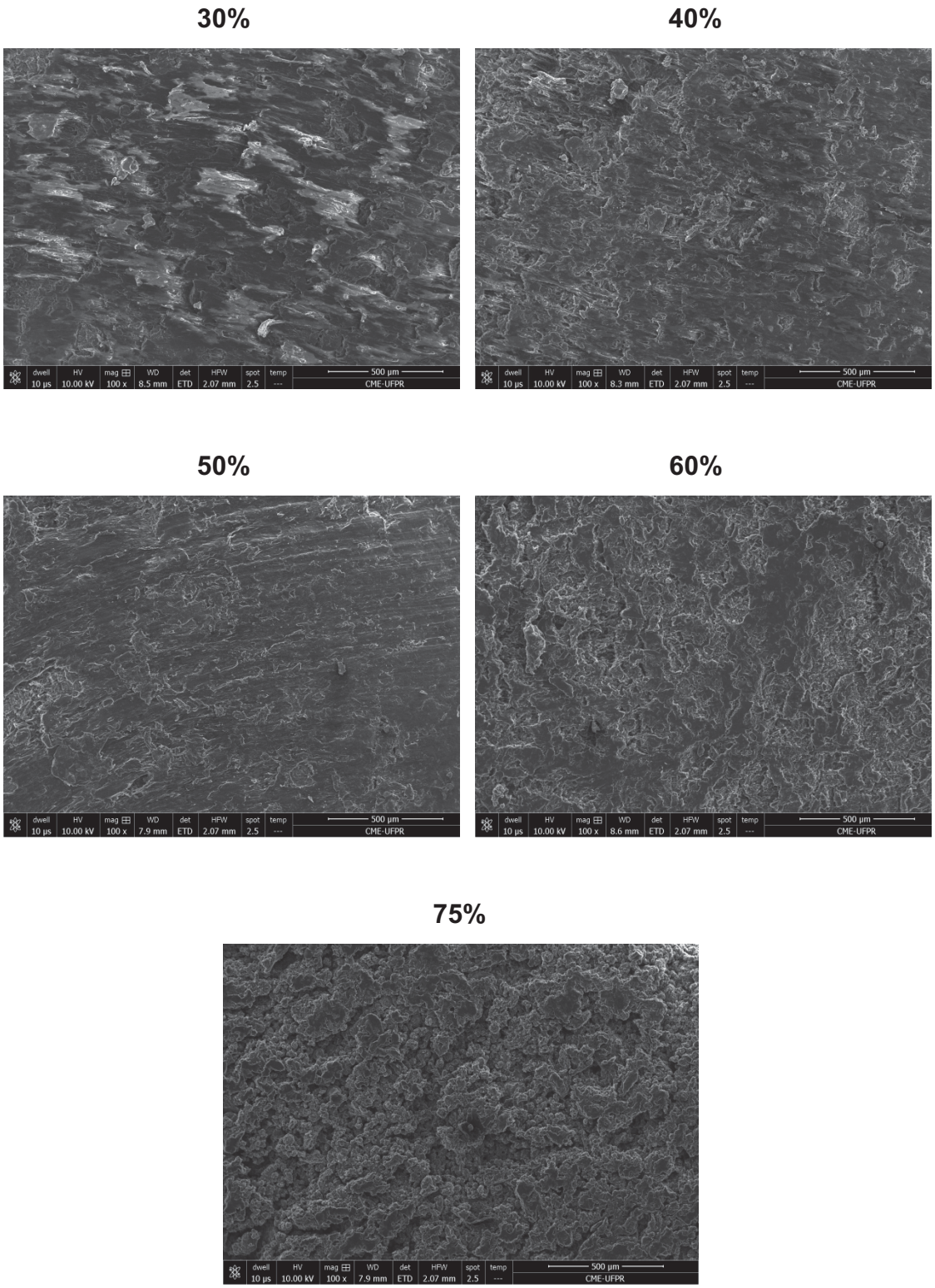


Figura 18 – Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies dos compósitos com 30, 40, 50, 60 e 75% (Negro de Fumo, m/m). Magnificação 100x.

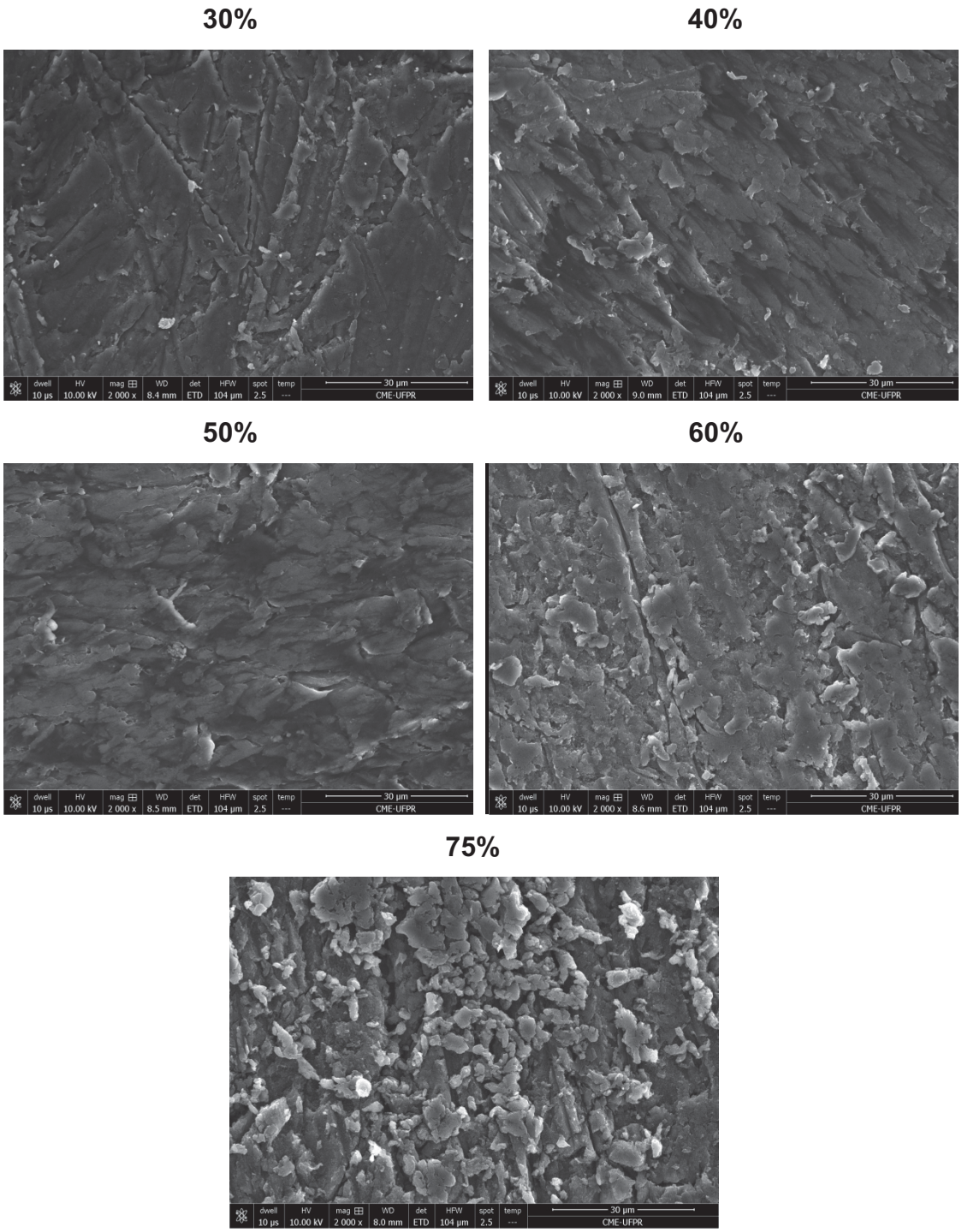


Figura 19 – Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies dos compósitos com 30, 40, 50, 60 e 75% (Negro de Fumo, m/m), após abrasão com lixa d'água 600 seguida por abrasão com lixa d'água 1200. Magnificação 2000x.

4.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE ANALITICA DO ELETRODO COMPÓSITO EVA/NF

4.3.1 Determinação amperométrica de ácido ascórbico utilizando análise por injeção em fluxo (FIA)

O comportamento voltamétrico do ácido ascórbico, assim como a sua determinação, tem sido investigado extensivamente como uma forma de avaliação da potencialidade eletroanalítica de um novo material eletródico (Navratil and Barek, 2009). A Figura 20 apresenta os voltamogramas cíclicos para o estudo do comportamento eletroquímico de AA sobre a superfície do eletrodo 25EVA/75NF. Neste experimento foi utilizada uma solução do analito 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7).

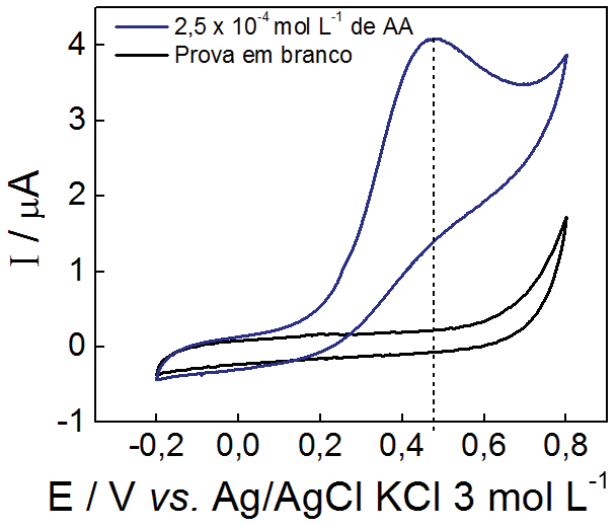


Figura 20 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo 25EVA/75NF em solução tampão fosfato 0,10 mol L-1 (pH 7) na (—) ausência e na (—) presença de ácido ascórbico 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1}. ν = 50 mV s^{-1}.

A Figura 20 mostra a formação de um pico de oxidação irreversível, tendo seu inicio a partir do potencial 0,20 V (*vs.* Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}), atingindo um máximo em 0,45 V (*vs.* Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}), aproximadamente, perfil ocasionado pela oxidação do AA na superfície do eletrodo. A reação de oxidação do analito, o qual apresenta perfil de resposta já estabelecido na literatura, é representado na Figura 21 (Roy *et al.*, 2004).

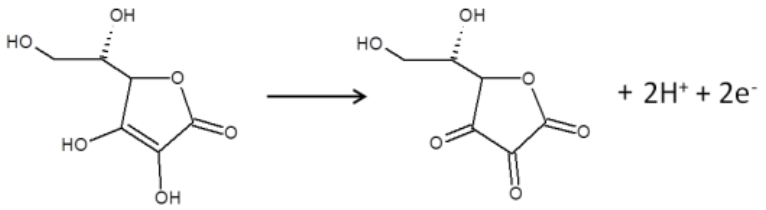


Figura 21 – Representação da reação de oxidação eletroquímica do ácido ascórbico.

Experimentos em um sistema convencional eletroquímico em condições hidrodinâmicas foram realizados com eletrodo 25EVA/75NF para a determinação de ácido ascórbico. O dispositivo proposto foi utilizado em uma célula eletroquímica convencional, contendo um eletrodo de referência (Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}), e um eletrodo auxiliar (platina). Essa avaliação consistiu apenas em um teste preliminar para verificar a estabilidade da resposta amperométrica e do material, os experimentos foram realizados em condições usuais, sem prévia otimização, sendo eles: solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) e potencial aplicado de 600 mV (*vs.* Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L^{-1}). Os resultados são apresentados na Figura 22.

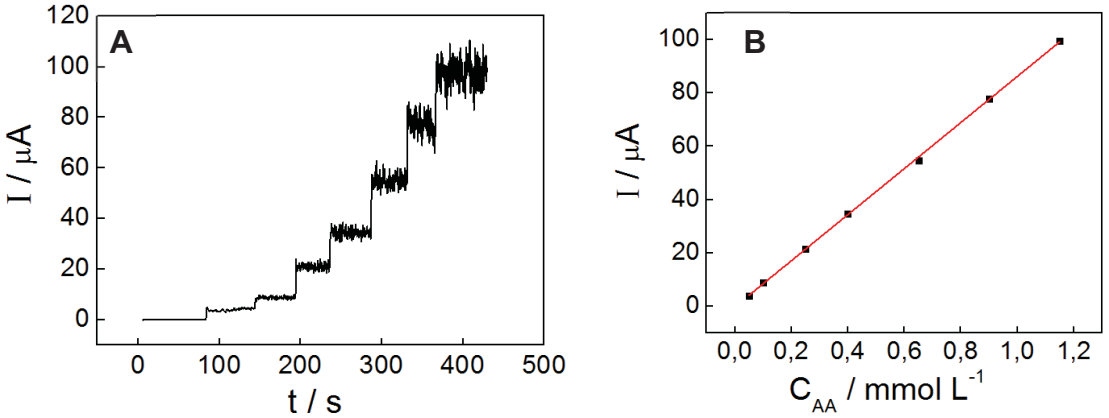


Figura 22 – A) Cronoamperograma obtido utilizando o eletrodo 25EVA/75NF em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) após adições consecutivas e de concentrações crescentes de ácido ascórbico ($5,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $2,5 \times 10^{-4}$; $4,0 \times 10^{-4}$; $6,5 \times 10^{-4}$; $9,0 \times 10^{-4}$ e $1,2 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}) e B) Curva analítica correspondente.

As intensidades de correntes amostradas foram correlacionadas com as respectivas concentrações de AA adicionadas, tornando possível a obtenção de uma curva analítica. Esse desempenho demonstra que o eletrodo proposto pode ser aplicado com sucesso em sistemas hidrodinâmicos credenciando o mesmo

para ser avaliado como um detector amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).

O modo de detecção amperométrico é comumente aplicado em sistemas com fluxo de solução, como sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA). Assim, visando verificar o desempenho do dispositivo como um detector amperométrico em sistema FIA foram investigadas as condições mais adequadas para a utilização do eletrodo 25EVA/75NF para determinação do AA. Dentro dessa proposta, algumas variáveis inerentes ao sistema FIA (potencial aplicado, volume da alça de amostragem e vazão da solução transportadora) foram estudadas. Estes experimentos foram realizados alterando uma variável de cada vez, mantendo constantes todas as outras. Todos os estudos foram realizados com injeções em triplicata de soluções contendo AA em concentrações de 1,0 x 10^{-4}, 5,0 x 10^{-4} e 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. A partir dos resultados obtidos, a relação entre as correntes dos sinais transientes em função das concentrações injetadas pode ser estabelecida, as sensibilidades (coeficiente angular (B)) encontradas foram comparadas e serviram como parâmetro de avaliação da variável estudada.

O efeito do potencial aplicado, Figura 23, na resposta amperométrica do ácido ascórbico foi investigado na faixa compreendida entre 200 e 700 mV, faixa escolhida segundo o perfil eletroquímico do AA apresentado na Figura 20. Os demais parâmetros ainda não avaliados, volume da alça de amostragem (200 μL) e vazão (4,24 mL min^{-1}), foram mantidos constantes.

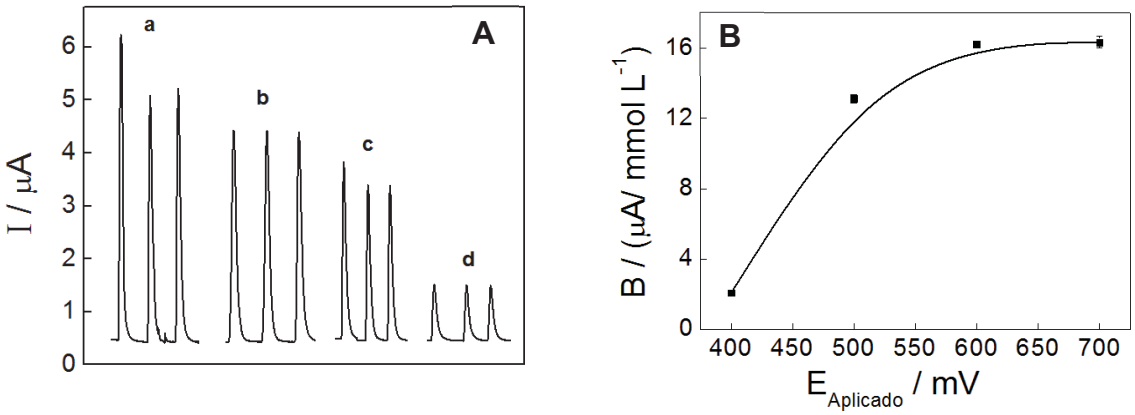


Figura 23 – A) Sinais transientes obtidos por meio da injeção de 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de ácido ascórbico aplicando os valores de potencial: (a) 700, (b) 600, (c) 500 e (e) 400 mV utilizando o

eletrodo compósito 25EVA/75NF e B) Efeito da variação do potencial aplicado na sensibilidade do eletrodo compósito.

Verifica-se que a corrente anódica aumenta significativamente com o aumento do valor de potencial até 600 mV. Essa tendência ocorre devido à oxidação do analito na superfície do eletrodo ser mais efetiva à medida que um potencial mais positivo é aplicado, promovendo uma maior intensidade do sinal de corrente. A partir do valor de 600 mV, a corrente torna-se independente do potencial aplicado. O potencial de 600 mV foi utilizado em todos os experimentos seguintes por corresponder ao valor onde foi encontrada melhor relação entre o potencial aplicado e a corrente obtida. Os valores de potencial abaixo de 400 mV não apresentaram sinal transiente significativo para amostragem de corrente, e, portanto, não foram considerados.

A influência do volume da alça de amostragem, Figura 24, na resposta amperométrica do AA foi avaliada nos valores: 25, 50, 100, 200, 300 e 400 μL. Nota-se um aumento da intensidade dos sinais transientes com a variação do volume da alça de amostragem de 25 até 100 μL. Volumes de alça de amostragem maiores propiciam um menor grau de dispersão na amostra, fazendo com que uma alíquota mais concentrada de AA chegue até o detector, e, portanto, uma maior quantidade de AA é oxidada (maior sinal transiente). Porém, a partir de 100 μL o aumento de corrente não foi significativo, a concentração em que o analito se encontra ao ser injetado no sistema é praticamente a mesma que irá chegar ao detector, tornando o sinal transiente independente do volume de alça de amostragem. O mesmo efeito pode ser observado na Figura 24-B, na qual nota-se a formação de um platô a partir do volume de 100 μL. A alça de amostragem de 100 μL foi escolhida devido a melhor relação entre reprodutibilidade e frequência analítica.

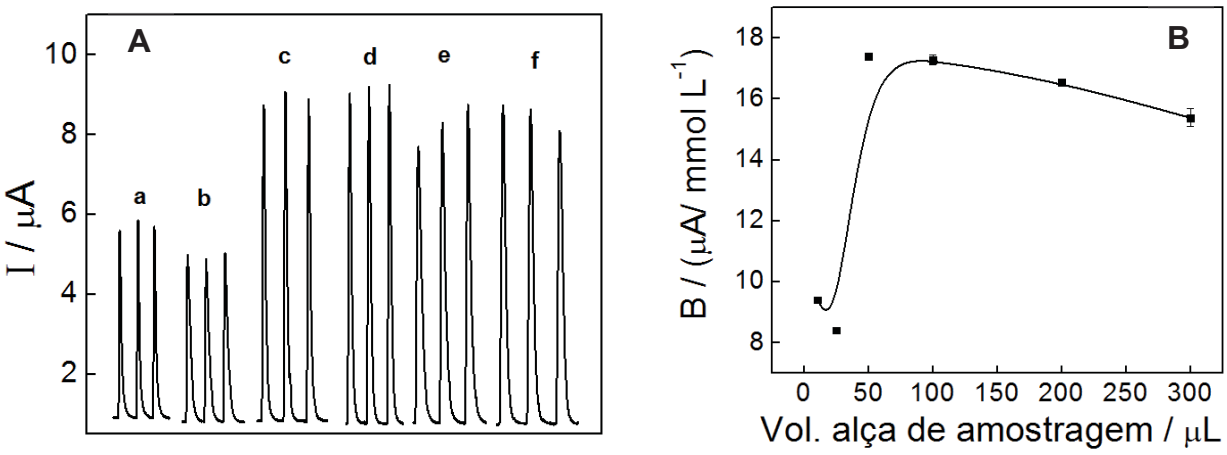


Figura 24 – A) Sinais transientes obtidos para sucessivas injeções de 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de ácido ascórbico variando os volumes de alça de amostragem: (a) 25, (b) 50, (c) 100, (d) 200 (e) 300 e (f) 400 μL utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF e B) Efeito da variação do volume de alça de amostragem na sensibilidade do eletrodo compósito.

A influência da vazão da solução transportadora (1,7 e 10,7 mL min^{-1}) foi avaliada sobre o sinal analítico do ácido ascórbico. A intensidade do sinal transiente proveniente da oxidação do AA se mantém praticamente constante até 4,3 mL min^{-1}, no entanto, a sensibilidade do sistema aumenta consideravelmente até a vazão de 7,3 mL min^{-1}. O aumento da vazão promove uma melhora no transporte de massa, ou seja, aumenta a velocidade de reposição do analito e, consequentemente, a eficiência de chegada do AA na superfície do eletrodo. Assim, uma maior taxa de oxidação do analito se torna possível, aumentando a sensibilidade do sistema. Contudo, em vazões acima de 5,3 mL min^{-1} foi observado um aumento na pressão interna do sistema, gerando um fluxo turbulento, o que aumenta a possibilidade de vazamentos nas conexões da tubulação além de um maior ruído de fundo nas medidas. Assim, a vazão de 4,3 min mL^{-1} foi eleita por combinar menor consumo de reagentes, melhor repetibilidade e frequência analítica adequada (63 injeções h^{-1}).

Na Tabela 9, encontram-se resumidos os parâmetros estudados e selecionados para a determinação de AA no sistema FIA proposto.

Tabela 9 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas para determinação de AA em sistema FIA.

Parâmetro	Valores Estudados	Valores Selecionados
Potencial aplicado	400 – 700 mV	600 mV
Vol. da alça de amostragem	25 – 400 μL	100 μL
Vazão	1,7 – 10,7 mL min^{-1}	4,3 mL min^{-1}

Uma série de experimentos, em triplicata e sob as condições experimentais fixadas, foi conduzida para obter a curva analítica. Todas as soluções padrão foram convenientemente diluídas a partir de uma solução estoque de 0,05 mol L^{-1}. As injeções das soluções contendo AA foram realizadas em triplicata (sentido crescente e decrescente) nos seguintes valores: 5,0 x 10^{-5}; 1,0 x 10^{-4}; 2,5 x 10^{-4}; 5,0 x 10^{-4}; 7,5 x 10^{-4} e 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. Os sinais transientes e a respectiva curva analítica são observados na Figura 25.

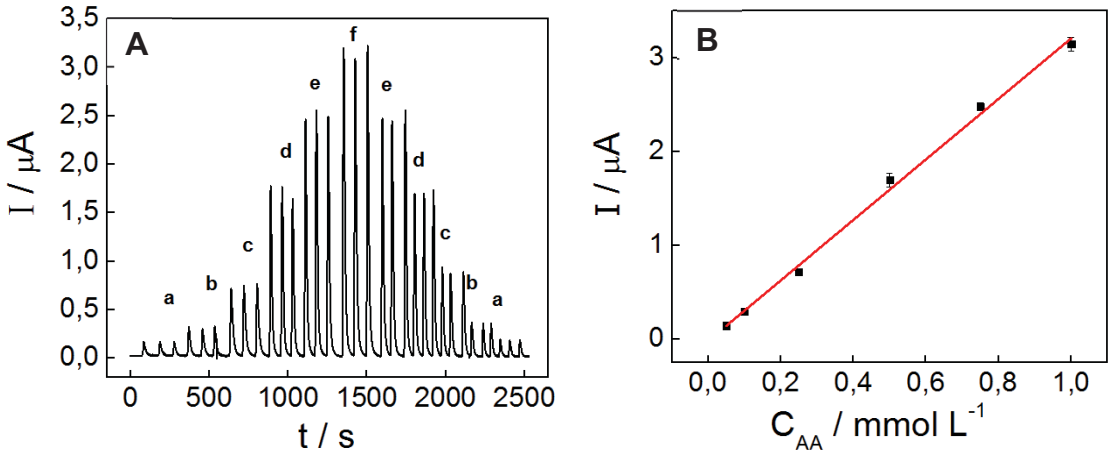


Figura 25 – A) Sinais transientes obtidos após a injeção de soluções de ácido ascórbico nas concentrações: (a) 5,0 x 10^{-5}, (b) 1,0 x 10^{-4}, (c) 2,5 x 10^{-4}, (d) 5,0 x 10^{-4}, (e) 7,5 x 10^{-4} e (f) 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}; B) Curva de calibração correspondente.

Foi observado um aumento linear na intensidade dos sinais transientes em função do aumento da concentração do AA, Figura 25-A, os quais apresentaram adequada repetitividade para as concentrações injetadas. Não foram observados efeitos de memória, a partir das injeções decrescentes, uma vez que apresentaram intensidades de corrente coerentes com as observadas

no sentido crescente de mesma concentração, como mostram as barras de estimativas de desvio padrão na Figura 25-B.

A partir da relação entre as intensidades dos sinais transientes e as respectivas concentrações de AA foi possível a obtenção da uma curva analítica, Figura 25-B, na qual pode ser observado um aumento linear da corrente em função do aumento da concentração do analito. Assim, foram realizados os cálculos dos parâmetros analíticos: sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa linear de trabalho, os resultados estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros analíticos calculados para a determinação de AA em sistema FIA.

Parâmetro	Valor calculado
Sensibilidade	3,3 μA L mmol^{-1}
LD	9,8 x 10^{-7} mol L^{-1}
LQ	3,4 x 10^{-6} mol L^{-1}
Faixa linear de trabalho	0,05 mmol L^{-1} – 1,0 mmol L^{-1}
Frequência de amostragem	63 injeções h^{-1}
R^2	0,9967

O método desenvolvido foi aplicado na análise de uma amostra comercial de suco de laranja para a determinação de ácido ascórbico. A solução da amostra comercial foi preparada pela simples diluição do suco em solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7), resultando em uma concentração de 2,6 x 10^{-4} mol L^{-1}, segundo o fabricante. A Figura 26 apresenta os sinais amperométricos referentes às soluções padrão do AA, com concentrações variando entre 5,0 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} (a-d), seguido dos sinais da amostra comercial de suco (S1) convenientemente diluídas em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7).

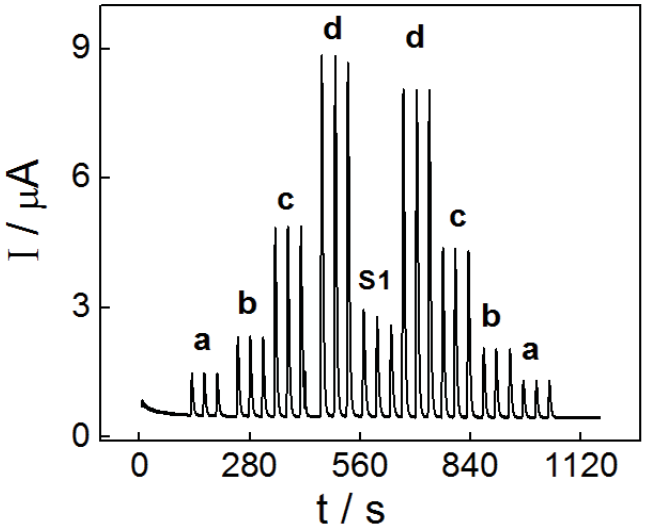


Figura 26 – Sinais transientes obtidos a partir de injeções contendo concentrações conhecidas de AA: (a) 5,0 x 10^{-5}; (b) 1,0 x 10^{-4}; (c) 2,5 x 10^{-4}; (d) 5,0 x 10^{-4}; (e) 7,5 x 10^{-4} mol L^{-1} e Injeções contendo amostra comercial: (S1) 2,6 x 10^{-4} mol L^{-1}.

A partir da relação entre o sinal de corrente da amostra comercial (S1) e a equação matemática proveniente da curva analítica pôde-se calcular a concentração de AA na amostra comercial. As determinações foram feitas em triplicata e os resultados são apresentados na Tabela 11. Com a finalidade de validar os resultados obtidos pelo método proposto, a amostra comercial de suco foi analisada por um método comparativo (iodimetria). Os resultados obtidos para o método comparativo, assim como uma comparação com o método proposto e com o valor de referência (rotulado) estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados obtidos para da determinação de AA em amostras comerciais utilizando o sistema FIA.

Método proposto (mg / 200 mL)	Método comparativo (mg / 200 mL)	Valor Rotulado (mg / 200 mL)	E_1 %	E_2 %
88,6 ± 0,8	82,4 ± 5,4	72,0	+ 7,5	+ 23,1

E_1%: Erro relativo entre o método proposto e o método comparativo.

E_2%: Diferença em porcentagem entre o método proposto e o valor rotulado.

Comparando os resultados pode-se verificar que método desenvolvido para a determinação de AA apresenta resultados satisfatórios com um erro relativo de 7,5%. Apesar de ambos os métodos (proposto e comparativo)

apresentarem uma diferença significativa do valor rotulado, tanto o método clássico (iodimetria) quanto o eletroanalítico apresentaram resultados concordantes, considerando um intervalo de confiança de 95%. Vale ressaltar que método proposto apresenta vantagens inerentes a um sistema FIA combinado com o sistema de detecção eletroquímico, tais como: rapidez, praticidade e elevada frequência analítica.

Para avaliar possíveis efeitos de envenenamento ou de “memória” no sistema FIA proposto, foram realizadas injeções consecutivas e intercaladas de uma solução padrão de ácido ascórbico e de uma solução contendo a amostra comercial. O estudo foi realizado intercalando a solução padrão (P) contendo AA de concentração de 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1} com a solução contendo a amostra comercial (S1), segundo o fabricante, de concentração 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}.

Os valores de repetibilidade do sinal amperométrico, para ambas as soluções testadas, mostram que não há efeito de memória ou envenenamento da superfície durante as injeções. Além disso, foram obtidos desvios padrões relativos de 4,0 e 5,3 % para as injeções da solução padrão de AA e da solução de amostra comercial de suco, respectivamente.

4.3.2 Desempenho do eletrodo compósito EVA/NF como um biossensor para determinação de glicose

A construção de biossensores utilizando enzimas da classe das oxiredutases, com mecanismo de funcionamento já bem explorado na literatura, vem sendo utilizado para demonstrar a possibilidade e potencialidade de aplicação de alguns eletrodos bases como eletrodos quimicamente modificados. Assim, no presente trabalho, o eletrodo EVA/NF foi utilizado como transdutor no desenvolvimento de um biossensor sensível a glicose.

Para a construção do biossensor, a superfície do eletrodo compósito 25EVA/75NF foi eletroquimicamente modificado com um mediador redox, o azul da Prússia (PB), e testado como um detector amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie relevante para o desenvolvimento de biossensores baseados em enzimas da classe das oxiredutases (Rodríguez and Rivas, 2002, Liu *et al.*, 2014).

A eletropolimerização do filme de azul da Prússia sob a superfície eletródica foi realizada empregando o método potenciodinâmico (voltametria cíclica). O experimento constituiu na deposição do filme de PB realizando varreduras cíclicas de potencial (25 ciclos) variando o potencial entre -0,1 a 0,5 V vs. ECS no sentido anódico a uma velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} em solução contendo $K_3Fe(CN)_6$ 2,50 mmol L^{-1} e $FeCl_3$ 2,50 mmol L^{-1} em meio de KCl 0,10 mol L^{-1} e HCl 0,10 mol L^{-1}. Os resultados apresentados na Figura 27 mostram um crescimento continuo e linear dos picos de corrente anódica e catódica, os quais indicam que esta ocorrendo à formação do filme de PB na superfície do eletrodo 25EVA/75NF.

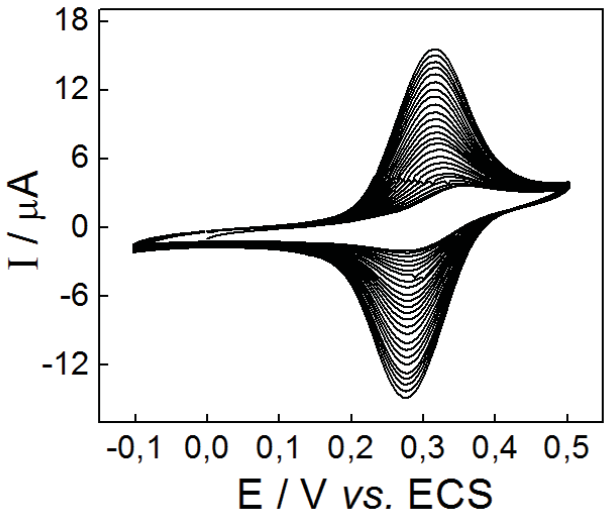


Figura 27 – Voltamogramas cíclicos decorrentes da aplicação de 25 ciclos no eletrodo 25EVA/75NF. Solução contendo $K_3Fe(CN)_6$ 2,50 mmol L^{-1} e $FeCl_3$ 2,50 mmol L^{-1} em KCl 0,10 mol L^{-1} e HCl 0,10 mol L^{-1} (pH 2,5), ν = 10 mV s^{-1}.

O voltamograma cíclico apresentado na Figura 28 mostra um perfil característico de eletrodos modificados com filme de azul da Prússia (25EVA/75NF-PB) quando se amplia a janela de varredura na direção positiva de potencial em solução de eletrólito suporte (Ricci and Palleschi, 2005).

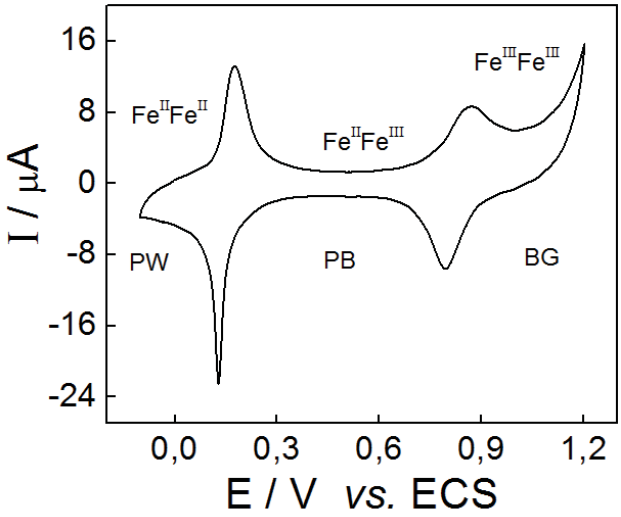


Figura 28 – Voltamograma cíclico obtido em meio de KCl 0,10 mol L^{-1} com o eletrodo 25EVA/75NF-PB. ν = 50 mV s^{-1}. PW: Branco da Prússia ($Fe^{II}Fe^{II}$), PB: Azul da Prússia ($Fe^{II}Fe^{III}$) e BG: Verde de Berlim ($Fe^{III}Fe^{III}$).

No processo de redução do filme de PB é formado um filme denominado branco da Prússia (PW) (E_p = 0,15 V) e no processo de oxidação é formado o filme Verde de Berlim (BG) (E_p = 0,80 V), o processo redox pode ser representado pelas seguintes equações (Ricci and Palleschi, 2005):

(i) Redução do filme:

$$KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6] + e^- + K^+ \rightarrow K_2Fe^{II}[Fe^{II}(CN)_6]$$

(ii) Oxidação do filme:

$$KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6] \rightarrow K_2Fe^{III}[Fe^{III}(CN)_6] + e^- + K^+$$

Foi estudada a estabilidade do filme de PB, Figura 29, utilizando voltametria cíclica (50 ciclos), no intervalo de -0,2 a 0,6 V *vs.* ECS. Nota-se que o PB depositado apresenta ótima estabilidade, pois não se observa mudança significativa nos voltamogramas após 50 ciclos.

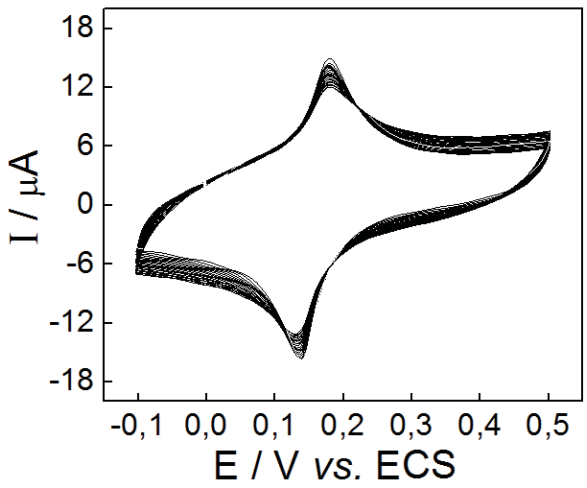


Figura 29 – Voltamogramas cíclicos decorrentes da aplicação de 50 ciclos no eletrodo 25EVA/75NF-PB em solução de KCl 0,10 mol L^{-1}. ν = 50 mV s^{-1}.

O eletrodo 25EVA/75NF-PB foi avaliado utilizando voltametria cíclica em solução 0,10 mol L^{-1} de KCl variando a velocidade de varredura entre 10 e 150 mV s^{-1}. A Figura 30 mostra uma relação linear entre a intensidade de corrente de pico e o quadrado da velocidade de varredura, indicando que o processo eletródico é controlado por difusão (Brett and Brett, 1993).

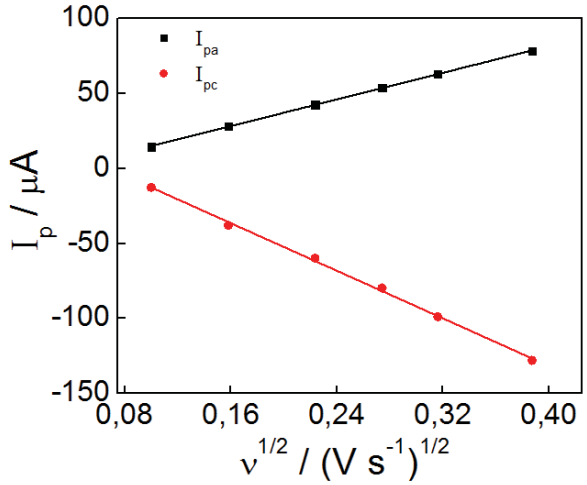


Figura 30 – Dependência das correntes anódicas e catódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura, utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF-PB variando a velocidade de varredura de 10 a 150 mV s^{-1}.

O eletrodo compósito modificado por PB foi avaliado para a determinação de peróxido de hidrogênio utilizando cronoamperometria ao potencial fixo. Inicialmente foram realizados experimentos por voltametria cíclica, utilizando o eletrodo 25EVA/75NF-PB, em um intervalo de potencial entre -0,8 e 0,0 V vs.

ECS para se avaliar o perfil eletroquímico do eletrodo compósito na presença e na ausência de H_2O_2 (Figura 31).

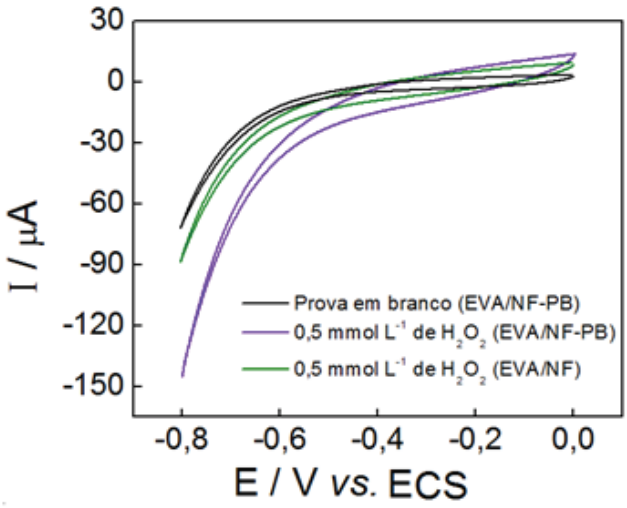


Figura 31 – Comportamento voltamétrico do eletrodo 25EVA/75NF-PB na (—) ausência e na (—) presença de uma solução de 0,50 mmol L^{-1} de H_2O_2 em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7). ν = 50 mV s^{-1}.

A partir da Figura 31 é possível verificar que o sinal referente à redução de peróxido de hidrogênio é mais bem pronunciado sobre o eletrodo modificado com o filme de PB na superfície para mediar à reação. Esse processo é baseado na redução química do peróxido de hidrogênio pelo branco da Prússia (PW), essa reação gera o azul da Prússia (PB), como o potencial aplicado é suficiente para reduzir novamente o PB ao PW gerando-se um ciclo que intensifica a corrente catódica. É possível que alguma contribuição da redução direta do H_2O_2 sobre a superfície eletródica possa existir na reposta registrada. Assim, pode-se verificar que a presença do filme de PB ocasiona uma melhora na resposta amperométrica para a redução do peróxido de hidrogênio. A redução de H_2O_2 inicia-se próximo ao potencial de -0,200 V *vs.* ECS e, portanto, o estudo de potencial aplicado no eletrodo compósito modificado foi variado entre -0,100 V a -0,600 V *vs.* ECS utilizando a técnica de cronoamperometria. O estudo foi realizado em triplicata e considerando a melhor reprodutibilidade e um potencial suficiente para a redução de H_2O_2 o potencial de -0,400 V *vs.* ECS foi selecionado.

Depois de escolhido o potencial mais adequado para a redução do H_2O_2 sobre o eletrodo modificado foi construída uma curva analítica. Na Figura 32 é

apresentado o cronoamperograma referente a nove adições de H_2O_2 0,10 mol L^{-1} em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7,0) sob agitação constante.

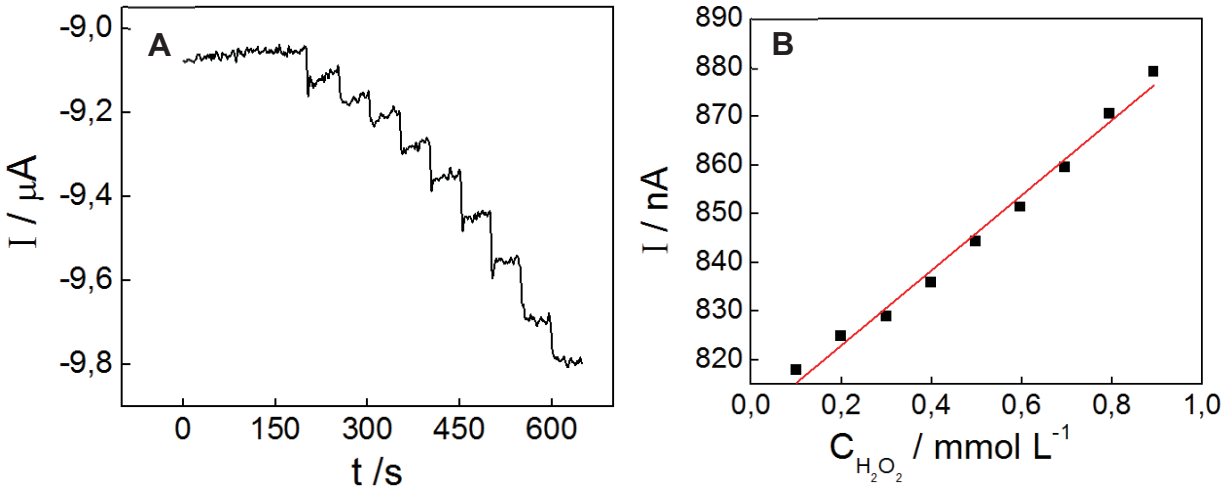


Figura 32 – A) Resposta cronoamperométrica do eletrodo 25EVA/75NF-PB frente a adições de alíquotas de 10 μL de uma solução de H_2O_2 0,010 mol L^{-1} em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 7) sob agitação constante. Potencial de trabalho: -400 mV. B) Curva analítica correspondente.

A curva analítica resultante, a qual obedece à equação (I μA = 0,07763 μA L $mmol^{-1}$ C_{H2O2} + 0,807 μA, R^2 = 0,9978) no intervalo de concentração de peróxido de hidrogênio de 9,99 x 10^{-5} a 8,91 x 10^{-4} mol L^{-1}, apresentou valores de LD e LQ de 6,94 x 10^{-5} e 2,32 x 10^{-4} mol L^{-1}, respectivamente.

No processo de redução do peróxido de hidrogênio o PW (ou PB_{Red}, representado na Figura 33), atua como um mediador de elétrons entre o eletrodo e o analito presente em solução (ou formado durante o curso da reação enzimática), de acordo com o esquema apresentado na Figura 33 (Ricci and Palleschi, 2005).

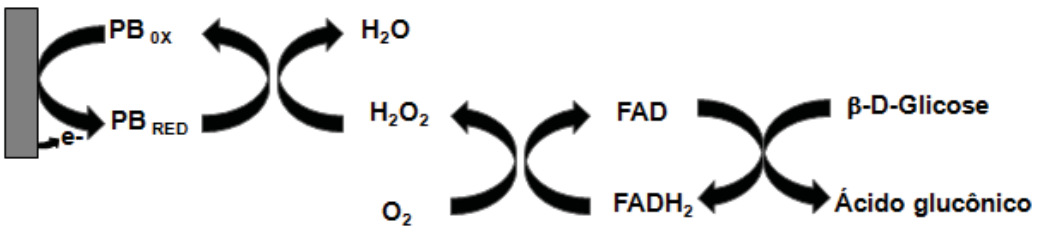


Figura 33 – Representação esquemática do mecanismo de ação para determinação de H_2O_2 ou glicose a partir do eletrodo compósito 25EVA/75NF.

Os resultados obtidos mostraram que o eletrodo compósito modificado com PB apresenta potencialidade para a determinação de peróxido de hidrogênio o que permite a construção de biossensores baseados em enzimas oxiredutases. Assim, a enzima Glicose oxidase foi imobilizada na superfície do eletrodo já modificado com filme de azul da Prússia, formando o biossensor 25EVA/75NF-PB-GOx.

O biossensor proposto foi utilizado para a determinação de glicose a partir da técnica de cronoamperometria ao potencial fixo (-0,400 V) nas mesmas condições empregadas na determinação de peróxido de hidrogênio. Na Figura 34 pode ser observada a curva analítica resultante.

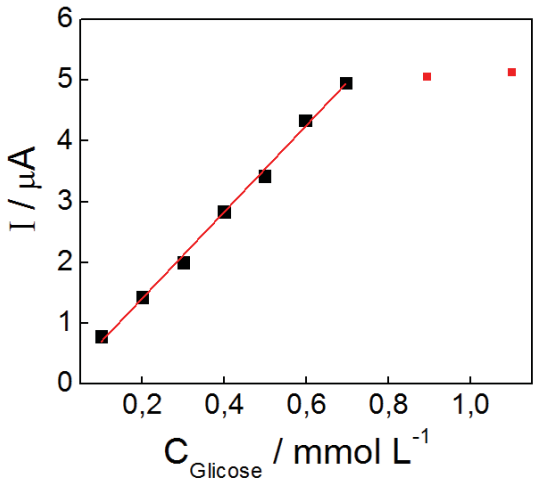


Figura 34 – Curva analítica referente a resposta amperométrica obtida pelo eletrodo 25EVA/75NF-PB-GOx.

O eletrodo apresentou uma resposta linear, segundo a equação (I A = 0,00712 A L mol^{-1} $C_{Glicose}$ - 1,14 x 10^{-8} A, R^2 = 0,9979) no intervalo de concentração de 9,99 x 10^{-5} a 6,95 x 10^{-4} mol L^{-1} de glicose, com LD e LQ de 7,76 x 10^{-6} e 2,58 x 10^{-5} mol L^{-1}, respectivamente. A saturação do biossensor pode ser observada a partir da concentração de 8,92 x 10^{-4} mol L^{-1}. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o eletrodo compósito EVA/NF se mostrou uma boa plataforma, ou eletrodo base, para a construção de biossensores.

4.4 DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE HIDROCLOROTIAZIDA COM O ELETRODO EVA/NF EM SISTEMA FIA

4.4.1 Comportamento voltamétrico da Hidroclorotiazida (HCTZ)

O eletrodo compósito 25EVA/75NF foi utilizado para o desenvolvimento de um método para a determinação amperométrica do fármaco hidroclorotiazida (HCTZ) empregando um sistema por injeção em fluxo. Inicialmente, foi caracterizado o comportamento voltamétrico do fármaco sobre o eletrodo compósito desenvolvido. A Figura 35 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão BR 0,040 mol L^{-1} (pH 9,5) contendo 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1} de HCTZ.

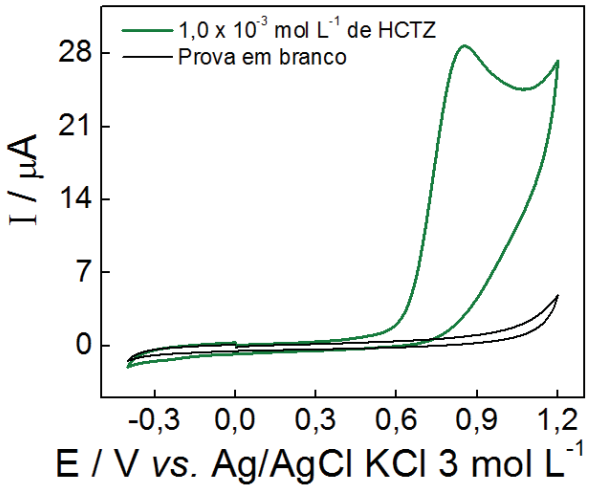


Figura 35 – Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo compósito 25EVA/75NF em solução de tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 9,5 na ausência (—) e na presença (—) de HCTZ 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. $\nu = 50$ mV s^{-1}.

O perfil eletroquímico da HCTZ é caracterizado por um pico de oxidação, com características irreversíveis, em 850 mV. O mecanismo para a reação, descrito na literatura (Abdel Razak, 2004), sugere o envolvimento de dois prótons e dois elétrons na oxidação de hidroclorotiazida à clorotiazida, conforme a reação apresentada na Figura 36.

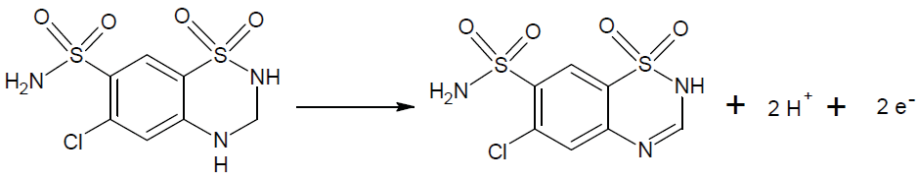


Figura 36 – Representação da reação de oxidação da HCTZ (Abdel Razak, 2004).

O efeito do pH sobre a oxidação eletroquímica da HCTZ foi avaliado variando o pH do eletrólito suporte de 3,5 a 9,5. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 37.

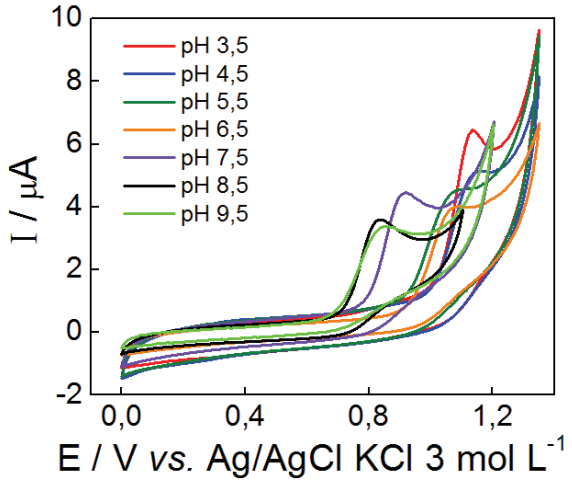


Figura 37 – Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de HCTZ 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em solução de tampão BR 0,040 mol L^{-1} em diferentes valores de pH utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF. ν = 50 mV s^{-1}.

Verifica-se um deslocamento dos picos de oxidação da HCTZ para potenciais menos positivos com o aumento do pH da solução de eletrólito suporte. Em soluções com pH menores, abaixo de 6, aproximadamente, a oxidação do analito ocorre próximo a região de oxidação do próprio eletrólito suporte utilizado, diminuindo a definição dos picos. A Figura 38 apresenta a relação entre a corrente de pico anódica (I_{pa}), potencial de pico anódico (E_{pa}) e o pH da solução de eletrólito.

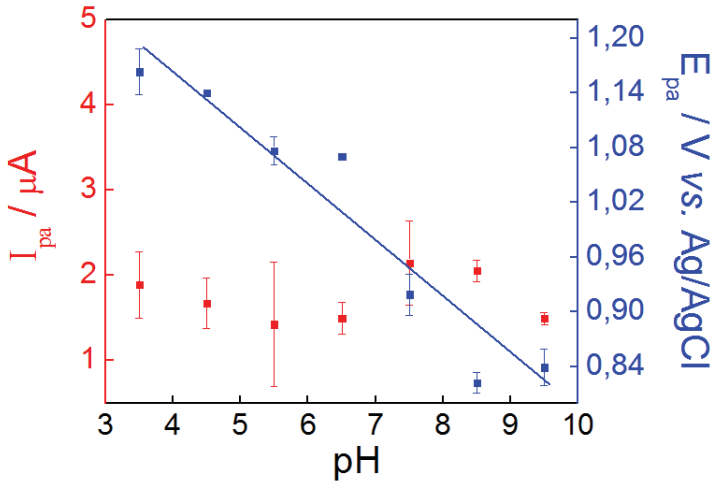


Figura 38 – Dependência da corrente e do potencial de pico de anódico em função do pH da solução de eletrólito suporte (Solução tampão BR).

A tendência apresentada pelo gráfico (pontos em vermelho) mostra que o pH da solução de eletrólito suporte não influencia significativamente as correntes de pico de oxidação da HCTZ. Assim, visando melhor definição do processo de oxidação do analito o pH de 7,5 foi selecionado para os demais estudos. Além disso, a escolha do pH (7,5) também foi baseada em condições de medidas mais brandas e de fácil aplicação em diversas amostras, como fluídos biológicos. Ademais, a partir da Figura 38, nota-se uma relação linear entre o potencial de pico (E_{pa}) e o pH das soluções de eletrólito suporte, que pode ser representada pela equação E_{pa} = 1410 mV – 63,0 pH com R^2 = 0,9594. O valor de inclinação de 63,0 mV sugere que exista uma mesma quantidade de prótons e elétrons envolvidos no processo de oxidação, em concordância com a reação representada na Figura 36.

O efeito da velocidade de varredura na resposta voltamétrica do eletrodo compósito na oxidação da HCTZ, Figura 39, foi investigado em solução tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 7,5, contendo 2,50 x 10^{-4} mol L^{-1} de HCTZ. A velocidade de varredura foi variada entre 10 a 150 mV s^{-1}.

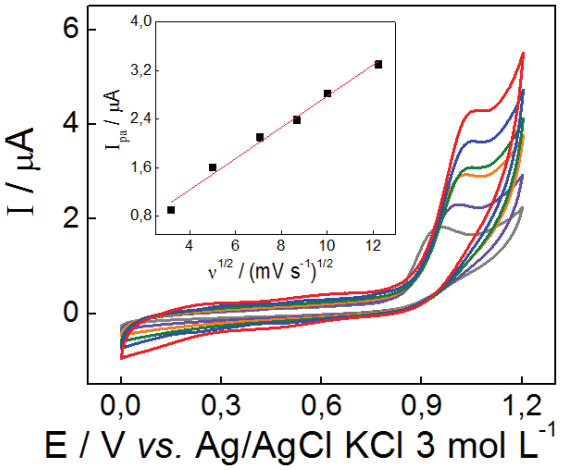


Figura 39 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 a 150 mV s^{-1}) utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF em solução tampão B-R 0,040 mol L^{-1} pH 7,5 na presença de 2,5 x 10^{-4} mol L^{-1} HCTZ. Detalhe: Dependência linear das correntes de pico anódicas com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Os voltamogramas apresentados na Figura 39 mostram uma dependência linear das correntes de pico anódicas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, conforme pode ser observado no detalhe presente

no gráfico, que obedece a equação I_{pa} = 2,58 x 10^{-7} $\nu^{1/2}$ + 2,08 x 10^{-7}, representando um processo controlado por difusão (Brett and Brett, 1993).

4.4.2 Efeito das condições de trabalho para o sistema FIA

Para estabelecer as condições mais favoráveis para a determinação amperométrica de hidroclorotiazida, as variáveis inerentes ao sistema FIA (potencial aplicado, volume da alça de amostragem e vazão da solução transportadora) foram estudadas. Estes experimentos foram realizados alterando uma variável de cada vez, mantendo constantes todas as outras. Além disso, para todos os estudos foram utilizadas soluções contendo concentrações de HCTZ de 1,0 x 10^{-4}, 2,5 x 10^{-4} e 5,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. A partir dos resultados obtidos, a relação entre as correntes dos sinais transientes em função das concentrações injetadas pode ser estabelecida, e as sensibilidades (coeficiente angular (B)) calculadas foram comparadas.

O efeito do potencial aplicado, Figura 40, na resposta amperométrica da HCTZ foi investigado na faixa compreendida entre 500 e 1100 mV, faixa escolhida segundo o perfil eletroquímico do analito apresentado anteriormente na Figura 35. Os demais parâmetros ainda não avaliados, volume da alça de amostragem (100 μL) e vazão (4,3 mL min^{-1}), foram mantidos constantes.

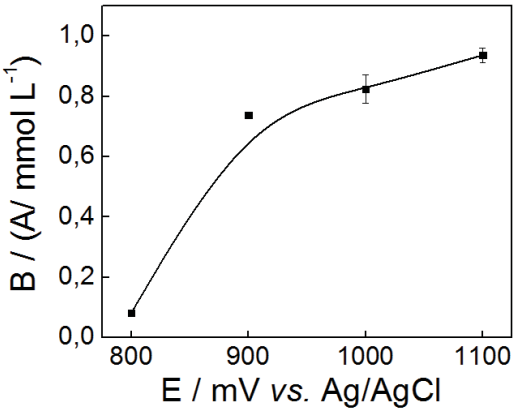


Figura 40 – Efeito da variação do potencial aplicado na sensibilidade do sistema, eletrodo compósito 25EVA/75NF.

A partir da Figura 40, pode-se notar que a sensibilidade do sistema aumenta significativamente com o aumento do valor de potencial aplicado,

devido à oxidação do analito na superfície do eletrodo ser mais efetiva à medida que um potencial mais positivo é aplicado. A curva apresentada na Figura 40 indica a tendência de formação de um platô, a partir de 900 mV, correspondendo ao valor máximo de sinal amperométrico, garantindo a completa oxidação do analito. Portanto, o potencial de 900 mV foi utilizado em todos os experimentos seguintes Os valores de potencial abaixo de 700 mV não apresentaram sinal significativo para compilação dos dados, e, portanto, não foram considerados.

A influência do volume de alça de amostragem (de 25 até 400 μL) e da vazão do sistema (de 1,7 até 8,0 mL min^{-1}) também foram avaliadas segundo a sensibilidade do sinal analítico da HCTZ, Figura 41.

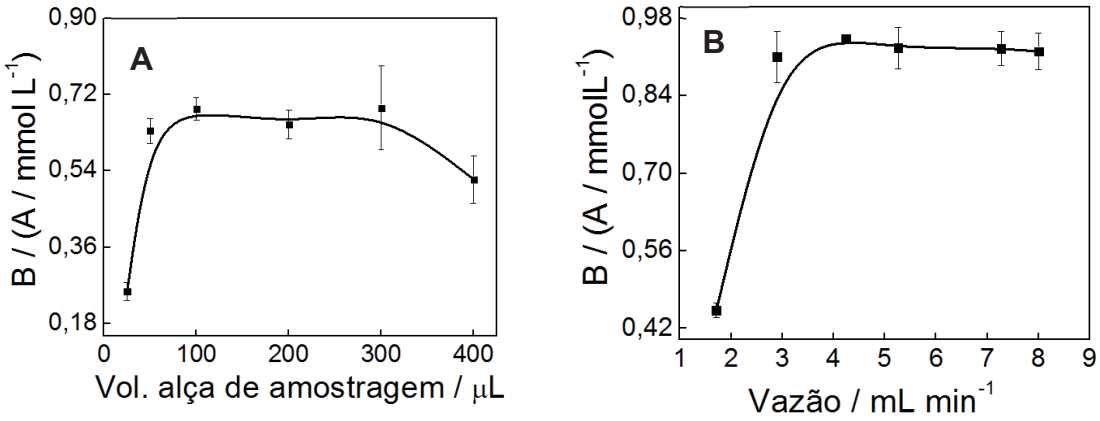


Figura 41 – A) Efeito da variação do volume de alça de amostragem e da B) vazão do sistema na sensibilidade do eletrodo compósito (25EVA/75NF).

Nota-se que o aumento do volume da alça de amostragem aumenta a sensibilidade do sistema para volumes de 50 μL e permanece praticamente a mesma para volumes maiores (Figura 41-A). Assim, a alça de amostragem de 100 μL foi escolhida devido a melhor relação entre a reprodutibilidade dos resultados obtidos (segundo as barras de desvio padrão) e o consumo adequado de amostra. A partir da Figura 41-B, pode-se observar que a sensibilidade do sistema aumenta com a vazão do sistema até 2,9 mL min^{-1} e permanece constante para vazões mais altas. A vazão de 5,3 mL min^{-1} foi eleita por combinar menor consumo de reagentes, melhor repetibilidade (segundo as barras de desvio padrão) e freqüência analítica elevada (128 injeções h^{-1}). Na Tabela 12, encontram-se resumidos os parâmetros estudados e selecionados para a

determinação de HCTZ utilizando o eletrodo compósito 25EVA/75NF como um sensor amperométrico em um sistema FIA.

Tabela 12 – Parâmetros avaliados e condições de trabalho selecionadas para determinação de HCTZ em sistema FIA.

Parâmetro	Valores Estudados	Valores Selecionados
Potencial aplicado	500 – 1100 mV	900 mV
Vol. da alça de amostragem	25 – 400 μL	100 μL
Vazão	1,70 – 8,00 mL min^{-1}	5,3 mL min^{-1}

Depois de escolhidas as condições experimentais, análises em triplicata foram conduzidas para obter uma curva analítica. Injeções das soluções foram realizadas em triplicata (sentido crescente e decrescente) nos seguintes valores: $1,0 \times 10^{-5}$; $2,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}. Os sinais transientes e a respectiva curva analítica estão apresentados na Figura 42.

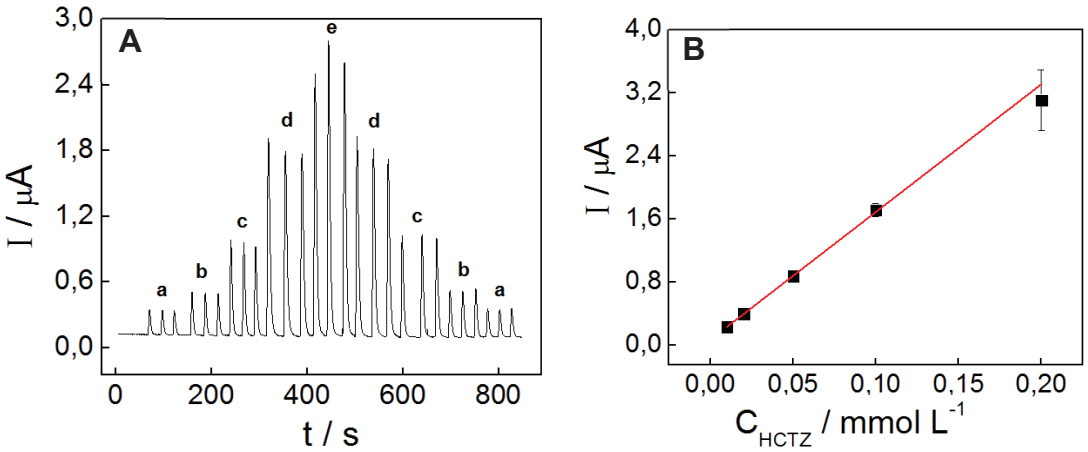


Figura 42 – A) Sinais transientes obtidos após a injeção de soluções de hidroclorotiazida nas concentrações: (a) $1,0 \times 10^{-5}$, (b) $2,0 \times 10^{-5}$, (c) $5,0 \times 10^{-5}$, (d) $1,0 \times 10^{-4}$ e (e) $2,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}; B) Curva de calibração correspondente.

A partir da relação entre as intensidades dos sinais transientes e as respectivas concentrações de HCTZ foi possível obtenção da uma curva analítica. Na Figura 42-B pode ser observado um aumento linear da corrente em função do aumento da concentração do analito. Assim, foram realizados os cálculos dos parâmetros analíticos: sensibilidade, limite de detecção (LD), limite

de quantificação (LQ) e faixa linear de trabalho. Os resultados estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros analíticos calculados para a determinação de HCTZ em sistema FIA.

Parâmetro	Valor calculado
Sensibilidade	16,2 μA L $mmol^{-1}$
LD	2,50 x 10^{-6} mol L^{-1}
LQ	8,32 x 10^{-6} mol L^{-1}
Faixa linear de trabalho	1,0 x 10^{-5} mol L^{-1} – 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}
R^2	0,9967
Frequência de amostragem	128 injeções h^{-1}

Para avaliar a repetibilidade dos sinais transientes obtidos pelo método proposto para determinação de HCTZ, 10 injeções consecutivas de uma solução contendo o analito foram registradas (Figura 43). Para este estudo, utilizou-se uma solução contendo HCTZ 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em solução de tampão BR 0,040 mol L^{-1} (pH 7,5). A repetibilidade do sinal amperométrico mostra que não há efeito de memória durante as injeções. Além disso, o sistema apresentou elevada estabilidade durante a medida.

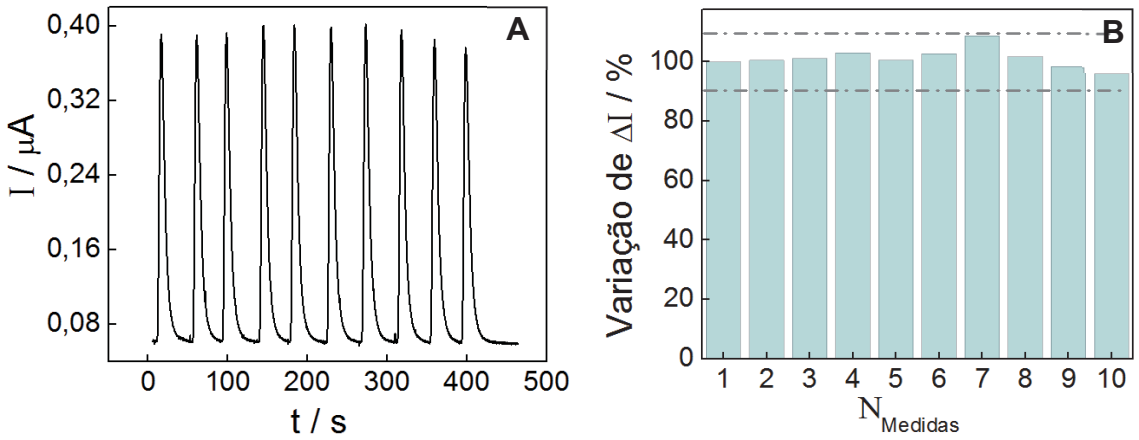


Figura 43 – A) Sinais transientes obtidos após 10 injeções consecutivas de HCTZ 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} B) Variação da intensidade do sinal transiente durante a medida.

4.4.3 Determinação de HCTZ em amostras de urina sintética fortificada e amostras comerciais

O método desenvolvido foi testado em amostras de urina sintética fortificadas com HCTZ. Para este estudo foram realizadas 5 injeções de soluções padrão contendo HCTZ, com concentrações variando entre 1,0 x 10^{-5} e 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1} (a-e), seguidas de 3 injeções das amostras de urina sintética fortificada, com concentrações variando entre 1,0 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} (U1-U3). As amostras de urina sintética fortificadas foram preparadas pela diluição em tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 7,5 partindo de uma solução de urina sintética fortificada com HCTZ 0,020 mol L^{-1}. As soluções padrão de HCTZ foram preparadas pela diluição em tampão BR 0,040 mol L^{-1} pH 7,5 partindo de uma solução de HCTZ 0,02 mol L^{-1} em tampão BR 0,040 mol L^{-1} (pH 9,5) juntamente com 30% (v/v) de acetona. A Figura 44 apresenta os sinais transientes referentes à análise.

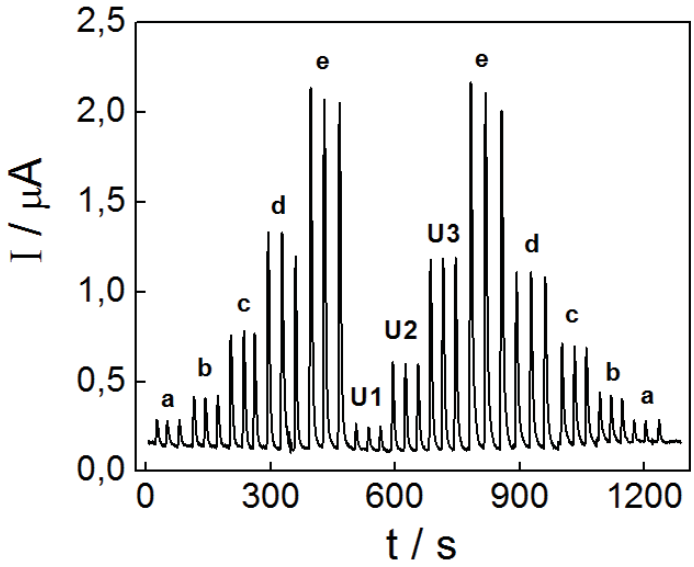


Figura 44 – Sinais transientes obtidos a partir de injeções contendo concentrações conhecidas de HCTZ: (a) 1,0 x 10^{-5}; (b) 2,0 x 10^{-5}; (c) 5,0 x 10^{-5}; (d) 1,0 x 10^{-4} e (e) 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e Injeções das soluções preparadas a partir da solução de urina sintética fortificada: (U1) 1,0 x 10^{-5}; (U2) 5,0 x 10^{-5} e (U3) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1}.

A partir da relação entre o sinal de corrente das amostras de urina sintética (U1-U3) e a equação matemática proveniente da curva analítica, pôde-se calcular a concentração de HCTZ nas amostras fortificadas. As

determinações foram feitas em triplicata e o os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados obtidos de adição/recuperação de HCTZ em amostras de urina sintética.

Conc. adicionada (mol L^{-1})	Conc. Encontrada (mol L^{-1})	Recuperação %
$1,00 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}	$1,08 \times 10^{-5} \pm 9,11 \times 10^{-7}$	108
$5,00 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}	$4,91 \times 10^{-5} \pm 3,83 \times 10^{-6}$	98
$1,00 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}	$1,13 \times 10^{-4} \pm 1,10 \times 10^{-6}$	113

Com base nos valores de recuperação, foram obtidos bons resultados para a recuperação de HCTZ nas amostras de urina sintética utilizadas, mostrando potencialidade analítica do uso do eletrodo compósito 25EVA/75NF em conjunto com sistema FIA para a detecção e determinação do fármaco.

O método desenvolvido para a determinação de HCTZ foi testado na formulação farmacêutica Clorana® (Sanofi Aventis). A solução da amostra comercial foi preparada dissolvendo quantidades apropriadas em meio de solução tampão Britton-Robinson 0,040 mol L^{-1} pH 9,5 juntamente com 30% (v/v) de acetona para resultarem em soluções de concentração de 0,010 mol L^{-1}, segundo o fabricante. A Figura 45 apresenta os sinais amperométricos referente às adições de solução padrão de HCTZ, com concentrações variando entre 2,0 x 10^{-5} e 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} (a-c), seguido da adição da amostra comercial (A1), diluição da solução estoque da amostra em tampão BR 0,040 mol L^{-1} (pH 7,5).

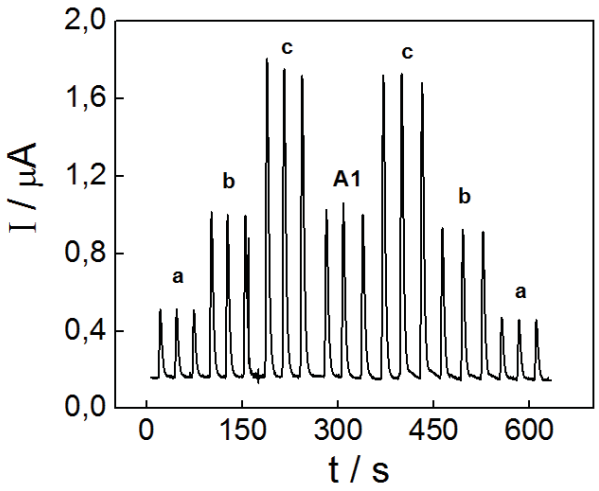


Figura 45 – Sinais transientes obtidos a partir de injeções contendo concentrações conhecidas de HCTZ: (a) 2,0 x 10^{-5}; (b) 5,0 x 10^{-5}; (c) 1,0 x 10^{-4} mol L^{-1} e Injeções contendo amostra comercial: (A1) 2,6 x 10^{-4} mol L^{-1}.

A partir da relação entre o sinal de corrente da amostra comercial (A1) e a equação matemática proveniente da curva analítica, pôde-se calcular a concentração de HCTZ na amostra comercial. As determinações foram feitas em triplicata e o os resultados são apresentados na Tabela 15. Os resultados obtidos para a determinação de HCTZ por este trabalho foram comparados com resultados obtidos pelo valor rotulado (fornecido pelo fabricante) e pelo método espectrofotométrico de absorção no ultravioleta, descrito como método oficial na farmacopéia brasileira (Farmacopéia Brasileira - vol. 2, 2010) (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultados obtidos para da determinação de HCTZ em amostras comerciais utilizando o sistema FIA.

Método proposto (mg/ comprimido)	Método comparativo (mg/ comprimido)	Valor Rotulado (mg/ comprimido)	E_1 %	E_2 %
53,8 ± 5,7	52,3 ± 1,2	50	+ 2,9	+ 7,6

E_1%: Erro relativo entre o método proposto e o método comparativo.

E_2%: Diferença em porcentagem entre o método proposto e o valor rotulado.

A partir da análise dos dados apresentados na Tabela 15, pode-se considerar que os resultados obtidos pela determinação amperométrica de HCTZ em sistema FIA concordam com os resultados obtidos por

espectrofotometria de absorção no ultravioleta, considerando um intervalo de confiança de 95 %, de acordo com o teste t para dados pareados.

4.4.4 Considerações gerais sobre o método proposto

O método proposto para a determinação de HCTZ apresentou ótimos resultados, sendo as principais vantagens, a determinação rápida e o desempenho analítico. O procedimento proposto para a determinação amperométrica de HCTZ em sistema FIA foi comparado a outros métodos publicados na literatura, Tabela 16.

Tabela 16 – Comparação do método proposto com outros métodos descritos na literatura para a determinação de HCTZ.

Eletrodo	Técnica	LD (mol L^{-1})	FLT (mol L^{-1})	Ref.
25EVA/75NF	Amperometria - FIA	$8,32 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$ – $2,0 \times 10^{-4}$	Método proposto
EDDB	SWV	$1,6 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-6}$ – $2,2 \times 10^{-5}$	(Mansano and Sartori, 2015)
GC	CV	$4,3 \times 10^{-9}$	$4,0 \times 10^{-6}$ – $4,0 \times 10^{-5}$	(Alghamdi, 2014)
2CBFGPE	SWV	$20,0 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-8}$ – $2,0 \times 10^{-4}$	(Beitollahi *et al.*, 2015)
ta-C:N thin-film electrode	SWV	$2,50 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-6}$ – $9,8 \times 10^{-6}$	(Lourenção *et al.*, 2014)

Comparado a alguns trabalhos descritos na literatura, embora o LD obtido pelo método proposto seja maior, esse procedimento possibilita a determinação da HCTZ em um sistema em fluxo e com frequência analítica extremamente elevada, de 128 injeções h^{-1}. Além disso, o desempenho do eletrodo foi satisfatório, não apresentando efeito significativo de envenenamento.

5 CONCLUSÕES

De maneira geral, pode-se concluir que os eletrodos 25PEVA/75NF apresentam enorme potencialidade eletroanalítica para serem utilizados como sensores eletroquímicos devido a sua fácil construção, baixo custo, sensibilidade, estabilidade e durabilidade, podendo ser aplicados em diversos meios de análise com amplo intervalo útil de potencial. Além disso, o eletrodo proposto ainda pode ser utilizado em sistemas hidrodinâmicos convencionais e sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA).

Os estudos voltamétricos para caracterização do material compósito permitiram verificar a influência da quantidade do negro de fumo e do copolímero EVA no desempenho eletroquímico dos eletrodos construídos. A melhor resposta voltamétrica foi obtida para o eletrodo compósito contendo 75% (negro de fumo, m/m) de fase condutora. Esse eletrodo compósito foi avaliado em diferentes condições e se apresentou bastante versátil, podendo ser utilizado em diversos meios, com amplos intervalos úteis de potencial, possibilitando sua atuação na determinação de diversos compostos, tanto em regiões mais positivas quanto em regiões mais negativas de potencial.

O método com detecção amperométrica e passagem de fluxo para a determinação de ácido ascórbico em amostra comercial de suco de laranja é simples, sensível, rápido e de baixo custo. Os resultados obtidos foram satisfatórios e suficientemente confiáveis para a associação do eletrodo 25EVA/75NF como um sensor amperométrico em sistema FIA.

A aplicação do material eletródico 25EVA/75NF como eletrodo base para o preparo de um EQM obteve resultados satisfatórios, apresentando-se assim como uma boa plataforma para a construção de biossensores.

O método desenvolvido para a determinação de hidroclorotiazida em amostras de urina humana e farmacêutica mostrou-se sensível, reprodutivo, extremamente rápido, além de concordante aos resultados obtidos com métodos oficiais, sendo a principal vantagem à freqüência analítica e a possibilidade de determinação direta, sem a necessidade de preparação da amostra.

REFERÊNCIAS

Abbaspour, A., Refahi, M., Khalafi-Nezhad, A., Soltani Rad, N. & Behrouz, S., 2010. Carbon composite–PVC based membrane coated platinum electrode for chromium determination. *Journal of Hazardous Materials,* 184**,** 20-25.

Abdel Razak, O., 2004. Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 34**,** 433-440.

Adam, M., Pavlíková, P., Čížková, A., Bajerová, P. & Ventura, K., 2012. Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for l-ascorbic acid determination in beverages. *Food Chemistry,* 135**,** 1613-1618.

Adams, R.N., 1958. CARBON PASTE ELECTRODES. *Analytical Chemistry,* 30**,** 1576-1576.

Adams, R.N., 1969. *Electrochemistry at solid electrodes*: N. Dekker.

Albertús, F., Llerena, A., AlpíZar, J., Cerdá, V., Luque, M., RíOs, A. & Valcárcel, M., 1997. A PVC–graphite composite electrode for electroanalytical use. Preparation and some applications. *Analytica Chimica Acta,* 355**,** 23-32.

Alghamdi, A.F., 2014. Electrochemical oxidation behavior of hydrochlorothiazide on a glassy carbon electrode and its voltammetric determination in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Journal of Food and Drug Analysis,* 22**,** 363-369.

Amatatongchai, M., Sroysee, W., Chairam, S. & Nacapricha, D., 2015. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles. *Talanta,* 133**,** 134-141.

American Diabetes, A., 2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care,* 33**,** S62-S69.

Andrade, J.P. & Nobre, F., 2010. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia,* 95**,** I-III.

Arduini, F., Di Nardo, F., Amine, A., Micheli, L., Palleschi, G. & Moscone, D., 2012. Carbon Black-Modified Screen-Printed Electrodes as Electroanalytical Tools. *Electroanalysis,* 24**,** 743-751.

Arduini, F., Giorgio, F.D., Amine, A., Cataldo, F., Moscone, D. & Palleschi, G., 2010. Electroanalytical Characterization of Carbon Black Nanomaterial Paste Electrode: Development of Highly Sensitive Tyrosinase Biosensor for Catechol Detection. *Analytical Letters,* 43**,** 1688-1702.

Azad, U.P. & Ganesan, V., 2011. Determination of hydrazine by polyNi(II) complex modified electrodes with a wide linear calibration range. *Electrochimica Acta,* 56**,** 5766-5770.

Baldoni, A.O., 2010. Estudo de utilização de medicamentos em idosos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Universidade de São Paulo.

Barsan, M.M. & Brett, C.M.A., 2009. A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose. *Bioelectrochemistry,* 76**,** 135-140.

Barsan, M.M., Pinto, E.M. & Brett, C.M.A., 2008. Electrosynthesis and electrochemical characterisation of phenazine polymers for application in biosensors. *Electrochimica Acta,* 53**,** 3973-3982.

Beitollahi, H., Hamzavi, M. & Torkzadeh-Mahani, M., 2015. Electrochemical determination of hydrochlorothiazide and folic acid in real samples using a modified graphene oxide sheet paste electrode. *Materials Science and Engineering: C,* 52**,** 297-305.

Biscoe, J. & Warren, B.E., 1942. An X-Ray Study of Carbon Black. *Journal of Applied Physics,* 13**,** 364-371.

Boni, A.C., Wong, A., Dutra, R.a.F. & Sotomayor, M.D.P.T., 2011. Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA. *Talanta,* 85**,** 2067-2073.

Bouklouze, A.A., Viré, J.C. & Cool, V., 1993. Barium ion-selective electrode based on a new neutral carrier complex. *Analytica Chimica Acta,* 273**,** 153-163.

Brett, C.M.A. & Brett, A.M.O., 1993. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*: Oxford University Press.

Brito, G.C., Menezes, M.S., Mesquita, A.R. & Júnior, D.P.L., 2009. *Efeito de um programa de manejo farmacoterapêutico em um grupo de idosos com hipertensão em Aracaju-Sergipe*.

Caetano, F.R., Gevaerd, A., Castro, E.G., Bergamini, M.F., Zarbin, A.J.G. & Marcolino-Junior, L.H., 2012. Electroanalytical application of a screen-printed electrode modified by dodecanethiol-stabilized platinum nanoparticles for dapsone determination. *Electrochimica Acta,* 66**,** 265-270.

Carmona, F. & Ravier, J., 2002. Electrical properties and mesostructure of carbon black-filled polymers. *Carbon,* 40**,** 151-156.

Cesarino, I., Marino, G. & Cavalheiro, É.T.G., 2010. A novel graphite–polyurethane composite electrode modified with thiol-organofunctionalized silica for the determination of copper ions in ethanol fuel. *Fuel,* 89**,** 1883-1888.

Couto, R.a.S., Lima, J.L.F.C. & Quinaz, M.B., Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta*.

De Oliveira, A.C., Dos Santos, S.X. & Cavalheiro, É.T.G., 2008. Graphite–silicone rubber composite electrode: Preparation and possibilities of analytical application. *Talanta,* 74**,** 1043-1049.

Donnet, J.B. & Voet, A., 1976. *Carbon Black: Physics, Chemistry, and Elastomer Reinforcement*: M. Dekker.

Drauz, K., Gröger, H. & May, O., 2012. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*: Wiley-VCH.

Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G. & Eklund, P.C., 1996. Chapter 2 - Carbon Materials. *In* M.S.D.D.C. Eklund (ed.) *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes.* San Diego: Academic Press, 15-59.

Elsherif, O.S., Vernon-Parry, K.D., Evans-Freeman, J.H. & May, P.W., 2012. Effect of doping on electronic states in B-doped polycrystalline CVD diamond films. *Semiconductor Science and Technology,* 27**,** 065019.

Fagan-Murphy, A. & Patel, B.A., 2014. Compressed multiwall carbon nanotube composite electrodes provide enhanced electroanalytical performance for determination of serotonin. *Electrochimica Acta,* 138**,** 392-399.

Farmacopéia Brasileira. 2010. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Farmacopéia Brasileira - vol. 2. 2010. *In* A.N.D.V. Sanitária (ed.) *Volume 2.* 5ª ed. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz.

Ferin, R., Pavão, M.L. & Baptista, J., 2013. Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV. *Clinical Biochemistry,* 46**,** 665-669.

Frackowiak, E. & Beguin, F., 2001. Carbon materials for the electrochemical storage of energy in capacitors. *Carbon,* 39**,** 937-950.

Freire, R.S., Pessoa, C.A. & Kubota, L.T., 2003. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova,* 26**,** 381-389.

Freitas, K.H.G. & Fatibello-Filho, O., 2010. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu3(PO4)2 immobilized in polyester resin. *Talanta,* 81**,** 1102-1108.

Garcia, C.a.B., Júnior, L.R. & Neto, G.D.O., 2003. Determination of potassium ions in pharmaceutical samples by FIA using a potentiometric electrode based on ionophore nonactin occluded in EVA membrane. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 31**,** 11-18.

Gonçalves, E.S., Rezende, M.C., Takahashi, M.F.K. & Ferreira, N.G., 2006. Electrochemical reversibility of reticulated vitreous carbon electrodes heat treated at different carbonization temperatures. *Materials Research,* 9**,** 147-152.

Gorton, L., Domı, Amp, X & Nguez, E., 2002. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology,* 82**,** 371-392.

Grassino, A.N., Milardović, S., Grabarić, Z. & Grabarić, B.S., 2012. Simple and reliable biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages. *Food Research International,* 47**,** 368-373.

Grundler, P., 2007. *Chemical Sensor An Introduction for scientists and engineers* Berlin: Springer.

Hansen, E.H. & Miró, M., 2007. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry,* 26**,** 18-26.

Harris, D.C., 2003. *Quantitative Chemical Analysis, Sixth Edition*: W. H. Freeman.

Hassan, K.M., Elhaddad, G.M. & Abdel Azzem, M., 2014. Simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and glucose using glassy carbon electrode modified by nickel nanoparticles at poly 1, 8-diaminonaphthalene in basic medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 728**,** 123-129.

Janáky, C. & Visy, C., 2013. Conducting polymer-based hybrid assemblies for electrochemical sensing: a materials science perspective. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 405**,** 3489-3511.

Jha, V., 2008. Carbon Black Filler Reinforcement of Elastomers. University of London.

Karyakin, A.A., Gitelmacher, O.V. & Karyakina, E.E., 1994. A High-Sensitive Glucose Amperometric Biosensor Based on Prussian Blue Modified Electrodes. *Analytical Letters,* 27**,** 2861-2869.

Khaskheli, A.R., Fischer, J., Barek, J., Vyskočil, V., Sirajuddin & Bhanger, M.I., 2013. Differential pulse voltammetric determination of paracetamol in tablet and urine samples at a micro-crystalline natural graphite–polystyrene composite film modified electrode. *Electrochimica Acta,* 101**,** 238-242.

Kissinger, P. & Heineman, W.R., 1996. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, Revised and Expanded*: Taylor & Francis.

Klatt, L.N., Connell, D.R., Adams, R.E., Honigberg, I.L. & Price, J.C., 1975. Voltammetric characterization of a graphite-teflon electrode. *Analytical Chemistry,* 47**,** 2470-2472.

Kuila, T., Khanra, P., Mishra, A.K., Kim, N.H. & Lee, J.H., 2012. Functionalized-graphene/ethylene vinyl acetate co-polymer composites for improved mechanical and thermal properties. *Polymer Testing,* 31**,** 282-289.

Kumaravel, A. & Chandrasekaran, M., 2010. A novel nanosilver/nafion composite electrode for electrochemical sensing of methyl parathion and parathion. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 638**,** 231-235.

Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J. & Peričin, D., 2005. Glucose oxidase from Aspergillus niger: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,* 37**,** 731-750.

Létant, S.E., Plant, D.F., Wilson, T.S., Alviso, C.T., Read, M.S.D. & Maxwell, R.S., 2011. Application of density functional theory to the investigation of polymer degradation: Example of cross-linked ethylene–vinyl acetate–vinyl alcohol (EVA-OH) terpolymer de-acetylation. *Polymer Degradation and Stability,* 96**,** 2019-2028.

Lin, Y., Hu, L., Yin, L. & Guo, L., 2015. Electrochemical glucose biosensor with improved performance based on the use of glucose oxidase and Prussian Blue incorporated into a thin film of self-polymerized dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 210**,** 513-518.

Liu, D., Jiang, J., Wang, P., Feng, S. & Hu, P., 2010. Simultaneous quantitative determination of olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B,* 878**,** 743-748.

Liu, H., He, P., Li, Z., Sun, C., Shi, L., Liu, Y., Zhu, G. & Li, J., 2005. An ionic liquid-type carbon paste electrode and its polyoxometalate-modified properties. *Electrochemistry Communications,* 7**,** 1357-1363.

Liu, L., Shi, L., Chu, Z., Peng, J. & Jin, W., 2014. Prussian blue nanocubes modified graphite electrodes for the electrochemical detection of various analytes with high performance. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 202**,** 820-826.

Lourencao, B.C., Silva, T.A., Fatibello-Filho, O. & Swain, G.M., 2014. Voltammetric Studies of Propranolol and Hydrochlorothiazide Oxidation in Standard and Synthetic Biological Fluids Using a Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon (ta-C:N) Electrode. *Electrochimica Acta,* 143**,** 398-406.

Lowinsohn, D. & Bertotti, M., 2006. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova,* 29**,** 1318-1325.

M.A. Tehrani, R., Ghadimi, H. & Ab Ghani, S., 2013. Electrochemical studies of two diphenols isomers at graphene nanosheet–poly(4-vinyl pyridine) composite modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 177**,** 612-619.

Mansano, G.R. & Sartori, E.R., 2015. *Oxidação Eletroquímica de Anlodipino e Hidroclorotiazida Sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro: Potencialidade de Determinação Simultânea em Urina*.

Maouche, N., Nessark, B. & Bakas, I., Platinum electrode modified with polyterthiophene doped with metallic nanoparticles, as sensitive sensor for the electroanalysis of ascorbic acid (AA). *Arabian Journal of Chemistry*.

MartíN, M.E., Hernández, O.M., Jiménez, A.I., Arias, J.J. & Jiménez, F., 1999. Partial least-squares method in analysis by differential pulse polarography. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. *Analytica Chimica Acta,* 381**,** 247-256.

Matsushima, J.T., Santos, L.C.D., Couto, A.B., Baldan, M.R. & Ferreira, N.G., 2012. Influência do eletrólito na eletrodeposição de nanopartículas de Cu sobre eletrodo de diamante dopado com boro. *Química Nova,* 35**,** 11-16.

Mendes, R.K., Claro-Neto, S. & Cavalheiro, E.T.G., 2002. Evaluation of a new rigid carbon–castor oil polyurethane composite as an electrode material. *Talanta,* 57**,** 909-917.

Merey, H.A., Ramadan, N.K., Diab, S.S. & Moustafa, A.A., 2014. Spectrophotometric methods for simultaneous determination of ternary mixture of amlodipine besylate, olmesartan medoxomil and hydrochlorothiazide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* 125**,** 138-146.

Moses, P.R. & Murray, R.W., 1977. Chemically modified electrodes: part V. Covalent binding of a reversible electrode reactant to RuO2 electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry,* 77**,** 393-399.

Motoc, S., Remes, A., Pop, A., Manea, F. & Schoonman, J., 2013. Electrochemical detection and degradation of ibuprofen from water on multi-walled carbon nanotubes-epoxy composite electrode. *Journal of Environmental Sciences,* 25**,** 838-847.

Navarro-Laboulais, J., Trijueque, J., Vicente, F. & Scholl, H., 1994. Voltammetric determination of optimal conductive load proportion in graphite—epoxy composite electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 379**,** 159-163.

Navratil, T. & Barek, J., 2009. Analytical Applications of Composite Solid Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry,* 39**,** 131-147.

Nigović, B., Sadiković, M. & Sertić, M., 2014. Multi-walled carbon nanotubes/Nafion composite film modified electrode as a sensor for simultaneous determination of ondansetron and morphine. *Talanta,* 122**,** 187-194.

Oliveira, P.R.D., Oliveira, M.M., Zarbin, A.J.G., Marcolino-Junior, L.H. & Bergamini, M.F., 2012. Flow injection amperometric determination of isoniazid using a screen-printed carbon electrode modified with silver hexacyanoferrates nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 171–172**,** 795-802.

Pacios, M., Del Valle, M., Bartroli, J. & Esplandiu, M.J., 2008. Electrochemical behavior of rigid carbon nanotube composite electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 619–620**,** 117-124.

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. & Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr,* 22**,** 18-35.

Park, S., Boo, H. & Chung, T.D., 2006. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors. *Analytica Chimica Acta,* 556**,** 46-57.

Pater, C., Bhatnagar, D., Berrou, J.-P., Luszick, J. & Beckmann, K., 2004. A novel approach to treatment of hypertension in diabetic patients – a multicenter, double-blind, randomized study comparing the efficacy of combination therapy of Eprosartan versus Ramipril with low-dose Hydrochlorothiazide and Moxonidine on blood pressure levels in patients with hypertension and associated diabetes mellitus type 2 – rationale and design [ISRCTN55725285]. *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine,* 5**,** 1-11.

Pereira, A.C., Santos, A.D.S. & Kubota, L.T., 2002. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova,* 25**,** 1012-1021.

Ping, J., Wang, Y., Wu, J., Ying, Y. & Ji, F., 2012. Determination of ascorbic acid levels in food samples by using an ionic liquid–carbon nanotube composite electrode. *Food Chemistry,* 135**,** 362-367.

Ratner, B.D., 1995. Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosensors and Bioelectronics,* 10**,** 797-804.

Rezaei, B. & Damiri, S., 2008. Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode as a Sensor for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Hydrochlorothiazide. *Sensors Journal, IEEE,* 8**,** 1523-1529.

Ricci, F. & Palleschi, G., 2005. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics,* 21**,** 389-407.

RodríGuez, M.C. & Rivas, G.A., 2002. Glassy carbon paste electrodes modified with polyphenol oxidase: Analytical applications. *Analytica Chimica Acta,* 459**,** 43-51.

Rong, M., Lin, L., Song, X., Wang, Y., Zhong, Y., Yan, J., Feng, Y., Zeng, X. & Chen, X., 2015. Fluorescence sensing of chromium (VI) and ascorbic acid using graphitic carbon nitride nanosheets as a fluorescent "switch". *Biosensors and Bioelectronics,* 68**,** 210-217.

Roy, P.R., Okajima, T. & Ohsaka, T., 2004. Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly(N,N-dimethylaniline) film-coated GC electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 561**,** 75-82.

Ružicka, J. & Hansen, E.H., 1988. *Flow Injection Analysis*: Wiley.

Salazar, P., Rico, V., Rodríguez-Amaro, R., Espinós, J.P. & González-Elipe, A.R., 2015. New Copper wide range nanosensor electrode prepared by physical vapor deposition at oblique angles for the non-enzimatic determination of glucose. *Electrochimica Acta,* 169**,** 195-201.

Salgado-Figueroa, P., Gutiérrez, C. & Squella, J.A., 2015. Carbon nanofiber screen printed electrode joined to a flow injection system for nimodipine sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 220**,** 456-462.

Santos, A.C.V.D. & Masini, J.C., 2010. A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira. *Química Nova,* 33**,** 1949-1956.

Santos, E.M.G., Araújo, A.N., Couto, C.M.C.M., Montenegro, M.C.B.S.M., Kejzlarová, A. & Solich, P., 2004. Ion selective electrodes for penicillin-G based on Mn(III)TPP-Cl and their application in pharmaceutical formulations control by sequential injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 36**,** 701-709.

Serafín, V., Hernández, P., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J.M., 2013. Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode. *Electrochimica Acta,* 97**,** 175-183.

Sheng, S., Zhang, L. & Chen, G., 2014. Determination of 5,7-dihydroxychromone and luteolin in peanut hulls by capillary electrophoresis with a multiwall carbon nanotube/poly(ethylene terephthalate) composite electrode. *Food Chemistry,* 145**,** 555-561.

Skeggs, L.T., 1966. *Automation in analytical chemistry*: Mediad.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. & Grassi, M.T., 2006. *Fundamentos de química analítica*: Pioneira Thomson Learning.

Stradiotto, N.R., Yamanaka, H. & Zanoni, M.V.B., 2003. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society,* 14**,** 159-173.

Švancara, I., Vytřas, K., Kalcher, K., Walcarius, A. & Wang, J., 2009. Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis,* 21**,** 7-28.

Swanson, H.E. & Tatge, E., 1953. National Institute of Standards and Technology U.S.: Circular of the National Bureau of Standards, 359.

Tajik, S., Taher, M.A. & Beitollahi, H., 2013. First report for simultaneous determination of methyldopa and hydrochlorothiazide using a nanostructured based electrochemical sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 704**,** 137-144.

Tallman, D.E. & Petersen, S.L., 1990. COMPOSITE ELECTRODES FOR ELECTROANALYSIS - PRINCIPLES AND APPLICATIONS. *Electroanalysis,* 2**,** 499-510.

Tang, D., Ma, G., Zhang, L. & Chen, G., 2013. Graphene–epoxy composite electrode fabricated by in situ polycondensation for enhanced amperometric detection in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A,* 1316**,** 127-134.

Trijueque, J., García-Jareño, J.J., Navarro-Laboulais, J., SanmatíAs, A. & Vicente, F., 1999. Ohmic drop of Prussian-blue/graphite+epoxy electrodes. *Electrochimica Acta,* 45**,** 789-795.

Trojanowicz, M., 2009. Recent developments in electrochemical flow detections—A review: Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta,* 653**,** 36-58.

Turkmen, E., Bas, S.Z., Gulce, H. & Yildiz, S., 2014. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode. *Electrochimica Acta,* 123**,** 93-102.

Tutunji, M.F., Ibrahim, H.M., Khabbas, M.H. & Tutunji, L.F., 2009. Simultaneous determination of bisoprolol and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B,* 877**,** 1689-1697.

Ungár, T., Gubicza, J., Ribárik, G., Pantea, C. & Zerda, T.W., 2002. Microstructure of carbon blacks determined by X-ray diffraction profile analysis. *Carbon,* 40**,** 929-937.

Veronez, L.L. & Simã?Es, M.J.S., 2009. *AnÃ¡lise da prescriÃ§Ã£o de medicamentos de pacientes hipertensos atendidos pelo SUS da rede municipal de saÃºde de RincÃ£o â€“ SP*.

Vicentini, F.C., Ravanini, A.E., Figueiredo-Filho, L.C.S., Iniesta, J., Banks, C.E. & Fatibello-Filho, O., 2015. Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms. *Electrochimica Acta,* 157**,** 125-133.

Vieira, R., Pham-Huu, C., Keller, N. & Ledoux, M.J., 2003. Novos materiais à base de nanofibras de carbono como suporte de catalisador na decomposição da hidrazina. *Química Nova,* 26**,** 665-669.

Wang, J., 2008. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews,* 108**,** 814-825.

Wang, Y., Rui, Y., Li, F. & Li, M., 2014. Electrodeposition of nickel hexacyanoferrate/layered double hydroxide hybrid film on the gold electrode and its application in the electroanalysis of ascorbic acid. *Electrochimica Acta,* 117**,** 398-404.

Wang, Z., Han, Q., Xia, J., Xia, L., Bi, S., Shi, G., Zhang, F., Xia, Y., Li, Y. & Xia, L., 2014. A novel phosphomolybdic acid–polypyrrole/graphene composite modified electrode for sensitive determination of folic acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 726**,** 107-111.

Wang, Z., Liu, F. & Lu, C., 2012. Chemiluminescence flow biosensor for glucose using Mg-Al carbonate layered double hydroxides as catalysts and buffer solutions. *Biosensors and Bioelectronics,* 38**,** 284-288.

Yang, J., Jiang, L.-C., Zhang, W.-D. & Gunasekaran, S., 2010. A highly sensitive non-enzymatic glucose sensor based on a simple two-step electrodeposition of cupric oxide (CuO) nanoparticles onto multi-walled carbon nanotube arrays. *Talanta,* 82**,** 25-33.

Yao, H.-C., Sun, M., Yang, X.-F., Zhang, Z.-Z. & Li, H., 2011. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide by time-resolved chemiluminescence with artificial neural network calibration. *Journal of Pharmaceutical Analysis,* 1**,** 32-38.

Yu, Y., Chen, Z., Zhang, B., Li, X. & Pan, J., 2013. Selective and sensitive determination of uric acid in the presence of ascorbic acid and dopamine by PDDA functionalized graphene/graphite composite electrode. *Talanta,* 112**,** 31-36.

Zagatto, E.a.G., Oliveira, C.C. & Collins, C.H., 1999. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994). *Química Nova,* 22**,** 143-146.

Zargoosh, K., Shamsipur, M., Qandalee, M., Piltan, M. & Moradi, L., 2011. Sensitive and selective determination of glucose in human serum and urine based on the peroxyoxalate chemiluminescence reaction of a new Fluorophore. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* 81**,** 679-683.

Zhang, R., Liu, S., Wang, L. & Yang, G., 2013. Electroanalysis of ascorbic acid using poly(bromocresol purple) film modified glassy carbon electrode. *Measurement,* 46**,** 1089-1093.

Zhang, X., Cui, Y., Lv, Z., Li, M., Ma, S., Cui, Z. & Kong, Q., 2011. Carbon nanotubes, Conductive Carbon Black and Graphite Powder Based Paste Electrodes. *International Journal of Electrochemical Science,* 6**,** 6063 - 6073.

Zheng, S., Huang, Y. & Chen, G., 2013. Fabrication and electrochemistry of graphite/poly(methylmethacrylate) composite electrode for o-sec-butylphenol determination. *Electrochimica Acta,* 88**,** 117-122.

Zhu, Z., Garcia-Gancedo, L., Flewitt, A.J., Xie, H., Moussy, F. & Milne, W.I., 2012. A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene. *Sensors,* 12**,** 5996-6022.

Zucolotto, V., Avlyanov, J. & Mattoso, L.H.C., 2004. Elastomeric conductive composites based on conducting polymer–modified carbon black. *Polymer Composites,* 25**,** 617-621.