

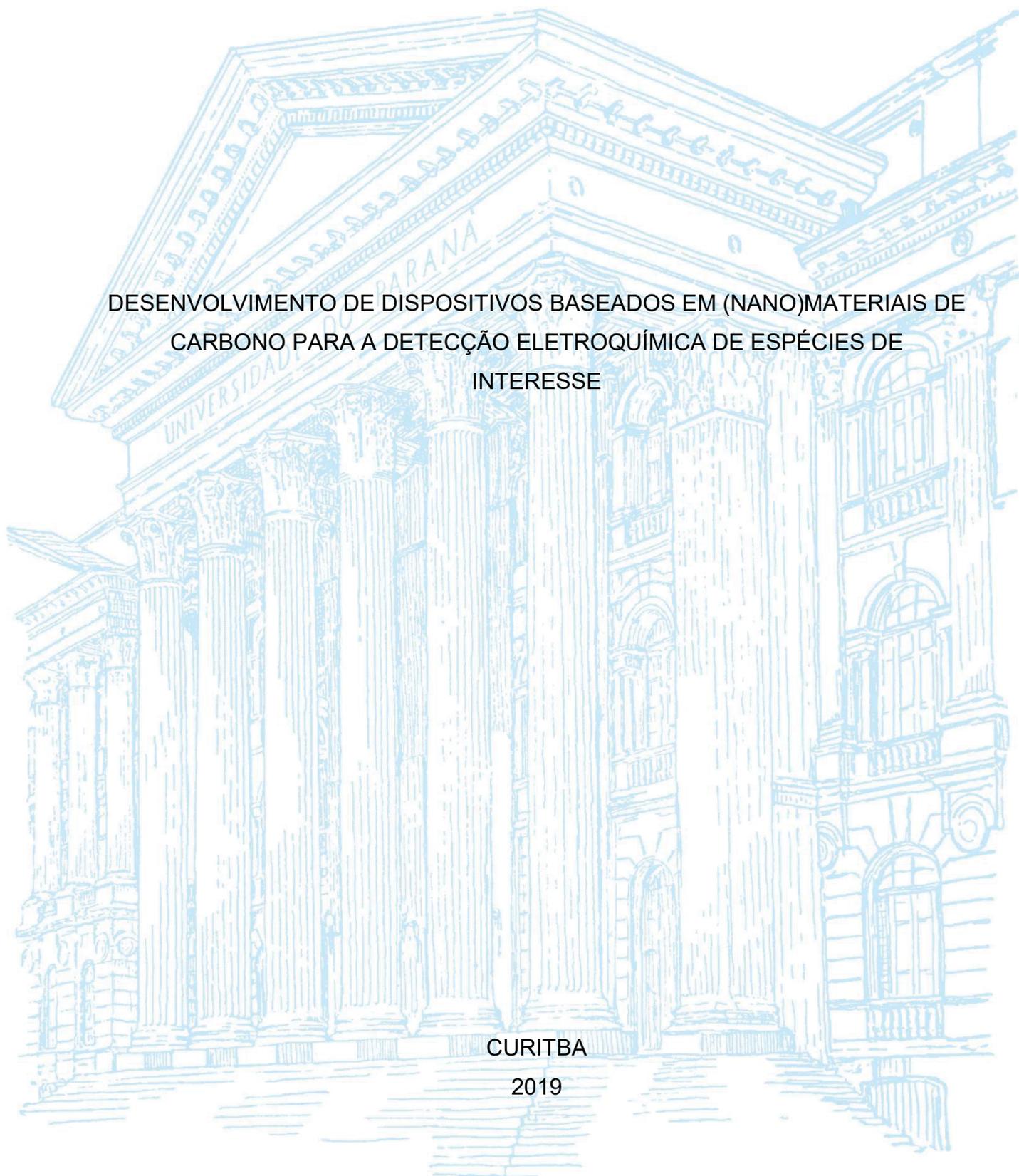
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AVA GEVAERD

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS BASEADOS EM (NANO)MATERIAIS DE
CARBONO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE ESPÉCIES DE
INTERESSE

CURITIBA

2019



AVA GEVAERD

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS BASEADOS EM (NANO)MATERIAIS DE
CARBONO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE ESPÉCIES DE
INTERESSE

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Jr

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

G396d

Gevaerd, Ava

Desenvolvimento de dispositivos baseados em (nano) materiais de carbono para a detecção eletroquímica de espécies de interesse [recurso eletrônico] / Ava Gevaerd. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Orientador: Luiz Humberto Marcolino Junior – Coorientador: Márcio Fernando Bergamini.

1. Materiais nanoestruturados. 2. Carbono. 3. Hormônios. 4. Pesticidas. 5. Micotoxinas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marcolino Junior, Luiz Humberto. III. Bergamini, Márcio Fernando. IV. Título.

CDD: 620.193

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **AVA GEVAERD** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS BASEADOS EM (NANO)MATERIAIS DE CARBONO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE ESPÉCIES DE INTERESSE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2019.

RONALDO CENSI FARIA
Avaliador Externo (UFSCAR)

LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR
Presidente da Banca Examinadora

ELISA SOUZA ORTH
Avaliador Interno (UFPR)

FABIO ROBERTO CAETANO
Avaliador Externo (UFPR)

EDUARDO GUILHERME CIVIDINI NEIVA
Avaliador Externo (FURB)

***Aos meus pais,
Ao Chris,
Dedico.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. Luiz Humberto Marcolino Jr e Prof. Márcio Fernando Bergamini pela orientação e amizade durante estes 10 anos de LabSensE, desde a iniciação científica até o doutorado; por me permitirem fazer parte do grupo por tantos anos, onde eu aprendi além da ciência, por serem pacientes e confiar no meu trabalho.

Aos professores avaliadores desta tese: Dr. Eduardo C. Neiva, Dra. Elisa S. Orth, Dr. Fábio Roberto Caetano e Dr. Ronaldo C. Faria. Ao Dr. Bruno J. G. da Silva pela participação da banca de qualificação e correção dos relatórios.

Aos meus queridos do LabSensE, aos que já passaram por lá e os que ainda estão lá... não tenho palavras pra descrever o sentimento que sinto por vocês, de poder conhecer e trabalhar junto com cada um, e de todas as experiências, risadas (muitas) e cervejas compartilhadas nesses anos. Vou sentir saudade de todos os bilhetinhos que, carinhosamente, já tive que deixar para vocês, espalhados pelo laboratório, pra que tudo funcionasse certo!! Muito obrigada por tudo.

Aos amigos que conheci através da química, do DQ e da UFPR, obrigada por todos os momentos, churrascos, risadas e amizade.

Aos meus pais por sempre acreditarem em mim e por me incentivarem a sempre buscar os meus sonhos, não importando quão distantes eles estivessem, vocês são os meus exemplos de vida. Aos meus irmãos, pelo apoio e carinho sempre, vocês são a minha fortaleza.

Ao Chris, pela compreensão e apoio sempre, por me incentivar a fazer todas as coisas com paixão, pela imensa paciência com os meus surtos e paranoias, e por ser uma parte tão fundamental da minha vida, já não me restam mais palavras para te agradecer o suficiente. Te amo!

À Gaya, meu ronron infinito, minha companheira de estudos!

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao departamento de química.

À Universidade Federal do Paraná, por toda a estrutura.

It's a long way to the top if you wanna Rock 'n Roll! Obrigada!

*It has to start somewhere
It has to start sometime
What better place than here
What better time than now
(Rage Against the Machine)*

*São tempos difíceis para os sonhadores.
(Amelie Poulain)*

RESUMO

Materiais nanoestruturados têm oferecido excelentes oportunidades para construção de novos sensores eletroquímicos. Em especial, os nanomateriais de carbono, vêm ganhando destaque e sendo continuamente descritos na literatura devido às suas estruturas e propriedades como, por exemplo, excelente condutividade elétrica, elevado efeito eletrocatalítico e área superficial, o que possibilita o desenvolvimento de sensores com baixos limites de detecção e elevadas sensibilidade. Nesse sentido o presente projeto explora características de diferentes nanomateriais de carbono, para a construção de dispositivos eletroquímicos para a determinação de diferentes espécies de interesse, tais como hormônios, pesticidas e micotoxinas. Para a determinação de progesterona, um eletrodo de carbono vítreo foi modificado com óxido de grafeno funcionalizado com imidazol. O efeito sinérgico entre os componentes foi fundamental para o bom desempenho do dispositivo que apresentou região linear de 0,22 a 14,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 68 nmol L^{-1} . O eletrodo foi empregado para a determinação de progesterona em amostra farmacêutica, apresentando resultados concordantes aos obtidos para o método comparativo (UV-Vis). Para a determinação de dietilestilbestrol, um eletrodo impresso foi modificado com grafeno quantum dots, e quando comparado ao eletrodo não modificado, o dispositivo proposto apresentou melhor desempenho em termos de corrente, em decorrência dos menores valores de resistência a transferência de carga. A metodologia apresentou faixa linear de 0,05 a 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 8,81 nmol L^{-1} . A aplicação do método para a determinação de dietilestilbestrol em amostras enriquecidas de água e urina apresentou bom desempenho em diferentes níveis de concentração, com percentuais de recuperação entre 80 a 117 %. O grafeno quantum dots serviu como plataforma para o ancoramento de nanopartículas de ouro, e o compósito foi empregado como modificador de um eletrodo impresso para a determinação de aflatoxina B1 em amostras fortificadas de malte, obtendo-se boas taxas de recuperação. O efeito eletrocatalítico com compósito é fortemente evidenciado pelo perfil voltamétrico que apresenta valores de potencial menos positivos para a oxidação da micotoxina. Sob condições otimizadas, uma curva analítica com região linear de 1,0 a 50,0 nmol L^{-1} , alcançando limites de 0,47 nmol L^{-1} . A determinação de paraoxon foi realizada em uma metodologia não enzimática empregando nanotubos de carbono funcionalizados com imidazol. A interação entre o imidazol e o pesticida permitiu que o dispositivo proposto apresentasse melhores resultados do que os demais. A análise de amostras fortificadas pode ser realizada, a partir da construção da curva analítica com região linear de 1,0 a 14,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 0,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já o fenamifós foi determinado empregando um eletrodo impresso de carbono modificado com óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido, que apresentou resposta superior ao dispositivo não modificado, a qual foi atribuído, além de outros fatores, ao baixo valor de resistência a transferência de carga. Com os parâmetros otimizados foi construída uma curva analítica com região útil de trabalho de 0,25 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limites de detecção e quantificação de 0,067 e 0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir disso, a utilização de nanomateriais de carbono aliados a dispositivos eletroanalíticos dão origem a estratégias versáteis que podem ser empregadas para a determinação de diferentes classes de espécies de interesse.

Palavras-chave: Nanomateriais de Carbono, Dispositivos Eletroanalíticos, Hormônios, Pesticidas, Micotoxina

ABSTRACT

Nanostructured materials have offered excellent opportunities for the construction of new electrochemical sensors. Carbon nanomaterials have been ahead prominence and are continuously described in literature due to their structures and properties such as excellent electrical conductivity, high electrocatalytic effect and surface area, which allows the development of sensors with low limits of detection and high sensitivity. In this way, the present project explores the characteristics of different carbon nanomaterials, for the construction of electrochemical devices for the determination of different species of interest, such as hormones, pesticides and mycotoxins. For the determination of progesterone, a glassy carbon electrode was modified with graphene oxide functionalized with imidazole. The synergistic effect of the components was fundamental for the good performance of the device that presented a linear region of 0.22 to 14.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a detection limit of 68 nmol L^{-1} . The electrode was successfully used for determination of progesterone in pharmaceutical sample, presenting results concordant to those obtained for the comparative method (UV-Vis). For the determination of diethylstilbestrol, a screen-printed electrode was modified by electrodeposition with graphene quantum dots. When compared to an unmodified electrode, the proposed device presented better performance in terms of current, due to the lower values of resistance to charge transfer. The methodology for this determination presented a linear range of 0.05 to 7.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a detection limit of 8.8 nmol L^{-1} . The application of the method for the determination of diethylstilbestrol in spiked water and urine samples presented good performance at different levels of concentration, with recovery percentages between 80 and 117%. Graphene quantum dots was used as a platform for attaching gold nanoparticles, and the composite was employed as a modifier of a screen-printed carbon electrode for the determination of aflatoxin B1 in fortified samples of malted barley, obtaining good recovery. The electrocatalytic effect presented by the composite is strongly evidenced by the voltammetric profile that presents less positive potential values for mycotoxin oxidation. Under optimized conditions, an analytical curve with linear region of 1.0 to 50.0 nmol L^{-1} , reaching limits of detection of 0.47 nmol L^{-1} . The determination of paraoxon was carried out in a non-enzymatic methodology using imidazole-functionalized carbon nanotubes. The interaction between imidazole and the pesticide allowed the proposed device to perform better than the others. The analysis of fortified samples can be performed, starting from the analytical curve with linear region of 1.0 to 14.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with detection limit of 0.12 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fenamiphos was determined using a carbon electrode with electrochemically reduced graphene oxide, which presented a superior response to the unmodified device, which was attributed, besides other factors, to the low value of resistance to transfer of charge. With the optimized parameters, an analytical curve was constructed with a useful working region of 0.25 to 25.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and limits of detection and quantification of 0.067 and 0.22 $\mu\text{mol L}^{-1}$. From this, the use of carbon nanomaterials combined with electroanalytical devices lead to versatile strategies that can be employed for the determination of different classes of species of interest.

Keywords: Carbon Nanomaterials, Electroanalytical Devices, Hormones, Pesticides, Mycotoxin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas idealizadas para Nanotubos de Carbono de A) Parede Única; e B) Paredes Múltiplas.	20
FIGURA 2 – Estruturas idealizadas A) grafeno, B) óxido de grafeno, E C) óxido de grafeno reduzido.	21
FIGURA 3 – Estrutura Idealizada para Grafeno Quantum Dots.	23
FIGURA 4 – A) Estrutura e B) Equilíbrio ácido-base do imidazol.	26
FIGURA 5 – Representação esquemática do eletrodo impresso e seus componentes.	29
FIGURA 6 – Fórmula Estrutural da Progesterona.	30
FIGURA 7 – Fórmula Estrutural do Dietilestilbestrol.	31
FIGURA 8 – Estrutura Química do Paraoxon.	33
FIGURA 9 – Estrutura Química do Fenamifós.	34
FIGURA 10 – Estrutura Química da Aflatoxina B ₁	36
FIGURA 11 – Representação Esquemática da Síntese do GOIMZ.	42
FIGURA 12 – Representação Esquemática do Procedimento Voltamétrico empregado para a determinação de Progesterona.	44
FIGURA 13 – A) análise Termogravimétrica e B) espectros Raman para go e goimz; imagens de meV C) go e d) goimz; e) espectros de infravermelho para go e goimz.	47
FIGURA 14 – Perfil Voltamétrico da Progesterona A) Voltametria Cíclica e B) Voltametria de Onda Quadrada.	49
FIGURA 15 – Mecanismo proposto para a Reação Redox da Progesterona.	50
FIGURA 16 – A) Voltamogramas de onda quadrada para Progesterona obtidos para diferentes eletrodos na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de P4. B) Gráfico de comparação para sinal analítico obtido a partir de voltamogramas em A. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta E_P = 40 \text{ mV}$; $\Delta E_S = 4 \text{ mV}$; NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	51
FIGURA 17 – Proposta de Mecanismo de interação entre o GOIMZ e Progesterona e formação do produto.	52
FIGURA 18 – A) Voltamogramas de Onda Quadrada da Progesterona obtidos para o estudo de pH; Gráficos de B) I_p vs. pH e C) E_p vs. pH. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta E_P = 40 \text{ mV}$; $\Delta E_S = 4 \text{ mV}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	54

FIGURA 19 – Gráfico de correlação de Corrente de Pico da Progesterona em função da quantidade de modificador GOIMZ $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta_{EP} = 40\text{mV}$; $\Delta_{ES} = 4\text{mV}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	55
FIGURA 20 – Voltamogramas de Onda Quadrada Obtidos para a Progesterona para o estudo da Frequência. $\Delta_{EP} = 40 \text{ mV}$; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	57
FIGURA 21 – Voltamogramas de Onda Quadrada Obtidos para a Progesterona para o estudo de Amplitude de Potencial. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	58
FIGURA 22 – Voltamogramas de Onda Quadrada Obtidos para a Progesterona para o estudo de Amplitude de Potencial. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta_{EP} = 40 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	59
FIGURA 23 – A) Voltamogramas de Onda Quadrada para Progesterona referentes à região linear de resposta. B) Curva analítica obtida a partir de voltamogramas de onda quadrada como os demonstrados em A. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; $\Delta_{EP} = 40 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	60
FIGURA 24 – Representação Esquemática do Procedimento Voltamétrico empregado para a determinação de Paraoxon.	67
FIGURA 25 – Voltamogramas Cíclicos obtidos para CNT-HNO ₃ -IMZ-GCE (preto) e CNT-H-IMZ-GCE (verde) na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PX. $v = 50,0 \text{ MV S}^{-1}$; TAMPÃO BR pH=10,0.....	71
FIGURA 26 – A) Termogramas; Espectros de B) FTIR E C) RAMAN obtidos para as amostras de CNT E CNT-H-IMZ.	72
FIGURA 27 – Imagens de SEM e TEM de A-C) CNT; e B-D) CNT-H-IMZ, respectivamente.....	73
FIGURA 28 – A) Perfil voltamétrico do Paraoxon; E B) Gráficos de barras de correlação entre corrente de pico obtida para cada eletrodo. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$; TAMPÃO BR pH=10,0.	74
FIGURA 29 – Reações envolvidas nos processos redox do Paraoxon.....	75
FIGURA 30 – A-B) Diagrama de Nyquist de Impedância dos diferentes eletrodos em intervalo de 100 kHz A 1 mHz de frequência e 10 mV de amplitude; C) Circuito equivalente utilizado. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH=10,0.	76
FIGURA 31 – A) Voltamogramas cíclicos do Paraoxon obtidos para estudo de variação de velocidade de varredura; Correlação entre B) log da corrente de pico E c)	

POTENCIAL DE PICO versus log da velocidade de varredura. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH=10,0.....	78
FIGURA 32 – Estudo de A) repetibilidade e B) reprodutibilidade obtidos empregando o CNT-H-IMZ-GCE na Presença de Paraoxon. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; a = 50 mV; t = 50 ms.....	80
FIGURA 33 – A) Voltamogramas de pulso diferencial para Paraoxon obtidos no estudo de pH; B) correlação entre corrente e potencial de pico em função da variação de pH. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; a = 50 mV; t = 50 ms.	81
FIGURA 34 – A) Voltamogramas de pulso diferencial para Paraoxon obtidos para o estudo de quantidade de modificador (CNT-H-IMZ); B) Variação de corrente de pico em função do volume de modificador. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; a = 50 mV; t = 50 ms.	82
FIGURA 35 – Resultados obtidos para o estudo da Amplitude de Pulso empregando CNT-H-IMZ-GCE para a determinação de Paraoxon. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; t = 50 ms.	83
FIGURA 36 – Resultados obtidos para o estudo de tempo de pulso empregando CNT- H-IMZ-GCE para a determinação de Paraoxon. $C_{px} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; a = 75 mV.	84
FIGURA 37 – A) Voltamogramas de Pulso Diferencial da Região Linear obtida empregando CNT-H-IMZ-GCE para a determinação de Paraoxon; B) Faixa de concentração de Paraoxon estudada; E C) Curva Analítica obtida. TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta_{ES} = 6 \text{ mV}$; a = 75 mV; t = 100 ms.	86
FIGURA 38 – Representação esquemática da rota de obtenção dos GQDs.	92
FIGURA 39 – Representação esquemática do processo de modificação dos Eletrodos Impressos a partida da eletrodeposição dos GQDs.	93
FIGURA 40 – Diagrama representativo da formação dos GQDs a partir do Ácido Cítrico.	97
FIGURA 41 – A) FTIR obtidos para o ácido cítrico e para o GQD. B) Imagem dos GQDs sob radiação visível (esquerda) e ultravioleta (direita).	98
FIGURA 42 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão para os GQD. INSERT: Histograma do tamanho médio das partículas.	99
FIGURA 43 – A) Voltamograma cíclico obtido na etapa de eletrodeposição dos GQDs na superfície do eletrodo impresso; imagens de mev da superfície do eletrodo B) não	

modificado - SPE e C) modificado - GQDSPE. Velocidade de varredura = 50,0 mV s ⁻¹	100
FIGURA 44 – a) Perfil voltamétrico para Dietilestilbestrol obtidos para o eletrodo modificado (preto) e eletrodo sem modificação (roxo). b) Diagramas de Nyquist obtidos a partir dos estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica; c) proposta de mecanismo de oxidação do DES. tampão BR pH=4, DES= 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , v= 50,0 mV s ⁻¹	102
FIGURA 45 – A) Voltamogramas cíclicos para Dietilestilbestrol obtidos para o estudo da velocidade; B) correlação obtida entre as correntes de pico anódico e catódico vs raiz quadrada da velocidade de varredura. tampão BR pH=4, DES= 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	104
FIGURA 46 – A) Voltamogramas cíclicos de Dietilestilbestrol obtidos para o estudo do pH; correlação entre B) corrente de pico e C) potencial de pico em função do pH. tampão BR, C _{DES} = 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , v= 50,0 mV s ⁻¹	105
FIGURA 47 – Voltamogramas cíclicos de Dietilestilbestrol obtidos para o estudo da quantidade de ciclos de modificação para a obtenção do GQDSPE. tampão BR pH=4, C _{DES} = 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , v= 50,0 mV s ⁻¹	106
FIGURA 48 – Voltamogramas Cíclicos obtidos para o estudo da estabilidade do sinal de Dietilestilbestrol. tampão BR pH=4, C _{DES} = 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , v= 50,0 mV s ⁻¹	107
FIGURA 49 – A) Voltamogramas de varredura linear obtidos para diferentes velocidades de varredura empregando GQDSPE na presença de DES. B) correlação entre as correntes de pico do processo anódico e a velocidade de varredura. tampão BR pH=4, C _{DES} = 1,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	108
FIGURA 50 – A) Voltamogramas de varredura linear obtidos para a oxidação do dietilestilbestrol no intervalo de 5,0 X 10 ⁻⁸ A 7,5 X 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ . B) Curva de correlação linear entre corrente de pico e concentração de dietilestilbestrol. tampão BR pH=4, v= 50,0 mV s ⁻¹	110
FIGURA 51 – Esquema de Síntese do Compósito entre Nanopartículas de Ouro e Grafeno <i>Quantum Dot</i>	115
FIGURA 52 – Representação esquemática da Metodologia de Preparo de Amostra empregada.	119
FIGURA 53 – A-C) Imagens de TEM do Nanocompósito formado entre AuNPs e GQD; D) Histograma de tamanho das partículas.	120

FIGURA 54 – Imagens de TEM do Nanocompósito AuGQD A) Campo claro; B) Campo escuro.....	121
FIGURA 55 – Difratoogramas de Raios-X obtidos para as amostras de GQD e AuGQD.	121
FIGURA 56 – Imagens de SEM A) Eletrodo não modificado; e B) Eletrodo modificado com AuGQD.....	122
FIGURA 57 – Voltamogramas Cíclicos obtidos para SPE (verde) e AuGQD-SPE (roxo) em tampão BR pH=5,0. $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$	123
FIGURA 58 – A) Perfil Voltamétrico para AFLB ₁ empregando diferentes eletrodos. Gráficos de Barra de correlação entre B) Corrente de pico e C) Potencial de Pico para os eletrodos testados. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; tampão B-R pH=5,0; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$	124
FIGURA 59 – Mecanismo Redox proposto para AFLB ₁	125
FIGURA 60 – A) Diagramas de Nyquist obtidos para os eletrodos: SPE (verde), GQD-SPE (azul) e AuGQD-SPE (roxo) na presença de Aflatoxina B ₁ . B) Circuito equivalente. $f = 0,1 \text{ MHz}$ a 10 mHz ; $a = 10 \text{ mV}$; $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	126
FIGURA 61 – A) Voltamogramas cíclicos característicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ obtidos para AuGQD-SPE; B) Voltamogramas cíclicos Comparativos entre os eletrodos: SPE (verde), GQD-SPE (azul) e AuGQD-SPE (roxo) em $v=100 \text{ mV s}^{-1}$; C) Gráfico de Randles-Sevick.	127
FIGURA 62 – A) Voltamogramas Lineares obtidos para o estudo de Velocidade de Varredura empregando AuGQD-SPE na presença de AFLB ₁ . B) Variação da Corrente em função da Velocidade de Varredura; C) Gráfico de $\log I$ vs $\log v$. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ Eletrólito: tampão B-R pH = 5,0; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$	128
FIGURA 63 – A) Voltamogramas Lineares de AFLB ₁ obtidos para o estudo do pH empregando AuGQD-SPE; B) Correlação entre Corrente e Potencial de Pico em função do pH. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ Eletrólito: tampão B-R; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$	130
FIGURA 64 – Formas pH dependentes propostas para AFLB ₁ com base no comportamento das cumarinas.	131
FIGURA 65 – Resultados obtidos para o estudo de Modificador (AuGQD) na resposta voltamétrica de AFLB ₁ . $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; Eletrólito: tampão B-R pH=5,0; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$	132

FIGURA 66 – Resultados para os estudos de A) Tempo e B) Potencial de Condicionamento do eletrodo AuGQD-SPE em função da Resposta em corrente obtida na presença de AFLB ₁ C _{AFLB1} = 5,0 × 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ ; Eletrólito: tampão B-R pH=5,0; v = 50,0 mV s ⁻¹	133
FIGURA 67 – Gráfico de barras obtidos para os estudo de A) Repetibilidade; e B) Reprodutibilidade. C _{AFLB1} = 5,0 × 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ ; Eletrólito: tampão B-R pH=5,0; v = 50,0 mV s ⁻¹ ; t _{APP} = 90 s; E _{APP} = -0,2 V	134
FIGURA 68 – A) Voltamogramas obtidos para a região linear de trabalho na determinação de AFLB ₁ empregando AuGQD-SPE; B) Correlação entre corrente de pico e concentração de AFLB ₁ .Eletrólito: tampão B-R pH=5,0; v = 50,0 mV s ⁻¹ ; t _{APP} = 90 s; E _{APP} = -0,2 V	135
FIGURA 69 – Representação esquemática da Modificação do Eletrodo Impresso.	141
FIGURA 70 – Caracterizações realizadas para o Óxido de Grafeno obtido pela metodologia de Hummers melhorada: A) DRX; B) FTIR e C) Raman.....	144
FIGURA 71 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do Óxido de Grafeno obtida pela metodologia de Hummers melhorada.	145
FIGURA 72 – Curvas titulométricas e primeira derivada para: A) titulação com NaOH, B) titulação com NaHCO ₃ e C) titulação com Na ₂ CO ₃	145
FIGURA 73 – Voltamogramas Cíclicos característicos para a formação de óxido de Grafeno Reduzido Eletroquimicamente.....	147
FIGURA 74 – Graficos de Barra obtidos para o estudo de A) Repetibilidade; e B) Reprodutibilidade do ERGO-SPE na presença de Fenamifós. C _{FNP} = 1,0 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , Tampão BR pH=6,0. f = 50 Hz; ΔE _P = 50 mV; ΔE _S = 10 mV.....	148
FIGURA 75 – A) Voltamogramas cíclicos; B) Voltamogramas de Varredura Linear C) Correlação entre a Corrente de Pico e Eletrodo obtidos para ERGO-SPE e SPE na presença de 1,0 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ de FNP. Eletrólito: Tampão BR pH = 6,0; v = 50,0 mV s ⁻¹	149
FIGURA 76 – Reação Redox proposta para o Fenamifós.	149
FIGURA 77 – A) Diagramas de Nyqst obtidos para SPE (azul) e ERGO-SPE (rosa) na presença de FNP (1,0 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹); B) Circuito Equivalente de Randles. f = 0,1 mHz a 10 mHz; a = 10 mV.....	150

FIGURA 78 – A) Voltamogramas Ciclicos para Fenamifós obtidos para o estudo de velocidade de Varredura empregando ERGO-SPE na presença de Fenamifós; B) Plot de $\log I$ vs $\log v$. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Tampão BR pH=6,0.....	151
FIGURA 79 – A) Voltamogramas lineares para Fenamifós obtidos para o estudo de pH empregando ERGO-SPE; B) Correlação entre as correntes de pico e o pH. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; Tampão BR; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$	152
FIGURA 80 – A) Voltamogramas lineares para Fenamifós obtidos para o estudo de quantidade de modificador (ERGO); B) Correlação entre corrente de pico e Número de Ciclos de formação do ERGO. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Tampão BR pH=6,0. $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$	154
FIGURA 81 – A) Comparativo do Perfil voltamétrico de FNP por LSV e SWV; B) Perfil de Onda Quadrada com as 3 componentes obtido para FNP. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Tampão BR pH=6,0.	155
FIGURA 82 – Resultados obtidos para o estudo de Frequência empregando ERGO-SPE para a determinação de Fenamifós. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Tampão BR pH=6,0; $\Delta E_P = 40 \text{ mV}$; $\Delta E_S = 4 \text{ mV}$	156
FIGURA 83 – Estudo da Amplitude de Pulso empregando ERGO-SPE para a determinação de Fenamifós. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Tampão BR pH=6,0; $f = 75 \text{ Hz}$; $\Delta E_S = 4 \text{ mV}$	157
FIGURA 84 – Resultados obtidos para o estudo de incremento de potencial empregando ERGO-SPE para a determinação de Fenamifós. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Tampão BR pH=6,0; $f = 75 \text{ Hz}$; $\Delta E_P = 50 \text{ mV}$	158
FIGURA 85 – A) Voltamogramas de onda quadrada para Fenamifós obtidos para a Região Linear de trabalho; B) Curva Analítica. Tampão BR pH=6,0. $f = 75 \text{ Hz}$; $\Delta E_P = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_S = 10 \text{ mV}$	159
FIGURA 86 – A) Voltamogramas lineares para Fenamifós obtidos para a região linear de trabalho; B) Curva analítica obtida empregando LSV. $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$	160

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Parâmetros otimizados para a determinação de Progesterona empregando GOIMZ-GCE.....	60
TABELA 2. Desempenho Analítico obtido com o GOIMZ-GCE para a determinação de P4.....	61
TABELA 3. Comparação da eficiência de alguns eletrodos modificados usados para determinação de P4.	63
TABELA 4. Condições estudadas e otimizadas para os parâmetros experimentais relacionados à determinação de PX empregando CNT-H-IMZ-GCE	85
TABELA 5. Desempenho Analítico obtido com o CNT-H-IMZ-GCE para a determinação de PX.....	87
TABELA 6. Resultados obtidos para a Análise da Amostra.....	87
TABELA 7. Resultados obtidos para o Estudo de Interferentes.....	87
TABELA 8. Comparação de Métodos Eletroquímicos para a determinação de PX. .	89
TABELA 9. Parâmetros Otimizados para a determinação de DES empregando o GQDSPE.....	109
TABELA 10. Desempenho Analítico obtido com o GQDSPE para a determinação de DES.....	110
TABELA 11. Resultados obtidos para a análise de Amostras Reais empregando o dispositivo proposto.....	111
TABELA 12. Comparação da eficiência de alguns eletrodos modificados usados para determinação de DES	112
TABELA 13. Parâmetros otimizados para a determinação de AFLB ₁	134
TABELA 14. Desempenho Analítico obtido com o AuGQD-SPE para a determinação de AFLB ₁	136
TABELA 15. Resultados obtidos para a determinação de AFLB ₁ em amostras de malte.	136
TABELA 16. Comparação do desempenho obtido empregando AuGQD-SPE com outros dispositivos eletroanalíticos descritos na literatura para a determinação de AFLB ₁	137
TABELA 17. Quantificação dos grupos superficiais ácidos do GO pelo Método de Boehm.....	146
TABELA 18. Parâmetros otimizados para a Determinação de FNP.....	159

TABELA 19. Parâmetros de Mérito Analítico obtidos empregando o ERGO-SPE para a determinação de FNP.....	160
TABELA 20. Tabela de comparação entre os Parâmetros de Mérito Analítico obtidos para ERGO-SPE para a determinação de FNP empregando LSV e SWV.	160
TABELA 23. Comparação do desempenho Analítico obtido para ERGO-SPE com outros trabalhos descritos na literatura.	162

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Δ_{EP} – Amplitude de Pulso

Δ_{ES} – Incremento de Potencial

AA – ÁCIDO ASCÓRBICO

AC – ÁCIDO CÍTRICO

AFLB₁ – AFLATOXINA B1

AuQD-SPE – ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM COMPÓSITO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E GRAFENO *QUANTUM DOTS*

AuNP – NANOPARTÍCULAS DE OURO

BDD – ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (Do inglês *BORON DOPED DIAMOND*)

CBZ – CARBENDAZIM

CE – CONTRA ELETRODO (Do inglês *COUNTER ELECTRODE*)

CNT – NANOTUBOS DE CARBONO (Do inglês *CARBON NANOTUBES*)

CNT-GCE – ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO

CNT-H-GCE – ELETRODO DE CARBONO VITREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO TRATADOS PELO MÉTODO DE HUMMERS

CNT-H-IMZ-GCE – ELETRODO DE CARBONO VITREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM IMIDAZOL

CQD – *QUANTUM DOTS* DE CARBONO (Do inglês *CARBON QUANTUM DOTS*)

CV – VOLTAMETRIA CÍCLICA (Do inglês *CICLIC VOLTAMMETRY*)

DES – DIETILESTILBESTROL

DPV – VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (Do inglês *DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY*)

DPASV – VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA POR PULSO DIFERENCIAL (Do inglês *DIFFERENTIAL PULSE ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY*)

EDC – CLORIDRATO DE N-(3-DIMETILAMINOPROPIL)-N'-ETILCARBODIIMIDA

EIS – ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (Do inglês *ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY*)

EQM – ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO

ERGO – ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO ELETROQUIMICAMENTE (Do inglês *ELECTROCHEMICALLY REDUCED GRAPHENE OXIDE*)

ERGO-SPE – ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO ELETROQUIMICAMENTE

f – Frequência

FNP – FENAMIFÓS

GLU – GLICOSE

GCE – ELETRODO DE CARBONO VÍTREO (Do inglês *GLASSY CARBON ELECTRODE*)

GO – ÓXIDO DE GRAFENO (Do inglês *GRAPHENE OXIDE*)

GO-GCE – ELETRODO DE CARBONO VITREO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO

GOIMZ – ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM IMIDAZOL

GOIMZ-GCE – ELETRODO DE CARBONO VITREO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM IMIDAZOL

GQD – GRAFENO *QUANTUM DOTS*

GQD-SPE – ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM GRAFENO *QUANTUM DOTS*

IMZ-GCE – ELETRODO DE CARBONO VITREO MODIFICADO COM IMIDAZOL

LDR – REGIÃO LINEAR (Do inglês *LINEAR DYNAMIC RANGE*)

LOD – LIMITE DE DETECÇÃO (Do inglês *LIMIT OF DETECTION*)

LOQ – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (Do inglês *LIMIT OF QUANTIFICATION*)

LSV – VOLTAMETRIS DE VARREDURA LINEAR (Do inglês *LINEAR SWEEP VOLTAMMETRY*)

NHS – N-HIDROXISUCCINIMIDA

NPs – NANOPARTICULAS

P4 – PROGESTERONA

PX – PARAOXON

RE – ELETRODO DE REFERÊNCIA (Do inglês *REFERENCE ELECTRODE*)

SPE – ELETRODO IMPRESSO (Do inglês *SCREEN-PRINTED ELECTRODES*)

SWV – VOLTAMERIA DE ONDA QUADRADA (Do inglês *SQUARE WAVE VOLTAMMETRY*)

WE – ELETRODO DE TRABALHO (Do inglês *WORKING ELECTRODE*)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 NANOMATERIAIS DE CARBONO PARA ELETROANÁLISE.....	19
1.1.1 Nanotubos de Carbono	19
1.1.2 Grafeno e Derivados	21
1.1.3 Quantum Dots a base de Carbono	23
1.1.4 Nanomateriais de Carbono Funcionalizados.....	24
1.1.4.1 Imidazol	25
1.1.4.2 Nanopartículas de Ouro.....	26
1.1.5 ELETRODOS BASE DE CARBONO.....	28
1.1.6 ESPÉCIES ESTUDADAS.....	29
1.1.6.1 Hormônios	30
1.1.6.2 Agrotóxicos.....	32
1.1.6.3 Micotoxinas.....	35
2 OBJETIVO GERAL	39
3 ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM IMIDAZOL PARA A DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA	41
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.2.1 Reagentes e Soluções	41
3.2.2 Síntese do GOIMZ	42
3.2.3 Modificação do Eletrodo e Medidas Eletroquímicas	43
3.2.4 Otimização dos parâmetros para o desenvolvimento da Metodologia analítica para a determinação da P4	44
3.2.4.1 Comportamento Eletroquímico da P4.....	44
3.2.4.2 Avaliação da potencialidade do GOIMZ-GCE como sensor para a determinação de P4	45
3.2.4.3 Estudo do Efeito da Variação do pH.....	45
3.2.4.4 Estudo do Volume de Modificador.....	45
3.2.4.5 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	45
3.2.4.6 Parâmetros da Técnica Analítica	46
3.2.4.7 Construção da Curva Analítica	46
3.2.4.8 Análise da Amostra e Método Comparativo	46

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.3.1 Caracterização do GOIMZ.....	47
3.3.2 Comportamento Eletroquímico da P4	48
3.3.3 Otimização dos Parâmetros da Metodologia Analítica	53
3.3.3.1 Estudo do Efeito da Variação do pH.....	53
3.3.3.2 Estudo da Quantidade de Modificador.....	55
3.3.3.3 Otimização dos Parâmetros da Técnica	56
3.3.4 Construção da Curva Analítica	59
3.3.5 Amostra e Método comparativo.....	61
3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	62
4 ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM IMIDAZOL PARA A DETERMINAÇÃO DE PARAOXON.....	65
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.2.1 Reagentes e Soluções	65
4.2.2 Síntese e Caracterização do CNT-H-IMZ.....	66
4.2.3 Modificação do Eletrodo e Medidas Eletroquímicas	66
4.2.4 Otimização dos parâmetros para o desenvolvimento da Metodologia analítica para a determinação da PX.....	67
4.2.4.1 Comportamento Eletroquímico do PX	67
4.2.4.2 Avaliação da potencialidade do CNT-H-IMZ-GCE como sensor para a determinação de PX.....	68
4.2.4.3 Estudo do Efeito da Variação do pH.....	68
4.2.4.4 Estudo do Volume de Modificador.....	69
4.2.4.5 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	69
4.2.4.6 Parâmetros da Técnica Analítica	69
4.2.5 Construção da Curva Analítica	69
4.2.6 Análise da Amostra	70
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.3.1 Escolha do Compósito.....	70
4.3.2 Caracterização do CNT-H-IMZ.....	71
4.3.3 Comportamento Voltamétrico do Paraoxon.....	74
4.3.4 Otimização da Metodologia Analítica	80

4.3.4.1	Estudo da Variação do pH.....	80
4.3.4.2	Estudo da Quantidade de Modificador.....	82
4.3.4.3	Parâmetros da Técnica de Pulso Diferencial.....	83
4.3.5	Curva Analítica e Aplicação em amostras.....	85
4.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	88
5 ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM GRAFENO QUANTUM DOTS		
PARA A DETERMINAÇÃO DE DIETILESTILBESTROL.....		
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	91
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
5.2.1	Reagentes e Soluções.....	91
5.2.2	Síntese do Grafeno <i>Quantum Dots</i>	92
5.2.3	Modificação do eletrodo e Medidas Eletroquímicas.....	93
5.2.4	Caracterização do GQD e GQDSPE.....	94
5.2.5	Otimização dos parâmetros para o desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação de DES.....	95
5.2.5.1	Comportamento eletroquímico do DES.....	95
5.2.5.2	Avaliação da potencialidade do GQDSPE como sensor para a determinação de DES95	
5.2.5.3	Estudo da Influência da Variação do pH.....	95
5.2.5.4	Estudo da Quantidade de Modificador.....	95
5.2.5.5	Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	96
5.2.6	Construção da Curva Analítica.....	96
5.2.7	Amostra real.....	96
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.3.1	Caracterização do GQD.....	96
5.3.2	Preparação e Caracterização do GQDSPE.....	99
5.3.3	Comportamento Voltamétrico do DES.....	101
5.3.4	Otimização dos Parâmetros da Metodologia Analítica.....	104
5.3.4.1	Variação do pH.....	104
5.3.4.2	Número de Ciclos de Modificação e Estabilidade o Sinal Analítico.....	106
5.3.4.3	Otimização da Velocidade de Varredura.....	108
5.3.5	Aplicação Analítica.....	109
5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	111

6 ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM COMPÓSITO ENTRE GRAFENO QUANTUM DOTS E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ EM MALTE.....	114
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	114
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	114
6.2.1 Reagentes e Soluções	114
6.2.2 Síntese e Caracterização do Compósito AuGQD.....	115
6.2.3 Procedimento Voltamétrico e Modificação do Eletrodo	116
6.2.4 Otimização da Metodologia Analítica	117
6.2.4.1 Comportamento eletroquímico da AFLB ₁	117
6.2.4.2 Avaliação da potencialidade do AuGQD-SPE como sensor para a determinação de AFLB ₁	117
6.2.4.3 Estudo da Influência da Variação do pH.....	117
6.2.4.4 Estudo da Quantidade de Modificador.....	117
6.2.4.5 Estudo do tempo e potencial de condicionamento do eletrodo	118
6.2.4.6 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade	118
6.2.5 Construção da Curva Analítica.....	118
6.2.6 Amostra Real.....	118
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
6.3.1 Caracterização do Compósito AuGQD.....	119
6.3.2 Comportamento eletroquímico da AFLB ₁	123
6.3.3 Otimização da Metodologia Analítica	129
6.3.3.1 Avaliação do pH.....	129
6.3.3.2 Avaliação da Quantidade de Modificador	131
6.3.3.3 Avaliação do Potencial e Tempo de Condicionamento.....	132
6.3.4 Curva analítica e Análise da Amostra	135
6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	136
7 ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO ELETROQUIMICAMENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE FENAMIFÓS.....	139
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	139
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	139
7.2.1 Reagentes e Soluções	139
7.2.2 Síntese e Caracterização do GO.....	140
7.2.3 Procedimento Voltamétrico e Formação do ERGO.....	141

7.2.4 Otimização da Metodologia Analítica	142
7.2.4.1 Comportamento eletroquímico do FNP e Avaliação da potencialidade do ERGO-SPE como sensor para a determinação de FNP	142
7.2.4.2 Estudo da Influência da Variação do pH.....	142
7.2.4.3 Estudo do Número de Ciclos de Eletrodeposição	142
7.2.4.4 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade	143
7.2.5 Construção da Curva Analítica e Análise da Amostra.....	143
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	143
7.3.1 Caracterização do Óxido de Grafeno e Formação do ERGO.....	143
7.3.2 Comportamento Voltamétrico do Fenamifós	148
7.3.3 Otimização da Metodologia Analítica	152
7.3.3.1 Avaliação do pH.....	152
7.3.3.2 Avaliação do Grau de redução do ERGO.....	153
7.3.3.3 Comparação de técnicas	154
7.3.3.4 Parâmetros da técnica de Voltametria de Onda Quadrada	155
7.3.4 Curva analítica e Análise da Amostra	158
7.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	162
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	164
REFERÊNCIAS.....	166
ANEXO 1.....	184
ANEXO 2.....	185

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A ação do homem no meio ambiente - influenciado pela necessidade de suprir as melhorias requisitadas nos processos da vida cotidiana, os quais são impulsionados pelo crescente populacional e busca pelo bem-estar e saúde - tem extrapolado limites e regulamentações estabelecidas por órgãos ambientais, que prezam pela proteção e manutenção do ecossistema. A principal consequência relacionada a tal interferência é a exposição diária e contínua de toda a cadeia alimentar a um grande número de compostos, naturais ou sintéticos, os quais têm seu destino final o meio ambiente [1,2].

Pesquisas recentes revelam a presença de contaminantes ambientais importantes que não eram conhecidos anteriormente. Muitos dessas espécies não têm toxicidade aguda como alguns contaminantes tradicionalmente conhecidos – espécies metálicas, por exemplo – mas exercem seus efeitos de maneira mais sutil e a longo prazo, por exemplo, através de alterações do sistema endócrino ou carcinogenicidade.

Tendo em vista que o emprego ou a presença de tais substâncias é inevitável, e a fim de minimizar seus efeitos para o homem e meio ambiente, a criação de dispositivos cada vez menores, mais robustos e seletivos para a determinação química de espécies de interesse constitui um dos grandes desafios da química analítica atual. Frente a isto, estratégias rápidas e sensíveis que identificam as amostras mais rapidamente, para que ações possam ser tomadas de maneira mais rápida, reduzindo custos e melhorando os serviços analíticos, são características primordiais.

Sendo assim, é importante contar com novas tecnologias analíticas que permitam um aumento no número de análises dos diversos tipos de poluentes, principalmente a um custo acessível. Sensores eletroquímicos representam uma ferramenta promissora devido às suas características únicas, tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento *in situ*.

Os procedimentos empregando técnicas eletroanalíticas compreendem um conjunto de métodos baseados em propriedades elétricas e fenômenos de interface, que podem ser utilizadas para a determinação e quantificação de espécies de

interesse. Nos últimos anos, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido uma das áreas de maior avanço dentro da Química Analítica, tendo merecido inúmeras revisões na literatura [3,4].

A ampla gama de aplicação de sensores eletroquímicos está ligada ao fato de sua construção extremamente versátil, podendo-se obter diversos arranjos de eletrodos, fabricados com diferentes dimensões e a partir de matérias primas diversas. [5–7] A construção de dispositivos quimicamente modificados, os quais possibilitam o controle da natureza físico-química da interface eletrodo-solução alterando a reatividade do sensor (promovendo apenas as reações de interesse), bem como a seletividade e a sensibilidade, podem ser uma alternativa para atender as demandas necessárias para as análises de maior apelo [8,9].

Dentre os materiais que podem ser utilizados como modificadores de sensores eletroquímicos, os nanomateriais de carbono vêm ganhando destaque e sendo continuamente descritos na literatura devido às suas propriedades físico-químicas, que melhoram as interações com as moléculas alvo, gerando sensores com baixos limites de detecção e elevada sensibilidade. Diferentes nanoestruturas de carbono têm sido utilizadas na construção de sensores e biossensores eletroquímicos como, por exemplo, grafeno e nanotubos de carbono [10,11].

Nesta tese de doutorado, diferentes nanomateriais de carbono utilizados para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos foram investigados. Além da construção, foi avaliada também a possibilidade de aplicação destes sensores, como prova conceito, frente à diferentes classes de contaminantes, como hormônios, micotoxinas e agrotóxicos, explorando as diferentes matrizes em que podem ser encontrados.

Para melhor organização, esta tese foi dividida em capítulos, dos quais o capítulo 1 faz uma introdução e revisão bibliográfica dos principais aspectos de nanomateriais de carbono para eletroanálise e das espécies estudadas.

O capítulo 2 esclarece, então, o objetivo geral no qual foi baseado todo o desenvolvimento desta tese, e os demais capítulos compreendem objetivos específicos, parte experimental e discussão de resultados correspondentes a cada procedimento experimental desenvolvido.

1.1 NANOMATERIAIS DE CARBONO PARA ELETROANÁLISE

A essência da nanociência e nanotecnologia está no fato de que as propriedades dos materiais (ópticas, magnéticas, elétricas, catalíticas, etc.) dependem não só de sua composição e estrutura, mas também do seu formato e tamanho. A obtenção de novos materiais em escala nanométrica despertou o interesse da comunidade científica devido ao grande número de aplicações possibilitadas pelas propriedades melhoradas observadas apenas com o controle do tamanho das partículas.

Os avanços na área provocaram o acelerado desenvolvimento da eletroanálise em direção a detecções altamente sensíveis e seletivas. Estes novos nanomateriais com propriedades físicas e químicas únicas, sintetizados e consolidados a partir dos anos 2000, e aplicados para eletroanálise, possibilitaram estudar qualitativa e/ou quantitativamente as mudanças de composições e estruturas de sistemas, permitindo novas inspirações científicas e aplicações. [12–14] A elevada área superficial, relativo baixo custo, aumento da sensibilidade e seletividade através de processos eletrocatalíticos e possibilidade de funcionalização química são características relevantes justificadas para a aplicação desta classe de materiais emergentes.

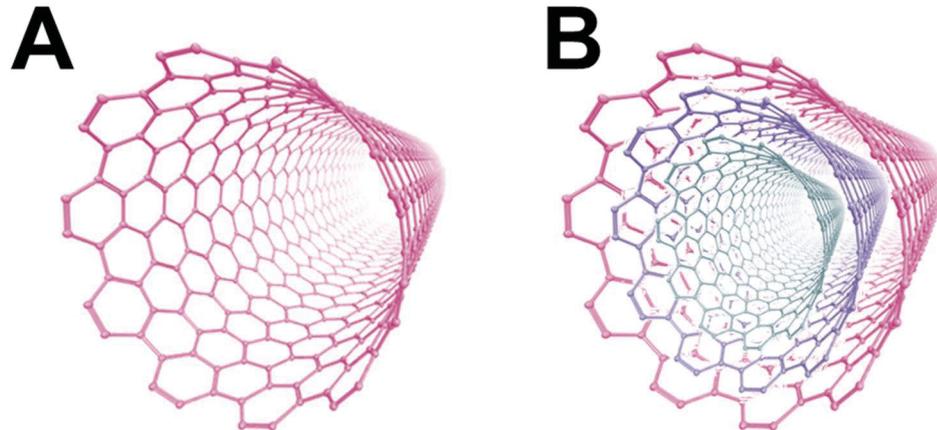
Destes novos materiais, os nanomateriais de carbono são considerados excelentes estratégias no preparo de superfícies de sensores, sendo que a união destas duas vertentes da química possibilitou a criação de procedimentos hábeis para aplicações destes dispositivos em diferentes áreas de diagnóstico clínico, segurança alimentar e ambiental [15–17].

1.1.1 Nanotubos de Carbono

Os Nanotubos de Carbono (CNTs) são arranjos hexagonais de carbono que originam pequenos cilindros, que podem ter as extremidades fechados por um tipo de “abóboda” e usualmente com diâmetro de dimensões nanométricas e comprimento de até centímetros, o que confere a esta classe elevada razão de aspecto [18,19]. Dois tipos de CNTs podem ser definidos: os de parede múltipla – nos quais várias folhas de grafeno se enrolam de forma concêntrica – e os de parede simples – formados pelo enrolamento de uma única folha de grafeno (FIGURA 1). Diversas rotas de obtenção

os CNTs, como deposição química de vapor, ablação a laser, entre outros, já são bem fundamentados na literatura [10,20].

FIGURA 1 – ESTRUTURAS IDEALIZADAS PARA NANOTUBOS DE CARBONO DE A) PAREDE ÚNICA; E B) PAREDES MÚLTIPLAS.



FONTE: A Autora (2019).

Desde a primeira publicação a respeito, em 1991, por Iijima [21], os nanotubos de carbono têm sido reconhecidos como um importante nanomaterial para a concepção de sensores e biossensores eletroquímicos. Eles possuem um forte efeito electrocatalítico, uma rápida taxa de transferência de elétrons, condutância elevada, boa estabilidade química e biocompatibilidade [22,23], e por isso a aplicação dos CNTs no desenvolvimento de sensores vem sendo continuamente descrito na literatura [20,24–26].

O tratamento oxidativo de nanotubos de carbono através de suas paredes e extremidades tem sido visto como uma forma de explorar ainda mais o potencial deste material na construção de dispositivos eletroanalíticos. Os CNTs tratados podem apresentar propriedades eletrônicas e mecânicas que diferem dos nanotubos não tratados e isto garante diferentes possibilidades de aplicações dentro da eletroanálise [27–29].

Diferentes revisões literárias abordam o tema tratamento oxidante de CNTs [23,30–32], e descrevem que a funcionalização é realizada a fim de adicionar grupamentos (como hidroxilas, carboxilas e aminas, etc.) na superfície e extremidades do material, a qual é possível uma vez que, estruturalmente, os tubos não são perfeitos, e a presença de domínios eletronicamente reativos principalmente nas

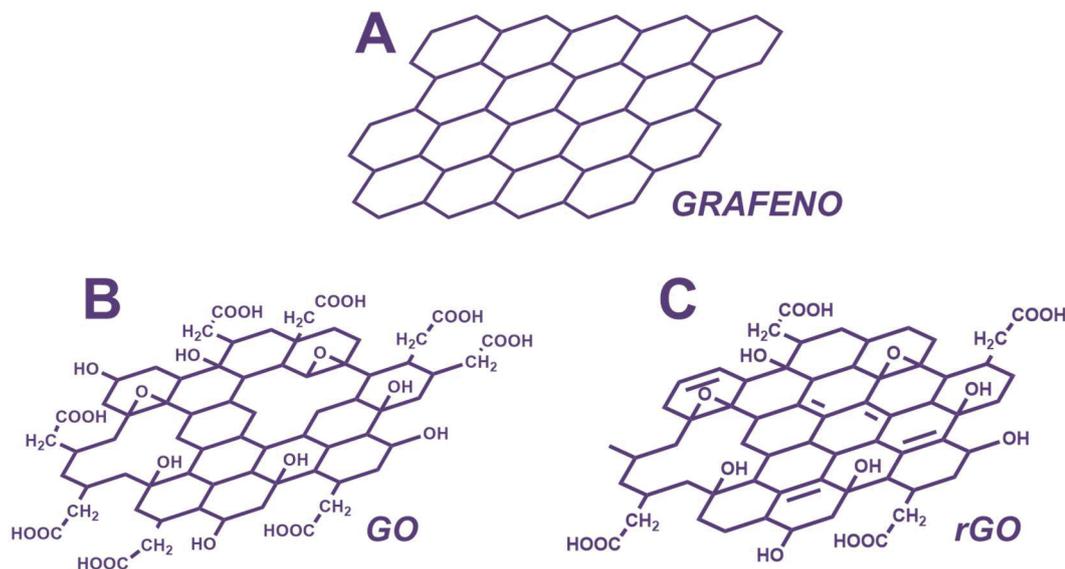
extremidades, faz com que essa inserção de grupos seja possível. A presença destes grupos permite que este material seja empregado, por exemplo, como suporte de outras moléculas de interesse, formando um compósito de novas características [33].

1.1.2 Grafeno e Derivados

O grafeno é considerado como o bloco de construção fundamental para nanomateriais de carbono. Consiste em uma monocamada de átomos de carbono covalentemente ligados entre si com hibridização sp^2 formando um arranjo hexagonal, cujos elétrons deslocalizados são responsáveis pela elevada condutividade elétrica deste material. Além desta, a área superficial, umas das maiores obtidas para materiais a base de carbono, também torna essa material atrativo [34,35].

A FIGURA 2 traz uma representação da estrutura do grafeno e alguns derivados.

FIGURA 2 – ESTRUTURAS IDEALIZADAS A) GRAFENO, B) ÓXIDO DE GRAFENO, E C) ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO.



FONTE: A Autora (2019).

Apesar das excelentes características do grafeno, sua utilização direta para muitas aplicações pode ser não possível, devido a dificuldades e limitações na manipulação do material e assim diferentes estratégias para a obtenção de materiais derivados de grafeno são empregadas, obtendo-se materiais com características diferenciadas e maior aplicabilidade.

O óxido de grafeno (GO) pode ser descrito como uma, ou mais, folha de grafeno que possui em sua superfície diferentes grupos funcionais oxigenados ligados covalentemente [36–38], os quais são os responsáveis pela hidrofiliabilidade do material. Em relação ao grafeno, que possui somente carbonos sp^2 conjugados em sua estrutura, a principal desvantagem do GO é baixa condutividade, uma vez que as ligações covalentes geradas pela presença dos grupos oxigenados geram domínios sp^3 e defeitos na estrutura deste material, que interrompem a conjugação e dificultam a transferência eletrônica. [38]

O óxido de grafeno reduzido (RGO) consiste no material obtido após uma etapa de redução do precursor, podendo ter sua estrutura carbonos em hibridização sp^2 conjugados, em sua maioria, restaurada, o que faz com que esse material tenha uma melhor condutividade elétrica que seu precursor. Isso porque, no processo de redução ocorre a retirada dos grupamentos oxigenados presentes no GO, e com isso os domínios sp^3 tornam-se sp^2 . Apesar de ter sua estrutura reestabelecida, ainda não foi possível obter uma amostra de RGO que apresentasse, novamente, as propriedades do precursor grafeno, uma vez que grupos oxigenados e defeitos na estrutura ainda são observadas após o processo de redução, acarretando assim em diferenças estruturais e eletrônicas. [38] O RGO pode ser obtido pela ação de agentes redutores químicos, alguns exemplos incluem borohidreto de sódio ($NaBH_4$) e hidrazina (N_2H_4), etc.[39,40] e também por rotas térmicas. [41]

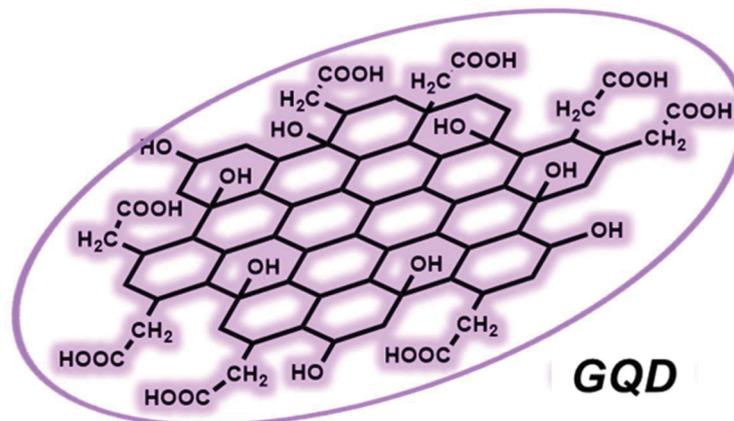
Ainda, o óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido (ERGO) pode ser obtido a partir da aplicação de potencial ao/em meio de GO através de técnicas voltamétricas e cronoamperométricas [42–44]. Em termos de frequência analítica, a redução eletroquímica do GO se apresenta mais atrativa e fácil, principalmente quando aplicado à modificação de eletrodos, uma vez que o ERGO já será formado na superfície desejada, não necessitando de etapas extras, evitando possíveis contaminações, estando pronto para sua utilização [39]. Outro atrativo está no fato de poder controlar e modular o grau de redução do GO em função das condições experimentais – como número de ciclos ou potencial/tempo aplicados, ajustando as propriedades do ERGO em relação a aplicação final do dispositivo. Os materiais obtidos através da síntese eletroquímica são obtidos de maneira mais rápida, eficiente e com maior reprodutibilidade. [42,45]

1.1.3 Quantum Dots a base de Carbono

Outro nanomaterial que vem sendo empregado como modificador de eletrodos são os chamados *quantum dots* (QDs) à base de carbono, constituídos por *quantum dots* de grafeno (GQDs) e *quantum dots* de carbono (CQDs), que são uma nova classe de nanomateriais de carbono obtidos durante a purificação de nanotubos de carbono com parede simples, em 2004 por Xu e colaboradores [46]. Tradicionalmente, os QDs são materiais de tamanho nanométrico obtidos a partir de um material semicondutor, em que os pares elétron-buraco são confinados nas três dimensões espaciais. [47] Em comparação com os tradicionais, os QDs à base de carbono são superiores em termos de solubilidade em água, robustez química e facilidade de modificação. Além disso, apresentam menor toxicidade e maior biocompatibilidade [48,49].

Os GQDs, uma das classes de QDs à base de carbono (FIGURA 3), são fragmentos de grafeno, de tamanho reduzido, que exibem características melhoradas devido ao fenômeno de confinamento quântico e efeitos de borda. Tipicamente, os GQDs têm diâmetro abaixo de 20 nm e unem as características inerentes dos QDs com o excelente desempenho apresentado pelo grafeno [47]. Normalmente, os GQDs apresentam grupos oxigenados remanescentes nas bordas, que conferem elevada solubilidade em água e possibilidade de posterior funcionalização, além de possuírem elevada área superficial e elevada condutividade elétrica que implica na melhoria dos processos de transferência eletrônica, entre outras características. Estas propriedades os tornam muito desejáveis para diferentes aplicações em comparação com os QDs inorgânicos [47,50].

FIGURA 3 – ESTRUTURA IDEALIZADA PARA GRAFENO QUANTUM DOTS.



FONTE: A Autora (2019).

As possibilidades de síntese dos QDs podem ser divididas em duas principais categorias: *top-down* e *bottom-up*, amplamente discutidas na literatura. [47,51] O primeiro grupo envolve a fragmentação de materiais *bulk*, como folhas de grafeno, nanotubos de carbono, fibras de carbono ou grafite em pequenos pedaços de grafeno *quantum dots*, enquanto nos métodos *bottom-up*, pequenas moléculas são usadas como materiais de partida para construir os QDs. Na literatura podem ser encontrados muitos trabalhos empregando QDs em diversas áreas, como sensor óptico [52], para dispositivos fotônicos e eletrônicos [50], biomarcadores [53,54], *drug-delivery* [55], além de sensores eletroquímicos [56–59].

1.1.4 Nanomateriais de Carbono Funcionalizados

A funcionalização de um material consiste em uma etapa de ligação entre elementos externos aos átomos superficiais do material carbonáceo. A introdução de outros grupos e compostos de interesse acarreta na modificação de características superficiais desse novo material. Como resultado, a partir da combinação das propriedades dos nanomateriais de carbono com as propriedades e funções de diversos outros componentes, novos materiais e sistemas analíticos inovadores podem ser criados, proporcionando novas oportunidades para o progresso das análises químicas. Os objetivos da funcionalização vão desde aumentar a solubilidade do material, melhorar a estabilidade e sensibilidade do compósito, até imobilizar grupos eletroativos de interesse.

As possibilidades de rotas de funcionalização de nanomateriais já são bem descritas e consolidadas na literatura [60,61] e ocorrem em duas abordagens principais: funcionalização covalente e funcionalização não covalente.

Na funcionalização covalente, os grupos funcionais de oxigenados presentes nos nanomateriais, incluindo grupos ácido carboxílico na borda e grupos epóxi / hidroxila no plano basal, podem ser utilizados para alterar a funcionalidade superficial do material [40,62,63]. Para tal, necessita-se realizar a ativação dos grupos, carboxílicos por exemplo, utilizando moléculas específicas que posteriormente são substituídas pela molécula de interesse. Uma das rotas mais empregadas é pela ativação com moléculas como N-Hidroxisuccinimida (NHS) e cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida (EDC), que permitem a formação de uma ligação covalente, por substituição, entre a molécula de interesse e o grupo

carboxílico, fornecendo uma imobilização mais estável, com amidas ou ésteres. Além dos ácidos carboxílicos, os grupos podem ser facilmente modificados através de reações de abertura de anel sob diferentes condições, em um mecanismo que envolve um ataque nucleofílico no carbono- α pela amina.

A rota de funcionalização não covalente se utiliza das interações fracas (isto é interação π - π , interações de Van der Waals e interação eletrostática) entre o nanomaterial e as moléculas de interesse. A rede sp^2 presente nas estruturas dos CNTs, GO, ERGO e GQDs fornece interações π - π com compostos aromáticos e outros que sejam passíveis de tal interação, que podem estabilizar o compósito formado, produzindo materiais funcionais [64].

A flexibilidade na modificação e funcionalização da superfície de nanomateriais através das diferentes rotas abriu uma gama de possibilidades para aplicações na área de sensores eletroquímicos [61,65–67].

Uma das características mais atrativas da funcionalização de materiais de carbono, é que esta pode ser modulada em função da aplicação final do dispositivo. Isso porque, diferentes grupos e espécies podem ser imobilizadas na superfície do material, desde espécies inorgânicas, como nanopartículas metálicas, como espécies orgânicas e biomoléculas. A área superficial e os grupos funcionais podem oferecer oportunidades especiais para a adsorção, ligação e aprisionamento de diferentes moléculas.

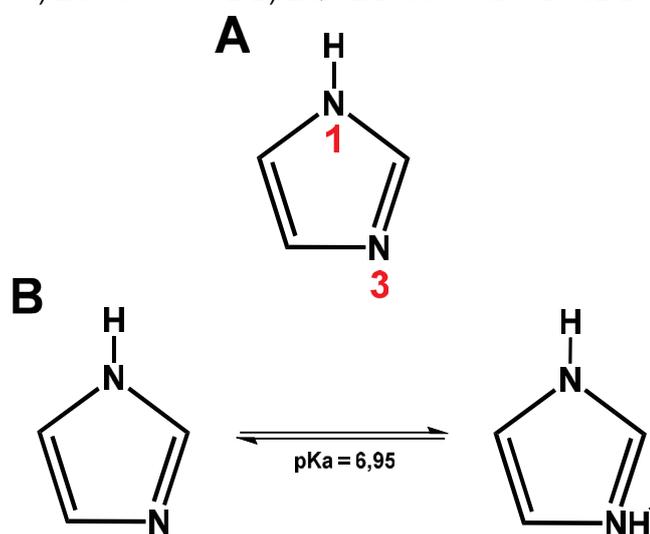
Uma gama diversificada de moléculas pode ser empregada para a funcionalização de nanomateriais, porém no contexto dessa tese serão abordadas as espécies empregadas, o imidazol e nanopartículas de ouro, discutidas a seguir.

1.1.4.1 Imidazol

O imidazol (FIGURA 4A, IMZ) é uma amina aromática heterocíclica de cinco membros derivado do grupo dos azóis, com três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3, existindo em duas formas tautoméricas equivalentes, porque a carga positiva pode estar localizada em qualquer um dos dois átomos de nitrogênio. Este sistema de anel está presente em importantes blocos de construção biológicos, como a histidina e o hormônio relacionado à histamina. É uma importante fonte de interesse para uma variedade de agentes medicinais, e seus derivados mostram várias atividades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, analgésica,

antifúngica, antibacteriana, etc., além de participar de diferentes processos biológicos [68–70].

FIGURA 4 – A) ESTRUTURA E B) EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE DO IMIDAZOL.



FONTE: A Autora (2019).

Por conta de suas características estruturais, é possível considerar o IMZ como uma molécula que possui propriedades híbridas de pirrol e piridina, podendo tomar a forma ionizada com $pK_a = 6,95$, e isto torna essa molécula de imensa versatilidade (FIGURA 4B). Em pH fisiológico o imidazol pode estar presente em ambas as formas, neutra (base) ou protonada (ácido), podendo atuar como catalisador ácido geral, ou como nucleófilo – que é a aplicação mais comum [71].

1.1.4.2 Nanopartículas de Ouro

O uso de eletrodos metálicos como sensores eletroquímicos já é bastante difundido na comunidade científica, e o uso desses materiais na forma de nanopartículas como material catalítico utilizado para esta finalidade é algo que vem sendo bastante explorado, gerando interfaces funcionais de detecção eletroquímica [72,73].

Estudos mostram que as nanopartículas em sistemas ideais são capazes de formar arranjos uni, bi e tridimensionais, que quando aglomeradas possuem propriedades físicas e químicas diferentes das nanopartículas isoladas e do equivalente macroscópico [74–76]. A redução de um eletrodo para a escala

nanométrica melhora consideravelmente o transporte de massa devido à contribuição da difusão radial e à diminuição da razão sinal/ruído por apresentar baixa resistência interna [77,78].

Nanopartículas de ouro (AuNPs) estão entre os nanomateriais mais extensivamente estudados. Desde o primeiro relato de ouro coloidal em 1857 por Faraday [79], muitos procedimentos diferentes para a obtenção de AuNPs foram desenvolvidos. Apresentam propriedades eletrônicas, óticas e químicas muito atraentes para várias aplicações tecnológicas nas áreas de desenvolvimento da nanoeletrônica, sensores, ótica e catálise. Dentre as propriedades desses nanomateriais, destacam-se a área superficial específica e a elevada atividade catalítica que está associada ao seu tamanho e composição [80–82].

Diferentes abordagens são descritas para a síntese de AuNPs [83–85], realizadas a partir redução dos sais de ouro. Tipicamente, é necessário que um agente estabilizante esteja presente durante a redução para evitar a agregação das nanopartículas à medida que elas são formadas. A redução dos sais precursores de ouro pode ser realizada quimicamente usando um agente redutor tal como citrato, descrito por Turkevich e colaboradores [86], ou borohidreto, como descreve Brust e colaboradores [87]. Além disso, variações de parâmetros durante a realização rotas sintéticas, como proporções de redutor/passivante [88,89] são fatores que afetam diretamente as propriedades das NPs geradas, como tamanho e morfologia por exemplo.

Muitas sínteses de nanopartículas coloidais são conhecidas, e em trabalhos recentes são dedicadas à síntese de NPs especificamente para a construção de dispositivos eletroquímicos nanoestruturados [90]. É sabido que as propriedades eletroquímicas dependem criticamente de seu tamanho e forma, que por sua vez dependem diretamente natureza e quantidade do passivante [76,89], sendo que, normalmente, quando rotas químicas são empregadas a presença de tais passivantes é inevitável para a integridade das características morfológicas das NPs.

Assim, a remoção de tais reagentes das rotas sintéticas torna-se um desafio chave para a construção de sensores a base de NPs em dispositivos funcionais. Uma estratégia é a formação de compósitos entre NPs e outros nanomateriais que geram materiais multifuncionais com propriedades provenientes de seus componentes individuais e de suas interações sinérgicas. Ao incorporar NPs em compósitos com nanomateriais de carbono (CNT, ERGO GQD, etc.), por exemplo, estes apresentam

a versatilidade de agir como passivante/estabilizantes – e por vezes como agente redutor – das NPs, além de exibir ainda excelentes características para a construção de sensores [91–93].

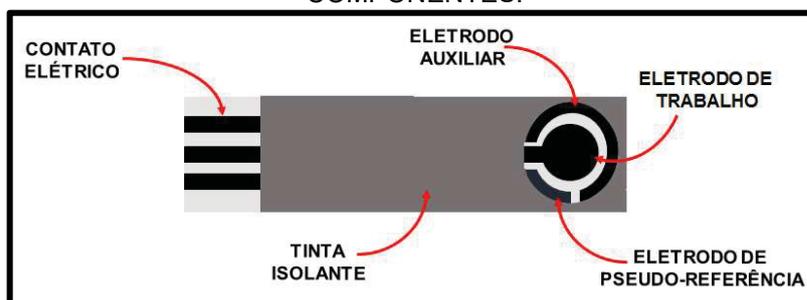
1.1.5 ELETRODOS BASE DE CARBONO

Os eletrodos de carbono, no geral, são bastante empregados para a eletroanálise, possuindo propriedades mecânicas interessantes, além de ampla faixa de potencial de trabalho, são inertes quimicamente, são passíveis de modificação superficial e apresentam relativo baixo custo. Várias são as possibilidades de plataformas a base de carbono que podem ser empregados como superfície eletródica, dos quais carbono vítreo e eletrodo de carbono impresso serão detalhadas.

O carbono vítreo é um material obtido por meio da carbonização de resinas termorrígidas, a pelo menos 1000 °C, que origina um material com excelentes valores de condutividades elétrica, térmica e biocompatibilidade, fatos que possibilitam a aplicação deste em eletroquímica.

Outra modalidade de emprego do carbono, como eletrodo base para aplicação em análises eletroquímicas é a impressão de tintas à base de carbono para a fabricação dos chamados eletrodos impressos (*Screen-Printed Electrode* – SPE). Estes são arranjos do sistema convencional de três eletrodos, eletrodo de referência (RE), eletrodo auxiliar (CE) e eletrodo de trabalho (WE), em um único suporte, de maneira miniaturizada, que pode ser definido como um filme condutor que é depositado sobre um suporte inerte, geralmente de cerâmica ou um polímero como PVC. Sobre esse filme condutor, é adicionado uma camada de uma tinta inerte a fim de delimitar a área do eletrodos [94]. Na FIGURA 5 está ilustrado um eletrodo impresso com suas partes constituintes, semelhante ao SPE empregado nesse trabalho.

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELETRODO IMPRESSO E SEUS COMPONENTES.



FONTE: A Autora (2019).

Os SPEs apresentam diversas vantagens quando comparados a arranjos convencionais de eletrodos, como a utilização de volumes reduzidos de amostras, baixo custo e descartabilidade, o que pode evitar problemas de contaminação ou envenenamento da superfície. O reflexo de tais vantagens pode ser visto em seu desempenho, os quais apresentam elevada sensibilidade em experimentos eletroanalíticos, elevada relação sinal/ruído, possibilidade de análises em um curto intervalo de tempo, e principalmente possibilitando a aplicação de técnicas eletroquímicas fora de laboratórios centralizados. [5,94–96] O grande leque de possibilidade de sua utilização para os mais diversos fins está ligado ao fato de que sua construção é extremamente versátil, podendo-se obter os mais diversos arranjos de eletrodos, fabricados a partir de diferentes dimensões e matérias primas [5–7].

1.1.6 ESPÉCIES ESTUDADAS

A presença de contaminantes orgânicos no meio ambiente e em alimentos têm se tornado uma grande preocupação devido aos efeitos nocivos que podem causar aos seres vivos. Tais espécies apresentam-se desde substâncias sintéticas como fármacos hormonais e agrotóxicos empregados na agricultura para o controle de pragas, bem como toxinas que são encontradas naturalmente em alimentos, como as micotoxinas. Independente da forma como são expostos ao meio ambiente e aos seres humanos, todas essas espécies têm potencial tóxico e são considerados de atenção emergente.

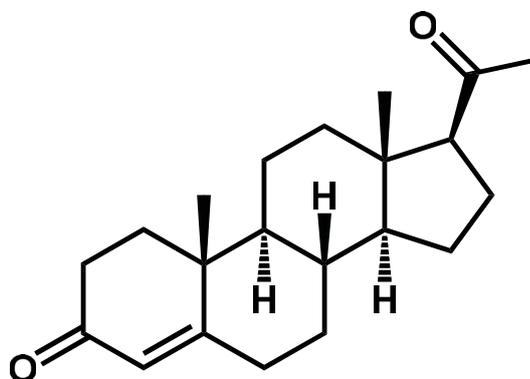
1.1.6.1 Hormônios

De acordo com a definição, adotada por diferentes comunidades científicas [97], um disruptor endócrino (DE) **"é uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino, causando efeitos adversos na saúde de um organismo ou sua progênie ou (sub)população"**. Ou seja, a estas substâncias são atribuídas capacidades de perturbar o sistema endócrino, simulando a ação de hormônios naturais, agindo como inibidores ou alterando funções regulares normais do sistema endócrino, danificando também os sistemas imunológico e nervoso [98,99].

Entre os grandes grupos de disruptores endócrinos, os hormônios esteroidais – naturais ou sintéticos – são os principais contribuintes para a atividade perturbadora endócrina [100,101] e são de particular interesse devido ao seu elevado potencial perturbador em concentrações na ordem de pg L^{-1} a ng L^{-1} [102–104].

A progesterona (FIGURA 6, P4) é o progestagênio mais importante nos seres humanos, apresentando um papel importante na estabilização e manutenção do período de gestação em mamíferos, atuando também na rota sintética de vários esteroides biologicamente ativos. Na ausência da progesterona, a gestação torna-se impossível, pois não ocorre implantação do embrião no útero ou o embrião é abortado. Por outro lado, a gestação também não ocorre quando grandes doses de progesterona são reintroduzidas [15,105].

FIGURA 6 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA PROGESTERONA.



FONTE: A Autora (2019).

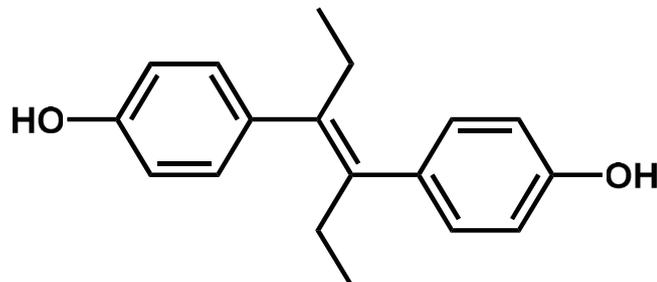
O desequilíbrio desse hormônio no organismo, que pode ter como causa principal a exposição contínua e persistente, pode causar problemas de infertilidade e

má formação do sistema reprodutivo. A exposição cumulativa pode levar a consequências a longo prazo, como apontado por alguns estudos relacionados a efeitos neurológicos graves, falhas de desenvolvimento, reprodutivo e imunológico, bem como genotoxicidade e carcinogenicidade [15,106]. A Farmacopeia Brasileira recomenda que o doseamento de progesterona em fármacos seja feito por espectrofotometria de absorção no ultravioleta [107].

Outro hormônio estudado nesse trabalho é o dietilestilbestrol (FIGURA 7, DES), um estrogênio sintético desenvolvido por Charles Dodds e colaboradores em 1938 [108]. Alguns estudos apontam que a atividade estrogênica deste estilbeno é dez vezes mais potente do que o estrogênio natural, 17- β -estradiol. O DES era prescrito inicialmente, entre 1940 a 1971, para mulheres grávidas, no intuito da redução de complicações durante o período de gravidez e parto prematuro, além de ser utilizado para evitar possíveis abortos [103,109]. Estudos da época demonstraram que a utilização do DES estava associada com o aparecimento de carcinoma de células claras, um tumor vaginal raro ocorrendo em meninas e mulheres que haviam sido expostas a este medicamento no útero. Após estes estudos, a FDA suspendeu a aplicação do hormônio para mulheres grávidas [110].

Recentemente, estudos confirmam as suspeitas da relação entre a exposição *in útero* das filhas do DES com o desenvolvimento de câncer de ovário, além de outros distúrbios como infertilidade e ocorrência de abortos espontâneos. Além disso, estão relacionados, também, casos de câncer de testículo e infertilidade para aqueles filhos de mães que ingeriram o DES durante a gravidez. Este é o primeiro exemplo de uma substância química que, quando administrada à mãe, pode causar efeitos ao bebê [103,111,112].

FIGURA 7 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO DIETILESTILBESTROL.



FONTE: A Autora (2019).

Além da utilização para fins medicinais, sendo comumente utilizado no tratamento da síndrome da menopausa e como método contraceptivo feminino, de ser empregado em formulações de produtos de cuidado pessoal [113], o DES também é bastante utilizado como anabolizante na pecuária em diversos países, devido às vantagens econômicas. Alguns dos principais países produtores de carne bovina fazem uso de anabolizantes a fim de aumentar a produção de carne [114–116]. As metodologias para a determinação de DES, recomendados pelas farmacopeias Britânica e Americana, utilizam Cromatografia Líquida (LC) e Espectrofotometria na Região do UV-Vis [117,118].

Na literatura, diversos trabalhos para a determinação desses hormônios são descritos, em sua maioria empregando técnicas cromatográficas como cromatografia líquida com um detector de fotodiodos [119], cromatografia em camada delgada [120], cromatografia em fase gasosa [121] e cromatografia líquida [122,123] acopladas ao detector de massas, além de procedimentos baseados em quimiluminescência [124,125] e diferentes abordagens de imunoenaios [126,127].

Em relação às metodologias eletroanalíticas, a maioria são baseadas em emprego de biossensores [128–131], uma abordagem bastante interessante devido a sua elevada seletividade, agregada pela presença de um componente biológico, além de sensibilidade e baixos limites de detecção. Em contrapartida, a baixa estabilidade dos componentes biológicos além do custo elevado, são os principais motivos das pesquisas por novos materiais, como os descritos anteriormente, que possam ser empregados em substituição aos sensores convencionais.

1.1.6.2 Agrotóxicos

Outra classe estudada foi a dos agrotóxicos, que merece grande destaque e atenção devido ao uso generalizado e intensivo destes compostos, que tem gerado diversos problemas relacionados à saúde pública e ao desequilíbrio ambiental - intoxicação de agricultores, contaminação de alimentos, água e solos, etc. O desequilíbrio ecológico ocasiona problemas à própria agricultura, agravando o surgimento e proliferação de pragas e doenças e, conseqüentemente, maior necessidade de se utilizar estes compostos [132].

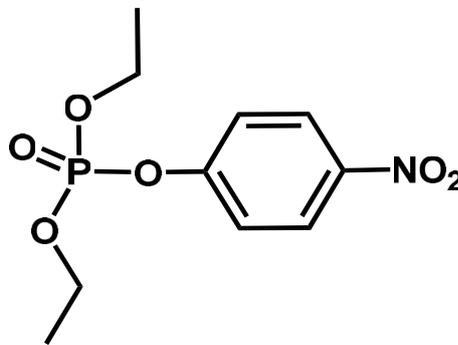
Essas substâncias podem ser absorvidas através da pele, por ingestão e inalação. Podem causar intoxicações agudas, com manifestações convulsivas,

dificuldade respiratória, entre outras. Porém, os efeitos a longo prazo, causados por intoxicação crônica, podem ser associadas a alterações cromossômicas e teratogênicas, infertilidade (ou problemas relacionados a fertilidade), além de ter características carcinogênicas, elevada neurotoxicidade, podendo causar doenças hepáticas, renais, etc. [133].

Entre os pesticidas mais utilizados e causadores de intoxicações ocupacionais estão os organofosforados, que estruturalmente contem, sem exceção, um átomo central de fósforo penta valente ao qual está ligado um átomo de oxigênio ou enxofre mediante dupla ligação. São pertencentes à classe dos inibidores das enzimas colinesterases (ChEs), principalmente a acetilcolinesterase (AChE), tendo seu mecanismo de ação através da fosforilação do sítio ativo dessas enzimas, causando a inibição da atividade enzimática [134], ligação que tende a irreversibilidade caso não seja tratada.

Vários são os pesticidas pertencentes à classe dos organofosforados, dentre estes destaca-se o Paraoxon (FIGURA 8, PX), um inseticida com uma vasta gama de efeitos biológicos e elevada toxicidade [135].

FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DO PARAOXON.

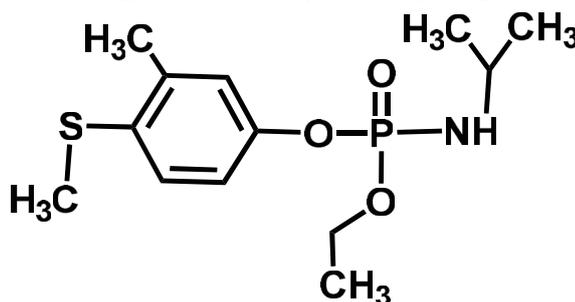


FONTE: A Autora (2019).

O paraoxon é um agente parassimpaticomimético que age como um inibidor da acetilcolinesterase, também é usado como medicamento oftálmico contra o glaucoma. É um dos mais potentes inseticidas inibidores da AChE disponíveis, tendo sua utilização quase nula devido ao risco de envenenamento para humanos e outros animais. Apesar disso, o último relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA [136] relatou a presença de PX em amostras de hortaliças [137].

O fenamifós (FIGURA 9, FNP), um pesticida amplamente utilizado como inseticida sistêmico e de contato contra nematoides do solo em campos de golfe e hortícolas em todo o mundo. Este pesticida é aplicado em vários estágios de crescimento de plantas, tais como pré-plantio, plantio, pré e pós-colheita em uma variedade de plantas incluindo tabaco, grama, banana, abacaxi, tomate e outras frutas, legumes e grãos [138].

FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DO FENAMIFÓS.



FONTE: A Autora (2019).

Geralmente, sob condições ambientais, o fenamifós pode ser oxidado principalmente ao sulfóxido, seguido de posterior oxidação a sulfona [139,140]. Estes produtos de oxidação têm atividade nematicida e toxicidade semelhante ao composto original, sendo o precursor classificado como extremamente tóxico devido ao seu risco potencial para a saúde humana [141], o que implica em uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos seguros, convenientes e viáveis para sua desintoxicação.

Os métodos tradicionais como a espectrofotometria no UV-Vis e colorimetria são normalmente utilizados para determinar a atividade enzimática baseada na inibição pelos pesticidas [142]. No entanto, os métodos eletroquímicos de análise surgem como alternativas de baixo custo e com o uso mínimo de reagentes para a determinação destes analitos em campo, apresentando boa precisão de respostas [143,144]. Uma abordagem comum envolve a medida da corrente de oxidação de tiocolina produzida a partir da hidrólise enzimática da acetiltiocolina (ASCh) pela AChE. Na presença de um composto organofosforado, a função da enzima é inibida limitando a produção de tiocolina. O grau de inibição é, portanto, correlacionado com a diminuição relativa da corrente de oxidação da tiocolina em relação a corrente medida na ausência de um inibidor [132].

A maior desvantagem do uso da ACh é a inibição irreversível causada pelos organofosforados em geral, o que pode levar a análises dispendiosas e demoradas [145]. Dessa forma, a busca por materiais que possam restaurar a atividade [146,147], ou mesmo, pode ser utilizada em substituição ao agente biológico tem sido a força motriz de muitos grupos de pesquisa nos últimos anos, conforme Jin e colaboradores [148] descreveram em uma recente revisão publicada.

1.1.6.3 Micotoxinas

O termo micotoxina (do grego *mykes* = fungo e do latim *toxican* = toxinas) é usado para designar um grupo de compostos produzidos por algumas espécies de fungos que as liberam, como metabólitos secundários, ao alcançarem a maturidade, que são responsáveis por algumas doenças, e até mesmo podem levar a óbito quando ingeridas pelo homem ou animais. Tais toxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimentos, uma vez que sua produção depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, ou estocagem do alimento. Contudo, o crescimento do fungo e a presença de toxinas não são sinônimos, pois nem todos os fungos produzem toxinas e as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram [149].

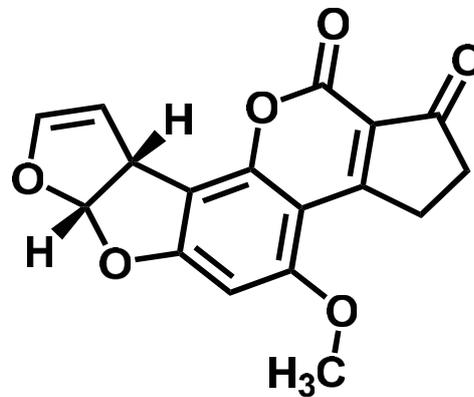
A história das micotoxinas teve início em 1960, quando um surto de mortes de aves no Reino Unido, especialmente perus, foi investigado. Tal episódio ficou mundialmente conhecido como *Turkey X Disease*. Após muito estudo, os pesquisadores chegaram à conclusão que o problema estava na ração utilizada na alimentação das aves, a base de amendoim, contaminada por uma substância fluorescente produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. Tal substância ficou conhecida e denominada como aflatoxina, derivada da expressão *A. flavus toxin* [149].

Os efeitos mais graves causados pela presença de micotoxinas no organismo humanos são crônicos, os quais tem difícil associação com o consumo de alimentos contaminados por tais substâncias e os principais são casos de câncer, lesão renal e depressão do sistema imune. A contaminação dos seres humanos por micotoxinas ocorre principalmente pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados de animais, tais como leite, queijo, carnes e outros produtos animais [150,151].

Atualmente conhecem-se cerca de 400 micotoxinas, mas apenas algumas destas são encontradas nos alimentos em quantidade suficiente para constituir um verdadeiro risco para a saúde pública [152]. Existem centenas de micotoxinas conhecidas, contudo, as mais estudadas, que comprovadamente têm propriedades tóxicas acentuadas e estão largamente distribuídas nos alimentos são as Aflatoxinas [153,154].

As Aflatoxinas são as micotoxinas mais amplamente estudadas, produzidas pelo fungo do gênero *Aspargillus*, e quimicamente são cumarinas substituídas dentre as quais a mais conhecida é a Aflatoxina B₁ (FIGURA 10, AFLB₁).

FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DA AFLATOXINA B₁.



FONTE: A Autora (2019).

A AFLB₁ é considerada o agente natural mais carcinogênico que se conhece e por isso, é a mais importante micotoxina no Brasil [155]. Exposição a baixas concentrações a longo prazo tem sido associada com doenças do fígado, como o câncer, cirrose, hepatite e icterícia, tanto em humanos como em animais, sendo consideradas como substâncias cancerígenas, genotóxicas e imunossupressoras [154].

A AFLB₁ não é fabricada comercialmente, sendo considerada um contaminante natural formado nos alimentos durante condições de elevada temperatura e umidade nas etapas de estocagem e transporte dos alimentos. A maior parte da exposição humana à AFLB₁ ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, sendo a quantidade estimada de consumo diário em 0,15 a 0,50 µg. Amendoim, nozes e malte estão entre os alimentos mais comuns em que esses fungos crescem. Carne, ovos, leite e outros produtos comestíveis de animais que consomem alimentos contaminados também podem conter AFLB₁ [156,157].

Tendo em vista a abordagem feita anteriormente, tem-se que a utilização de nanomateriais de carbono aliados a dispositivos eletroanalíticos dão origem a estratégias versáteis que podem ser empregadas para a determinação de diferentes classes de espécies de interesse. Sabendo da importância dessa classe de materiais, estes tiveram suas características estudadas, otimizadas e exploradas na construção de diferentes eletrodos modificados para a determinação de espécies de importância em diferentes âmbitos da sociedade atual, e os resultados obtidos para cada um desses estudos estão descritos nos capítulos a seguir.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese é desenvolver de metodologias eletroanalíticas para a determinação de espécies de interesse ambiental e farmacêutico, como pesticidas e hormônios, além de contaminantes naturais, como as micotoxinas, empregando dispositivos eletroquímicos a base de diferentes nanomateriais de carbono, tais como nanotubos, grafeno e derivados, e quantum dots.

CAPÍTULO 3

3 ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO FUNCIONALIZADO COM IMIDAZOL PARA A DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar eletrodos de carbono vítreo modificados com óxido de grafeno funcionalizado com imidazol (GOIMZ);
- Avaliar a potencialidade desse material para a determinação de progesterona (P4);
- Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de P4 empregando o dispositivo proposto, posterior construção da curva analítica e obtenção de parâmetros de mérito analítico;
- Aplicação da metodologia desenvolvida na análise de amostra farmacêutica e comparação com a metodologia oficial.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes e Soluções

A solução estoque de P4 $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada pela dissolução de uma quantidade do hormônio em etanol, estocada e mantida sob refrigeração até sua utilização. Diluições até as concentrações desejadas foram realizadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque ou pela adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica. Para os estudos foi empregado solução de hidróxido de sódio, 0,1 mol L⁻¹.

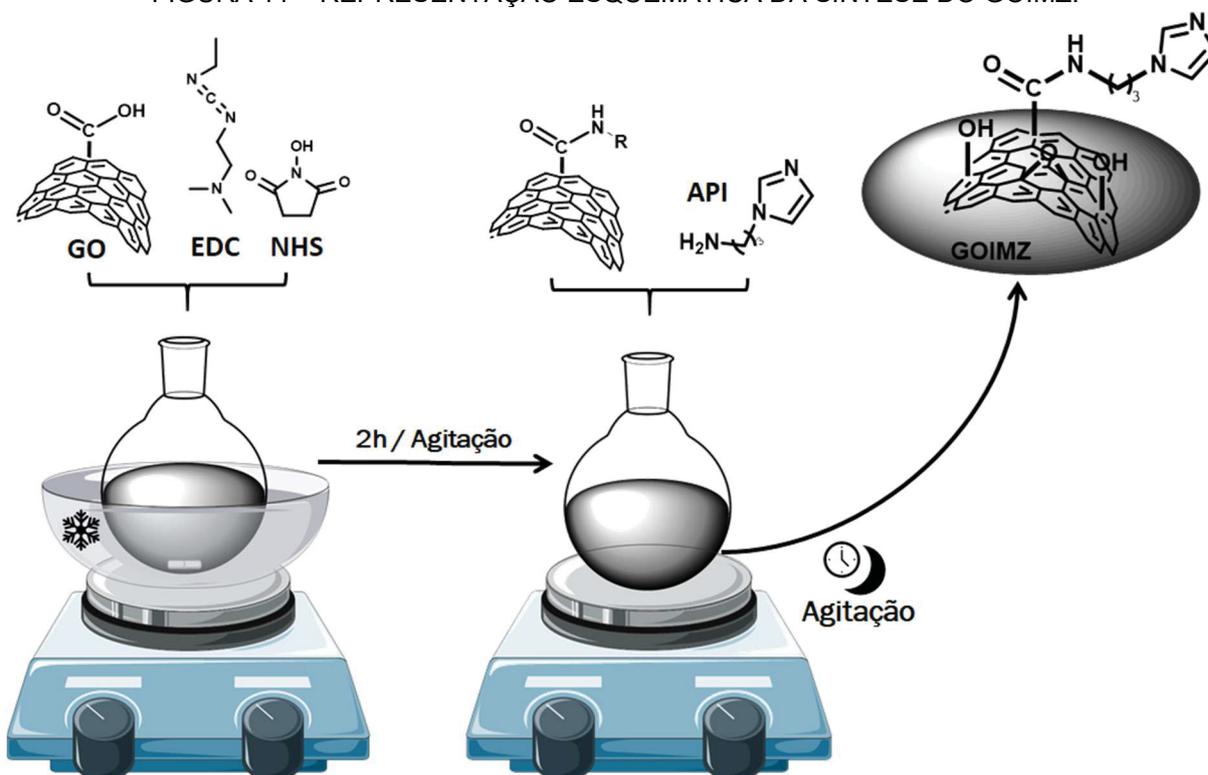
As suspensões do modificador empregadas nos estudos foram preparadas pela dispersão dos materiais em isopropanol, na concentração de 1 mg mL⁻¹, e armazenadas em vials, que posteriormente foram levados ao banho ultrassônico para homogeneização. Antes de cada modificação, as suspensões são submetidas ao banho durante 15 minutos.

3.2.2 Síntese do GOIMZ

O material foi obtido em colaboração com o Grupo de Cinética e Catálise (GCC), sob orientação da Prof. Dra. Elisa S. Orth, e com o Grupo de Química de Materiais (GQM), sob orientação do Prof. Dr. Aldo J. G. Zarbin, ambos do Departamento de Química da UFPR.

A síntese de GOIMZ foi realizada como descrito na literatura [158,159], conforme a FIGURA 11. Uma mistura de 1 mg mL^{-1} de GO, obtida pelo método modificado de Hummers, foi misturada com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS), em um balão redondo, sob banho de gelo, mexendo vigorosamente durante 2 h. Após este período, adicionou-se 1-(3-aminopropil) imidazol (API) à mistura e deixou-se a agitação durante a noite à temperatura ambiente. O produto sólido resultante (GOIMZ) foi separado por filtração, lavado repetidamente com água destilada e seco a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE DO GOIMZ.



FONTE: A Autora (2019).

O produto, GOIMZ, foi caracterizado por técnicas como a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

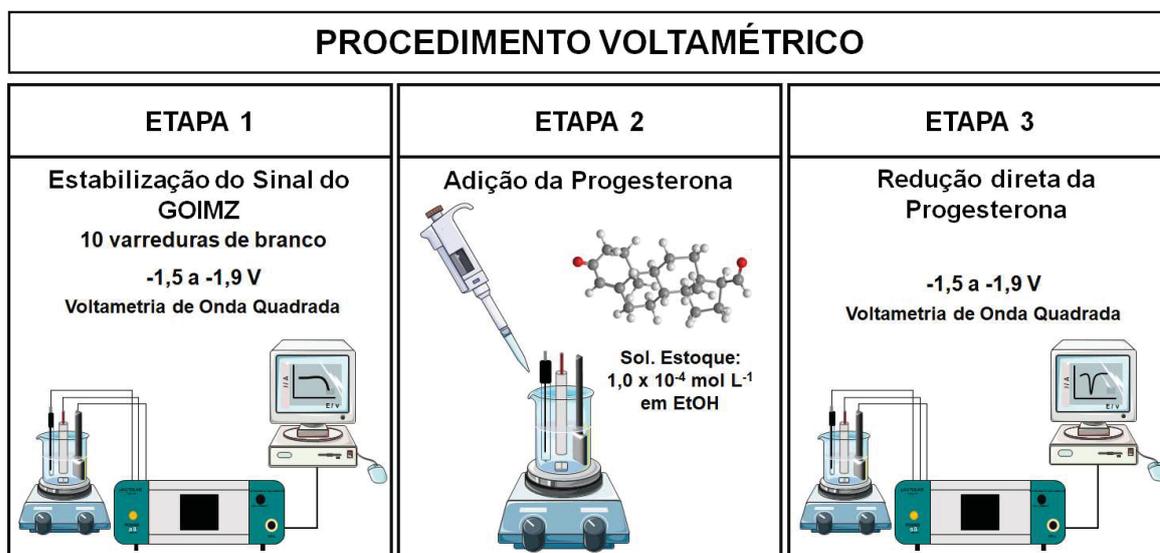
3.2.3 Modificação do Eletrodo e Medidas Eletroquímicas

O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo de carbono vítreo, GCE, com 3,0 mm de diâmetro. A modificação da superfície eletródica foi realizada por *drop casting*, sendo que uma alíquota de 2,0 μL de uma suspensão do GOIMZ em metanol, com concentração de 1 mg mL⁻¹. A gota é dispensada na superfície do eletrodo, que é deixado em repouso até que o solvente evapore totalmente. Ao final, se obtém o eletrodo de carbono vítreo recoberto com o modificador.

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato $\mu\text{Autolab}^{\text{®}}$ Type III, a coleta de dados foi obtida com auxílio do software NOVA 1.10. Os dados coletados foram tratados com o software Origin PRO8[®]. O eletrodo de referência utilizado em todas as medidas foi o de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e um eletrodo de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar.

As medidas eletroquímicas foram realizadas empregando a voltametria de onda quadrada, no intervalo de potencial de -1,5 a -1,9 V. A célula eletroquímica utilizada tem volume máximo de 20,0 mL, sendo utilizado o volume fixo de eletrólito suporte de 10,0 mL para todas as medidas. O procedimento utilizado é representado pela FIGURA 12.

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO EMPREGADO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA.



FONTE: A Autora (2019).

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas, em triplicata e em meio previamente des aerado pela passagem de um fluxo de nitrogênio por 15 minutos.

3.2.4 Otimização dos parâmetros para o desenvolvimento da Metodologia analítica para a determinação da P4

3.2.4.1 Comportamento Eletroquímico da P4

O eletrodo depois de preparado, foi transferido para uma célula de trabalho contendo o eletrólito suporte, sendo registrados os voltamogramas do branco. Uma alíquota proveniente da solução estoque da progesterona foi adicionada ao eletrólito suporte e então os voltamogramas referentes ao analito foram obtidos. A voltametria cíclica (CV) foi empregada a fim de se obter dados sobre o comportamento eletroquímico do hormônio e a voltametria de onda quadrada (SWV) foi usada para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica e para a determinação da progesterona.

3.2.4.2 Avaliação da potencialidade do GOIMZ-GCE como sensor para a determinação de P4

Foi realizado um estudo a fim de verificar a potencialidade e a viabilidade de construção e emprego do GOIMZ-GCE como sensor para a P4, com a comparação da resposta obtida entre diferentes eletrodos. Sendo assim, foram construídos 4 eletrodos sendo eles: eletrodo de carbono vítreo (GCE), eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno (GO-GCE) eletrodo de carbono vítreo modificado com imidazol (IMZ-GCE) e eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno funcionalizado com imidazol (GOIMZ-GCE). Os eletrodos foram submetidos a medidas de SWV, e as correntes obtidas para cada um dos eletrodos foram coletadas e comparadas através de um gráfico de barras.

3.2.4.3 Estudo do Efeito da Variação do pH

Para o estudo da variação do pH foram empregadas soluções de NaOH com diferentes concentrações, na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os eletrólitos/pH foram avaliados utilizando CV e SWV e a partir da melhor resposta, em função de corrente e perfil voltamétrico, para o hormônio, o pH foi escolhido.

3.2.4.4 Estudo do Volume de Modificador

Volumes de 0,5, a 3,0 μL de dispersão da GOIMZ foram adicionadas sobre o GCE e em seguida foram realizadas medidas por SWV, no intervalo de potencial de -1,5 a -1,9 V em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A correntes de pico para a P4 foram coletadas e comparadas para a escolha do melhor volume.

3.2.4.5 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para o estudo de repetibilidade, foram feitas 5 medidas de SWV com a mesma superfície do GOIMZ-GCE. As correntes obtidas para cada uma das medidas foram coletadas e comparadas. Para o estudo da reprodutibilidade foram realizadas 5 medidas de SWV com 5 superfícies de GOIMZ-GCE diferentes e as correntes obtidas foram comparadas.

3.2.4.6 Parâmetros da Técnica Analítica

Foram realizados estudos de otimização dos principais parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada, a fim de se avaliar a influência de cada um deles na resposta do eletrodo para o analito. Os parâmetros avaliados foram: frequência (20 a 90 Hz), amplitude de pulso (10 a 100 mV) e incremento de potencial (1 a 6 mV).

3.2.4.7 Construção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais e de técnica, foi realizado o estudo da região de resposta linear do GOIMZ-GCE para a P4, com a construção de uma curva analítica. O intervalo de concentração de analito avaliado foi de $7,4 \times 10^{-7}$ a $5,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Com a curva de analítica foi possível obter a região linear de trabalho, bem como o desempenho analítico do método, através do cálculo dos limites de detecção e quantificação e da obtenção da sensibilidade através da equação da reta.

3.2.4.8 Análise da Amostra e Método Comparativo

O medicamento empregado como amostra rotula 200 mg de progesterona por cápsula. Sendo assim, uma cápsula do medicamento foi empregada para análise, a qual foi colocada em um béquer de 25,0 mL, em contato com 2,0 mL de uma solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) para a abertura da camada externa da cápsula e então o conteúdo foi diluído para um volume final de 50 mL de etanol. Porém, essa diluição foi realizada por alíquotas de 10,0 mL de etanol, colocadas em contato com a cápsula e lavadas ao banho ultrassônico por 10 minutos e transferidos para o balão volumétrico, a fim de garantir que toda a progesterona fosse extraída do invólucro gelatinoso. Dessa solução, alíquotas foram retiradas e analisadas tanto pelo método proposto quanto para o método comparativo.

Baseado na farmacopeia brasileira, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi utilizada como método comparativo objetivando a validação do método desenvolvido neste trabalho para determinação de progesterona em fármacos. A curva para o padrão de progesterona foi obtida utilizando-se a solução estoque de progesterona que foi diluída para alcançar concentrações na faixa de 12,5 a 57,8 µmol

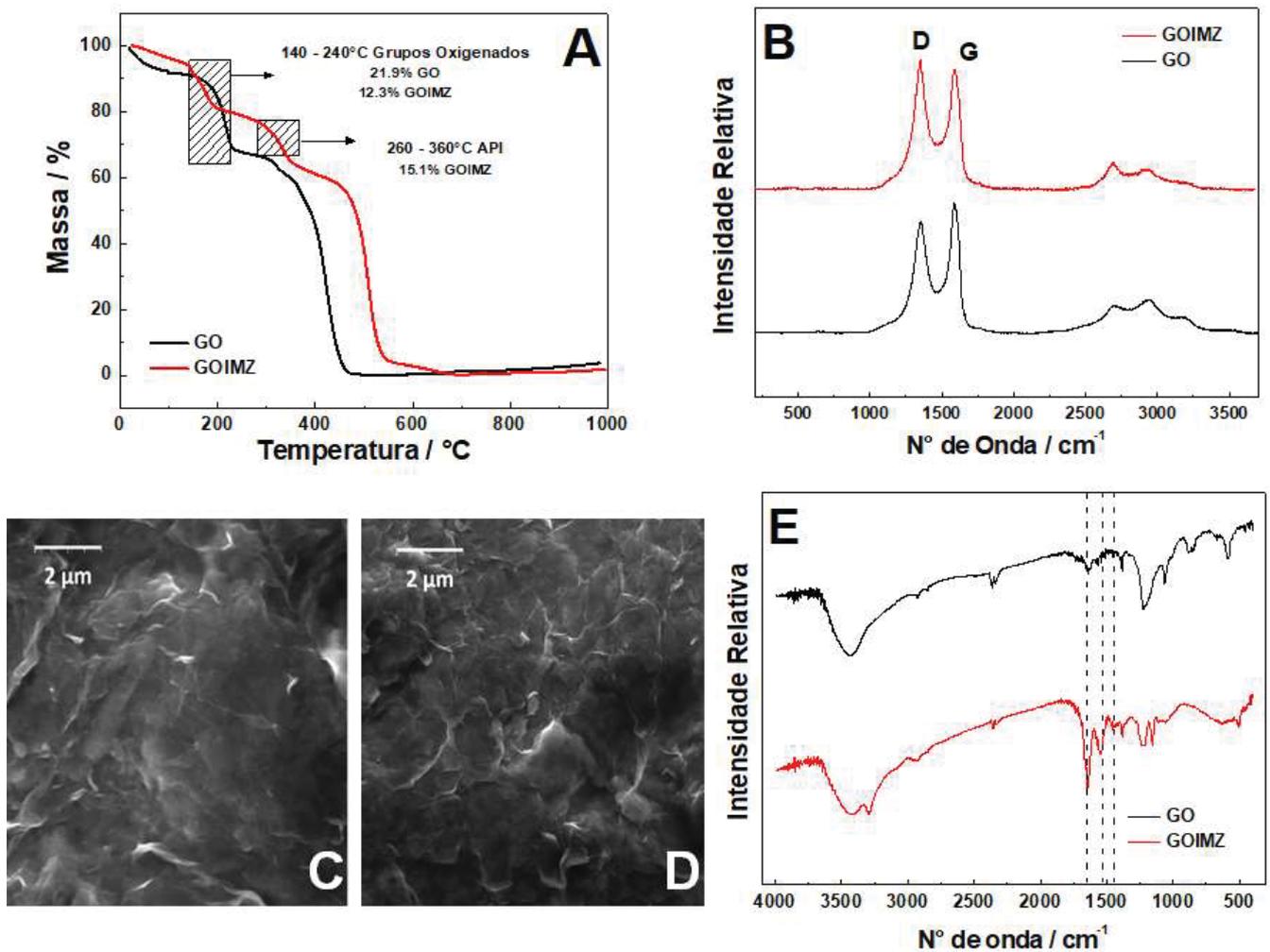
L⁻¹ na cubeta com volume de 2,0 mL de etanol e a absorbância foi medida monitorando-se o máximo de sinal em comprimentos de onda de 235 nm utilizando o etanol como branco.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização do GOIMZ

O modificador GOIMZ foi caracterizado por técnicas como a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrados na FIGURA 13.

FIGURA 13 – A) ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E B) ESPECTROS RAMAN PARA GO E GOIMZ; IMAGENS DE MEV C) GO E D) GOIMZ; E) ESPECTROS DE INFRAVERMELHO PARA GO E GOIMZ.



Os experimentos por análise termogravimétrica, FIGURA 13A, revelam eventos de perda de massa, para ambas as amostras, na região de 140 a 240°C, relacionados a presença de grupos oxigenados. Já para a amostra funcionalizada apresenta um evento consistente associado ao derivado de imidazol, na região de 260 a 360°C, que não é observado na amostra dos precursores. [160] Também se pode inferir que a inserção do derivado de imidazol estabilizou termicamente o compósito, pois o evento de degradação da rede gráfica deslocou aproximadamente 100° C.

Os resultados obtidos pelas análises de Raman, FIGURA 13B, mostram as bandas características do GO, e a partir dos espectros é possível o cálculo da relação I_D / I_G , que sugere a presença de defeitos na superfície do material. Sendo assim, houve um aumento do valor da relação de 1,8 para GO e 2,2 para GOIMZ, que pode estar relacionado com a presença de heteroátomos na estrutura do material funcionalizado, que acarreta em uma maior quantidade de defeitos da estrutura sp^2 . [161].

Os espectros de infravermelho obtidos para ambos os materiais, apresentam bandas significativas, principalmente nas regiões em 3400 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligações O-H, além dessa, nas regiões de 1750 , 1450 e 1090 cm^{-1} que são referentes a estiramentos de C=O, O-H e C-O, de grupamentos fenólicos e carboxílicos e expóxidos. [162] Após a funcionalização, é possível observar o aparecimento das bandas referentes a ligação amida formada pela ligação covalente do derivado imidazol ao GO precursor, nas regiões de 3290 cm^{-1} atribuído à N-H, 1642 , 1560 e 1427 cm^{-1} devido ao C=O, N-H e C-N de amida, respectivamente [163,164].

A partir das imagens de MEV, demonstradas na FIGURA 13C e D, é possível verificar que, mesmo após a funcionalização química, não houve diferenças significativas entre a morfologia do GO e GOIMZ, o que pode sugerir que as características morfológicas do precursor, como integridade da folha do GO, são preservadas e adicionadas às novas características do compósito [165].

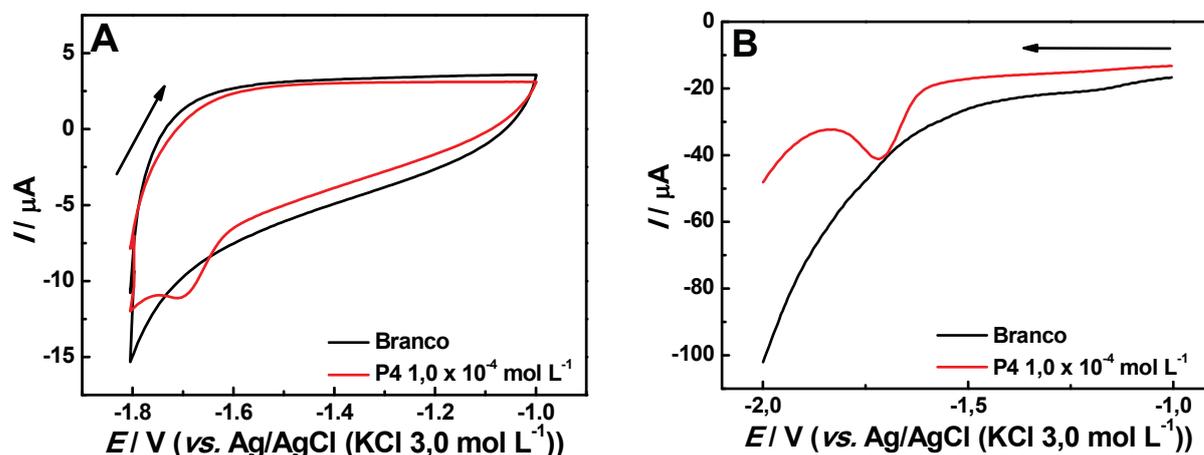
3.3.2 Comportamento Eletroquímico da P4

Inicialmente, foi estudado o comportamento voltamétrico da progesterona em hidróxido de sódio, $0,10\text{ mol L}^{-1}$ utilizando o GOIMZ-GCE. Na FIGURA 14A, observam-se voltamogramas cíclicos na ausência (preto) e na presença (vermelho) de P4 $1,0 \times$

10^{-4} mol L⁻¹ após a varredura de potencial de -1,0 V a -1,8 V, e na FIGURA 14B estão representados os voltamogramas obtidos a partir de uma varredura de onda quadrada, no intervalo de -1,0 a -2,0 V.

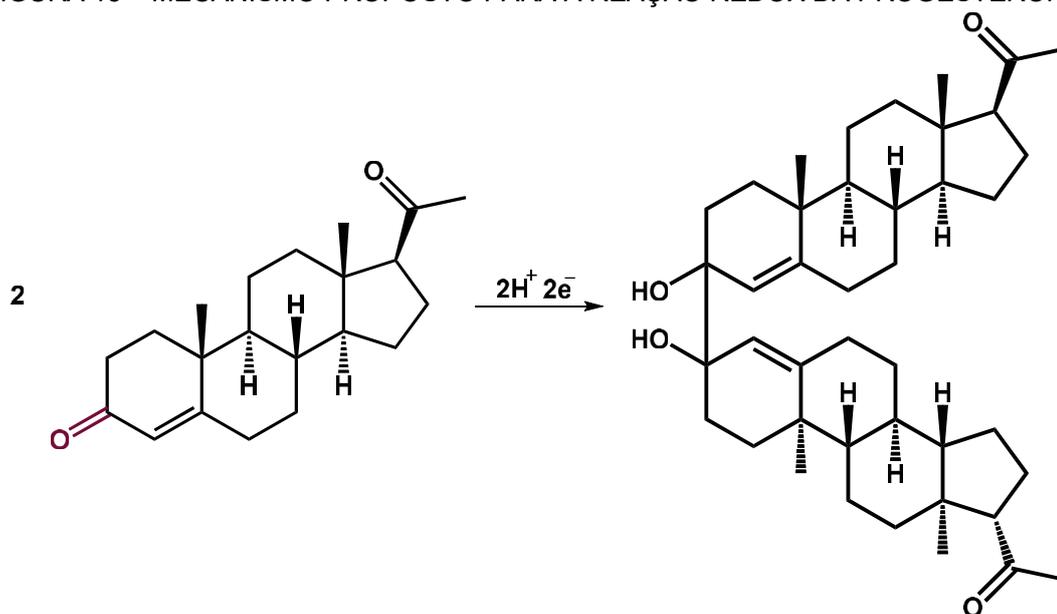
É possível visualizar um pico definido na região de potencial de aproximadamente -1,70 V, referente a redução do hormônio na superfície do eletrodo e que não é observado nos voltamogramas em preto, indicando que o modificador não é eletroativo nessa região de potencial. Além do pico de redução, não é observado nenhum pico referente a oxidação do hormônio, conforme o voltamograma em FIGURA 14A [166].

FIGURA 14 – PERFIL VOLTAMÉTRICO DA PROGESTERONA A) VOLTAMETRIA CÍCLICA E B) VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA.



De Boer e colaboradores [167] estudaram as propriedades eletroquímicas dos corticosteroides, incluindo a progesterona, em diferentes eletrólitos suporte e Arévalo e colaboradores [166] investigaram a redução eletroquímica de progesterona em acetonitrila. Em ambos os casos um dímero é proposto como o produto final da redução da P4, embora diferenças experimentais entre os artigos existam. De acordo com os autores, em meio alcalino a dimerização ocorre inicialmente através de uma reação de transferência de um elétron com a redução do grupo ceto em C-3 no anel-A da molécula de P4 e a formação de um radical não protonado. O radical é, então, protonado e reage com outro radical não protonado, resultando em um dímero. A reação geral pode ser descrita como representado pela FIGURA 15. De maneira mais simples, é aceito que o mecanismo geralmente envolve a redução da ligação dupla do grupo carbonila [168].

FIGURA 15 – MECANISMO PROPOSTO PARA A REAÇÃO REDOX DA PROGESTERONA.

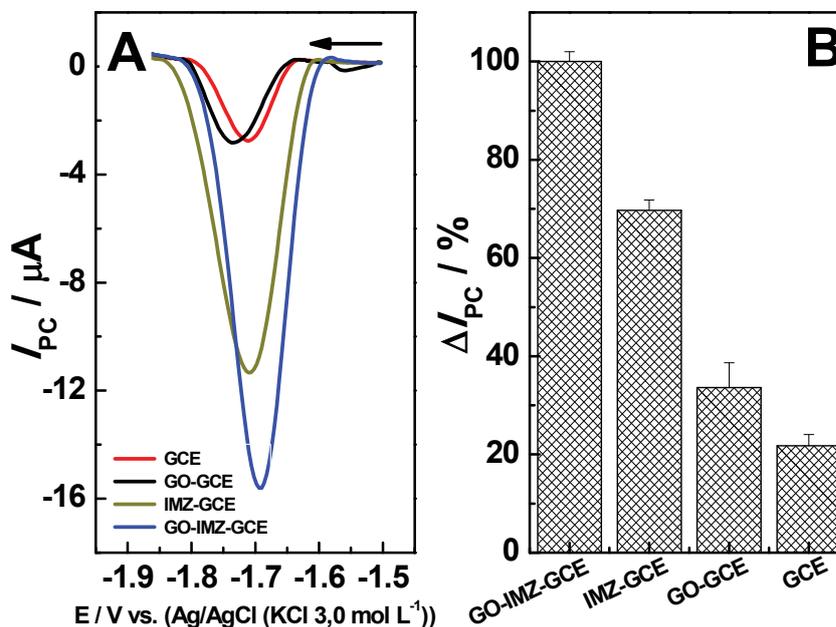


FONTE: A Autora (2019).

Para comprovar a melhora da resposta e a viabilidade de aplicação do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno e imidazol (GOIMZ-GCE), em relação a um eletrodo carbono vítreo modificado apenas com óxido de grafeno (GO-GCE), um eletrodo de carbono vítreo modificado apenas com imidazol (IMZ-GCE) e com um eletrodo de carbono vítreo sem modificação (GCE), os eletrodos foram submetidos a medidas de SWV para obter o perfil voltamétrico da progesterona sobre cada um dos eletrodos. Por conta da característica adsortiva da progesterona, já descrita na literatura [169], antes de cada medida é necessária a realização de uma etapa de limpeza, a fim de eliminar qualquer resquício que esteja sobre a superfície eletródica.

A FIGURA 16 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para os eletrodos supracitados, e uma comparação entre as correntes obtidas.

FIGURA 16 – A) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA PARA PROGESTERONA OBTIDOS PARA DIFERENTES ELETRODOS NA PRESENÇA DE $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ DE P4. B) GRÁFICO DE COMPARAÇÃO PARA SINAL ANALÍTICO OBTIDO A PARTIR DE VOLTAMOGRAMAS EM A. $f = 50$ Hz; $\Delta E_{EP} = 40$ mV; $\Delta E_S = 4$ mV; NaOH 0,1 mol L⁻¹



Comparando-se as correntes de pico do processo catódico amostradas, é possível perceber um incremento de corrente superior para GOIMZ-GCE em relação aos demais eletrodos além de um pico de redução da P4 melhor definido para o eletrodo proposto.

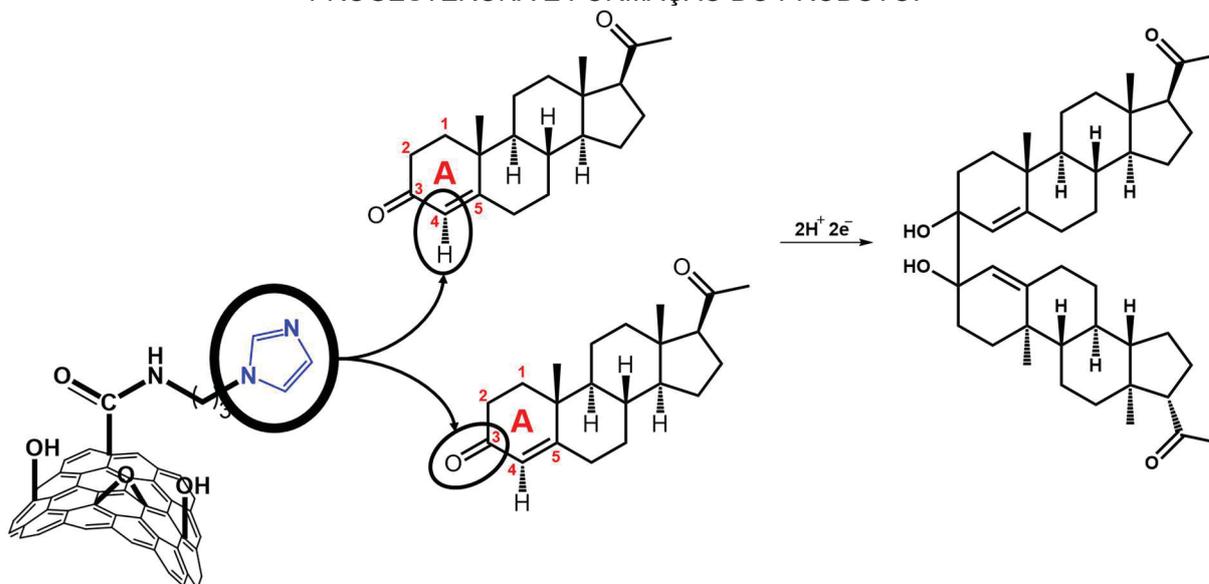
É possível perceber, também, que os eletrodos modificados apresentaram um incremento de corrente superior ao eletrodo não modificado, comprovando assim que melhores respostas podem ser obtidas com a modificação da superfície eletródica [8] e que outros mecanismos de redução estão envolvidos nesses eletrodos, do que apenas a adsorção da progesterona na superfície do eletrodo.

Pode-se sugerir que a resposta do dispositivo proposto seja através do efeito sinérgico entre o GO e o IMZ, que é responsável pela resposta eletroquímica apresentada pelo GOIMZ-GCE ser superior àquela apresentada pelos eletrodos modificados com as espécies separadas. Tal comportamento também foi observado por Wang e colaboradores [67] que descrevem em seu trabalho, para a determinação de dopamina (DA), diferentes eletrodos e entre eles um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno funcionalizado com tirosinase, e discutem que, para uma mesma condição (voltametria de pulso diferencial em tampão B-R pH=5,0, na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DA), o eletrodo proposto apresentou magnitude de corrente de pico superior em relação aos demais eletrodos, a qual os autores atribuem

à contribuição sinérgica entre a enzima e o óxido de grafeno, relacionada com o aumento da área de superfície do eletrodo, a presença de ligações conjugadas π - π e grande quantidade de sítios ativos.

Com base em outros sistemas [170,171], pode-se propor que o grupo imidazol possa atuar como um co-catalisador envolvido em várias etapas do processo redox, atuando de forma a facilitar a formação das espécies eletroativas ou na remoção do próton para uma possível formação de intermediários, devido ao seu caráter básico, ou mesmo atuando sobre a carbonila, facilitando a quebra da ligação, como um nucleófilo. A FIGURA 17 traz um esquema das propostas de funcionamento do GOIMZ-GCE.

FIGURA 17 – PROPOSTA DE MECANISMO DE INTERAÇÃO ENTRE O GOIMZ E PROGESTERONA E FORMAÇÃO DO PRODUTO.



FONTE: A Autora (2019).

Para avaliar a estabilidade da superfície eletródica e a confiabilidade da resposta do sensor, foram realizados estudos de repetibilidade e reprodutibilidade das medidas voltamétricas, com o intuito de avaliar a variação de corrente para P4 ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), para medidas consecutivas com uma mesma superfície (n = 5 - repetibilidade) e para medidas com diferentes superfícies (n = 5 - reprodutibilidade).

A progesterona possui um comportamento fortemente adsorptivo [169,172], o que pode causar o envenenamento da superfície eletródica. Tal comportamento foi observado durante os experimentos, e principalmente quando o estudo de repetibilidade foi realizado. Os resultados obtidos apresentaram forte influência

dessas características, sendo as variações de corrente maiores de 10%, sugerindo efeito de memória nas respostas obtidas a partir de medidas consecutivas.

Para o estudo da reprodutibilidade, o valor de desvio padrão relativo encontrado foi de 5,3%, calculado a partir da média das correntes, o que pode ser atribuído a um bom controle do processo de preparação do eletrodo, desde a limpeza realizada na superfície do GCE (polimento em alumina e limpeza eletroquímica), preparação da dispersão do compósito, através de banho ultrassônico, e da alíquota da dispersão que é utilizada para a modificação. Tal característica garante a viabilidade de utilização diferentes eletrodos superfícies eletródicas (construídas a partir de diferentes modificações, quando necessário), não prejudicando o desempenho da metodologia desenvolvida.

3.3.3 Otimização dos Parâmetros da Metodologia Analítica

3.3.3.1 Estudo do Efeito da Variação do pH

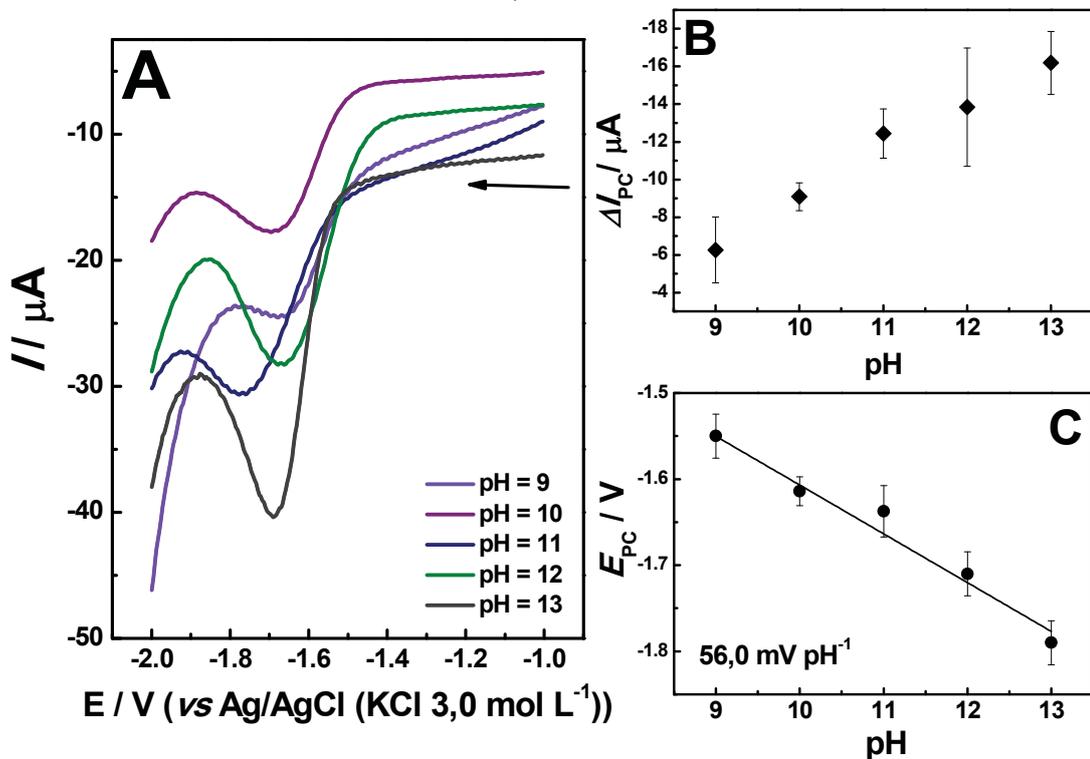
O valor do pH da solução muitas vezes tem um efeito significativo nas características dos materiais utilizados para a modificação de eletrodos. Por exemplo, quando um material carbonáceo contendo heteroátomos em sua estrutura é submerso em água, ele desenvolve sobre sua superfície uma carga proveniente da dissociação de grupos funcionais superficiais. Esta carga superficial também é dependente do valor do pH do meio e das características da superfície do material [173]. Esse comportamento relacionado com o pH e sua variação pode afetar diretamente nos processos envolvidos em uma reação eletroquímica e podem reger diferentes mecanismos de acordo com a espécie presente majoritariamente em cada valor de pH.

De acordo com a literatura [167,174], os valores de pH mais altos são os mais adequados para as reações de redução/oxidação da P4. A reação de redução, mostrada no Esquema 1, ocorre em duas etapas, sendo uma química e outra eletroquímica, sendo que a segunda reação só é possível se a primeira ocorre. De maneira geral, a reação eletroquímica ocorre apenas na ausência do hidrogênio da posição alfa à carbonila. O grupo carbonila é retirador de elétrons, o que eleva a acidez da ligação C-H em posição alfa, sendo possível a desprotonação desse carbono em um meio em que o pH é superior ao pKa do hidrogênio alfa carbonila. Normalmente,

os valores de pKa para α,β -insaturados varia de 15 a 20, sendo possível uma desprotonação parcial empregando-se NaOH, por exemplo, que já é suficiente para dar início às reações desta espécie [175,176].

Sendo assim, foi realizado um estudo da variação do pH do eletrólito suporte, na faixa de 9,0 a 13,0 a partir da variação da concentração do NaOH, sendo os resultados obtidos para esse estudo, mostradas na FIGURA 18.

FIGURA 18 – A) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA DA PROGESTERONA OBTIDOS PARA O ESTUDO DE pH; GRAFICOS DE B) I_P vs. pH E C) E_{PC} vs. pH. $f = 50$ Hz; $\Delta E_P = 40$ mV; $\Delta E_S = 4$ mV; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$



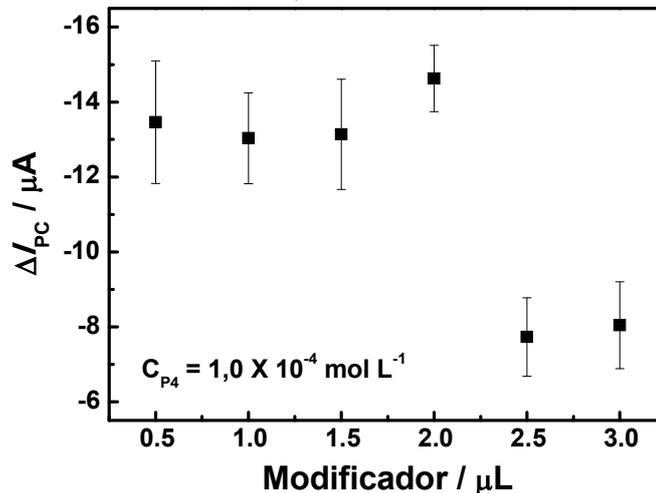
É possível visualizar um aumento crescente e linear da corrente do pico referente a redução da P4, com o aumento da basicidade do meio, em concordância com a literatura [167,172], sendo o valor de pH 13,0 (NaOH 0,1 mol L $^{-1}$) o valor empregado para os estudos posteriores.

A partir da FIGURA 18C, é possível observar a dependência do potencial de pico de 56,0 mV por unidade de pH, indicando um processo de redução envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons transferidos, como sugerido anteriormente [166,172]. Ainda, é possível observar que há o deslocamento do potencial com o aumento do pH, porém mesmo em potenciais mais extremos não há interferência no resultado apresentado pelo dispositivo.

3.3.3.2 Estudo da Quantidade de Modificador

A partir dos resultados anteriores, foi possível observar um ganho na magnitude de corrente da P4 para o GOIMZ-CGE em relação aos demais eletrodos testados, sugerindo que a melhora se dá pela presença do modificador em questão. Sendo assim, foi realizado um estudo para verificar se a variação da quantidade desse material na superfície do eletrodo de carbono vítreo teria influência na resposta obtida. Os resultados para este estudo são dispostos na FIGURA 19.

FIGURA 19 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO DE CORRENTE DE PICO DA PROGESTERONA EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE MODIFICADOR GOIMZ $f = 50$ Hz; $\Delta E_P = 40$ mV; $\Delta E_S = 4$ mV; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹



A partir do gráfico acima é possível observar um platô em relação as correntes obtidas, levando em consideração a variação das barras de erro, no intervalo de 0,5 a 2,0 μL , sendo alcançado o valor máximo de corrente nesse volume, e para volumes maiores ocorre uma queda brusca de magnitude de corrente. Tal decaimento pode estar associado a baixa condutividade elétrica do GO [38], ou também pelo envenenamento da superfície, uma vez que há maior quantidade disponível do modificador para interagir com a P4, o que pode atrapalhar na chegada de novas moléculas do analito à superfície do eletrodo.

Já na região de platô da FIGURA 19, é possível verificar que, quando não são considerados os desvios, o gráfico apresenta uma leve tendência crescente da corrente com o aumento do volume, que atinge o máximo de corrente em 2,0 μL , o qual foi escolhido como ótimo, por apresentar os menores desvios e melhor perfil

voltamétrico. Além disso, o valor de 2,0 μL foi escolhido por ser um volume de suspensão razoável para a modificação, pelo fato de que valores menores ficam mais próximos do limite de volume mínimo da micropipeta utilizado, o que pode acarretar em uma maior incerteza nas quantidades pipetadas, apresentando também menores valões de desvio padrão entre as respostas obtidas.

3.3.3.3 Otimização dos Parâmetros da Técnica

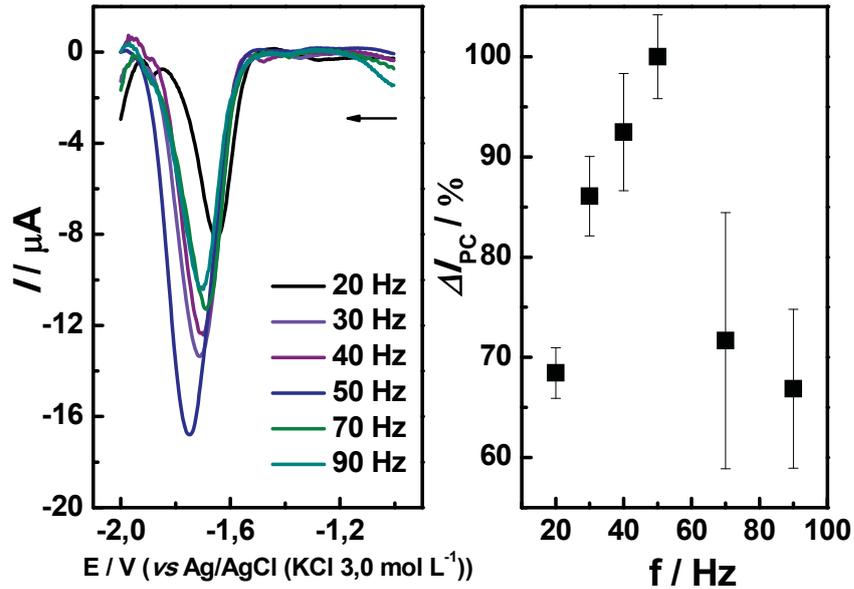
Foram realizados estudos de otimização dos parâmetros inerentes da técnica de voltametria de onda quadrada, a fim de obter-se a melhor a resposta do GOIMZ-GCE em relação ao hormônio P4.

Assim como a velocidade de varredura está para a voltametria cíclica, a frequência de aplicação dos pulsos está para a SWV, sendo esta a responsável pela magnitude do sinal analítico e conseqüentemente a sensibilidade do método. Outro parâmetro possível de otimização na técnica SWV é a amplitude do pulso de potencial aplicado. Sua variação influencia diretamente na seletividade do pico, que tende a ficar mais largo para altos valores de amplitude. Nesse contexto, a velocidade de varredura na SWV é resultado do produto entre frequência de aplicação do pulso e o incremento de potencial, que assim como a frequência detém influência com respeito à sensibilidade das análises.

Para todos os estudos o eletrodo foi exposto a uma solução de P4, $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , já na célula eletroquímica e posterior varredura em modo de onda quadrada. Todos os parâmetros otimizados anteriormente foram empregados para esses estudos.

O primeiro parâmetro otimizado foi a frequência. A otimização desse parâmetro é de fundamental importância, pois para a maioria dos processos eletródicos a corrente de pico é diretamente proporcional ao seu valor. Assim, com a maximização do valor de f , aumenta-se, conseqüentemente, a sensibilidade do procedimento.[177] O resultado obtido para os estudo de frequência está apresentado na FIGURA 20.

FIGURA 20 – VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA OBTIDOS PARA A PROGESTERONA PARA O ESTUDO DA FREQUÊNCIA. $\Delta_{EP} = 40 \text{ mV}$; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

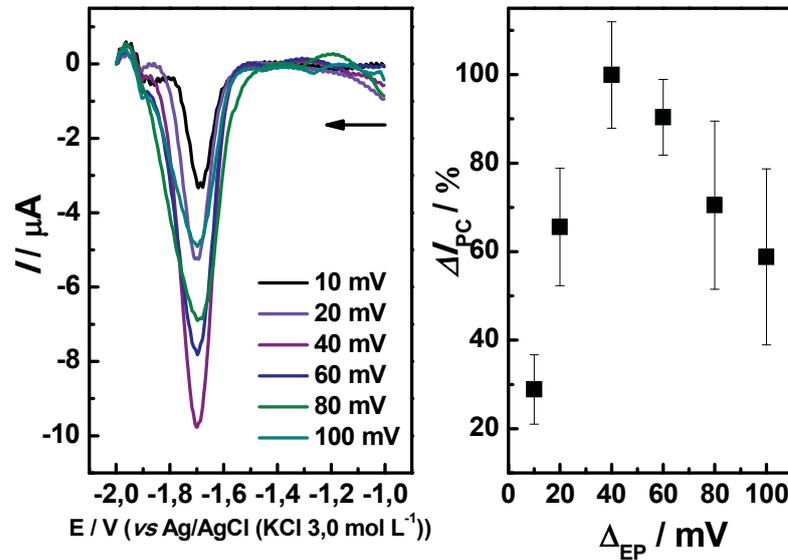


É possível observar que com o aumento da frequência há o aumento da corrente de pico referente a redução da P4, que atinge o seu máximo para o valor de 50 Hz, e a partir de tal frequência há o decréscimo da corrente de pico de resposta do sensor, sendo o valor escolhido.

A frequência está diretamente relacionada com a velocidade em que as ondas de pulso são aplicadas e varridas. Dessa maneira, valores elevados de frequência influem em uma elevada velocidade de varredura. Caso a cinética da reação não seja rápida o suficiente para acompanhar a velocidade em que o experimento irá ocorrer, uma perda de sensibilidade pode ocorrer e com isso o decréscimo de corrente pode ser observado, bem como o aumento dos valores de desvio em relação à corrente apresentados na figura acima [177].

A amplitude de aplicação dos pulsos de potencial, Δ_{EP} , também influencia nos valores obtidos para a corrente de pico. A FIGURA 21 traz os resultados obtidos para o estudo desse parâmetro.

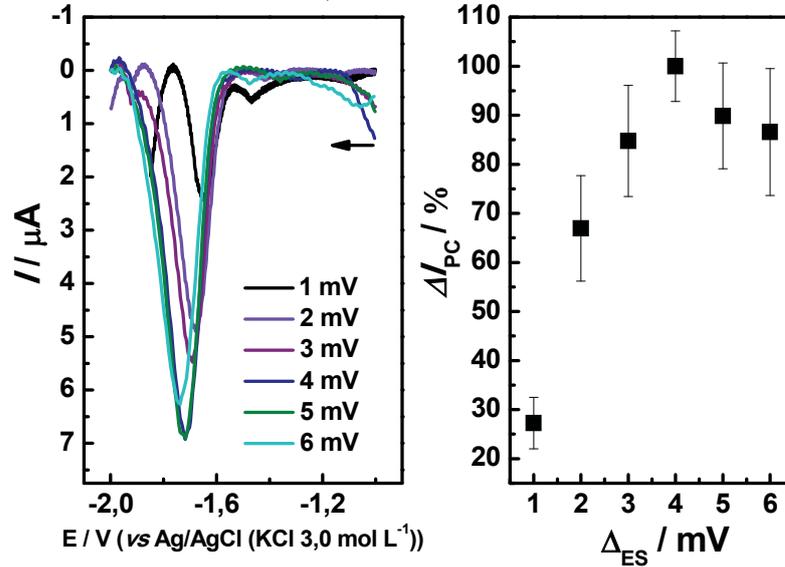
FIGURA 21 – VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA OBTIDOS PARA A PROGESTERONA PARA O ESTUDO DE AMPLITUDE DE POTENCIAL. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta E_{\text{ES}} = 4 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{\text{P4}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$



O aumento da corrente, que atinge seu máximo em 40 mV e depois tende a declinar. Este comportamento está de acordo com a teoria da SWV, desenvolvida para sistemas irreversíveis com a espécie adsorvida na superfície do eletrodo, que afirma que para amplitudes acima de 50 mV a corrente de pico não sofre variações significativas [177].

A velocidade na SWV é o resultado do produto da frequência pelo incremento de potencial. Deste modo, um incremento de potencial maior pode aumentar o sinal obtido e, assim, melhorar a sensibilidade do método. Porém, incrementos maiores de potencial, podem acarretar um alargamento dos picos, comprometendo novamente a definição dos picos obtidos. [177] Os valores de correntes obtidos para a variação do incremento de potencial são apresentados na FIGURA 22.

FIGURA 22 – VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA OBTIDOS PARA A PROGESTERONA PARA O ESTUDO DE AMPLITUDE DE POTENCIAL. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta_{EP} = 40 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $C_{P4} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$



É possível perceber que a corrente aumenta com o aumento do incremento até atingir o valor de 4,0 mV e, a partir desse valor, pode ocorrer perda significativa da definição dos voltamogramas, que não é compensada pela corrente obtida, que não apresenta variação significativa que justifique a escolha de maiores valores de amplitude de pulso.

3.3.4 Construção da Curva Analítica

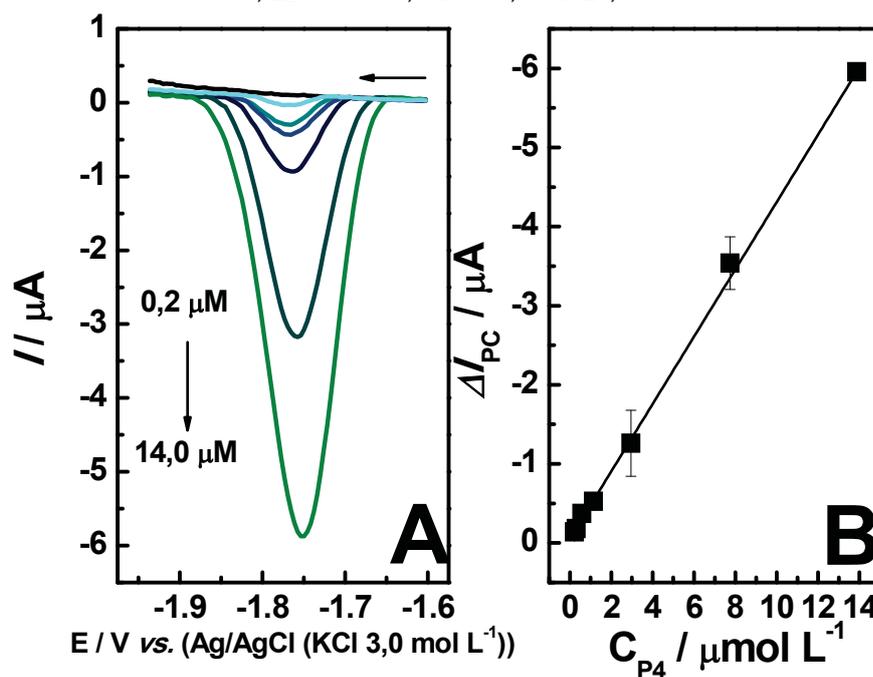
Com todos os parâmetros da metodologia proposta já otimizados (Tabela 1), foi possível obter uma curva analítica,

FIGURA 23, para a P4 empregando o GOIMZ-GCE como eletrodo de trabalho, além da obtenção dos parâmetros de mérito analítico.

TABELA 1. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROGESTERONA EMPREGANDO GOIMZ-GCE.

Parâmetro	Faixa Estudada	Otimizado
Eletrólito	NaOH	NaOH
pH	9,0 – 13,0	13,0
Quantidade de Modificador / μL	0,5 – 3,0	2,0
Frequência / Hz	20 – 90	50
Amplitude de Pulso / mV	10 – 100	40
Incremento de Potencial / mV	1 – 6	4

FIGURA 23 – A) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA PARA PROGESTERONA REFERENTES À REGIÃO LINEAR DE RESPOSTA. B) CURVA ANALÍTICA OBTIDA A PARTIR DE VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA COMO OS DEMONSTRADOS EM A. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta E_{\text{ES}} = 4 \text{ mV}$; $\Delta E_{\text{EP}} = 40 \text{ mV}$; $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $N=3$.



É possível perceber que há um aumento linear de resposta de corrente em função do aumento da concentração de progesterona adicionada em uma região de $2,2 \times 10^{-7} - 1,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com sensibilidade de $0,43 \text{ A L mol}^{-1}$.

Para os cálculos de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), foram utilizadas as equações 1 e 2, respectivamente [178]:

$$LOD = \frac{3SD}{b} \quad (1) \quad LOQ = \frac{10SD}{b} \quad (2)$$

Sendo SD o desvio padrão de 5 medidas consecutivas do branco e b o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica. A Tabela 2 traz o desempenho analítico obtido com o dispositivo desenvolvido.

TABELA 2. DESEMPENHO ANALÍTICO OBTIDO COM O GOIMZ-GCE PARA A DETERMINAÇÃO DE P4

Região Linear / mol L⁻¹	$2,2 \times 10^{-7} - 1,4 \times 10^{-5}$
R²	0,99
Sensibilidade / A L mol⁻¹	0,43
LOD/ mol L⁻¹	$6,4 \times 10^{-8}$
LOQ / mol L⁻¹	$2,1 \times 10^{-7}$

3.3.5 Amostra e Método comparativo

A exatidão do método proposto foi avaliada a partir da análise de uma amostra comercial, que é um comprimido de progesterona, sendo rotulado um valor de 200,0 mg de P4/comprimido.

Uma alíquota da amostra preparada, de concentração conhecida, foi adicionada na cela eletroquímica e posteriormente foi realizada a varredura voltamétrica. O valor de corrente obtido, que está relacionado com a concentração de P4 na amostra, foi interpolado diretamente na equação da reta obtida a partir da curva analítica, apresentada em (3):

$$I = 0,426C_{P4} + 5,269 \times 10^{-8} \quad (3)$$

O valor médio das correntes obtidas foi de $1,78 \times 10^{-6}$ A, que quando interpolado na equação acima e a partir de cálculos adequados, chega a um valor de progesterona na amostra de $205 \pm 0,8$ mg. Esse valor apresenta um erro relativo em relação ao rotulado de 2,5%, e que pode ser atribuído, principalmente, ao fato de que o potencial para a redução da P4 é bastante negativo e suficiente para reduzir algumas espécies que estejam presentes no meio, provenientes da própria amostra. Porém, pode ser considerado um valor satisfatório.

Outra forma de verificar a exatidão do método desenvolvido é a comparação dos resultados obtidos com os resultados de um segundo método. Assim, para testar a viabilidade de utilização da metodologia eletroanalítica, empregou-se como método comparativo a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. A curva foi obtida para o padrão de progesterona na faixa de concentração de 12,5 a 57,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. e apresentou boa linearidade, com $R^2 = 0,99$.

Da mesma maneira que foi realizado para o método proposto, uma alíquota da amostra contendo a progesterona foi analisada pelo método comparativo, e o valor de absorbância obtido foi interpolado diretamente na equação da reta obtida pela curva analítica, (4):

$$A = 16649,37C_{P4} - 0,05162 \quad (4)$$

Sendo assim, o valor médio de absorbância obtido foi de 0,952 u.a., chegando ao valor de P4 na amostra igual a $189 \pm 0,3$ mg, com valor de erro relativo de -5,25%.

Quando se calcula o erro relativo entre as duas metodologias, chega-se ao valor de -8,2%, que é um valor aceitável para o valor de concentração que está sendo analisado, bem como a complexidade da amostra.

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Foi possível a utilização do compósito entre óxido de grafeno e imidazol como modificador de um eletrodo de carbono vítreo, posteriormente utilizado para o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de progesterona.

Estudos de otimização puderam ser realizados, indicando que a resposta do dispositivo é afetada principalmente pela variação do pH do eletrólito, tendo seu desempenho intrinsecamente ligado a este valor. Com posse dessa informação, foi possível propor um mecanismo de interação entre o GO-IMZ e a P4, com base, também, em outros sistemas descritos na literatura.

Com as otimizações feitas, obteve-se a melhor condição de compromisso e uma curva analítica pode ser construída, e os parâmetros de mérito analítico puderam ser obtidos, sendo a região linear de trabalho de $2,2 \times 10^{-7} - 1,4 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e LOD e LOQ calculados de $6,4 \times 10^{-8}$ e $2,1 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} , respectivamente.

Em relação aos demais trabalhos listados em literatura, a Tabela 3 mostra um comparativo entre as figuras de mérito.

TABELA 3. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ALGUNS ELETRODOS MODIFICADOS USADOS PARA DETERMINAÇÃO DE P4.

Eletrodo	Técnica	LDR / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD / nmol L^{-1}	Ref
mAb-SPE	Cronoamperometria	0,005 - 0,050	1,0	[129]
Fe₃O₄@GQD/f-MWCNTs/GCE	DPAAdSV	0,01 - 3,0	2,18	[179]
Ex-situ BiFe	SWAdSV	0,40 - 7,90	180	[172]
GQD-PSSA/GO/GCE	DPV	0,1 - 6,0	0,31	[180]
GO-IMZ/GCE	SWV	0,22 - 14,0	64,0	***

mAb: anticorpo monoclonal; SPE: Eletrodo impresso; BiFE: Eletrodo de filme de Bismuto; GQD: Grafeno quantum dots; PSSA: poli(ácido sulfosalisílico); *** esse trabalho

É possível observar os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, tendo em vista que a metodologia desenvolvida e posteriormente empregada é simples, sem etapas de pré concentração do analito, ou mesmo tratamentos de amostras compostos por várias etapas. Além disso, não houve a necessidade de utilização de componentes biológicos específicos para o hormônio na construção do dispositivo, como comumente é utilizado, o que torna essa metodologia bastante atrativa.

CAPÍTULO 4

4 ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM IMIDAZOL PARA A DETERMINAÇÃO DE PARAOXON

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono funcionalizado com imidazol (CNT-H-IMZ);
- Avaliar a potencialidade desse material para a determinação de paraoxon (PX);
- Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de PX empregando o dispositivo proposto e construção da curva analítica e parâmetros de mérito analítico;
- Aplicação da metodologia desenvolvida na análise de amostras de suco de laranja.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes e Soluções

A solução estoque de PX $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada pela dissolução de uma quantidade do analito em acetonitrila, estocada e mantida sob refrigeração até sua utilização. Diluições até as concentrações desejadas foram realizadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque ou pela adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica. Para os estudos foi empregado como eletrólito uma solução tampão Britton-Robinson (CH₃COOH 0,04 mol L⁻¹; H₃BO₃ 0,04 mol L⁻¹; H₃PO₄ 0,04 mol L⁻¹, B-R), com pH=10,0 ajustado empregando NaOH 1,0 mol L⁻¹.

As suspensões do modificador empregadas nos estudos foram preparadas pela dispersão dos materiais em isopropanol, na concentração de 1 mg mL⁻¹, e armazenadas em vials, que posteriormente foram levados ao banho ultrassônico para homogeneização. Antes de cada modificação, as suspensões são submetidas ao banho durante 15 minutos.

4.2.2 Síntese e Caracterização do CNT-H-IMZ

O material foi obtido em colaboração com o Grupo de Cinética e Catálise (GCC), sob orientação da Prof. Dra. Elisa S. Orth, e com o Grupo de Química de Materiais (GQM), sob orientação do Prof. Dr. Aldo J. G. Zarbin, ambos do Departamento de Química da UFPR.

Os CNTs, obtidos pelo método desenvolvido no GQM-UFPR a partir do ferroceno, é oxidado por uma modificação do método de Hummers, em que 30,0 mg de NTC são adicionados a um balão de fundo redondo de 50 mL junto com NaNO_3 (0,045g) e H_2SO_4 (2,07 mL) e agitados por 15 minutos em banho de gelo. Em seguida, foi realizada adição de KMnO_4 (0,09 g) lentamente, e deixado sob agitação por 75 minutos, posteriormente adicionou-se 4,14 mL de água à 0 °C, 12,6 mL de água à 90°C e mantida a agitação do sistema por 30 minutos. Ao fim do período, H_2O_2 30% (0,015 mL) foi adicionado e a agitação foi mantida por mais 30 minutos. O material obtido foi lavado com solução de HCl 0,5 mol L^{-1} até pH neutro, filtrado e seco em estufa à 60°C por 24 horas, obtendo-se a amostra nomeada CNT-H.

Para a funcionalização do CNT-H e obtenção do CNT-H-IMZ, a metodologia descrita anteriormente para a obtenção do GOIMZ foi utilizada [158,159]. Uma dispersão de CNT-H (0,5 mg mL^{-1}) foi adicionada em um balão de fundo redondo e misturada com 30,0 mmol de NHS e 30,0 mmol de EDC sob banho de gelo e agitação. Após 2 horas, adicionou-se de API (3,52 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação durante 18 horas à temperatura ambiente. O produto sólido resultante foi separado por filtração, lavado repetidamente com água destilada e seco a 50 °C por 24 horas, nomeado de CNT-H-IMZ.

4.2.3 Modificação do Eletrodo e Medidas Eletroquímicas

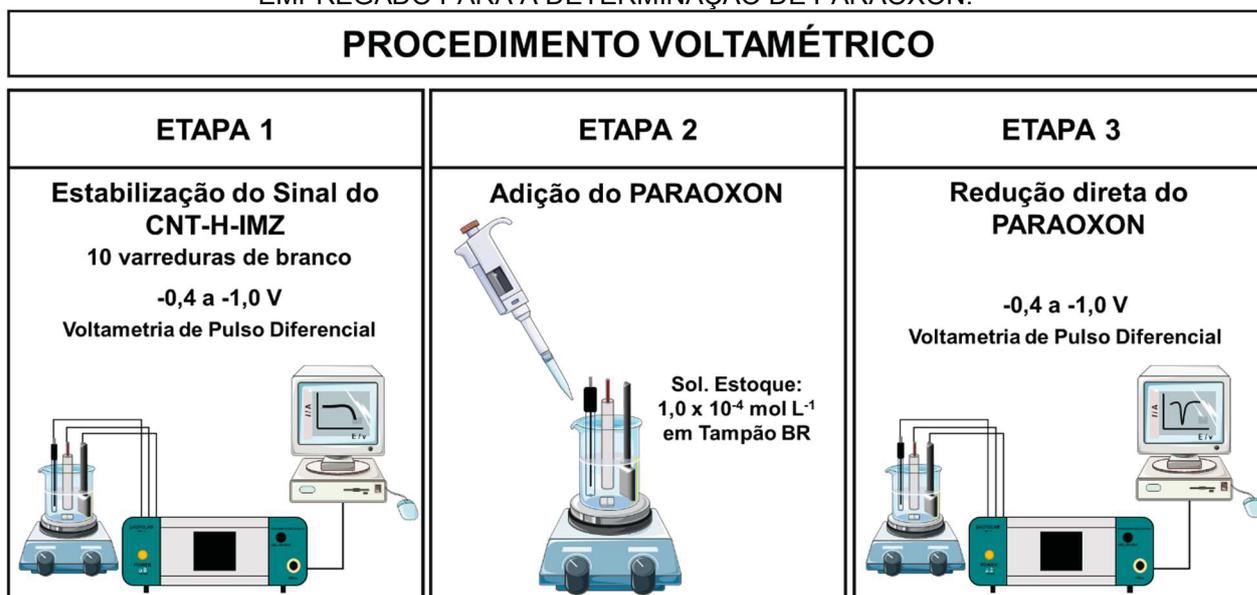
O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo de carbono vítreo, GCE, com 3,0 mm de diâmetro. A modificação da superfície eletródica foi realizada por *drop casting*, de maneira similar ao descrito anteriormente para a P4.

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato $\mu\text{Autolab}^{\text{®}}$ Type III, a coleta de dados foi obtida com auxílio do software NOVA 1.10. Os dados coletados foram tratados com o software Origin PRO8[®]. O eletrodo de referência

utilizado em todas as medidas foi o de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e um eletrodo de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar.

As medidas de voltametria de pulso diferencial foram feitas no intervalo de potencial de -0,4 a -1,0 V. A célula eletroquímica utilizada tem volume máximo de 20,0 mL, sendo utilizado o volume fixo de eletrólito suporte de 10,0 mL para todas as medidas. O procedimento utilizado é representado pela FIGURA 24.

FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO VOLTAMÉTRICO EMPREGADO PARA A DETERMINAÇÃO DE PARAOXON.



FONTE: A Autora (2019).

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em triplicata e em meio previamente desareado pela passagem de um fluxo de nitrogênio por 15 minutos.

4.2.4 Otimização dos parâmetros para o desenvolvimento da Metodologia analítica para a determinação da PX

4.2.4.1 Comportamento Eletroquímico do PX

O eletrodo depois de preparado, foi transferido para uma célula de trabalho contendo o eletrólito suporte, sendo registrados os voltamogramas do branco. Uma alíquota proveniente da solução estoque do paraoxon foi adicionada ao eletrólito suporte e então os voltamogramas referentes ao analito foram obtidos. A voltametria cíclica (CV) foi empregada a fim de se obter dados sobre o comportamento

eletroquímico do pesticida e a voltametria de pulso diferencial (DPV) foi usada para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica e posterior determinação.

Foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), em um intervalo de 100 kHz a 1 mHz e amplitude de 10 mV (rms), com polarização do eletrodo na condição de potencial de pico (referente ao pico R2) em um PGSTAT204 com módulo de impedância FRA32N. Os dados foram analisados por meio dos *softwares* Nova 2.1® e OriginPro8®. Pela técnica de EIS, fenômenos de interface podem ser identificados. O sinal alternado aplicado ao sistema gera uma resposta que corresponde a processos como limitações difusionais, ou resistência à transferência de carga, que estão correlacionados à estrutura do eletrodo.

4.2.4.2 Avaliação da potencialidade do CNT-H-IMZ-GCE como sensor para a determinação de PX

Foi realizado um estudo a fim de verificar a potencialidade e a viabilidade de emprego do CNT-H-IMZ-GCE como sensor para a PX, comparando-se as respostas obtida entre diferentes eletrodos. Sendo assim, foram construídos 4 eletrodos sendo eles: eletrodo de carbono vítreo (GCE), eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (CNT-GCE), eletrodo de carbono vítreo modificado nanotubos tratados pelo método de Hummers (CNT-H-GCE) e eletrodo de carbono vítreo modificado nanotubos de carbono tratados pelo método de Hummers e funcionalizados com imidazol (CNT-H-IMZ-GCE). Os eletrodos foram submetidos a medidas de CV, e as correntes obtidas para cada um dos eletrodos foram coletadas e comparadas através de um gráfico de barras.

4.2.4.3 Estudo do Efeito da Variação do pH

Para o estudo da variação do pH foram empregadas soluções de tampão Britton-Robinson com diferentes valores de pH, na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Os eletrólitos/pH foram avaliados utilizando DPV e a partir da melhor resposta, em função de corrente e perfil voltamétrico em relação ao PX (1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹), o pH foi escolhido.

4.2.4.4 Estudo do Volume de Modificador

Volumes de 0,5, a 3,0 μL de dispersão da CNT-H-IMZ foram adicionadas sobre o GCE e em seguida foram realizadas medidas por DPV, no intervalo de potencial de -0,4 a -1,0 V em tampão BR pH=10,0 e PX $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As correntes de pico para a PX foram coletadas e comparadas para a escolha do melhor volume.

4.2.4.5 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para o estudo de repetibilidade, foram feitas 5 medidas de DPV com a mesma superfície do CNT-H-IMZ-GCE. As correntes obtidas para cada uma das medidas foram coletadas e comparadas. Para o estudo da reprodutibilidade foram realizadas 5 medidas de DPV com 5 superfícies de CNT-H-IMZ-GCE diferentes e as correntes obtidas foram comparadas.

4.2.4.6 Parâmetros da Técnica Analítica

Foram realizados estudos de otimização dos principais parâmetros da técnica de voltametria pulso diferencial, a fim de se avaliar a influência de cada um deles na resposta do eletrodo para o analito. Os parâmetros avaliados foram: amplitude de pulso (10 a 100 mV), tempo de pulso (10 a 100 ms) e velocidade de varredura (5 a 40 mV s^{-1}).

4.2.5 Construção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais e de técnica, foi realizado o estudo da região de resposta linear do CNT-H-IMZ-GCE para a PX, com a construção de uma curva analítica. O intervalo de concentração de analito avaliado foi de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Com a curva de analítica foi possível obter a região linear de trabalho, bem como o desempenho analítico do método, através do cálculo dos limites de detecção e quantificação e da obtenção da sensibilidade através da equação da reta.

4.2.6 Análise da Amostra

Para a análise de amostras reais, foram realizadas medidas de adição e recuperação em três amostras de suco de laranja que podem estar sujeitas à contaminação por PX, adquiridas na cidade de Curitiba.

As amostras foram fortificadas com $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PX e depois diluídas diretamente na célula eletroquímica na proporção de 1: 1 (Amostra: BR-Buffer). Após, medidas de DPV foram realizadas, sendo as correntes obtidas interpoladas na curva de regressão linear para obter a concentração recuperada e comparada com a concentração adicionada inicialmente.

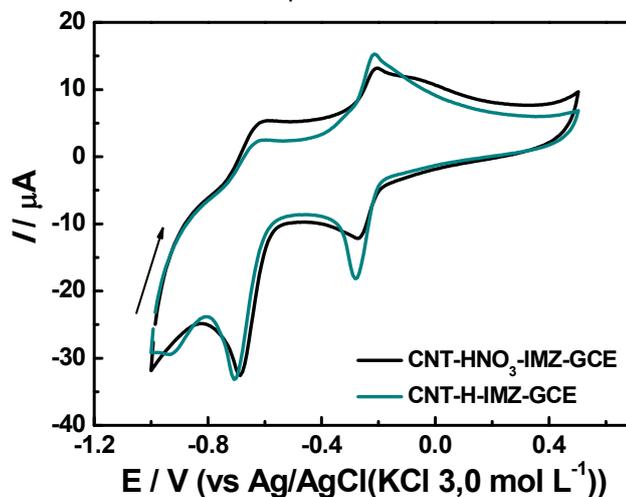
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Escolha do Compósito

Os materiais utilizados nesse trabalho foram uma parceria com o grupo GCC do DQ-UFPR, a qual tinha como proposta avaliar o efeito de tratamentos ácidos sobre CNT e posterior funcionalização com IMZ. Sendo assim, foram realizados dois tratamentos: um pela rota de Hummers e outro por oxidação com ácido nítrico, e ambos os materiais foram disponibilizados para utilização.

Sendo assim, foi realizado um estudo prévio empregando ambos os materiais, aqui nomeados como CNT-H-IMZ (Hummers) e CNT-HNO₃-IMZ (ácido nítrico), como modificador de um GCE e o perfil voltamétrico obtido para o PX está apresentado na FIGURA 25.

FIGURA 25 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CNT-HNO₃-IMZ-GCE (PRETO) E CNT-H-IMZ-GCE (VERDE) NA PRESENÇA DE $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ DE PX. $v = 50,0$ MV S⁻¹; TAMPÃO BR pH=10,0.



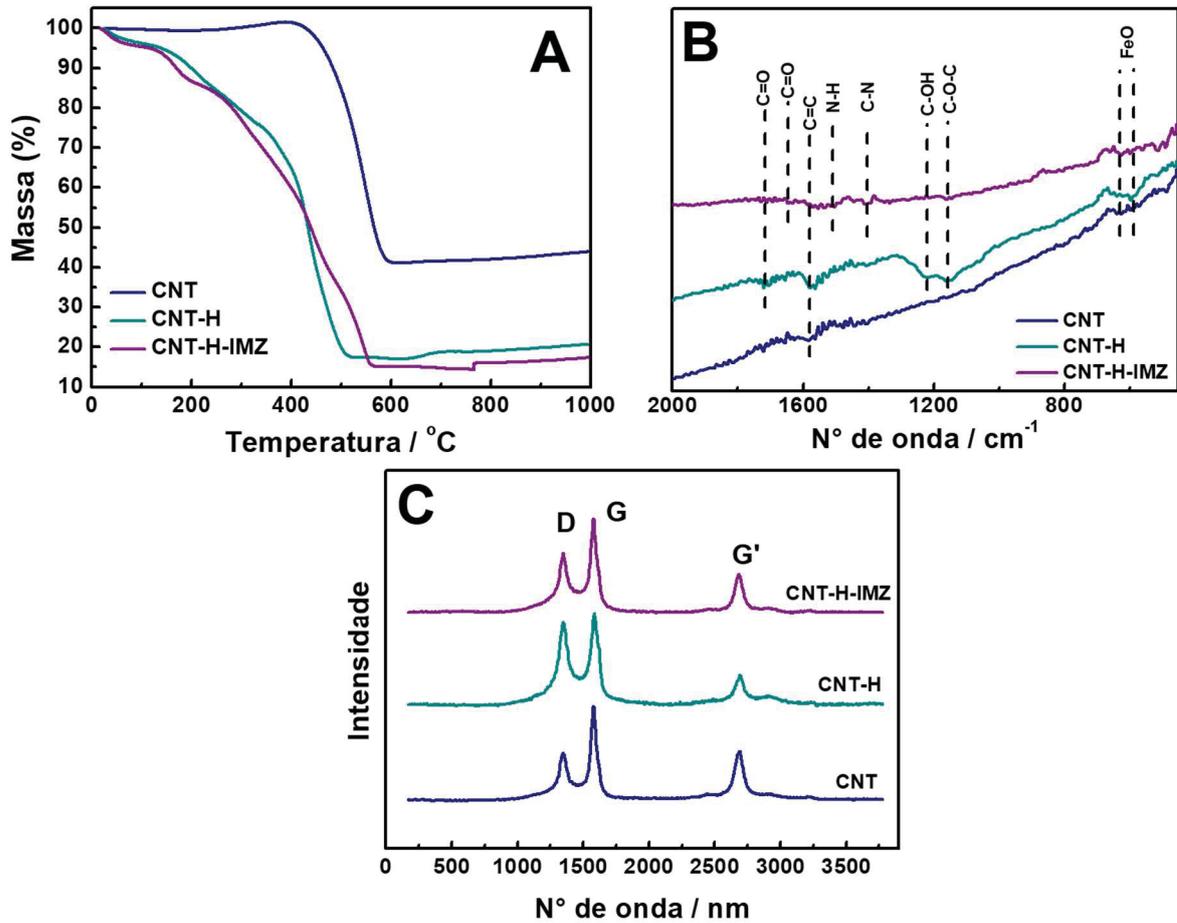
É possível observar a presença dos processos faradáicos referentes ao PX, que serão discutidos posteriormente, e não há grandes diferenças entre as respostas obtidas em uma mesma condição para ambos os compósitos. Sendo assim, os estudos foram conduzidos empregando o CNT tratado pelo método de Hummers, e as caracterizações apresentadas nesse trabalho serão referentes aos derivados desse tratamento.

4.3.2 Caracterização do CNT-H-IMZ

O material compósito foi caracterizado por diferentes técnicas, como TGA, SEM, TEM, FTIR e Raman.

O resultado obtido pelas análises de TGA para ambas amostras de CNTs estão demonstradas na FIGURA 26A, e mostra eventos de perda de massa distintos para as amostras, que são referentes a grupos oxigenados e derivados de imidazol [162,181]. O resultado de TGA mostra eventos distintos como: (i) perda de água abaixo de 100 °C; (ii) perda de grupos oxigenados entre 140 – 240 °C. Além disso, a diferença notável na degradação do CNT de amostras tratadas pelo método de Hummers indica que houve remoção de camadas CNT neste processo. No geral, os resultados de TGA permitiram confirmar que a oxidação pelo método de Hummers realmente foi efetiva, apresentando, portanto, um grau de funcionalização mais alto em relação ao precursor.

FIGURA 26 – A) TERMOGRAMAS; ESPECTROS DE B) FTIR E C) RAMAN OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE CNT E CNT-H-IMZ.



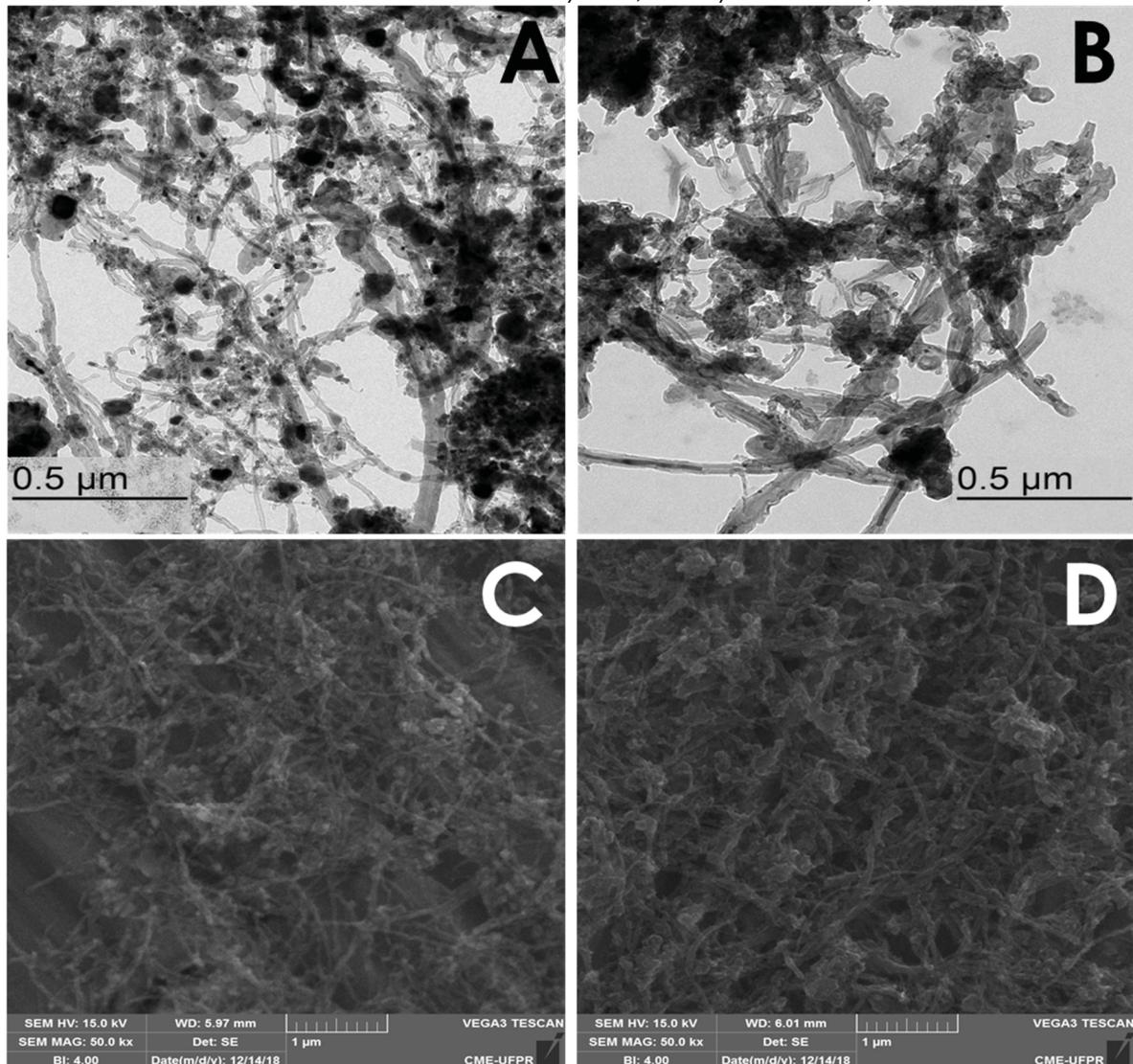
A partir dos espectros de FTIR (FIGURA 26B), foi possível observar alguns sinais de interesse como: C=C em torno de 1580 cm⁻¹, [182,183], estiramento referente ao óxido de ferro magnético Fe-O em 620 e 580 cm⁻¹ [184]; após oxidação C=O a aproximadamente 1720 cm⁻¹, em relação aos aglomerados ácido carboxílico, C-OH em 1220 cm⁻¹ de álcoois primários; nas amostras funcionalizadas, bandas relacionadas à ligação amida, como C = O a 1638 cm⁻¹, N-H a 1530 cm⁻¹ e C-N a 1410 cm⁻¹ [163,164].

Nos espectros Raman (FIGURA 26C) obtidos para as 3 amostras, é possível notar a presença das bandas características do CNT: banda D em 1352 cm⁻¹, a banda G em 1572 cm⁻¹ e a banda G' em 2687 cm⁻¹ [185,186]. A razão I_D/I_G nos espectros Raman traz informações a respeito dos defeitos estruturais do material, como a presença de heteroátomos na estrutura, por exemplo, sendo possível o cálculo dessa razão a partir dos espectros, que apresentaram valores de 0,462 a 0,574 e 0,863 para CNT, CNT-H e CNT-H-IMZ, respectivamente. O aumento da razão na ordem CNT <

CNT-H < CNT-H-IMZ indica o aumento de defeitos na estrutura do nanomaterial causado pelos processos de tratamento oxidativo e tratamento oxidativo + funcionalização.

A caracterização da morfologia dos CNTs pode ser obtida a partir de imagens de TEM (FIGURA 27A-B) e SEM (FIGURA 27C-D), nas quais é possível verificar que, mesmo após a funcionalização química, o CNT-H-IMZ apresenta a mesma morfologia do precursor CNT, não apresentando diferenças significativas, sugerindo que as propriedades dos CNTs que são relacionadas à estrutura, foram mantidas. Além disso, o material fica disperso por toda a área do substrato.

FIGURA 27 – IMAGENS DE SEM E TEM DE A-C) CNT; E B-D) CNT-H-IMZ, RESPECTIVAMENTE.

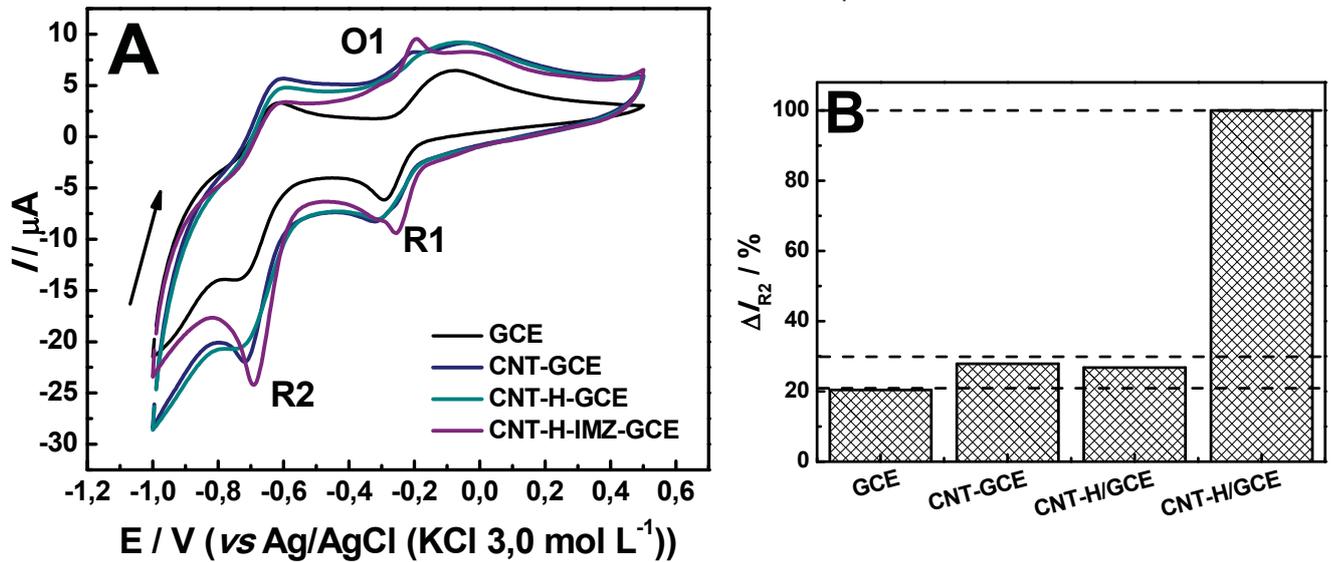


FONTE: A Autora (2019).

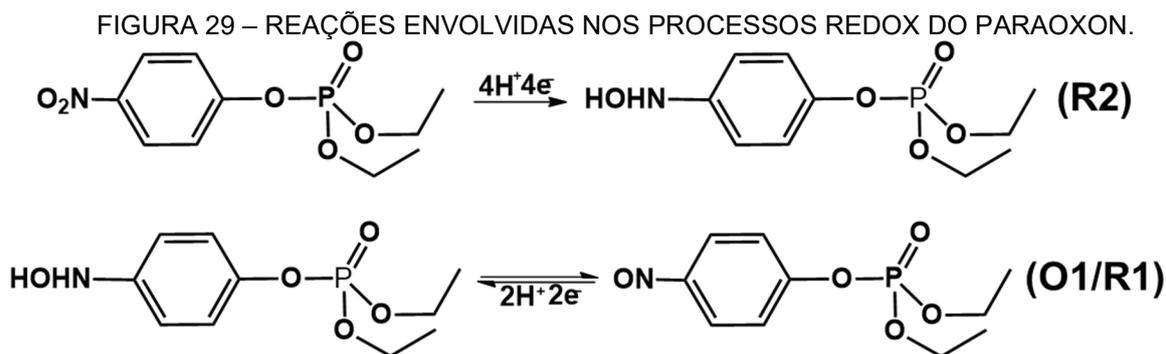
4.3.3 Comportamento Voltamétrico do Paraoxon

A fim de estudar e explorar o comportamento eletroquímico do PX, experimentos de voltametria cíclica e EIS foram realizados em diferentes superfícies eletródicas: eletrodo de carbono vítreo não modificado (GCE), nanotubos de carbono (CNT-GCE), nanotubos de carbono tratados pelo método de Hummers (NCT-H-GCE) e nanotubos de carbono tratados pelo método de Hummers funcionalizados com Imidazol (CNT-H-IMZ-GCE) em BR solução tampão de pH 10. Os resultados obtidos estão na FIGURA 28.

FIGURA 28 – A) PERFIL VOLTAMÉTRICO DO PARAOXON; E B) GRÁFICOS DE BARRAS DE CORRELAÇÃO ENTRE CORRENTE DE PICO OBTIDA PARA CADA ELETRODO. $C_{PX} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; $v = 50,0$ mV s⁻¹; TAMPÃO BR pH=10,0.



A FIGURA 28A mostra voltamogramas cíclicos típicos de PX, 10,0 mmol L⁻¹, em meio de tampão BR em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. É possível observar, nos voltamogramas acima a presença de três processos faradáicos em -0,20V (O1), -0,25V (R1) e -0,71V (R2), sendo as reações representativas destas etapas voltamétricas apresentadas na FIGURA 29.



FONTE: A Autora (2019).

A presença de processos faradâicos referentes ao PX é obtido para todos os eletrodos testados, que são processos normalmente observados para nitrocompostos [187,188]. O processo R2 está relacionado à reação irreversível da redução do grupo nitrofenil presente no PX, gerando um grupo hidroxilamina, sendo 4 elétrons envolvidos nesta reação. O processo O1 vem da oxidação do grupo hidroxilamina ao grupo nitro, que é então reduzido à hidroxilamina em um processo reversível, como observado no processo R1. Neste processo, dois elétrons estão envolvidos.

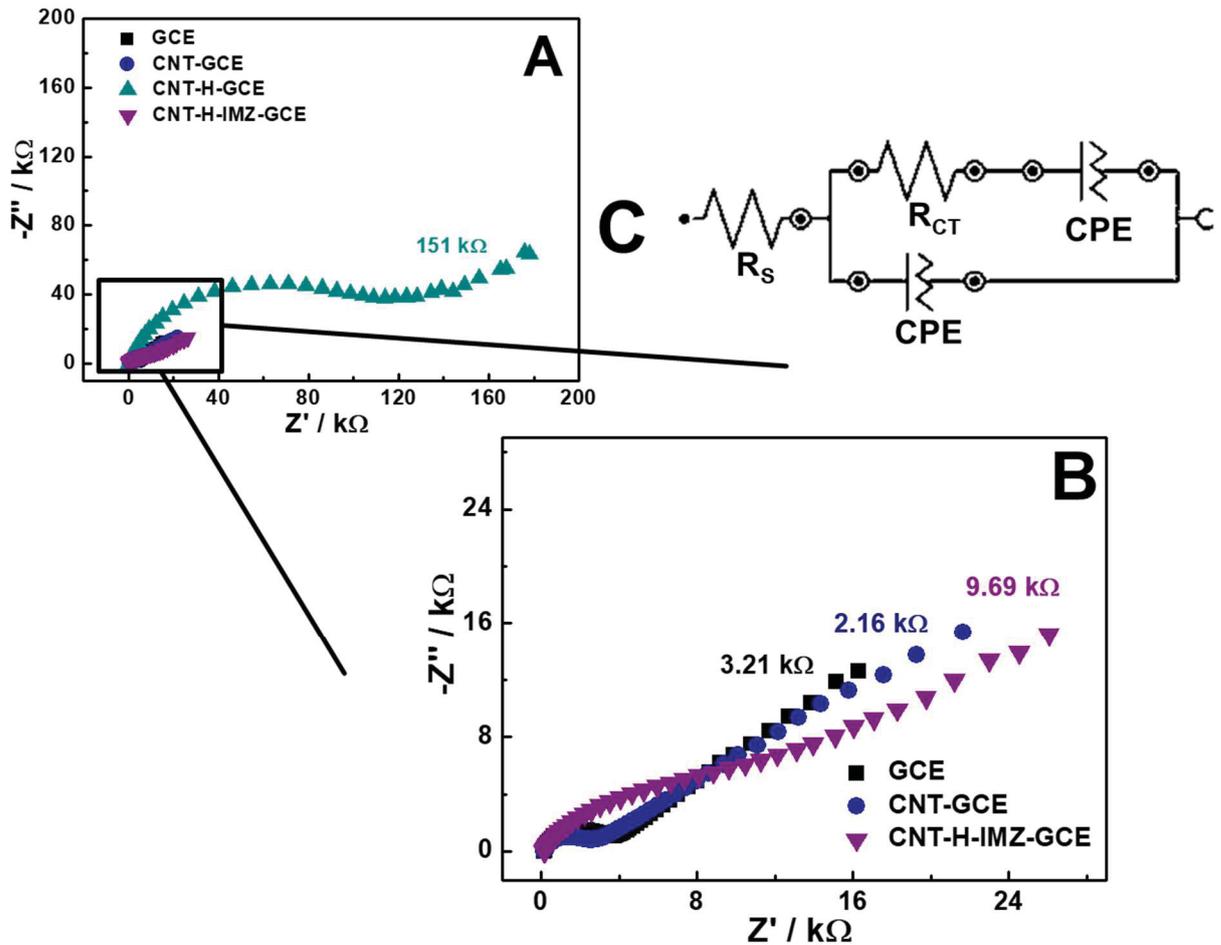
Além da presença dos processos, é possível observar, no gráfico da FIGURA 28B, que a magnitude de corrente dos picos voltamétricas é mais pronunciada na presença dos modificadores em relação ao GCE, comportamento já esperado. Normalmente, um sensor eletroquímico baseado em CNT apresenta resposta superior que um sensor não modificado devido, por exemplo, ao aumento da área do eletrodo ou através da melhora na transferência eletrônica, facilitando a cinética e termodinâmica do processo redox [189].

A fim de investigar a natureza da melhora das respostas, experimentos de EIS foram realizadas, a partir dos quais informações sobre o sistema podem ser tiradas. Por exemplo em altas frequências (100 kHz), a intersecção do início do arco com o eixo real indica o valor da resistência em série (R_s). Este valor é atribuído à resistência que o eletrólito utilizado durante as medidas de EIS apresenta para a mobilidade dos íons do interior da solução à superfície do eletrodo de trabalho, e pode ser associada à resistência dos conectores externos ligados à célula eletroquímica.

O valor da resistência à transferência de carga (R_{ct}) pode ser estimado pelo ajuste do arco que ocorre em frequências intermediárias e está relacionado à resistência aos processos redox faradâicos na interface eletrodo e eletrólito. Já em

baixas frequências (1 mHz) podem ser sinalizadas limitações difusionais. Todas essas informações são representadas pelos diagramas de Nyquist, sendo os obtidos para os experimentos de EIS representados na FIGURA 30.

FIGURA 30 – A-B) DIAGRAMA DE NYQUIST DE IMPEDÂNCIA DOS DIFERENTES ELETRODOS EM INTERVALO DE 100 kHz A 1 mHz DE FREQUENCIA E 10 mV DE AMPLITUDE; C) CIRCUITO EQUIVALENTE UTILIZADO. $C_{PX} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH=10,0.



É possível observar, na FIGURA 30A, quando se compara CNT(●) e CNT-H (▲), que o tratamento de oxidação afeta diretamente o comportamento eletroquímico e os processos redox na superfície do material, nesse caso dificultados no CNT-H, e que pode ser observado pelo aumento do diâmetro do semicírculo apresentado nos diagramas de Nyquist. Esse aumento da resistividade pode ser atribuído à diminuição da condutividade do material devido à presença dos grupos oxigenados, e por consequência diminuição da conjugação e dos sítios sp^2 . Ainda, na presença do CNT-H-IMZ (▼), o comportamento resistivo é diminuído em relação ao CNT-H (▲), porém ainda superior ao CNT precursor e ao GCE, já que este material também tem

estruturas de carbono sp^2 conjugadas substituídas por sp^3 , e com isso a condutividade no material é diminuída. Assim como já descrito em outros sistemas [190,191], a melhora pode ser atribuída a presença de certa quantidade de nitrogênios e diminuição de oxigênios, o que, sugerido pelos autores, ocorre o aumento da reatividade da superfície do material, fazendo com uma maior interação interfacial ocorra, facilitando as interações com as espécies com cargas, melhorando a transferência eletrônica, diminuindo o R_{CT} .

A partir dos espectros de EIS obtidos para os quatro eletrodos - GCE, CNT-GCE, CNT-H-GCE e CNT-H-IMZ-GCE, e empregando o circuito equivalente de Randles modificado (FIGURA 30B), foi possível calcular a resistência de transferência de carga (R_{CT}), sendo 3,21 k Ω , 2,16 k Ω , 151 k Ω e 9,69 k Ω , respectivamente, usando o circuito equivalente de Randles modificado (FIGURA 30C).

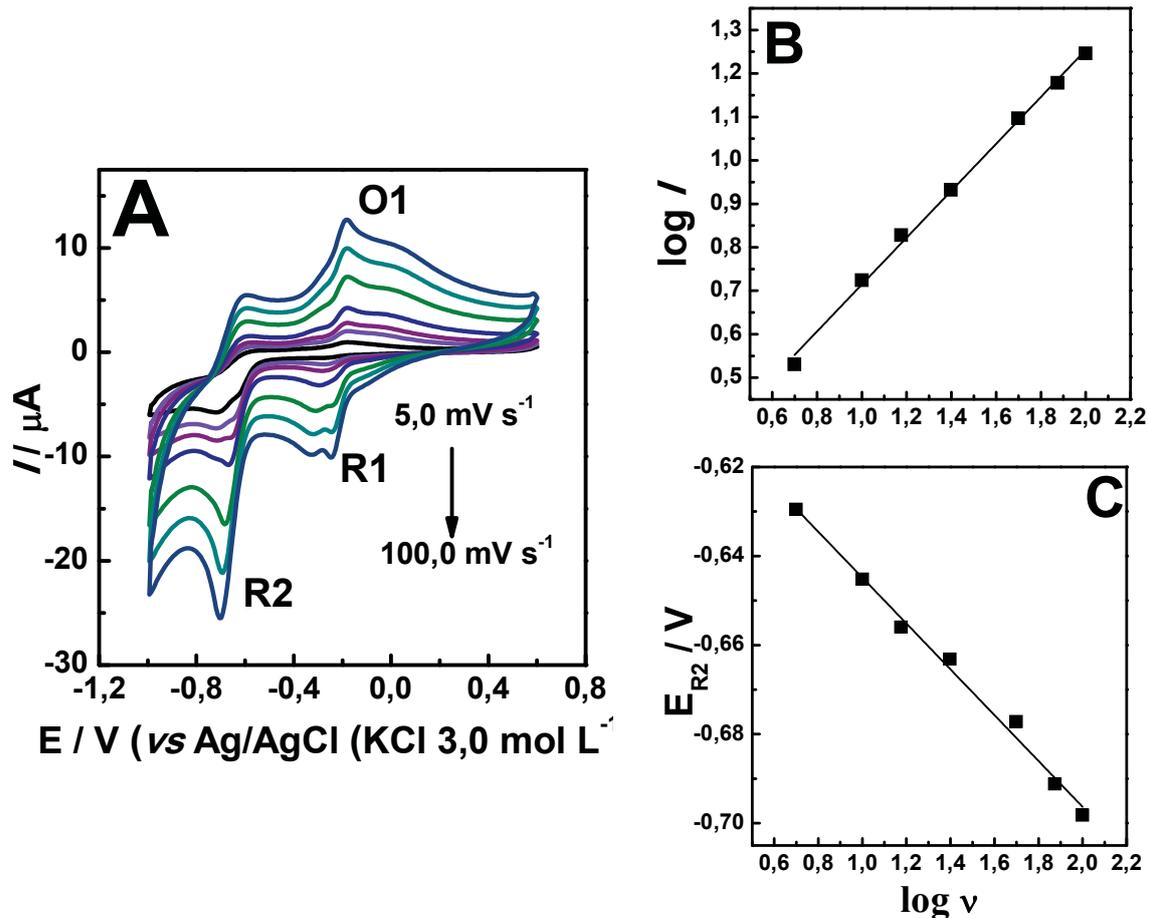
Além disso, por estudos de voltametria cíclica foi possível calcular a área ativa, empregando a equação de Randles-Sevcik, para ambos os eletrodos utilizando ferricianeto de potássio como uma sonda redox em diferentes velocidade de varredura e foi observado que a área ativa para GCE (0,0420 cm²) e CNT-GCE (0,0684 cm²) foi maior que a CNT-H-IMZ -GCE (0,0257 cm²) obtido nas mesmas condições, indicando que este não é, novamente, o fator limitante que faz com que o dispositivo desenvolvido tenha o melhor resultado em relação aos demais testados.

Mesmo com resultados experimentais discutidos anteriormente, o dispositivo proposto CTN-H-IMZ-GCE exibiu corrente de pico para redução de PX cerca de 70% maior em contraste com GCE, CNT-GCE e CNT-H (FIGURA 28B), indicando que a contribuição sinérgica entre IMZ e CNT pode aumentar notavelmente a atividade eletroquímica de PX, como já descrito em outros trabalhos [170,171,192], em que o grupo imidazol pode atuar como um co-catalisador e provavelmente está envolvido em várias etapas do processo redox, agindo de maneira indireta.

Pode-se sugerir que a ação do IMZ é pela interação entre o resíduo de histidina e pesticidas organofosforados, que ocorre pela “formação de um complexo”, que se formado na superfície do eletrodo, pode facilitar os processos redox naturais de grupos nitro, uma vez que mais espécies de PX estão na interface eletrodo/solução, disponíveis para serem oxidadas. Essa maior quantidade de analito implica, então, em maior corrente de pico observada nos voltamogramas, condizente com os resultados obtidos (FIGURA 28).

Informações adicionais sobre o processo redox PX no dispositivo proposto foram obtidas a partir de experimentos de voltametria cíclica com a variação da velocidade de varredura e avaliação de parâmetros como corrente e potencial de pico para o pico R2, sendo os resultados apresentados na FIGURA 31.

FIGURA 31 – A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO PARAOXON OBTIDOS PARA ESTUDO DE VARIAÇÃO DE VELOCIDADE DE VARREDURA; CORRELAÇÃO ENTRE B) LOG DA CORRENTE DE PICO E C) POTENCIAL DE PICO VERSUS LOG DA VELOCIDADE DE VARREDURA. $C_{PX}=1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH=10,0.



A velocidade de varredura do experimento controla a taxa com que o potencial aplicado é varrido em função do tempo. Velocidades de varredura mais rápidas levam a uma diminuição no tamanho da camada de difusão; como consequência, correntes mais altas são observadas. Em geral, a corrente de pico de uma reação redox controlada por difusão segue a equação de Randles-Sevcik [193]:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (5)$$

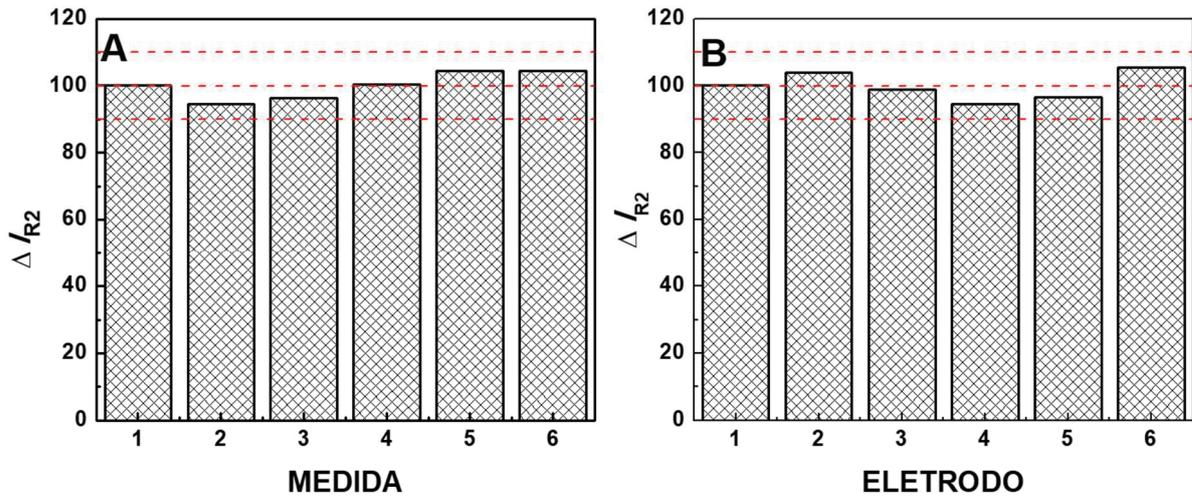
Em que $2,69 \times 10^5$ é a constante k com unidades de $C \text{ mol}^{-1} V^{-1/2}$, n é o número de elétrons na reação redox, A é a área do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão do analito ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e ν é a velocidade de varredura ($V \text{ s}^{-1}$). Sendo assim, a linearidade da curva de I vs. $\nu^{1/2}$ ou valor de *slope* = 0,5 da curva de $\log I$ vs. $\log \nu$ indicam um processo com controle difusional

Para os experimentos realizados, foi obtida uma curva $\log I$ vs. $\log \nu$, (FIGURA 31B) cuja inclinação apresentou valor de 0,54, muito próximo ao valor ideal, que sugere comportamento de um processo redox controlado por difusão, isto é, o transporte de massa é o fator limitante do sistema. Além disso, a dependência linear de E_{PC} vs $\log \nu$, com a mudança para potenciais mais negativos com o aumento da velocidade de varredura é característica de processos irreversíveis, condizente com o processo monitorado do PX [193,194].

Para fins analíticos, o pico de redução a $-0,71V$ – o qual será designado por R2 – apresenta a corrente mais alta, além de ser um processo independente dos outros processos, portanto este pico foi escolhido para ser monitorado durante os estudos e construção da metodologia, e posterior detecção de paraoxon.

Para avaliar a robustez e concordância das respostas obtidas pelo sensor proposto, foram realizadas seis medidas consecutivas utilizando a mesma superfície do eletrodo, bem como medidas com seis diferentes CNTH-IMZ-GCE. Ambos os estudos foram realizados utilizando uma concentração de PX de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um desvio padrão relativo abaixo de 10% ($n = 6$) foram obtidos para ambos os estudos, o que dá uma boa repetibilidade e reprodutibilidade de respostas obtidas com o dispositivo proposto (FIGURA 32).

FIGURA 32 – ESTUDO DE A) REPETIBILIDADE E B) REPRODUTIBILIDADE OBTIDOS EMPREGANDO O CNT-H-IMZ-GCE NA PRESENÇA DE PARAOXON. $C_{PX}=1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; $a = 50 \text{ mV}$; $t = 50 \text{ ms}$.



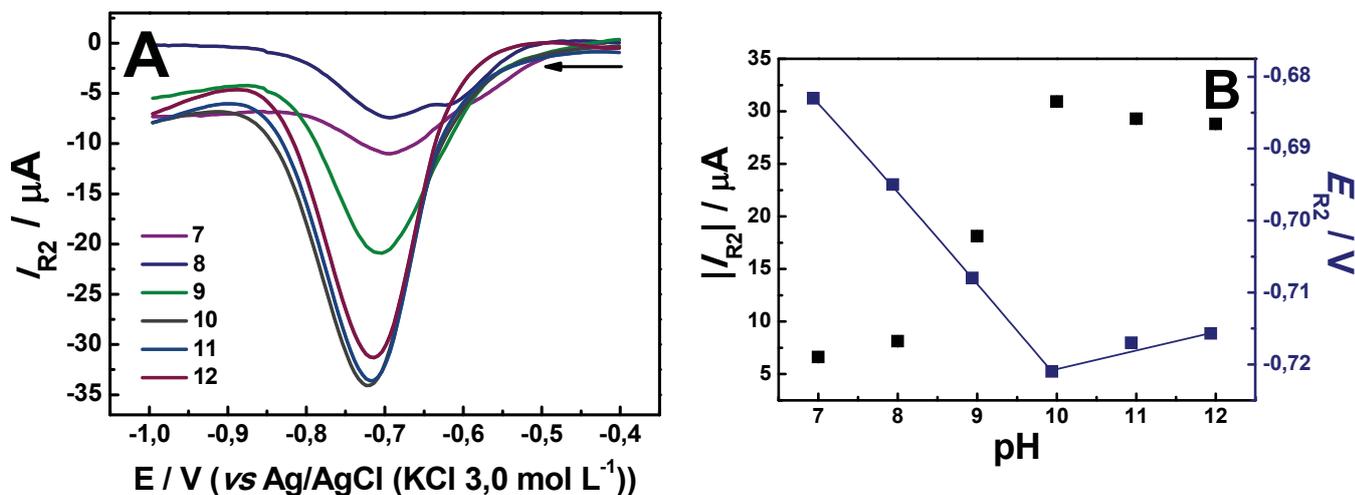
4.3.4 Otimização da Metodologia Analítica

Para viabilizar a proposta do CNT-H-IMZ como modificador de eletrodos, foram realizados estudos para otimizar alguns parâmetros que influenciam diretamente na resposta do sensor.

4.3.4.1 Estudo da Variação do pH

Foi realizado um estudo de variação do pH do eletrólito suporte a fim de avaliar a influência desse parâmetro na resposta do dispositivo desenvolvido. Para tal, medidas de DPV na presença do analito foram realizadas e os voltamogramas obtidos então representados na FIGURA 33.

FIGURA 33 – A) VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA PARAOXON OBTIDOS NO ESTUDO DE pH; B) CORRELAÇÃO ENTRE CORRENTE E POTENCIAL DE PICO EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE pH. $C_{PX} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR; $\Delta_{ES} = 4 \text{ mV}$; $a = 50 \text{ mV}$; $t = 50 \text{ ms}$.



É possível observar que o aumento no valor de pH é acompanhado com o aumento da corrente de pico observada para redução de PX, que atinge o máximo em $\text{pH} = 10,0$, escolhido como valor ótimo e sem diferenças significativas para valores maiores que isto.

A partir das reações do PX, mostrados na FIGURA 29, é possível notar que a reação de redução referente ao pico R2 envolve a transferência de 4 prótons, sendo assim, em valor de pH mais baixos, ou seja, com mais quantidade de H^+ disponível, seria a condição mais favorável da reação ocorrer, ou seja, condição oposta à otimizada.

Pode-se sugerir, então, que a variação do pH afeta mais a reatividade do modificador, do que o PX propriamente dito. Isso porque, com base em um estudo realizado por Orth e colaboradores [119], em que os autores descrevem estudos catalíticos empregando compósitos funcionalizados com IMZ, os autores sugerem que a atividade catalítica do imidazol está intimamente relacionada ao meio, e o mesmo comportamento observado neste estudo foi observado: ocorre o aumento na atividade catalítica com o aumento do valor do pH. Essa melhora foi atribuída às espécies de imidazol neutras, majoritárias nessa condição.

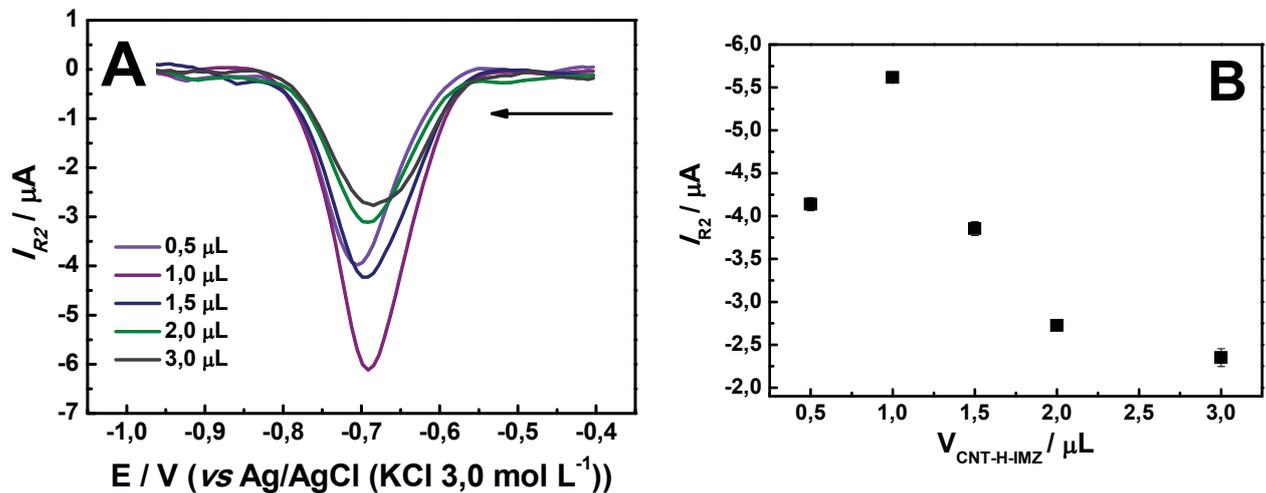
Sendo assim, em $\text{pH} = 10,0$ tem-se a condição ótima de ação do IMZ, que é diretamente responsável pela boa atuação do dispositivo; além disso, tem-se os grupamentos oxigenados totalmente desprotonados ($\text{pK}_a \sim 10$ [195]) que podem interagir com o PX, facilitando ainda mais as reações na superfície do dispositivo.

O deslocamento para potenciais mais negativos, ao passo que o meio se torna mais básico, conforme observado na FIGURA 33B indica que o processo do eletrodo é influenciado pela presença de prótons, conforme discutido anteriormente.

4.3.4.2 Estudo da Quantidade de Modificador

O efeito do volume de CNT-H-IMZ para modificação de GCE foi avaliado no intervalo de 0,5 a 3,0 μL , e os resultados estão dispostos na FIGURA 34.

FIGURA 34 – A) VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL PARA PARAOXON OBTIDOS PARA O ESTUDO DE QUANTIDADE DE MODIFICADOR (CNT-H-IMZ); B) VARIAÇÃO DE CORRENTE DE PICO EM FUNÇÃO DO VOLUME DE MODIFICADOR. $C_{\text{PX}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta E_{\text{S}} = 4 \text{ mV}$; $a = 50 \text{ mV}$; $t = 50 \text{ ms}$.



A partir dos voltamogramas e da intensidade de corrente, a melhor resposta eletroanalítica para a redução do paraoxon foi com o volume de 1,0 μL da suspensão de CNT-H-IMZ, valor otimizado e utilizado para todos os estudos, e a partir deste volume houve o decréscimo dos valores de corrente.

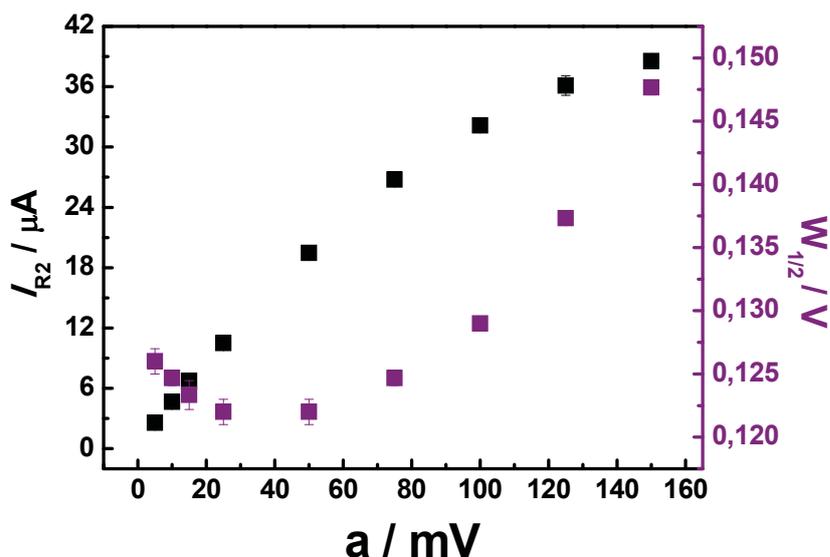
Tal comportamento pode estar associado à presença do Nafion na suspensão, utilizado para que o CNT não lixivie da superfície do eletrodo à medida que os experimentos são realizados. O Nafion é um polímero não condutor, e essa característica pode ser mais pronunciada em volumes maiores do modificador, que tem uma quantidade maior desta espécie e que pode estar atrapalhando as reações na superfície do CNT-H-IMZ-GCE.

4.3.4.3 Parâmetros da Técnica de Pulso Diferencial

A metodologia desenvolvida para a determinação de PX empregando o CNT-H-IMZ-GCE foi baseada em medidas de voltametria de pulso diferencial, por se tratar de uma técnica mais sensível. Para se obter a melhor condição para a aplicação de tal dispositivo, os parâmetros intrínsecos da DPV foram avaliados, sendo eles amplitude e tempo de pulso, e velocidade de varredura.

O primeiro parâmetro otimizado foi a amplitude, para tal foram fixados os valores de tempo de pulso e velocidade de varredura, e o valor de amplitude de pulso foi variado no intervalo de 1 a 150 mV, sendo o resultado obtido na FIGURA 35.

FIGURA 35 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DA AMPLITUDE DE PULSO EMPREGANDO CNT-H-IMZ-GCE PARA A DETERMINAÇÃO DE PARAOXON. $C_{PX} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta E_S = 4$ mV; $t = 50$ ms.

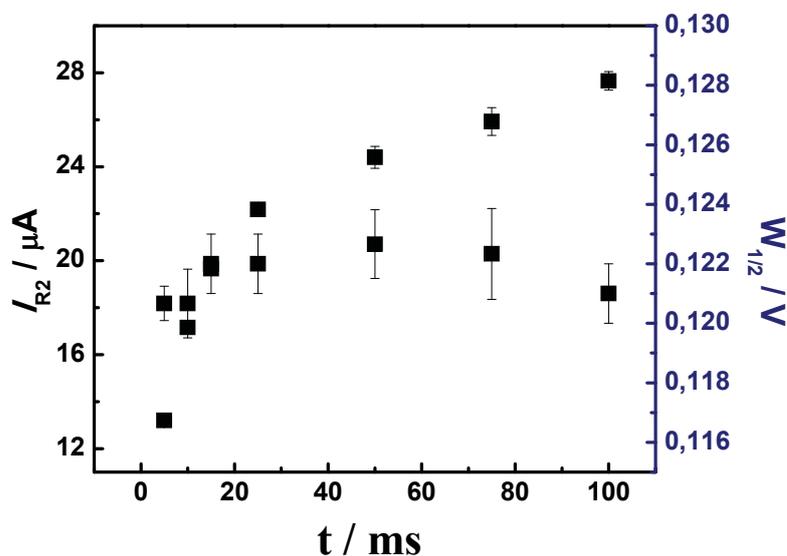


A amplitude de pulso é caracterizada pela intensidade de potencial elétrico aplicada a cada pulso. Em tese, o aumento dessa perturbação promove uma maior energia na superfície eletródica, gerando assim uma maior intensidade do processo faradáico. Em contrapartida, o aumento da amplitude de pulso provoca também o aumento da largura dos picos, uma vez que a perturbação não potencializa apenas a corrente faradáica, mas também a contribuição da corrente capacitiva, o que pode afetar a seletividade das medidas. Sendo assim, a escolha da melhor amplitude de pulso é dada pela avaliação da intensidade de corrente e da largura de potencial de pico.

É possível observar uma relação direta entre o aumento da amplitude de pulso e o aumento da intensidade de corrente de pico catódico, que se deve ao fato de uma maior perturbação do sistema que acarreta em mais espécies sofrendo redução. O aumento da intensidade de corrente tem comportamento linear até o valor de amplitude de 75 mV. Já, a largura de pico aumenta de maneira pronunciada a partir de 50 mV. Assim, o melhor resultado em função de corrente e largura de pico foi observado para as medidas empregando amplitude de 75 mV, valor fixado para medidas e análises subsequentes.

O tempo de pulso é outro parâmetro que foi avaliado e está diretamente relacionado com a maior ou menor contribuição da corrente faradáica (corrente de interesse). Além disso, o tempo de cada medida é dependente deste parâmetro, influenciando diretamente na frequência analítica. Para a realização deste estudo foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial variando o valor do tempo de pulso de 5 a 100 ms e fixando os demais parâmetros já otimizados, tal como a amplitude de pulso em 75 mV. Os resultados obtidos estão na FIGURA 36.

FIGURA 36 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE TEMPO DE PULSO EMPREGANDO CNT-H-IMZ-GCE PARA A DETERMINAÇÃO DE PARAOXON. $C_{PX} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta E_S = 4 \text{ mV}$; $a = 75 \text{ mV}$.



É possível observar que ocorre o aumento da corrente de pico com o aumento do tempo de pulso, e não há variação significativa da largura de pico. Além disso, para valores maiores de tempo de pulso tem-se uma maior contribuição da corrente faradáica, promovendo uma melhor definição do pico. Sendo assim, foi escolhido

como melhor condição o tempo de pulso de 100 ms pelo fato de apresentar intensidade de corrente de pico satisfatória.

A Tabela 4 traz um resumo dos parâmetros otimizados.

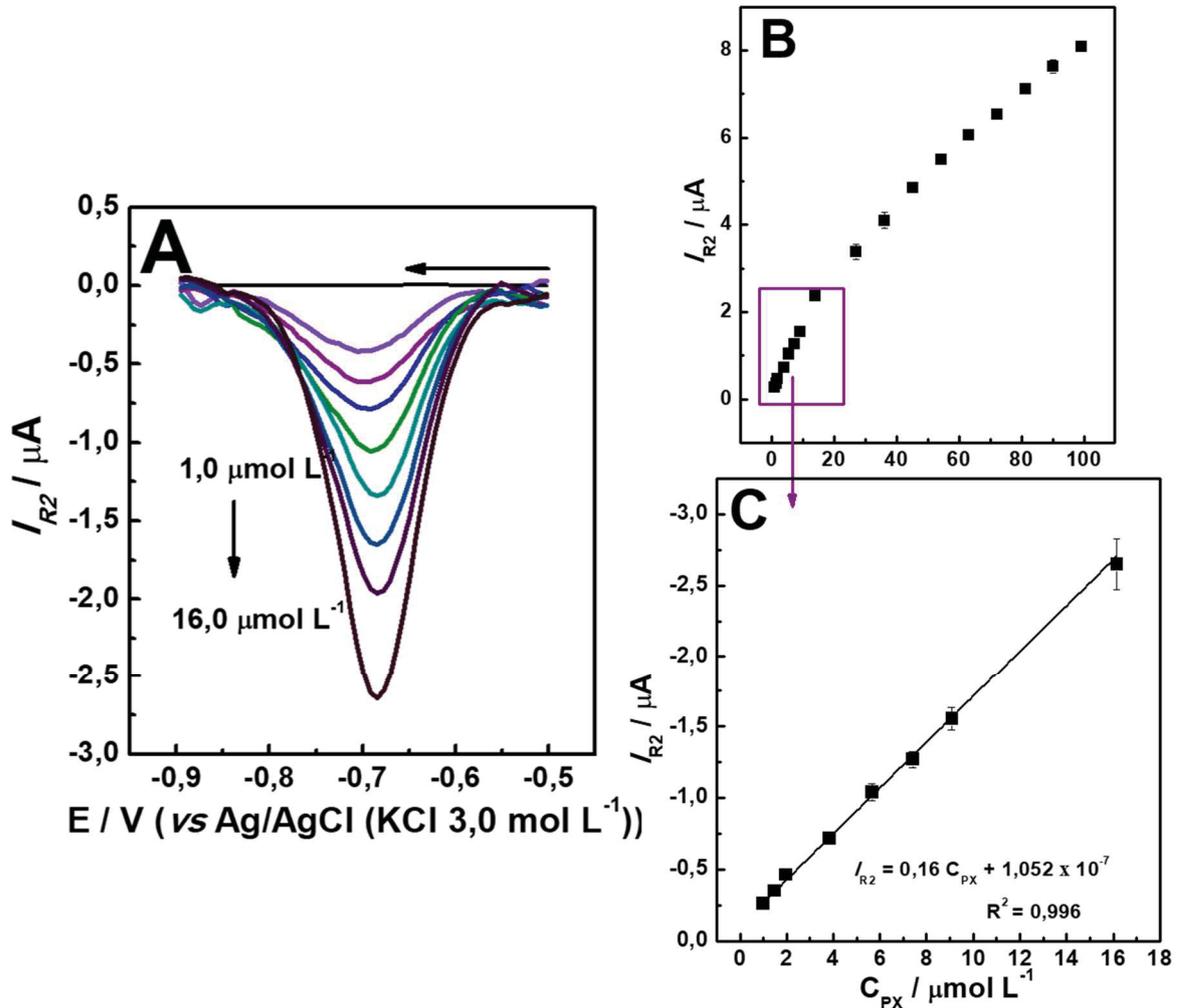
TABELA 4. CONDIÇÕES ESTUDADAS E OTIMIZADAS PARA OS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS RELACIONADOS À DETERMINAÇÃO DE PX EMPREGANDO CNT-H-IMZ-GCE

Parâmetro	Faixa Estudada	Otimizado
Eletrólito	Tampão BR	
pH	7,0 – 12,0	10,0
Quantidade de Modificador / μL	0,5 – 3,0	1,0
Amplitude de Pulso / mV	5 – 150	75
Tempo de pulso / ms	5 – 100	100

4.3.5 Curva Analítica e Aplicação em amostras

Sob condições otimizadas, foi possível obter uma curva analítica através de adições crescentes e sucessivas de paraoxon diretamente na célula eletroquímica, e os resultados estão apresentados na FIGURA 37.

FIGURA 37 – A) VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL DA REGIÃO LINEAR OBTIDA EMPREGANDO CNT-H-IMZ-GCE PARA A DETERMINAÇÃO DE PARAOXON; B) FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE PARAOXON ESTUDADA; E C) CURVA ANALÍTICA OBTIDA. TAMPÃO BR pH = 10,0; $\Delta E_{ES} = 6$ mV; $a = 75$ mV; $t = 100$ ms; $N=3$



É possível observar que ocorre um aumento linear da corrente até a concentração de $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e a partir desta concentração tem-se a diminuição da sensibilidade. A partir da regressão linear da curva, FIGURA 37C, foi possível obter os parâmetros de mérito analítico, sendo os LOD e LOQ calculados a partir das equações (2) e (3) [178]. A Tabela 5 traz o desempenho analítico obtido com o dispositivo desenvolvido.

TABELA 5. DESEMPENHO ANALÍTICO OBTIDO COM O CNT-H-IMZ-GCE PARA A DETERMINAÇÃO DE PX

Região Linear / mol L⁻¹	$1,0 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-5}$
R²	0,996
Sensibilidade / A mol⁻¹ L	0,16
LOD / mol L⁻¹	$1,2 \times 10^{-7}$
LOQ / mol L⁻¹	$4,0 \times 10^{-7}$

Para avaliar a potencialidade de uso do dispositivo construído para determinação de PX em amostras reais, estudos de recuperação foram realizados em diferentes amostras (suco de laranja, suco de laranja fresco e leite) enriquecidas com PX, sendo os resultados demonstrados na Tabela 6.

TABELA 6. RESULTADOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE DA AMOSTRA. N=3

Amostra	Add / mol L⁻¹	Rec / mol L⁻¹	Rec / %
Suco Orgânico		$4,58 \times 10^{-6}$	91,55
Suco Integral	$5,0 \times 10^{-6}$	$4,84 \times 10^{-6}$	96,79
Suco Natural		$4,45 \times 10^{-6}$	88,90

Para todas as amostras, os valores recuperados obtidos usando o dispositivo construído estão de acordo com os valores adicionados em um nível de confiança de 95%.

Mesmo apresentando bons valores recuperação, é possível observar que o suco natural, preparado na hora da análise, foi o que apresentou menor taxa de recuperação, que pode ser associado com a presença de elevadas quantidade de ácido ascórbico, interferente o qual apresentou maior variação na corrente do PX, durante os estudos de possíveis interferentes, apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE INTERFERENTES.

C_{PX} / mol L⁻¹	INT	GLU	AA	AC
	C_{INT} / mol L⁻¹	% de Variação da I_{R2} em função da C_{INT}		
1,0 × 10⁻⁶	$1,0 \times 10^{-7}$	3,4	0,78	2,9
	$1,0 \times 10^{-6}$	12,2	6,0	5,2
	$1,0 \times 10^{-5}$	11,7	24,6	6,2

Foram avaliados os componentes principais da composição do suco / fruta: ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) e glicose (GLU). A partir das variações de resposta atuais para o paraoxon foi possível notar que nenhuma dessas espécies causa interferência significativa, mesmo em concentrações 10 vezes superiores à concentração de PX, nem mesmo o ácido ascórbico visto o valor de recuperação apresentado anteriormente.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A partir de diferentes tratamentos dos nanotubos, oxidação pelo método Hummers e com ácido nítrico, e posterior funcionalização com imidazol, foi possível observar que a resposta de ambos compósitos, quando utilizados como modificador, foi bastante semelhante, e por isso o CNT tratado pelo método de Hummers foi escolhido.

Ainda, foi possível empregar o CNT-H-IMZ como modificador de um eletrodo de carbono vítreo e testar sua potencialidade para a determinação do pesticida Paraoxon, apresentando resposta superior em relação aos outros eletrodos testados.

Além disso, observou-se que o grupo IMZ presente na superfície do nanotubo é crucial para o bom desempenho do sensor. A partir de estudos empregando CV e EIS foi visto que os fatores área superficial e transferência de carga não são os fatores determinantes da melhora do sinal obtido para o dispositivo proposto, o qual apresentou resultados bastante semelhantes ao GCE e ao CNT-GCE, sugerindo fortemente que o IMZ é fator determinante para tal melhor comportamento.

Foi possível o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de PX, com a avaliação de diversos parâmetros, e após conclusão da otimização, foi possível a construção da curva analítica, que apresentou região linear de trabalho de 1,0 a 16,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, coeficiente de correlação de 0,996, sensibilidade de 0,16 $\mu\text{A L mol}^{-1}$. A partir disso, os limites de detecção e quantificação para este sensor foram de 0,12 e 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, que se mostram bastante satisfatório quando comparado com outros trabalhos encontrados em literatura (Tabela 8), uma vez que é um sistema simples de se obter, de baixo custo agregado, sem necessidade de etapas adicionais, como por exemplo etapa de pré concentração do analito previamente a medida eletroquímica.

Por fim, foi possível empregar o dispositivo CNT-H-IMZ-GCE na determinação de PX em diferentes amostras fortificadas, sem a necessidade de preparo de amostras além de diluição, com bons valores de recuperação.

TABELA 8. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ELETROQUÍMICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PX.

Eletrodo	Técnica	LOD / nmol L⁻¹	LDR / μmol L⁻¹	Ref.
GOS@CuFeS₂/SPE	DPV	4,5	0,073 – 801,5	[194]
MWCNT-(PEI/DNA)₂/OPH/AChE	CV/UV-Vis	473,0	0,47 – 37,8	[196]
AChE/HGO/GCE	DPV	5,4	0,034 – 0,15	[197]
GCE-MC/Nafion	Crono	9,0	0,5 a 25,0	[198]
Bi/Gr/GCE	DPV	2,0	0,005 – 0,04	[199]
CNT-H-IMZ-GCE	DPV	120	1.0 – 16,0	**

GOS@CuFeS₂: Compósito 3D entre óxido de grafeno encapsulado na fase porosa de calcopitira; MC: carbono mesoporoso; Bi/Gr: Filme de bismuto imobilizado em grafite; SPE: eletrodo impresso; GCE: eletrodo de carbono vítreo; **Este trabalho

CAPÍTULO 5

5 ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM GRAFENO QUANTUM DOTS PARA A DETERMINAÇÃO DE DIETILESTILBESTROL

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar grafeno *quantum dots* a partir da pirolise do ácido cítrico;
- Caracterizar morfologicamente e estruturalmente o material obtido através de técnicas de microscopia e espectroscopia;
- Utilizar o material para a modificação de eletrodos impressos;
- Caracterizar o material por técnicas voltamétricas;
- Avaliar o dispositivo modificado com QGDs para a determinação voltamétrica de DES;
- Desenvolver uma metodologia analítica empregando o eletrodo impresso modificado com GQD para a determinação de DES;
- Aplicar o dispositivo proposto para a determinação de dietilestilbestrol em amostras de água de torneira e urina sintética.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes e Soluções

As soluções de hidróxido de sódio, empregadas na síntese de GQD, foram preparadas pela dissolução de uma quantidade pertinente do sólido, para a concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, em um balão volumétrico e água ultrapura (MilliQ).

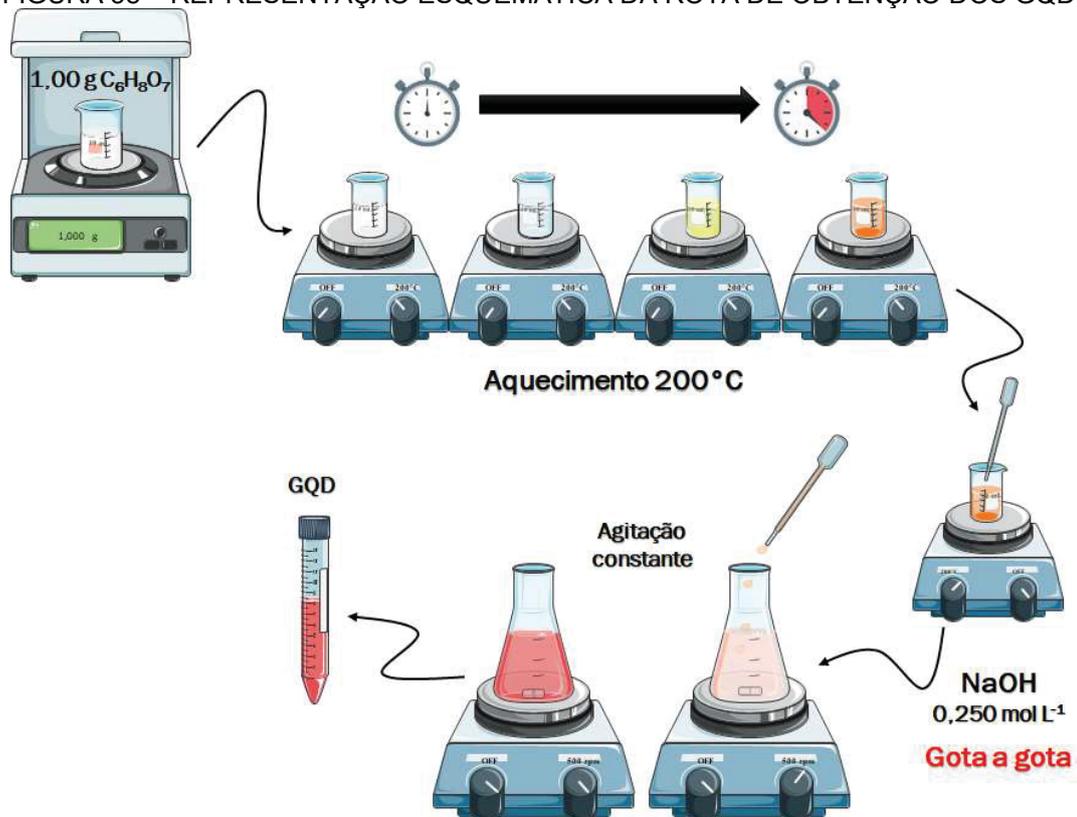
O eletrólito empregado foi tampão Britton-Robinson (CH_3COOH $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; H_3BO_3 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; H_3PO_4 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, B-R), sendo que para o estudo da variação de pH, as soluções foram ajustadas na faixa de 2,0 a 9,0, com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de DES, $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada pela dissolução de uma quantidade do hormônio em etanol, estocada e mantida sob refrigeração até sua utilização. Diluições até as concentrações desejadas foram realizadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque, e guardadas em geladeira até a utilização.

5.2.2 Síntese do Grafeno *Quantum Dots*

A rota de síntese dos GQD é adaptada de Dong e colaboradores [200], baseada na pirólise do precursor ácido cítrico, representada na FIGURA 38. Em uma primeira etapa, o ácido cítrico ($m \sim 1,00$ g) é pesado em um béquer e aquecido em chapa de aquecimento a 200°C . Durante o tempo de síntese, o sólido é liquefeito, tornando-se incolor e subsequentemente torna-se amarelo claro, o que indica o início dos processos de pirólise e carbonização e, ao final da reação o líquido torna-se laranja, indicando a formação dos GQDs. O tempo de reação é de 20 minutos. A segunda etapa da rota consiste na adição do líquido laranja em uma solução de NaOH ($0,250\text{ mol L}^{-1}$), gota a gota sob agitação vigorosa, obtendo-se assim a solução de grafeno *quantum dots*. Ao final da reação, os GQDs são armazenados sob refrigeração e ao abrigo de claridade.

FIGURA 38 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ROTA DE OBTENÇÃO DOS GQDS.



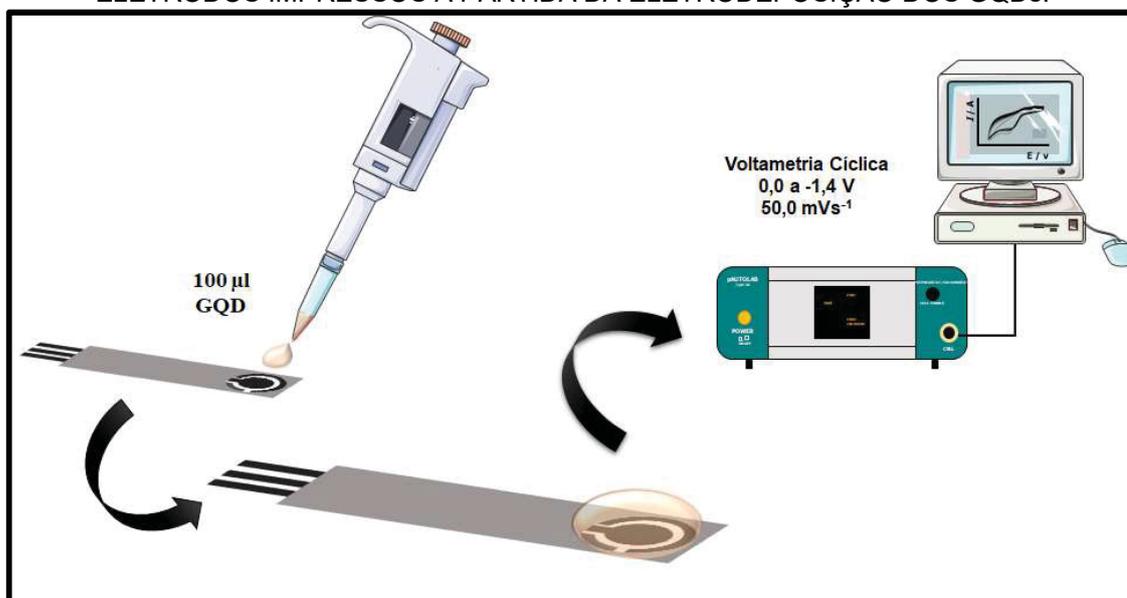
FONTE: A Autora (2019).

5.2.3 Modificação do eletrodo e Medidas Eletroquímicas

Os eletrodos utilizados neste trabalho [201] são eletrodos impressos produzidos no laboratório do Professor Dr. Craig Banks na Universidade Metropolitana de Manchester, Reino Unido. A impressão foi realizada utilizando as máscaras apropriadas e uma impressora *microdek* 1670RS e as etapas consistiram na deposição de tintas de carbono grafite (para impressão de WE e CE), Ag/AgCl (RE) e tinta dielétrica (Gwent, Liverpool, Reino Unido) sobre um substrato de poliéster.

O WE possui área de $0,07 \text{ cm}^2$, o qual foi modificado com a solução de GQD por eletrodeposição, conforme ilustrado pela FIGURA 39. Assim, $100,0 \mu\text{L}$ da solução de GQD gotejada sobre o eletrodo impresso, cobrindo a área dos três eletrodos, que é conectado ao potenciostato e submetido a varredura cíclica, em velocidade de $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ no intervalo de potencial de $0,0$ a $-1,4 \text{ V}$. Ao final da varredura, a gota de GQD é cuidadosamente retirada da superfície do eletrodo, com a ajuda de um papel absorvente, e o eletrodo é lavado com água destilada, dando origem ao GQD-SPE, pronto para o uso.

FIGURA 39 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS A PARTIR DA ELETRODEPOSIÇÃO DOS GQDs.



FONTE: A Autora (2019).

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato/galvanostato $\mu\text{Autolab}^{\text{®}}$ Type III, gerenciado pelo software NOVA 1.10,

empregando uma célula de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho e auxiliar de carbono e um eletrodo de pseudo-referência de Ag/AgCl. Nessa configuração miniaturizada de uma cela eletroquímica, o volume de eletrólito suporte empregado para as medidas foi de 100,0 μL , uma gota que recobre totalmente a área dos três eletrodos (semelhante ao processo representando na FIGURA 39) e as técnicas empregadas foram voltametria cíclica (CV) e voltametria de varredura linear (LSV). As linhas de base foram ajustadas usando a ferramenta *Moving Average* disponível no software NOVA.

5.2.4 Caracterização do GQD e GQDSPE

As propriedades do material sintetizado foram investigadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (*Scanning Electron Microscopy* – Mira FEG Tescan, 10 kV - In Beam-SE), Microscopia Eletrônica de Transmissão (*Transmission Electron Microscopy* – JEOL JEM 1200) e Espectroscopia na Região do Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy* – FTIR – BOMEN MB100).

As caracterizações das propriedades eletroquímicas do material foram realizadas empregando as técnicas de voltametria cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. O experimento de variação da velocidade de varredura foi realizado no intervalo de 2 a 100 mV s^{-1} , com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo, empregando tampão BR pH = 4,0 como eletrólito e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dietilestilbestrol. As medidas de EIS foram realizadas em um intervalo de 100 kHz a 1 mHz e amplitude de 10 mV (rms), em potencial contínuo. As medidas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N e os dados foram analisados por meio dos *softwares* ZView® e OriginPro8®.

Com o intuito de verificar a presença de grupamentos da superfície do GQD e quantificá-los, foram realizadas titulações de Boehm. Para tal, 50,0 mg da amostra de GQD, previamente neutralizadas e precipitadas, foram pesadas em béqueres de 25 mL e adicionado volume de 5,0 mL da solução padronizada de NaOH. O sistema foi deixado sob agitação durante 24 horas, e posteriormente uma alíquota de 10,0 mL de HCl padronizado foi adicionado, realizando-se em seguida uma retrotitulação potenciométrica com NaOH.

5.2.5 Otimização dos parâmetros para o desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação de DES

5.2.5.1 Comportamento eletroquímico do DES

O comportamento voltamétrico do hormônio foi avaliado através das técnicas de voltametria cíclica e linear, no intervalo de potencial de -0,5 a 1,4 V (vs. Ag/AgCl), a fim de avaliar os processos faradâicos referentes ao DES.

5.2.5.2 Avaliação da potencialidade do GQDSPE como sensor para a determinação de DES

A potencialidade e a viabilidade do emprego do GQD como modificador para a construção de um sensor para a determinação de DES foram avaliadas pela comparação das respostas obtidas para um SPE com e sem a modificação, na presença do hormônio, na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os eletrodos foram submetidos a medidas de CV e LSV, e as correntes obtidas para cada um dos eletrodos foram coletadas e comparadas.

5.2.5.3 Estudo da Influência da Variação do pH

Para avaliar a influência do pH nos processos redox do DES, foram preparadas soluções tampão BR, na faixa de 2,0 a 12,0, que foram utilizadas no preparo das soluções de DES ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). O perfil voltamétrico para cada valor de foi obtido a partir de varreduras cíclicas, e posteriormente comparados.

5.2.5.4 Estudo da Quantidade de Modificador

O número de ciclos para a eletrodeposição do GDQ na superfície do eletrodo foi avaliado no intervalo de 5 a 100 ciclos. Para cada modificação foi realizada a medida de voltametria cíclica na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DES, e os perfis obtidos posteriormente comparados.

5.2.5.5 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para o estudo de repetibilidade, foram feitas 6 medidas de LSV com a mesma superfície de GQDSPE e as correntes obtidas para cada uma das medidas foram coletadas e comparadas. Para o estudo da reprodutibilidade foram realizadas medidas de LSV com 6 superfícies de GQDSPE diferentes e as correntes obtidas foram comparadas.

5.2.6 Construção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais e de técnica, foi realizado o estudo para avaliar a região de resposta linear do GQD-SPE para o DES, com a construção de uma curva analítica, de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, sendo possível obter a região linear de trabalho, bem como o desempenho analítico do método, através do cálculo dos limites de detecção e quantificação e da obtenção da sensibilidade através da equação da reta.

5.2.7 Amostra real

A aplicação analítica do método proposto foi realizada usando o GQD -SPE para determinação de DES em água da torneira e urina sintética. Alíquotas de amostras (1,5 mL) foram adicionadas com DES para obter uma concentração final de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, e de cada solução de estoque de amostra, as diluições foram feitas usando tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH = 4,0 e submetidas para medições lineares de varredura. O teor de hormônio nestas amostras foi quantificado usando o método de calibração externa.

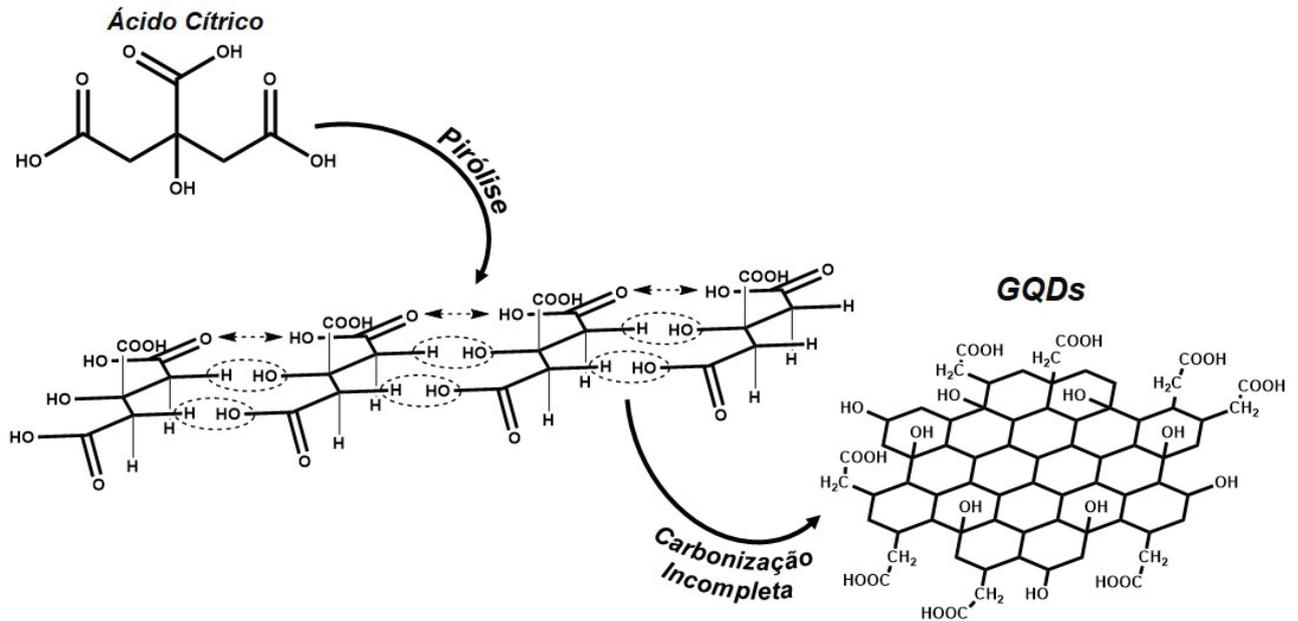
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização do GQD

Como descrito brevemente na introdução, diversos procedimentos podem ser adotados para a síntese de QDs de grafeno, as quais diferem desde precursor até mecanismos físicos ou químicos de obtenção.

A metodologia adotada neste trabalho foi baseada no trabalho de Dong e colaboradores [200], a partir da pirólise seguida de carbonização incompleta do ácido cítrico, conforme a FIGURA 40. Os primeiros resultados mostrados são referentes à síntese descrita pelos autores.

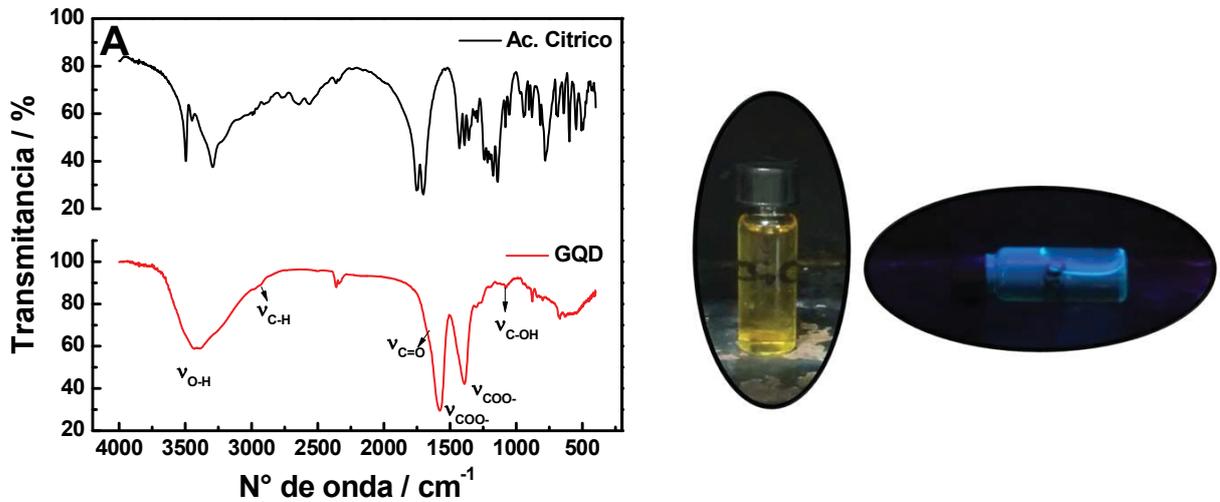
FIGURA 40 – DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DOS GQDs A PARTIR DO ÁCIDO CÍTRICO.



FONTE: A Autora (2019).

Segundo os autores, os GQDs formados contêm apenas uma única camada de grafite, sendo que por ser resultado de uma carbonização incompleta ainda existem grupos funcionais oxigenados superficiais. Para avaliar a presença de tais grupos oxigenados, medidas de FTIR foram realizadas e estão representadas na FIGURA 41A.

FIGURA 41 – A) FTIR OBTIDOS PARA O ÁCIDO CÍTRICO E PARA O GQD. B) IMAGEM DOS GQDS SOB RADIAÇÃO VISÍVEL (ESQUERDA) E ULTRAVIOLETA (DIREITA).

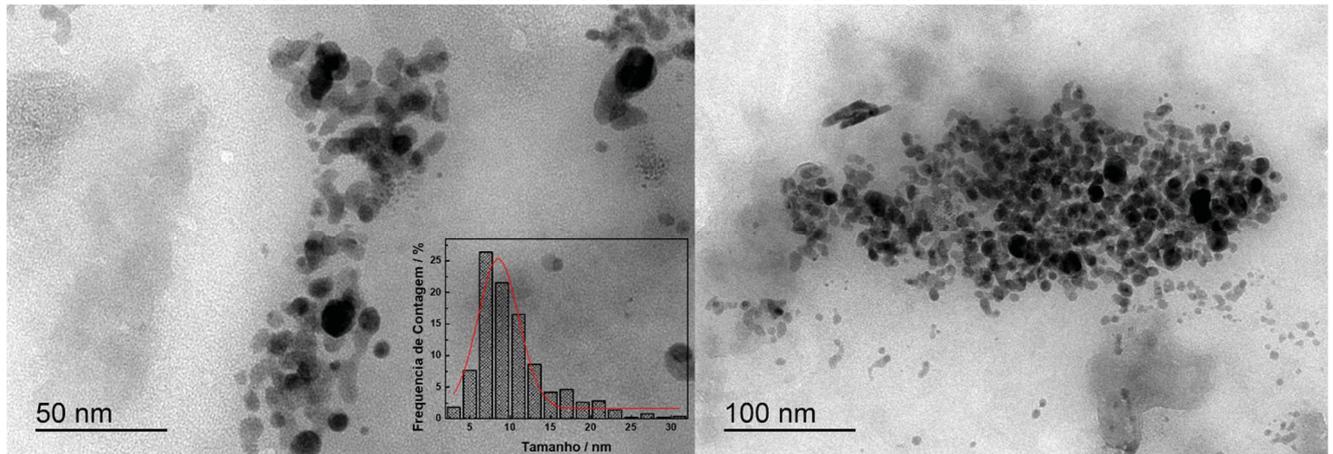


Os espectros obtidos são bastante coerentes com encontrados na literatura [180,200], sendo possível observar a presença de estiramentos referentes a grupos carboxílicos e hidroxílicos, indicando a presença de grupos oxigenados remanescentes na superfície do material. O ácido cítrico apresentou vibrações em 2950 cm^{-1} e abaixo de 1350 cm^{-1} referentes a estiramento C-H, os quais podem ser vistas no espectro dos GQDs, o que sugere a presença do precursor no material sintetizado. Para o espectro dos GQDs são possíveis de observar bandas em 1680 cm^{-1} (C = O), 1380 cm^{-1} (C-H), 1590 cm^{-1} (C = C), 1090 cm^{-1} (vibração de alongamento do grupo C-O) e a banda em torno de 3400 cm^{-1} (-OH) devido a moléculas de água intercaladas presentes em GQDs.

Como esperado e discutido anteriormente, os GQDs apresentam luminescência quando excitados, sendo essa uma característica modulada através da síntese, podendo emitir em todo o espectro. Os materiais sintetizados pela rota de Dong e colaboradores apresentam emissão azul, quando excitados em 365 nm . A FIGURA 41B traz imagens dos materiais em condição de radiação visível e ultravioleta. A emissão pode ser associada a diferentes razões. Os autores atribuem a coloração azul ao fato da carbonização incompleta, uma vez que para tempos maiores de reação, nos quais ocorre a pirolise total do ácido cítrico, ocorre a formação de óxido de grafeno, que produzem uma luminescência muito menor em relação ao GQD [200]. Outros autores descrevem que a cor pode estar associada, também, ao tamanho da partícula formada, a presença e quantidade de grupos funcionais e também a efeitos de borda [202].

Foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de transmissão, a fim de avaliar as estruturas obtidas. As imagens estão apresentadas na FIGURA 42.

FIGURA 42 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA OS GQD. INSERT: HISTOGRAMA DO TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS.



FONTE: A Autora (2019).

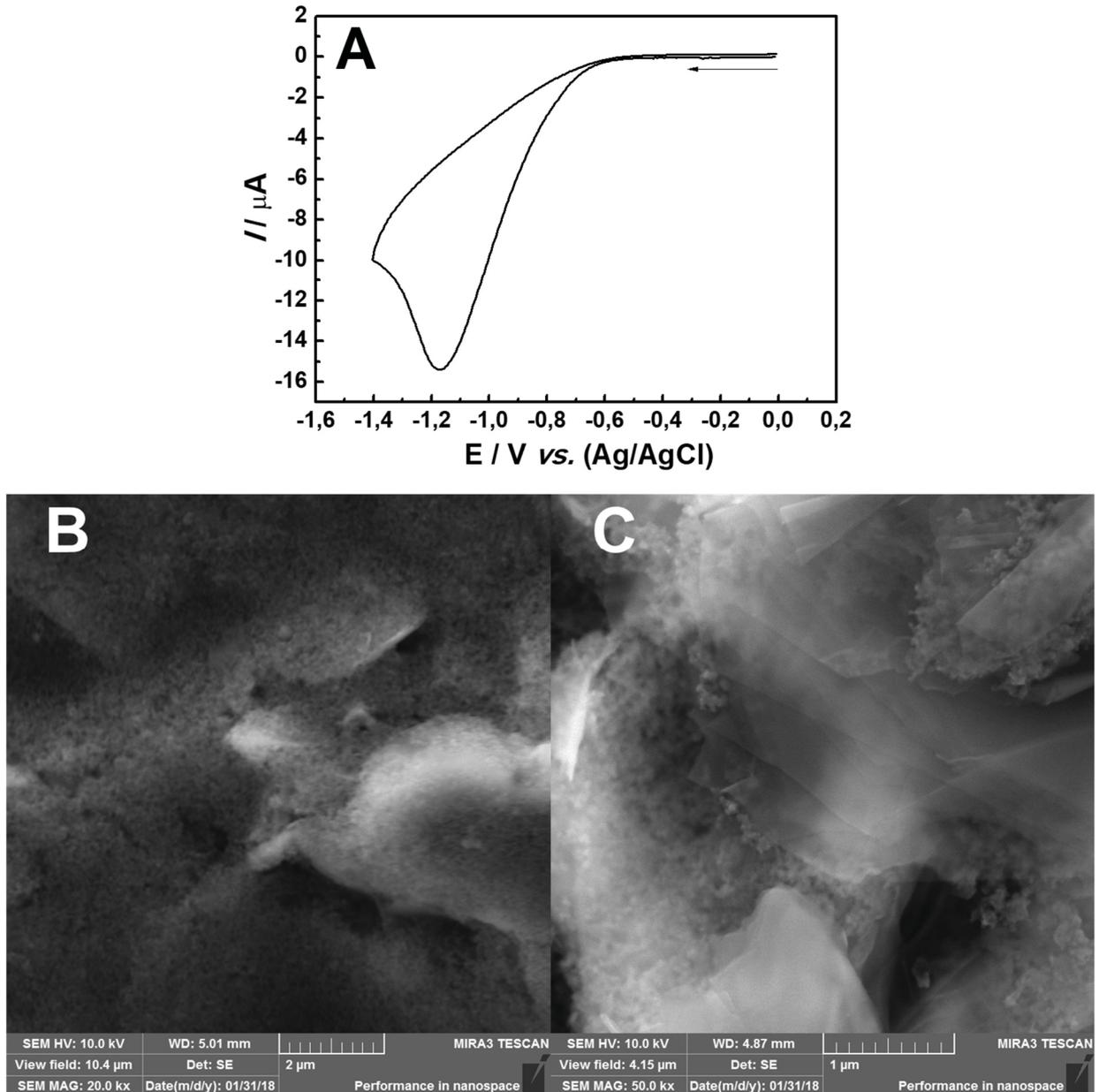
Os resultados na FIGURA 42 indicam que o material sintetizado é uniforme e está disperso por todo o substrato. É possível perceber a presença das partículas envoltas em uma massa menos escura e disforme, que alguns autores sugerem que é a presença de ácido cítrico que não sofreu pirólise, o que também pode ser visto pelos espectros de FTIR, discutidos anteriormente. A partir do histograma, o tamanho médio das partículas é de $7,0 \pm 2$ nm.

5.3.2 Preparação e Caracterização do GQDSPE

A modificação do eletrodo é uma etapa crucial para todo o desenvolvimento do método que será realizado posteriormente. Uma das preocupações maiores é o fato de que os GQDs são extremamente solúveis em água, o que poderia acarretar na lixiviação do modificador da superfície do eletrodo ao longo da realização das medidas.

Sendo assim, optou-se pela modificação dos SPEs a partir da eletrodeposição dos GQDs na superfície eletródica, procedimento descrito por diferentes autores como abordado em recente revisão [203]. Para tal, o eletrodo foi submetido a sucessivos ciclos, no intervalo de 0,0 a -1,4 V, sendo obtido o perfil voltamétrico demonstrado na FIGURA 43.

FIGURA 43 – A) VOLTAMOGRAMA CÍCLICO OBTIDO NA ETAPA DE ELETRODEPOSIÇÃO DOS GQDs NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO IMPRESSO; IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO B) NÃO MODIFICADO - SPE E C) MODIFICADO - GQDSPE. VELOCIDADE DE VARREDURA = 50,0 mV s⁻¹



FONTE: A Autora (2019).

O perfil obtido (FIGURA 43A) é característico para a redução de espécies a base de grafeno, sendo o pico em torno de -1,2 V referente à redução dos grupamentos oxigenados presentes no modificador. Tal comportamento, já descrito na literatura em [56,204], é associado com a formação de um filme fino de espécies de óxido de grafeno reduzido sobre a superfície do eletrodo, sendo que a diminuição do sinal é observada, acarretado pela organização dos GQDs na superfície do

eletrodo e diminuição dos grupos oxigenados, acarretando na modificação do eletrodo.

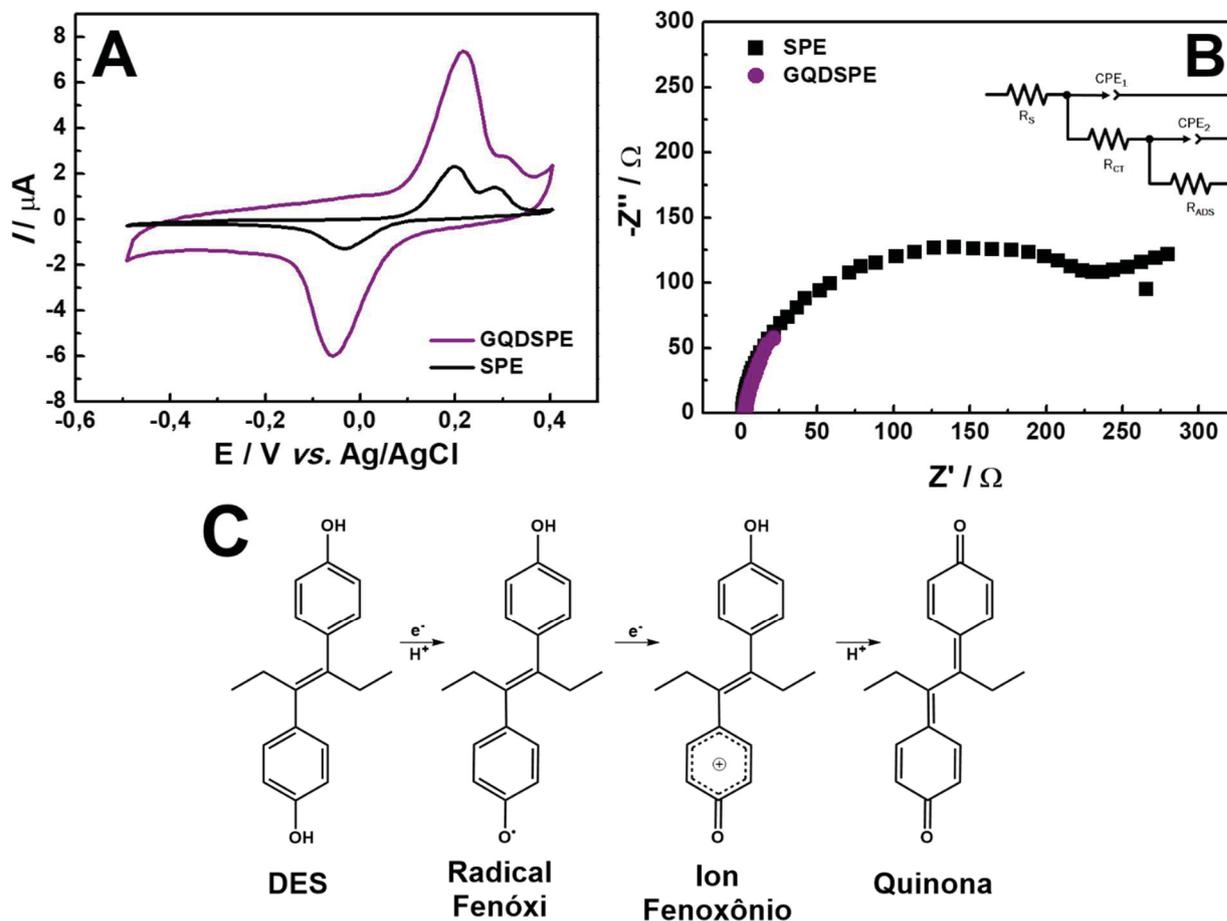
A fim de avaliar a morfologia do eletrodo construído, foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura de dois eletrodos: um SPE sem modificação e um GQDSPE, mostradas na FIGURA 43B-C. É possível verificar a ocorrência de aglomerados de folhas de grafeno na superfície do eletrodo, porém não é possível afirmar se ocorre a formação de um filme contínuo e homogêneo, principalmente devido a irregularidade morfológica apresentada pelo SPE; para tal são necessárias outras técnicas de análise morfológica. Porém, levando em consideração os mecanismos de transporte de massa, a organização do modificador em aglomerados, tem além das contribuições planares, a contribuição do transporte radial, o que pode acarretar em uma melhora considerável da resposta do eletrodo em relação ao dispositivo não modificado.

Para avaliar a estabilidade da superfície eletródica e a confiabilidade entre as medidas foi realizado um estudo de repetibilidade e reprodutibilidade das medidas voltamétricas. Tais medidas foram realizadas com o intuito de avaliar a variação de corrente para o DES em duas situações: medidas consecutivas em uma mesma superfície (repetibilidade, $n=6$) e medidas sobre diferentes superfícies (reprodutibilidade, $n=6$). Valores de desvios para o estudo de repetibilidade foram de 3,6 % e 6,6% para a reprodutibilidade da superfície, sugerindo que o processo de confecção dos eletrodos é reprodutível, e que a mesma superfície pode ser utilizada para diferentes medidas sem alteração da intensidade de corrente para uma mesma concentração de DES ($5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Isso significa que as medidas, independente da superfície eletródica, são reprodutivas e assim confiáveis para a realização dos estudos posteriores de otimização e aplicação.

5.3.3 Comportamento Voltamétrico do DES

A fim de avaliar o comportamento voltamétrico do DES sobre os eletrodos, SPE e GQD-SPE, foram realizadas medidas de voltametria cíclica na presença do hormônio, e os resultados estão apresentados na FIGURA 44A.

FIGURA 44 – A) PERFIL VOLTAMÉTRICO PARA DIETILESTILBESTROL OBTIDOS PARA O ELETRODO MODIFICADO (PRETO) E ELETRODO SEM MODIFICAÇÃO (ROXO). B) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS A PARTIR DOS ESTUDOS DE ESPECTROSCÓPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA; C) PROPOSTA DE MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO DES. TAMPÃO BR pH=4, DES= $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, $v = 50,0$ mV s⁻¹



A partir de FIGURA 44A é possível observar a presença dos processos faradâicos referentes ao DES, sendo o processo de oxidação em duas etapas de transferência eletrônica e um único processo de redução, os quais são mais pronunciados no eletrodo modificado, GQDSPE, que pode ser atribuído a diversas características do modificador [180,205], como elevada área superficial o que pode facilitar os processos electrocatalíticos, amplificando o sinal de resposta; além disso a transferência de elétrons na superfície do eletrodo modificado é facilitada, associada a boa condutividade elétrica dos GQDs, gerando assim incrementos de corrente superiores ao eletrodo não modificado e que podem ser observadas pelos voltamogramas acima.

A área eletroativa dos eletrodos foi calculada a partir de experimentos de variação de velocidade de varredura usando hexaamin-rutênio (III) como uma sonda redox, sendo a área do eletrodo modificado apenas 1,0% maior que a área ativa de

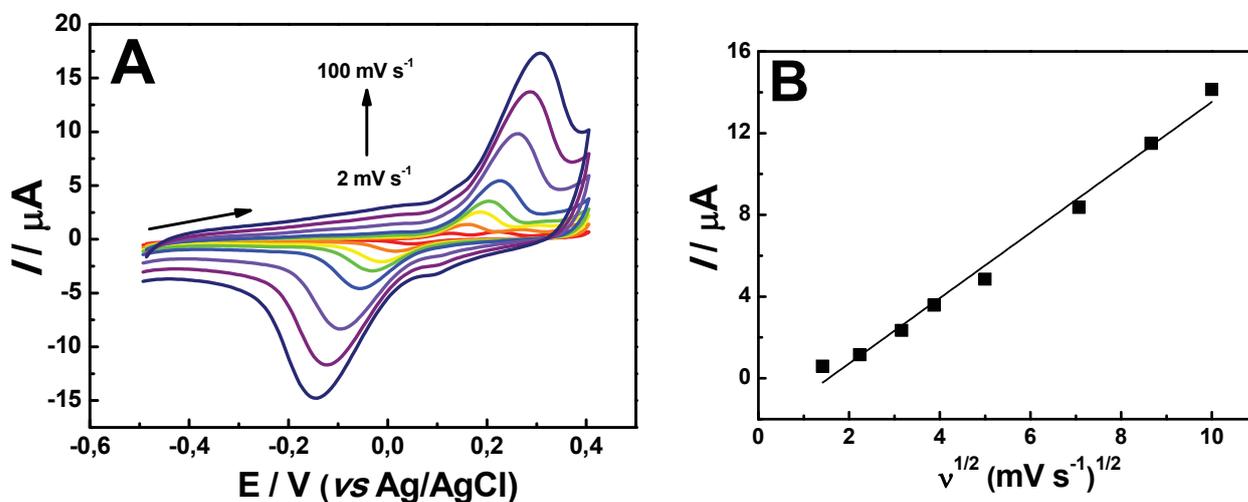
SPE obtida nas mesmas condições. Assim, o aumento do sinal voltamétrico observado na FIGURA 44A pode estar associado principalmente à boa condutividade elétrica deste material. Além disso, a constante cinética de transferência de elétrons (k^0) [206,207] foi estimada para ambos eletrodos, fornecendo valores k^0 de $(3,1 \pm 0,4) \times 10^{-3}$ e $(2,5 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ para GQD-SPE e SPE, respectivamente, corroborando com os resultados discutidos anteriormente.

Na da FIGURA 44B são mostrados os diagramas de Nyquist obtidos para o estudo de EIS, sendo possível confirmar a melhora da transferência eletrônica para o eletrodo modificado, o qual apresenta um semicírculo com raio inferior aquele apresentado para o eletrodo não modificado, indicando a diminuição da resistência de transferência eletrônica, sendo os valores de R_{CT} de 15 e 284 k Ω para GQDSPE e SPE, respectivamente. Além disso, a melhora da resposta obtida pelo eletrodo modificado pode ser sugerida com base em Linjin e colaboradores [208], que descrevem que, em meio levemente ácido, as interações entre os grupos oxigenados da superfície do eletrodo e a hidroquinona, ocorrem por interações de hidrogênio, fazendo com que a concentração do analito na superfície do eletrodo aumente, gerando um incremento na corrente.

A literatura descreve [209,210] que a oxidação dos grupos fenólicos presentes da estrutura do DES envolve dois elétrons, sendo a primeira transferência para a formação de um radical fenóxi que pode novamente oxidado, sendo a segunda transferência de elétrons para a formação do íon fenoxônio correspondente. E, em seguida, a quinona é formada por rearranjo dos elétrons, juntamente com a perda de um próton, como mostrado nas reações da FIGURA 44C. Durante a varredura reversa de potencial ocorre a redução das espécies formadas na etapa de oxidação.

A fim de avaliar a natureza dos processos de transporte de massa envolvidos nos processos eletroquímicos do DES, foi realizado um estudo da variação da velocidade de varredura e os resultados obtidos estão representados na FIGURA 45.

FIGURA 45 – A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA DIETILESTILBESTROL OBTIDOS PARA O ESTUDO DA VELOCIDADE; B) CORRELAÇÃO OBTIDA ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICO E CATÓDICO VS RAIZ QUADRADA DA VELOCIDADE DE VARREDURA. TAMPÃO BR pH=4, DES= $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.



Analisando o gráfico de Randles, na FIGURA 45B, nota-se que existe uma dependência linear entre i e $v^{1/2}$ para o pico do processo anódico, comportamento regido pela equação (5):

$$I_p = (2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2} \quad (5)$$

Ou seja, o transporte de massa, do seio da solução até a superfície do eletrodo é controlado pela difusão das espécies, sendo este o fator limitante do sistema [211].

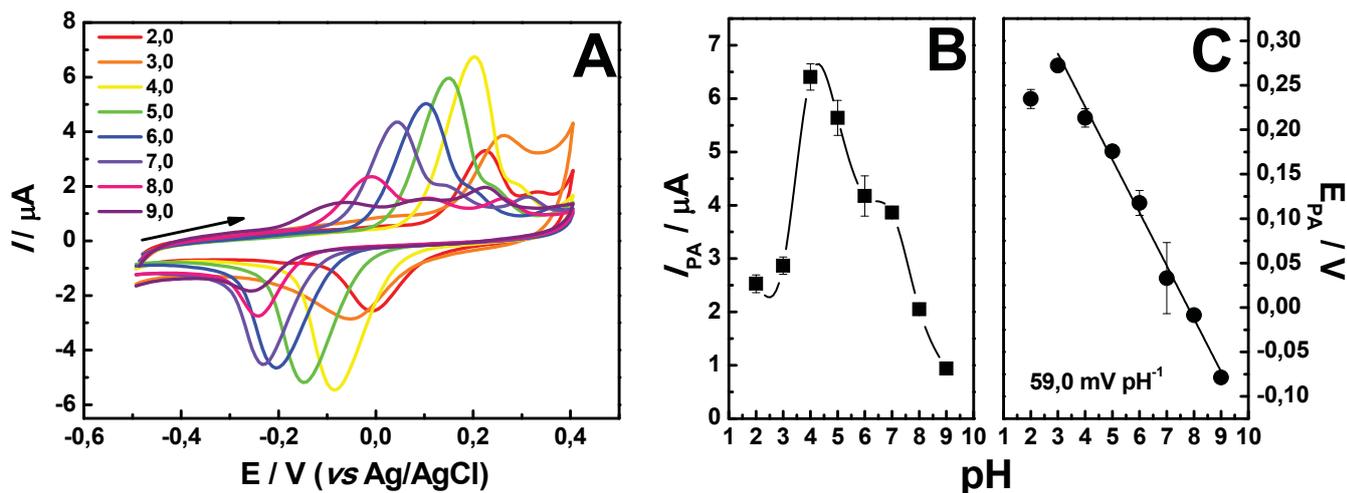
5.3.4 Otimização dos Parâmetros da Metodologia Analítica

5.3.4.1 Variação do pH

Foi realizado um estudo a fim de verificar qual a influência exercida sobre a resposta do sensor quando há variação do pH da solução que compõe o eletrólito, bem como a solução do padrão de DES. Isso porque, o valor de pH pode afetar diretamente a superfície do material modificador, principalmente quando existem grupos oxigenados em sua superfície, além de afetar também a reação redox do analito.

Para o estudo foram preparadas soluções tampão BR, no intervalo de pH de 2,0 a 12,0, as quais foram empregadas para preparar as soluções de DES, $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, e os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 46.

FIGURA 46 – A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE DIETILESTIBESTROL OBTIDOS PARA O ESTUDO DO pH; CORRELAÇÃO ENTRE B) CORRENTE DE PICO E C) POTENCIAL DE PICO EM FUNÇÃO DO pH. TAMPÃO BR, $C_{DES} = 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, $v = 50,0$ mV s⁻¹



Com base no mecanismo de oxirredução proposto para o DES, o esperado seria que com o aumento do valor de pH ocorresse o aumento da corrente de oxidação do hormônio, conforme descrito em literatura [211,212]. Porém, a partir dos voltamogramas e da FIGURA 46B, é possível observar um máximo de corrente para o pH 4,0 e um decréscimo de corrente é observado com o aumento dos valores de pH, até pH 9,0. Comportamento similar já descrito na literatura [208], para as reações da hidroquinona, em que os autores sugerem que para meios mais ácidos, tal comportamento é decorrente de um equilíbrio entre o consumo/formação de espécies durante o procedimento voltamétrico entre o cátodo e o ânodo, que faz com que ocorra um consumo maior do analito, implicando no aumento da difusão dessas espécies para a superfície do eletrodo, gerando assim um incremento de corrente. Como o valor de pH foi bastante divergente em relação a literatura, foram realizadas curvas analíticas com o pH 4,0 e o pH 7,0. A sensibilidade obtida para o pH 4,0 foi superior àquela obtida para o meio neutro, e por isso o pH mais ácido foi empregado para os estudos posteriores.

Para os valores de pH 10,0 a 12,0, não foi possível coletar os valores de corrente ou mesmo perfil voltamétrico, visto que os produtos formados bloqueavam

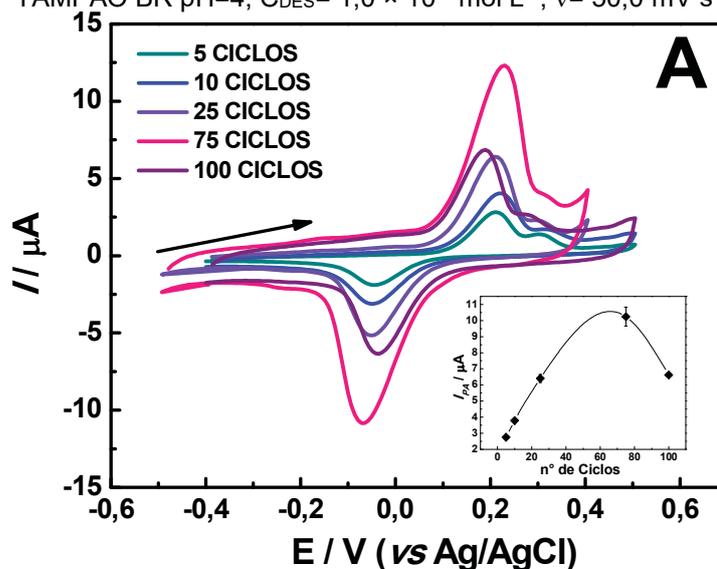
totalmente a superfície do eletrodo já no segundo ciclo, por isso foram desconsiderados.

A partir do gráfico de potencial *versus* pH (FIGURA 46C) é possível observar o deslocamento do valor de potencial de pico para valores mais positivos quanto menor é o valor de pH, o que pode ser explicado pelo fato de existir maiores quantidades de H⁺ nesses meios, os quais podem competir com aqueles do analito, fazendo com que a oxidação do DES necessite de uma energia maior para ocorrer [213]. A inclinação da curva apresentou valor de 59,0 mV pH⁻¹, o que indica um número igual de elétrons e prótons transferidos durante a oxidação do DES, conforme previsto em literatura [211,214], demonstrado na FIGURA 44C.

5.3.4.2 Número de Ciclos de Modificação e Estabilidade o Sinal Analítico

Para avaliar a influência da quantidade de modificador depositada na superfície do eletrodo na resposta obtida para o DES, foi realizado um estudo no qual foi variado o número de ciclos na etapa de eletrodeposição do GDQ, de 5 a 100 ciclos, e os resultados podem ser vistos na FIGURA 47.

FIGURA 47 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DE DIETILESTILBESTROL OBTIDOS PARA O ESTUDO DA QUANTIDADE DE CICLOS DE MODIFICAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GQDSPE. TAMPÃO BR pH=4, C_{DES}= 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹, v= 50,0 mV s⁻¹

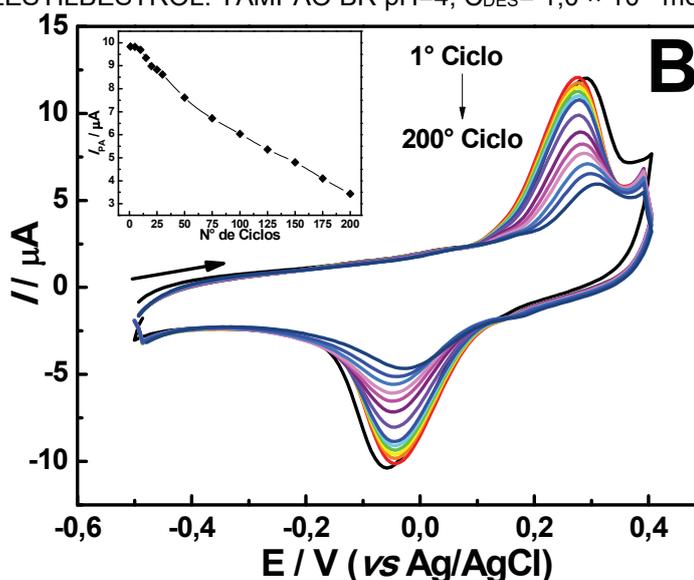


É possível observar que ocorre um aumento do sinal de corrente para os processos do DES ao passo que o número de ciclos de eletrodeposição aumenta,

alcançando um valor máximo para 75 ciclos, e a partir daí ocorre o decréscimo da corrente. Pode-se sugerir que a partir de 75 ciclos a disposição do material sobre o eletrodo de trabalho pode ocorrer de maneira a se acumular na superfície, não favorecendo o transporte de massa das espécies até a superfície eletródica, impedindo os processos de transferência eletrônica do DES.

Para avaliar a estabilidade do sinal do DES, ou seja, a fim de garantir que as variações de corrente sejam em relação à variável que está sendo estudada e não a variação do sinal da formação das espécies do DES, o sistema foi submetido a sucessivas varreduras cíclicas no intervalo de potencial de -0,5 a 0,4 V vs. Ag/AgCl e a corrente de pico anódica foi registrada, visando estabelecer um número de ciclos no qual a variação de corrente fosse desprezível. A FIGURA 48 mostra os resultados obtidos para este estudo.

FIGURA 48 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DA ESTABILIDADE DO SINAL DE DIETILESTILBESTROL. TAMPÃO BR pH=4, $C_{DES} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$



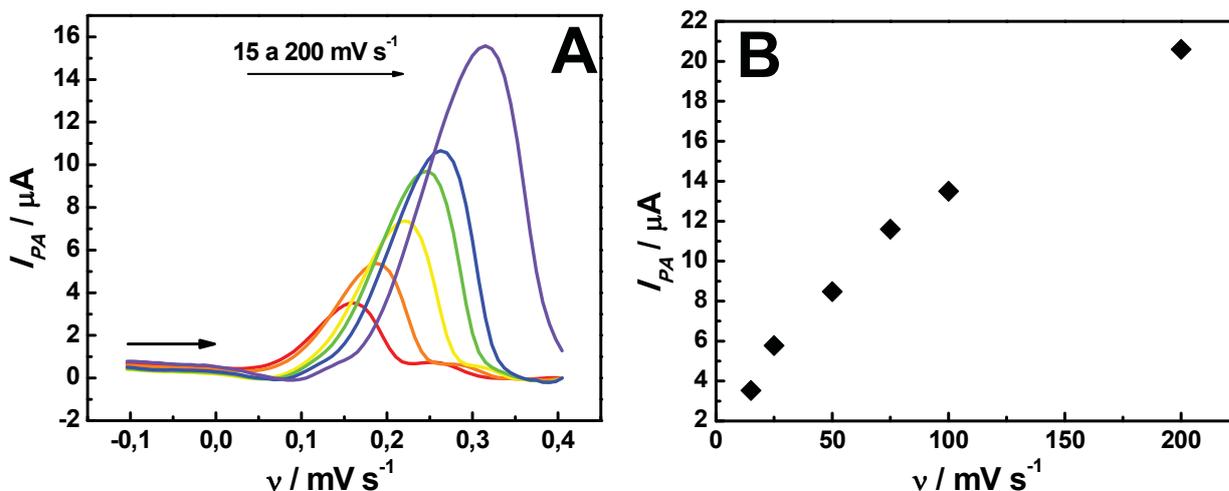
É possível observar que ocorre um decréscimo apreciável de corrente, principalmente a partir do ciclo 25, sendo que a estabilidade do sinal ocorre a partir do 10º ciclo, permanecendo assim até o 20º ciclo e a partir de então ocorre o decaimento brusco. Esse decréscimo pode ser atribuído ao fato de que algumas espécies envolvidas nos processos redox do DES são adsorvidas na superfície do eletrodo, causando o bloqueio e por fim o decréscimo da corrente. Esse comportamento já é descrito na literatura [212] e por isso os valores de corrente coletados são sempre o do 10º ciclo.

5.3.4.3 Otimização da Velocidade de Varredura

Tendo em vista que o processo de oxidação seria o utilizado para os fins analíticos, por ser mais estável e independente do processo de redução, a construção da curva analítica e aplicação foi realizado por voltametria de varredura linear, escolhida após um estudo preliminar comparativo com outras técnicas voltamétricas, voltametria de pulso diferencia e de onda quadrada.

Por ser um procedimento voltamétrico de perturbação mais simples, a única variável a ser estudada é a velocidade de varredura, sendo os resultados apresentados na FIGURA 49.

FIGURA 49 – A) VOLTAMOGRAMAS DE VARREDURA LINEAR OBTIDOS PARA DIFERENTES VELOCIDADES DE VARREDURA EMPREGANDO GQDSPE NA PRESENÇA DE DES. B) CORRELAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO DO PROCESSO ANÓDICO E A VELOCIDADE DE VARREDURA. TAMPÃO BR pH=4, $C_{DES} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.



Como é possível observar a partir da FIGURA 49B, o aumento da corrente de pico acompanha o aumento da velocidade de varredura, assim como a largura de pico também tem esse comportamento, alargando com o aumento da velocidade. Além disso, o potencial de pico também desloca para potenciais mais positivos, indicando que a reação fica mais difícil de acontecer, necessitando de mais energia. Como o alargamento de pico pode implicar na baixa seletividade do método, o valor de velocidade de varredura de $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ foi o escolhido por manter o bom compromisso entre largura de pico e incremento de corrente.

A Tabela 9 traz um resumo dos parâmetros otimizados.

TABELA 9. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DES EMPREGANDO O GQDSPE.

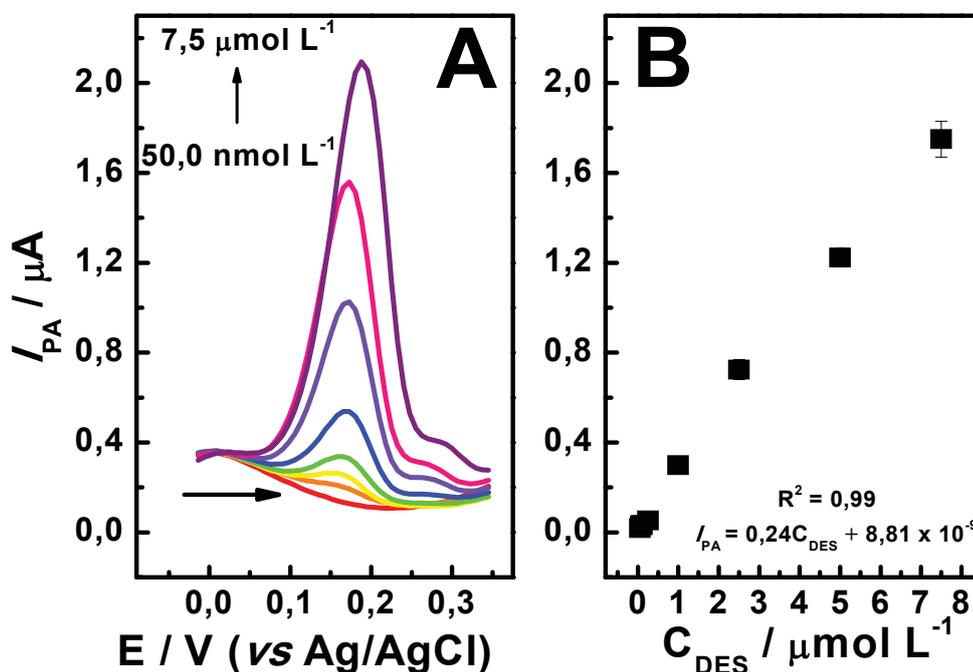
Parâmetro	Otimizado
Eletrólito	Tampão B-R
pH	4,0
Ciclos de Eletrodeposição	75 ciclos
Ciclos de Estabilização	10 ciclos
Velocidade de Varredura	50,0 mV s ⁻¹

5.3.5 Aplicação Analítica

Após o estudo para avaliar as melhores condições experimentais foram construídas curvas analíticas (n=3) empregando tais condições. Para a obtenção da curva analítica para DES, foi realizada uma varredura linear de potencial no sentido anódico, no intervalo de 0,0 a 0,4 V na presença de concentrações crescentes do analito.

Os voltamogramas obtidos para as curvas permitiram a correlação entre as intensidades de corrente de pico com suas respectivas concentrações. Com base nos gráficos de correlação foi possível obter informações quanto à faixa linear de concentração (LDR), sensibilidade (inclinação da reta), além do cálculo dos limites de detecção e quantificação. Os voltamogramas e a curva obtida estão representados na FIGURA 50.

FIGURA 50 – A) VOLTAMOGRAMAS DE VARREDURA LINEAR OBTIDOS PARA A OXIDAÇÃO DO DIETILESTILBESTROL NO INTERVALO DE $5,0 \times 10^{-8}$ A $7,5 \times 10^{-6}$ MOL L⁻¹. B) CURVA DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE CORRENTE DE PICO E CONCENTRAÇÃO DE DIETILESTILBESTROL. TAMPÃO BR pH=4, $v= 50,0$ mV s⁻¹; N=3.



É possível perceber que há um aumento linear de resposta de corrente em função do aumento da concentração de DES adicionado em uma região de $5,0 \times 10^{-8}$ – $7,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com sensibilidade de $0,24$ A L mol⁻¹.

Para os cálculos de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), foram utilizadas as equações 1 e 2, anteriormente demonstradas [178].

Sendo SD o desvio padrão de 10 medidas consecutivas do branco e b o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica. A Tabela 10 mostra o desempenho analítico obtido com o dispositivo desenvolvido.

TABELA 10. DESEMPENHO ANALÍTICO OBTIDO COM O GQDSPE PARA A DETERMINAÇÃO DE DES

Região Linear / mol L ⁻¹	$5,0 \times 10^{-8} - 7,5 \times 10^{-6}$
R ²	0,99
Sensibilidade / A mol ⁻¹ L	0,24
LOD / nmol L ⁻¹	8,81
LOQ / nmol L ⁻¹	29,0

A precisão do método proposto foi avaliada pelo estudo de recuperação realizado para amostras de água da torneira e de urina sintética enriquecidas com DES, para três diferentes níveis de concentração. Para todas as amostras, os valores recuperados obtidos usando o sensor proposto são bastante semelhantes aos valores adicionados, como pode ser observado na Tabela 11.

TABELA 11. RESULTADOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS EMPREGANDO O DISPOSITIVO PROPOSTO. N=3

Amostra	Add / nmol L⁻¹	Rec / nmol L⁻¹	%Rec
Água	29	28,9	99,6
	50	57,1	114,4
	500	558,0	111,7
Urina	29	34,3	117,2
	50	52,0	101,4
	500	404,0	80,9

A partir dos valores de recuperação, é possível sugerir que não há efeitos de matriz significativos que possam afetar o desempenho do dispositivo.

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Foi possível realizar a síntese de GQDs, em um método simples de dois passos, com baixo consumo de reagentes e método ecologicamente correto. Os GQDs obtidos mostraram-se excelentes modificadores de eletrodos, aumentando a resposta voltamétrica do DES quando comparado ao eletrodo não modificado.

A SPE foi uma plataforma viável para modificação, fornecendo um sinal eletroquímico reproduzível que sugere uma boa afinidade entre os GQDs e o substrato eletrodo. A metodologia de desenvolvimento para a determinação de DES é eficaz, simples, com poucos passos envolvidos, alcançando bons limites de detecção, quantificação e sensibilidade e com componentes que levam a custos experimentais mais baixos.

A Tabela 12 mostra um comparativo com outros dispositivos descritos na literatura, sendo possível observar que os resultados obtidos para o dispositivo proposto são satisfatórios quando comparados a outros encontrados na literatura.

TABELA 12. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ALGUNS ELETRODOS MODIFICADOS USADOS PARA DETERMINAÇÃO DE DES

Eletrodo	Técnica	LDR / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD / nmol L^{-1}	Ref
GO-Cs-GCE	DPASV	0,015 a 30,0	3,0	[212]
Gr/Nano-Au/GCE	CV	120 a 0,12	9,8	[215]
GCE	DPV	2,0 a 100,0	80,0	[216]
ERGO– MWCNTs/GCE	LSV	0,01 a 40	3,0	[217]
GQDSPE	LSV	0,05 a 7,5	8,8	**

GO-CS: óxido de grafeno modificado com quitosana; DPASV: *Voltametria* de Redissolução Anódica de *Pulso Diferencial*. GCE: Eletrodo de Carbono Vítreo; DPV: *Voltametria* de Pulso Diferencial; Gr/Nano-Au/GCE: Eletrodo de Carbono Vítreo modificado com Grafeno dopado com Nanopartículas de Ouro; CV: *Voltametria* Cíclica; ERGO–MWCNTs/GCE: Eletrodo de Carbono vítreo modificado com compósito entre Oxido de Grafeno Reduzido Eletroquimicamente e Nanotubos de Carbono; LSV: *Voltametria* de Varredura Linear **esse trabalho

CAPÍTULO 6

6 ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM COMPÓSITO ENTRE GRAFENO *QUANTUM DOTS* E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ EM MALTE

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar grafeno *quantum dots* a partir da pirólise do ácido cítrico e a partir dele sintetizar o compósito com nanopartículas de ouro;
- Caracterizar morfológicamente e estruturalmente o material obtido através de técnicas de microscopia e espectroscopia;
- Utilizar o material para a modificação de eletrodos impressos;
- Caracterizar o material por técnicas voltamétricas;
- Avaliar o dispositivo modificado com AuGQD para a determinação voltamétrica de aflatoxina B₁;
- Avaliar e caracterizar o comportamento da AFLB₁ através de técnicas voltamétricas;
- Desenvolver uma metodologia analítica empregando o eletrodo impresso modificado com o compósito para a determinação de AFLB₁;
- Aplicar o dispositivo proposto para a determinação da micotoxina em amostras de malte.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Reagentes e Soluções

As soluções de hidróxido de sódio, empregadas na síntese de GQD, foram preparadas pela dissolução de uma quantidade pertinente do sólido, para a concentração de 0,250 mol L⁻¹, em um balão volumétrico e avolumado com água ultrapura (MilliQ). O precursor de ouro, H₂AuCl₄, obtido da Sigma-Aldrich®, foi utilizado no preparo da solução de ouro a partir da dissolução de uma quantidade pertinente e água, e mantido sob abrigo da luz até a utilização.

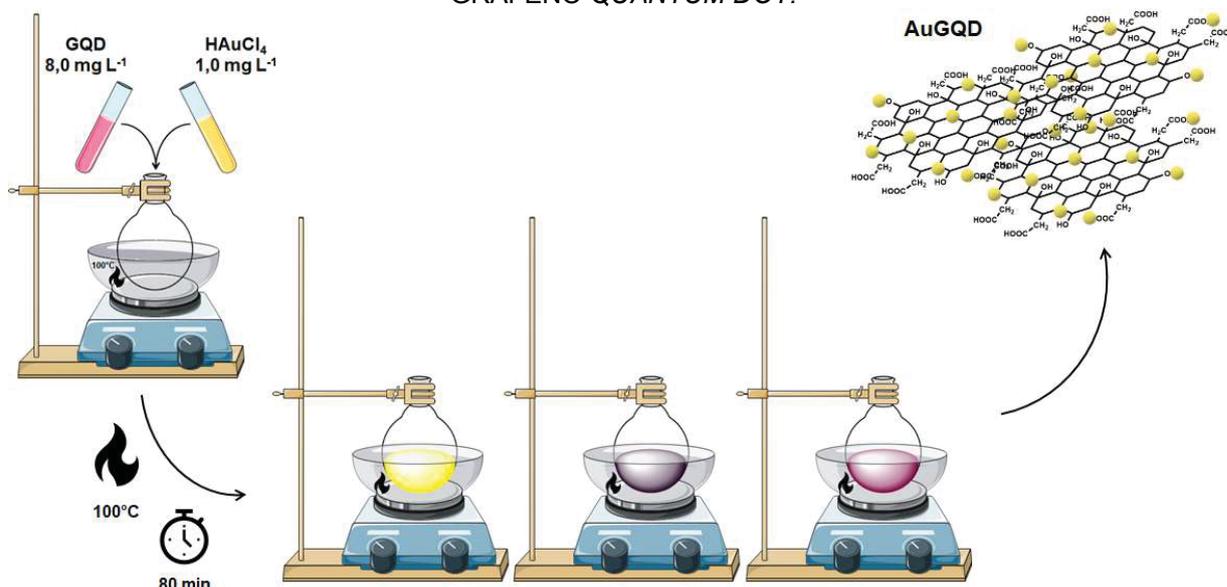
O eletrólito empregado foi tampão Britton-Robinson (CH_3COOH $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; H_3BO_3 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; H_3PO_4 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, B-R), sendo que para o estudo da variação de pH, as soluções foram ajustadas na faixa de 2,0 a 9,0, com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de AFLB_1 (Sigma-Aldrich®), $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada pela dissolução de uma quantidade do micotoxina em metanol, fracionada em volumes de $100 \mu\text{L}$ estocadas e mantida sob refrigeração e ao abrigo de luz até sua utilização. Diluições até as concentrações desejadas foram realizadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque fracionada, e guardadas em geladeira até a utilização.

6.2.2 Síntese e Caracterização do Compósito AuGQD

A síntese do compósito em NPAu e GQDs foi realizada com base em um procedimento descrito na literatura por Huang e colaboradores [218], representada na FIGURA 51, em que $2,0 \text{ mL}$ de uma solução aquosa de HAuCl_4 ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi misturada com $2,0 \text{ mL}$ de uma dispersão aquosa de GQDs ($8,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e mantida em banho de silicone por 100°C durante 80 minutos. Durante a reação, a mistura, inicialmente amarela, torna-se roxo escuro e após vermelho persistente [93], o que indica a formação do compósito. Ao término do tempo de reação, a dispersão foi mantida sob refrigeração até o uso.

FIGURA 51 – ESQUEMA DE SÍNTESE DO COMPÓSITO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E GRAFENO QUANTUM DOT.



FONTE: A Autora (2019).

O compósito foi caracterizado a partir de técnicas microscópicas, como Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) realizadas no microscópio JEOL, modelo JEM 1200, e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) realizadas no microscópio TESCAN, modelo MIRA III, equipado com filamento FEG e utilizando a voltagem de 10 kV, sem recobrimento com ouro, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Os tratamentos de imagens bem como a estimativa do tamanho médio de partículas foram realizados com o auxílio do software ImageJ.

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

As caracterizações eletroquímicas do material e do eletrodo modificado foram realizadas empregando as técnicas de EIS, LSV e CV. As medidas de EIS foram realizadas em um intervalo de 100 kHz a 1 mHz e amplitude de 10 mV (rms), em potencial contínuo referente ao potencial de pico. O experimento de variação da velocidade de varredura foi realizado no intervalo de 2 a 100 mV s⁻¹, com o objetivo de avaliar a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo, empregando tampão BR pH = 6,0 como eletrólito e 5,0 $\times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de AFLB₁. Ainda, medidas de voltametria cíclica em meio de sondas eletroquímicas, como Ru e Ferri foram realizadas a fim de caracterizar a superfície do SPE modificada com o compósito.

6.2.3 Procedimento Voltamétrico e Modificação do Eletrodo

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato PGSTAT204, a coleta de dados foi obtida com auxílio do software NOVA versão 2.1. O eletrodo utilizado é o SPE que contém o arranjo de três eletrodos em uma única plataforma, idêntico ao descrito no procedimento anterior. Os dados coletados foram tratados com o software Origin PRO8®. As linhas de base foram ajustadas usando a ferramenta *Moving Average* disponível no software NOVA.

O eletrodo de trabalho do SPE foi modificado por *drop casting*, a partir do gotejamento de um volume fixo do modificador sobre a superfície do WE e aguardada total evaporação do solvente. As medidas eletroquímicas foram realizadas empregando 100 μ L de eletrólito ou do analito, conforme já descrito na seção anterior.

6.2.4 Otimização da Metodologia Analítica

6.2.4.1 Comportamento eletroquímico da AFLB₁

O comportamento voltamétrico da micotoxina foi avaliado através da técnica de voltamétrica de varredura linear, no intervalo de potencial de -0,2 a 1,1 V (vs. Ag/AgCl), a fim de avaliar a presença de processos faradáicos referentes ao analito.

6.2.4.2 Avaliação da potencialidade do AuGQD-SPE como sensor para a determinação de AFLB₁

A potencialidade e a viabilidade do emprego do compósito como modificador para a construção de um sensor para a determinação de AFLB₁ foram avaliadas pela comparação da resposta obtida para o dispositivo proposto (AuGQD-SPE) com a resposta obtida para um SPE modificado apenas com GQD e um SPE sem a modificação, na presença da micotoxina, na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os eletrodos foram submetidos a medidas de LSV e EIS e as respostas obtidas, de corrente e R_{CT} , para cada um dos eletrodos foram coletadas e comparadas.

6.2.4.3 Estudo da Influência da Variação do pH

Para avaliar a influência do pH nos processos redox da AFLB₁, foram preparadas soluções tampão BR, na faixa de 2,0 a 12,0, que foram utilizadas no preparo das soluções de AFLB₁ ($5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). O perfil voltamétrico para cada valor de pH foi obtido a partir de varreduras cíclicas, e posteriormente comparados.

6.2.4.4 Estudo da Quantidade de Modificador

Foi avaliado o volume de modificador empregado para a modificação do SPE, no intervalo de 0,5 a 5,0 μ L do compósito. Para cada volume de modificação foi realizada a medida de voltametria linear na presença de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de AFLB₁, e os perfis obtidos posteriormente comparados.

6.2.4.5 Estudo do tempo e potencial de condicionamento do eletrodo

Para o estudo do tempo de aplicação de potencial de condicionamento (potencial aplicado antes da varredura de potencial), inicialmente um valor de potencial baseado em literatura [219,220] foi fixado, e variou-se o tempo de aplicação no intervalo de 0 a 300 s. Imediatamente após o término do tempo, foi realizada a medida de LSV e a partir dos valores de corrente o melhor tempo foi otimizado.

Para o estudo do potencial de condicionamento, foram avaliados valores de -0,3 a 0,4 V, os quais foram aplicados durante um período e realizada, imediatamente após, a varredura linear, sendo as respostas em função de corrente, para cada um dos potenciais estudados, comparadas para se obter a melhor condição.

6.2.4.6 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para o estudo de repetibilidade, foram feitas 5 medidas de LSV com a mesma superfície de AuGQD-SPE e para o estudo da reprodutibilidade foram realizadas medidas de LSV com 5 AuGQD-SPE diferentes, na presença de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de AFLB₁, e as correntes obtidas foram comparadas com média das correntes obtidas para cada estudo, podendo-se obter o desvio padrão relativo para cada estudo.

6.2.5 Construção da Curva Analítica

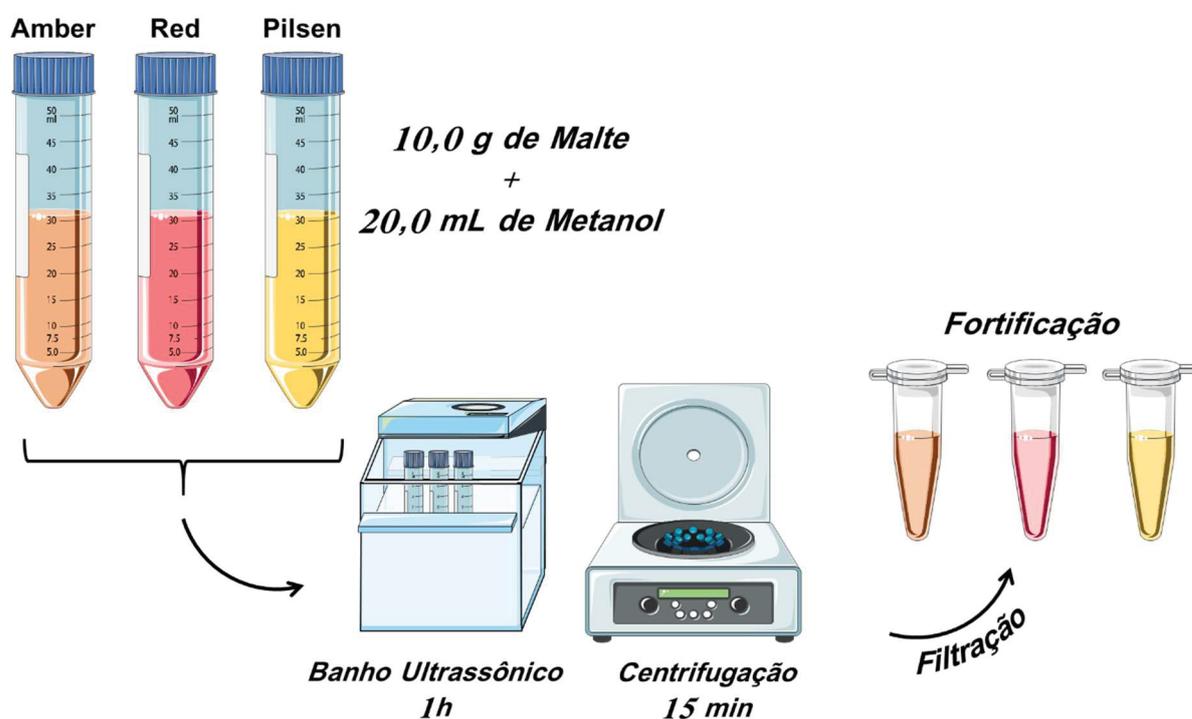
Após a otimização dos parâmetros experimentais e de técnica, foi realizado o estudo para avaliar a região de resposta linear do AuGQD-SPE para AFLB₁, com a construção de uma curva analítica, de $2,5 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, sendo possível obter a região linear de trabalho, bem como o desempenho analítico do método, através do cálculo dos limites de detecção e quantificação e da obtenção da sensibilidade através da equação da reta.

6.2.6 Amostra Real

Foram realizados ensaios em três tipos de malte: Amber, Pilsen e Red, gentilmente doados pela HomeBrewers, Curitiba-PR, e foram preparadas com base em metodologia descrita em literatura [221]. Alíquotas (10,0 g) de pó de malte foram

colocados em tubos de centrifuga e adicionados 20,0 mL do solvente de extração, metanol. Após isso, as amostras foram deixadas sob banho ultrassônico durante uma 1h, e posteriormente centrifugadas. Do sobrenadante, alíquotas de 10,0 mL foram retiradas e fortificadas com o padrão da AFLB₁ de acordo com a legislação brasileira (RDC 07/2011 [222]). As amostras fortificadas foram então diluídas em tampão BR em três níveis de concentração, e analisadas pelo método desenvolvido. A FIGURA 52 ilustra a metodologia de preparo de amostras empregado.

FIGURA 52 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGADA.



FONTE: A Autora (2019).

Os valores recuperados foram calculados empregando a curva de regressão linear obtida a partir da curva analítica e os valores foram reportados em porcentagem de recuperação.

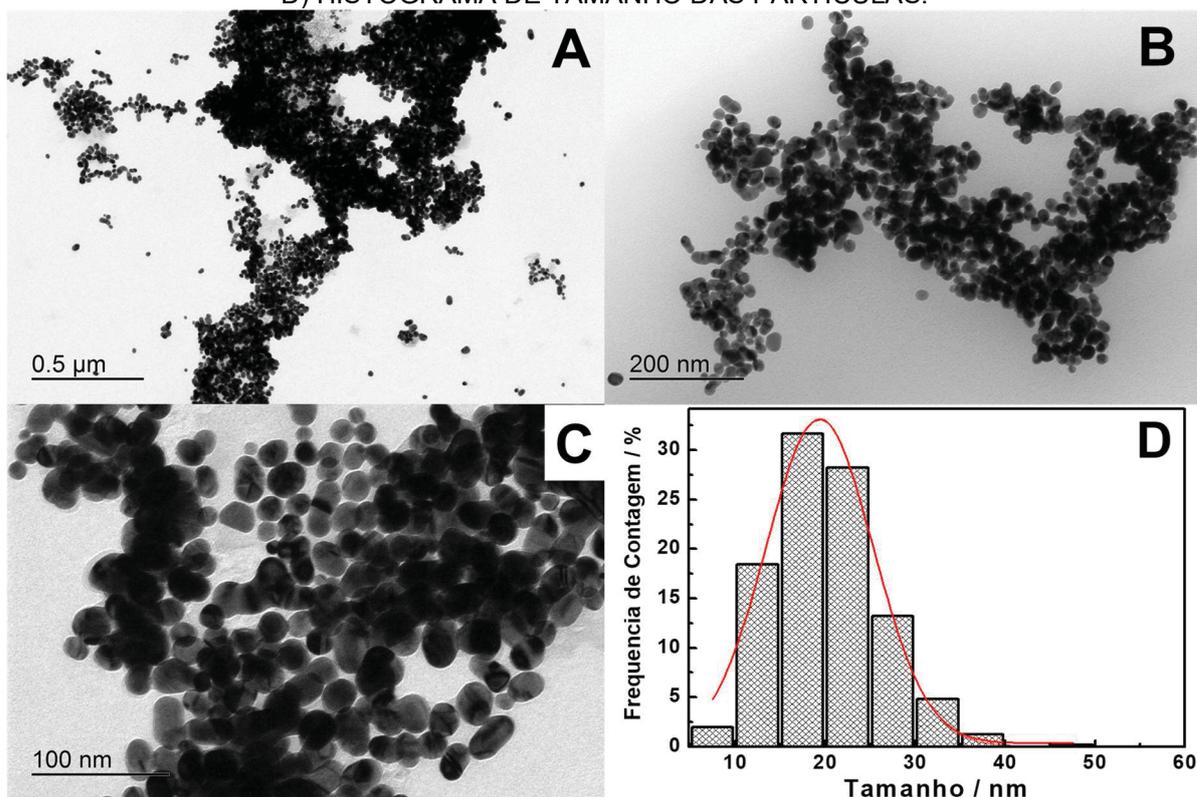
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Caracterização do Compósito AuGQD

Após a síntese, o material foi caracterizado por TEM e MEV, a fim de avaliar características morfológicas e de composição do compósito obtido. Além disso,

informações sobre o tamanho podem ser obtidas sendo este um dado pertinente, principalmente do ponto de vista da eletroquímica, pois sabe-se que tal parâmetro tem influência direta na resposta voltamétrica apresentada pelas NPs [89]. As imagens obtidas a partir das análises de microscopia eletrônica de transmissão estão apresentadas FIGURA 53.

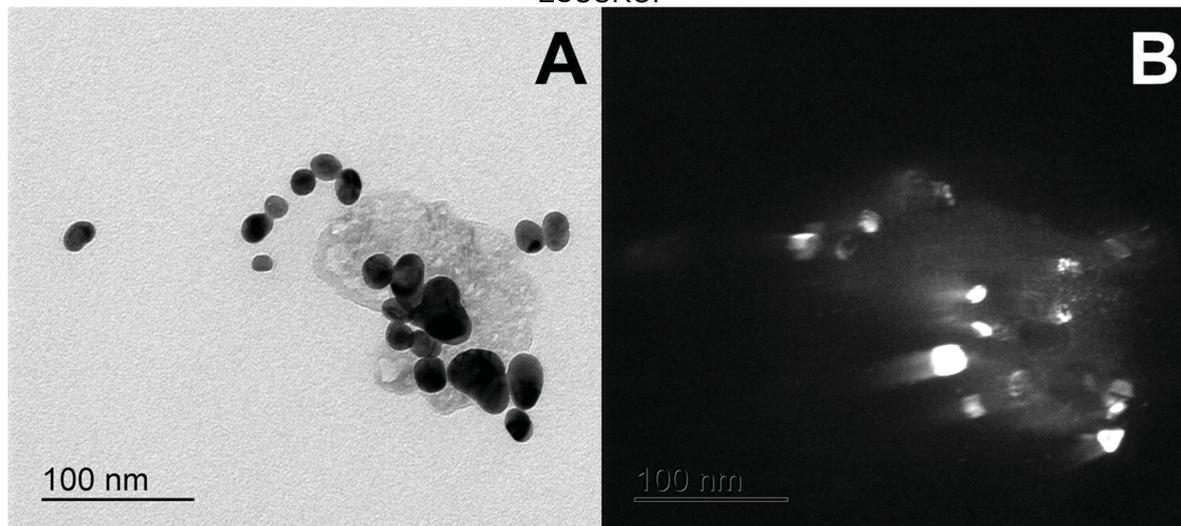
FIGURA 53 – A-C) IMAGENS DE TEM DO NANOCOMPÓSITO FORMADO ENTRE AuNPs E GQD; D) HISTOGRAMA DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS.



FONTE: A Autora (2019).

A partir das imagens acima, é possível observa a formação de nanopartículas, que estão espalhadas de maneira homogênea por toda a dispersão, além de uma pequena parcela que está disposta sobre os GQDs, melhor observado na FIGURA 54. A partir da contagem de 1000 partículas, tem-se o histograma apresentado em D, obtendo-se assim, o valor de $19,4 \pm 6$ nm como tamanho médio, conforme descrito pela literatura para a rota de síntese empregada. [93]

FIGURA 54 – IMAGENS DE TEM DO NANOCOMPÓSITO AuGQD A) CAMPO CLARO; B) CAMPO ESCURO.

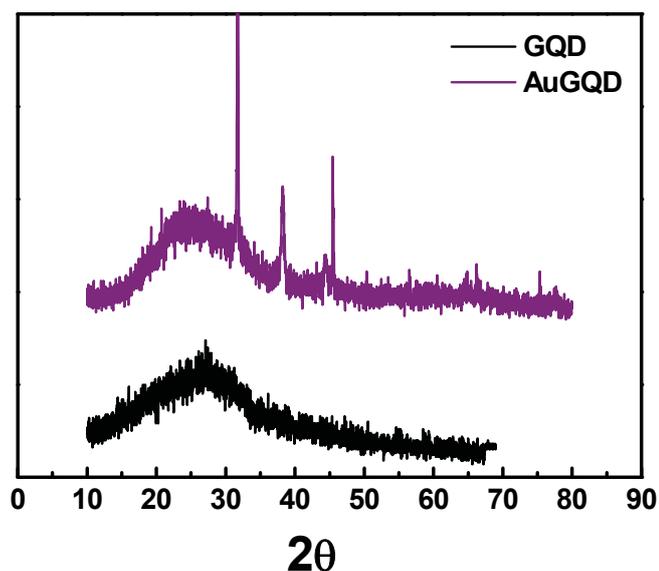


FONTE: A Autora (2019).

A imagem formada em campo escuro refere-se à porção de elétrons que passou pela amostra e foi refratada por planos específicos e pode fornecer informações a respeito da cristalinidade do material. No caso, é possível observar que em campo escuro, os pontos de claros correspondem as nanopartículas de ouro atribuídas na imagem de campo claro.

Foram realizadas medidas de difratometria de Raios-X para as amostras de GQD e AuGQD, apresentadas na FIGURA 55.

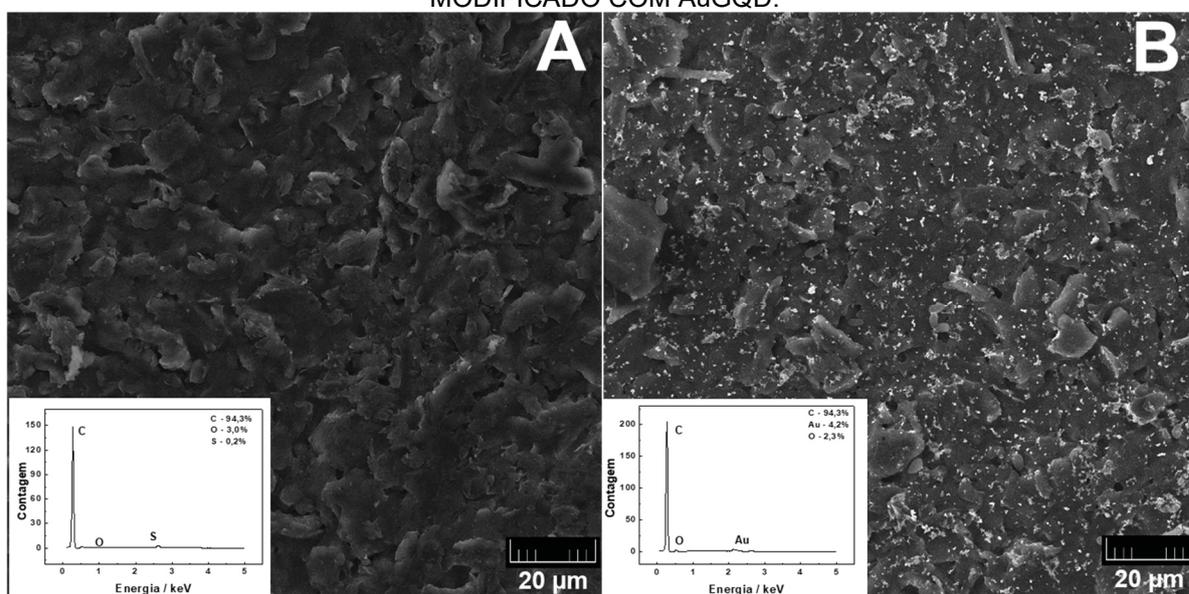
FIGURA 55 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE GQD E AuGQD.



Em relação ao GQD, o padrão de DRX revelou um halo centrado a $2\theta = 26^\circ$, o que é consistente com (002) espaçamento de rede de materiais à base de carbono com desordem, consistente com a literatura [200]. Após a formação do compósito, ainda é possível observar a banda do GQD, porém com o padrão de difração do ouro, atribuídos em ($2\theta = 37,9^\circ, 44,2^\circ, 64,4^\circ$), em concordância com o perfil JCPDS 04 – 0784 [223].

Foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura, bem como análise elementar por EDS, da superfície do eletrodo a fim de verificar a morfologia do SPE após a modificação. As imagens estão na FIGURA 56.

FIGURA 56 – IMAGENS DE SEM A) ELETRODO NÃO MODIFICADO; E B) ELETRODO MODIFICADO COM AuGQD.

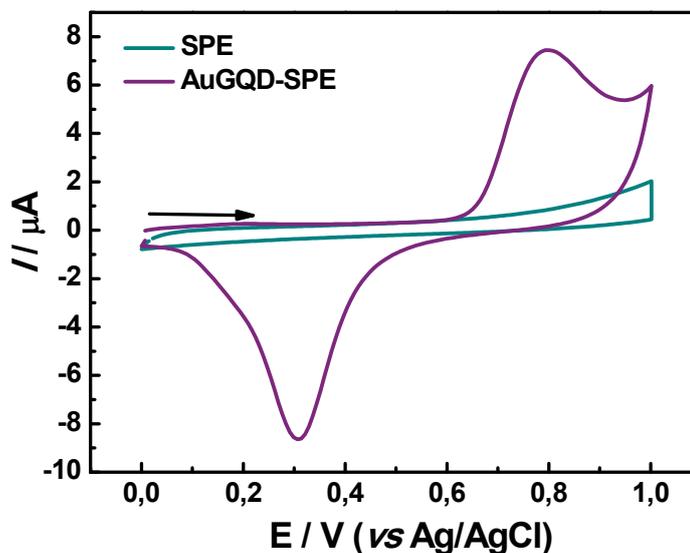


FONTE: A Autora (2019).

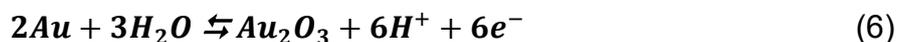
É possível observar que a modificação do SPE dá origem a uma superfície recoberta pelo compósito, e que há a presença de ouro na superfície do AuGQD-SPE, que não é possível de observar para o SPE.

A presença do ouro foi, ainda, confirmada a partir de medidas de voltametria cíclica, nos voltamogramas em FIGURA 57.

FIGURA 57 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA SPE (VERDE) E AuGQD-SPE (ROXO) EM TAMPÃO BR pH=5,0. $\nu = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$



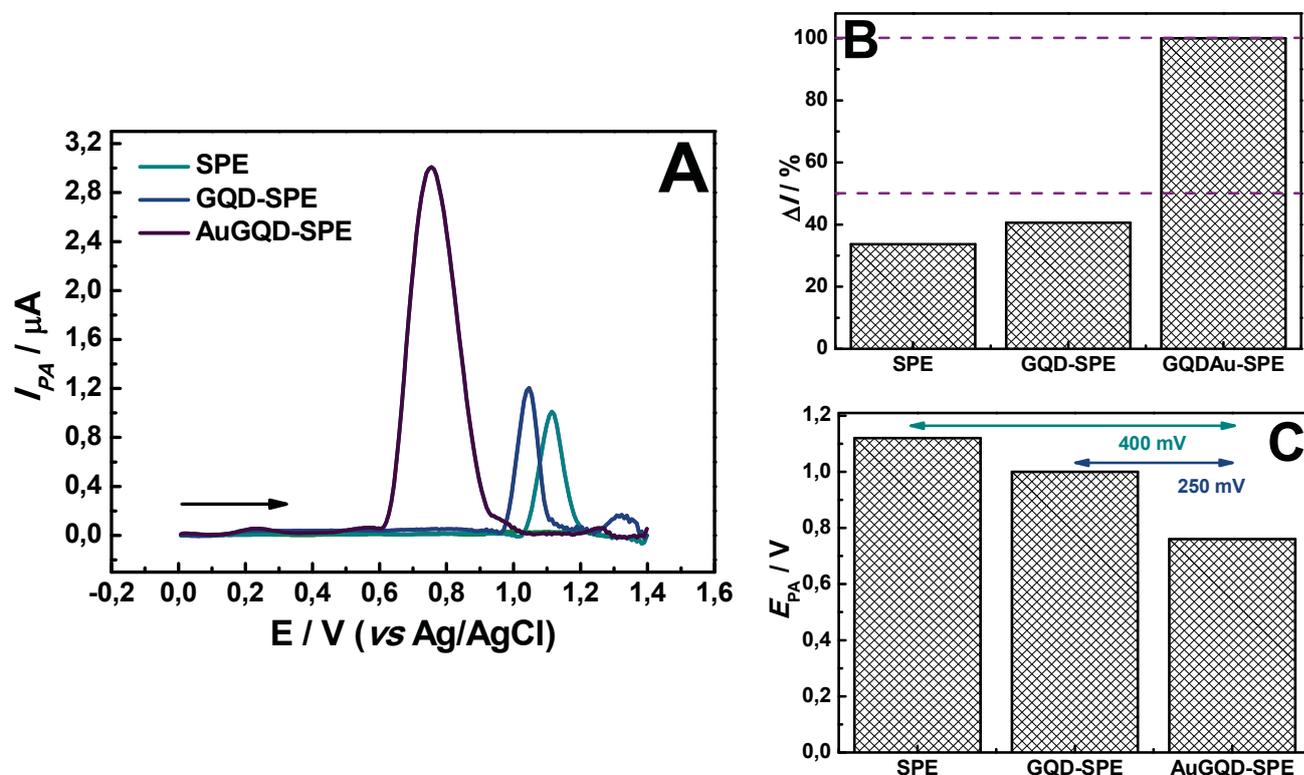
No voltamogramas é possível observar a presença dos processos faradáicos característicos para o ouro, com a formação dos óxidos de ouro no sentido de oxidação, e a redução para ouro metálico no sentido reverso, seguindo a reação a seguir [224]:



6.3.2 Comportamento eletroquímico da AFLB₁

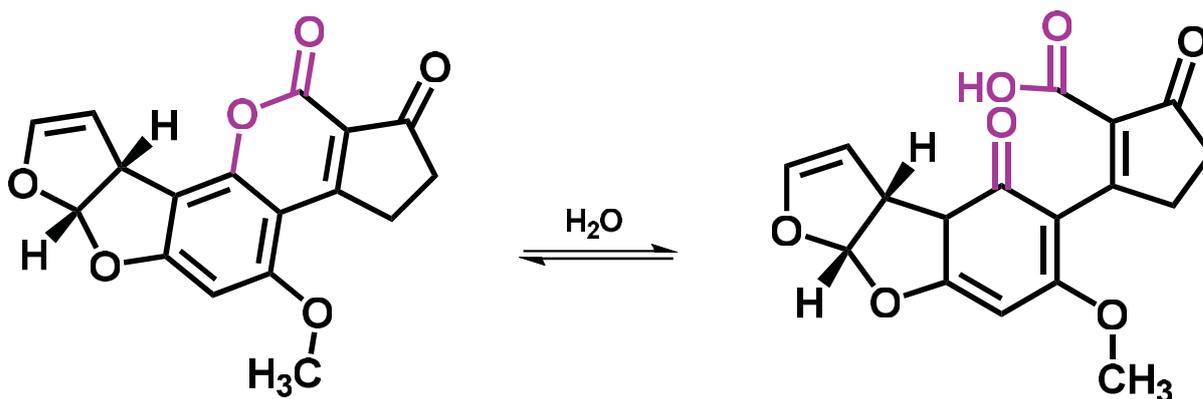
Para obter maiores informações sobre o comportamento eletroquímico da micotoxina empregando o eletrodo proposto, AuGQD-SPE, além da comparação com outros eletrodos, apenas o SPE, e o SPE modificado com GQD, GQD-SPE, experimentos de voltametria linear foram realizadas, apresentadas na FIGURA 58.

FIGURA 58 – A) PERFIL VOLTAMÉTRICO PARA AFLB₁ EMPREGANDO DIFERENTES ELETRODOS. GRÁFICOS DE BARRA DE CORRELAÇÃO ENTRE B) CORRENTE DE PICO E C) POTENCIAL DE PICO PARA OS ELETRODOS TESTADOS. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO B-R pH=5,0; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$.



É possível observar a presença de um processo faradáico referente a oxidação da micotoxina sobre os eletrodos testados. Não há na literatura nenhum mecanismo redox proposto para a AFLB₁, pois a grande maioria dos trabalhos que fazem a determinação desta substância o fazem empregando biossensores, e correlacionam a resposta de outras espécies à quantidade da toxina.

Levando em consideração que a estrutura química da AFLB₁ é de uma cumarina substituída, e com base em trabalhos da literatura, uma reação redox global é proposta e apresentada na FIGURA 59. [225]

FIGURA 59 – MECANISMO REDOX PROPOSTO PARA AFLB₁.

FONTE: A Autora (2019).

Esse mecanismo sugere que ocorre a formação de uma carboxila pela oxidação da hidroxila que é formada pela abertura do anel. Essa abertura é dependente do pH, e são sugeridas duas formas principais para a molécula (levando-se em consideração a cumarina). Estudos computacionais sugerem que a parte em destaque nas estrutura da AFLB₁ é onde há mais chances de ocorrer as reações que envolve esta espécie [226,227], sugerindo que o mecanismo proposto pode de fato ocorrer nessa região da molécula.

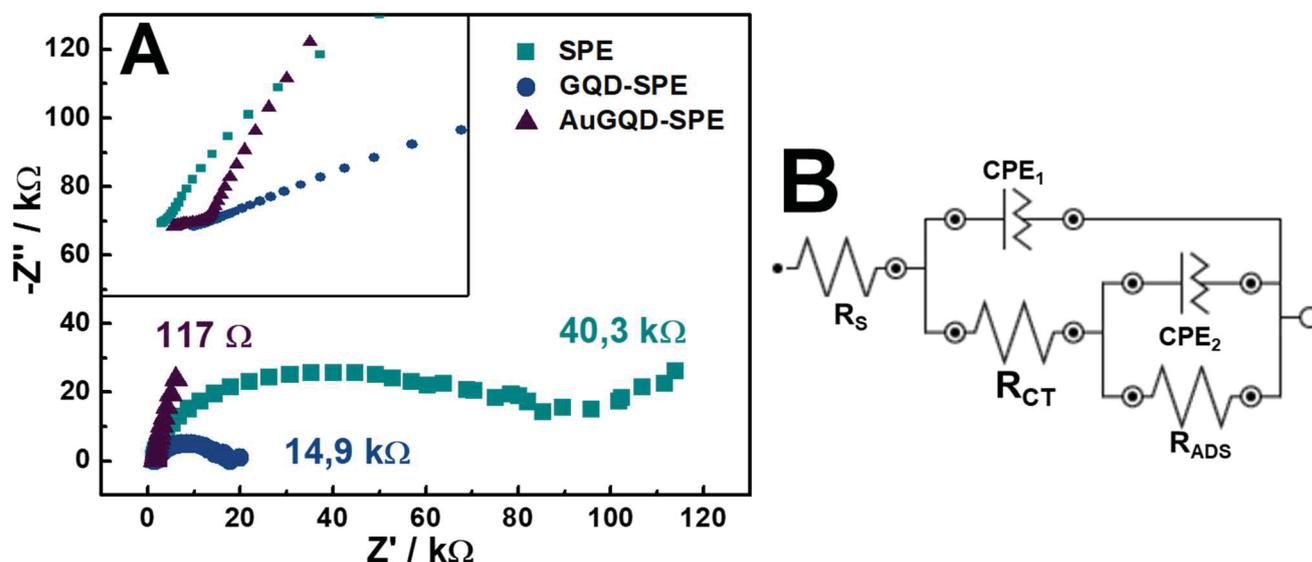
É possível observar que há uma melhora significativa da corrente de pico (FIGURA 58B) apresentada pelo dispositivo proposto, AuGQD-SPE, em relação aos demais dispositivos testados. Essa amplificação do sinal pode ser atribuída a presença das nanopartículas que modificam o eletrodo, que fazem com que a contribuição radial seja mais efetiva do que nos demais eletrodos. Além disso, é possível observar em FIGURA 58C que há um deslocamento do potencial de pico, para valores menos positivos, para este dispositivo, indicando um forte efeito eletrocatalítico que pode ser atribuído ao modificador.

Essas melhoras, tanto de corrente quanto de potencial de pico, podem ser atribuídas às boas características que os nanomateriais podem agregar quando empregados como modificadores de eletrodos. A utilização de materiais nanoestruturados em eletroanálise oferece propriedades únicas como o aumento de transporte de massa, área superficial elevada e maior relação sinal-ruído – com a diminuição da corrente residual. A elevada área das nanopartículas, que atuam como se fossem nanoeletrodos, quando combinadas melhoram além do transporte de massa, os valores de correntes obtidas por esses dispositivos, principalmente em

relação a densidade de corrente, uma vez que a área eletroativa desses eletrodos é ligeiramente maior.

A fim de avaliar os processos interfaciais, medidas de EIS foram realizadas para os diferentes eletrodos, e os resultados apresentados na FIGURA 60. A amplitude de oscilação foi ajustada para 10 mV (RMS) em uma faixa de frequência de 0,1 MHz a 10 mHz. O potencial de trabalho (potencial DC) foi otimizado para o potencial de pico para cada eletrodo vs. Ag / AgCl empregando AFLB₁ $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

FIGURA 60 – A) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS PARA OS ELETRODOS: SPE (VERDE), GQD-SPE (AZUL) E AuGQD-SPE (ROXO) NA PRESENÇA DE AFLATOXINA B₁. B) CIRCUITO EQUIVALENTE. $F = 0,1$ MHz A 10 mHz; $a = 10$ mV; $C_{AFLB_1} = 5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹



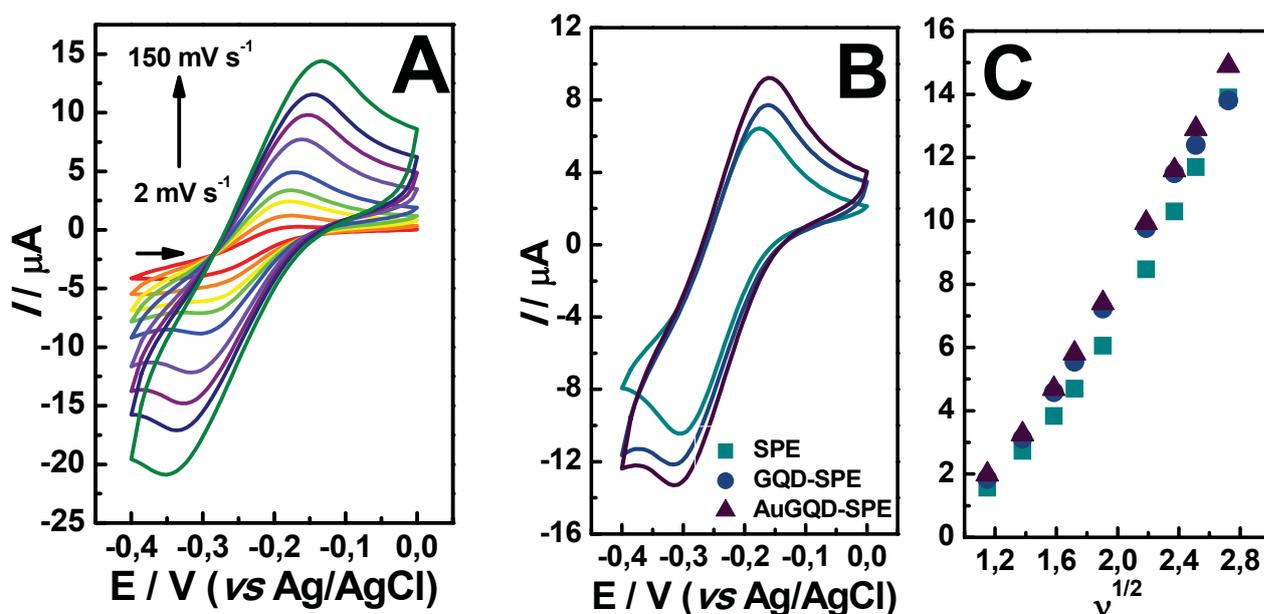
Os gráficos de Nyquist consistem em um semicírculo capacitivo ligeiramente deprimido, em frequências altas, correspondentes à resistência de transferência de carga e à capacitância de dupla camada para o primeiro; já em baixas frequências, a deformação e não formação do ângulo de 45° de Warburg, é causado pela adsorção de intermediários de reação na superfície do eletrodo. O circuito equivalente proposto, representado na FIGURA 60B, foi empregado para tratar os dados, escolhidos com base na literatura [228].

O cálculo das resistências de transferência de carga foi realizado empregando o circuito indicado na FIGURA 60B. Neste R_s , CPE e R_{CT} representam a resistência da solução, um elemento de fase constante que corresponde à capacitância de camada dupla e à resistência de transferência de carga, respectivamente. Também foram adicionados CPE_{ADS} e R_{ADS} que são elementos elétricos relacionados à

adsorção de intermediários de reação e modificadores [229–231]. Os valores de R_{CT} obtidos foram de 117 Ω , 14,9 k Ω e 40,3 k Ω para AuGQD-SPE, GQD-SPE e SPE respectivamente. A melhora da resposta visto nos voltamogramas anteriores está diretamente ligada à melhora das transferências exemplificadas pelos valores de R_{CT} . Para o dispositivo proposto tem-se a melhora atribuída pelo sinergismo entre as nanopartículas de ouro e os *quantum dots*, que apresentam elevada condutividade elétrica.

A área eletroativa para os eletrodo foi obtida a partir da utilização do par $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$, com os resultados apresentados na FIGURA 61.

FIGURA 61 – A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS CARACTERÍSTICOS PARA $[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$ OBTIDOS PARA AuGQD-SPE; B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS COMPARATIVOS ENTRE OS ELETRODOS: SPE (VERDE), GQD-SPE (AZUL) E AuGQD-SPE (ROXO) EM $v=100\text{ mV s}^{-1}$; C) GRAFICO DE RANDLES-SEVICK.



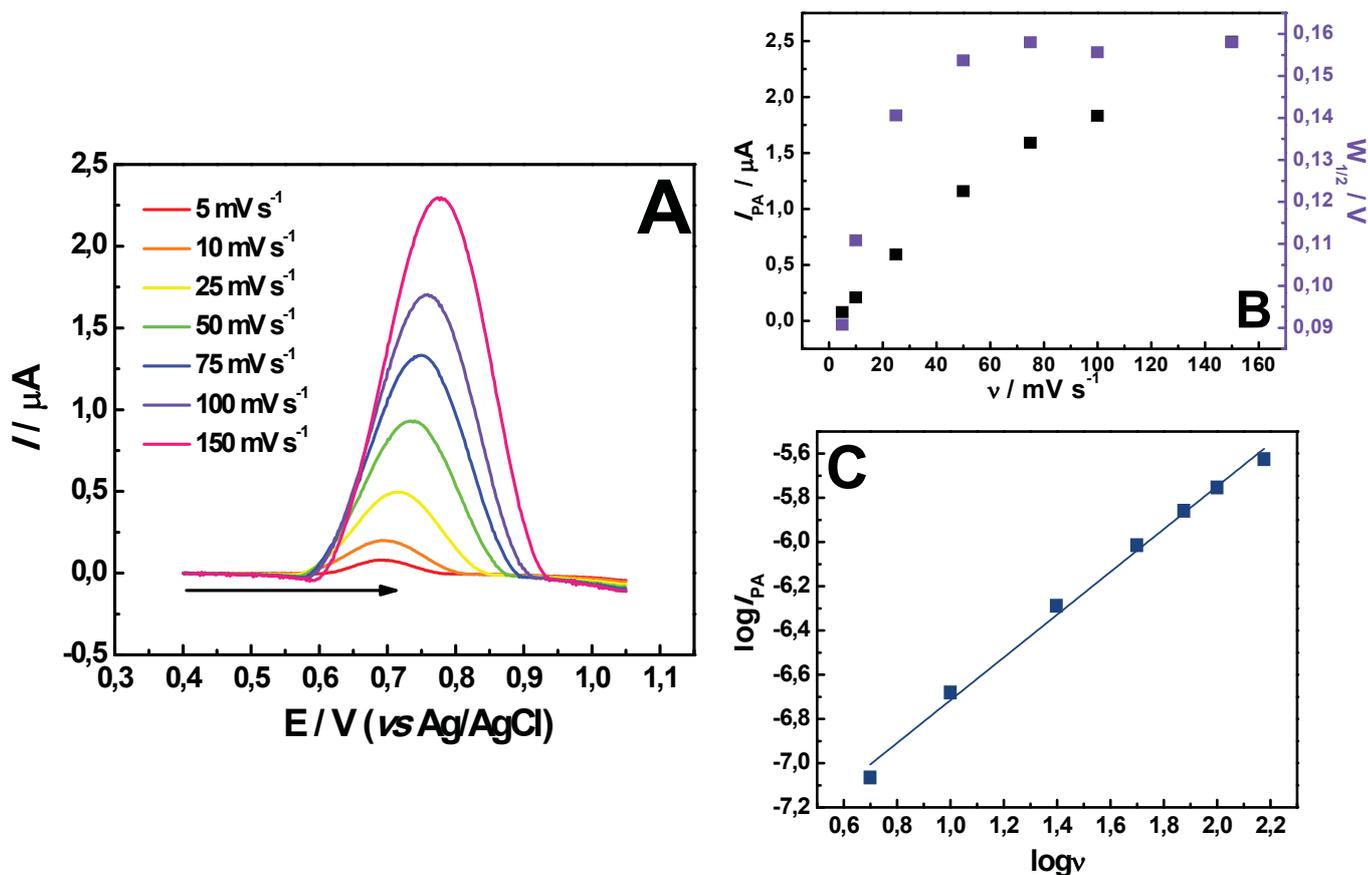
A área ativa do eletrodo foi estimada utilizando a técnica de voltametria cíclica, em que as velocidade de varredura são variadas (FIGURA 61) e as correntes de pico para cada velocidade são recolhidas e plotadas conforme FIGURA 61C. Empregando-se a equação de Randles-Sevcik (5), pode-se obter a área, desde que conhecidos o número de elétrons, coeficiente de difusão e concentração da espécie eletroativa, velocidade de varredura do potencial e corrente de pico a uma dada temperatura. A área pode ser calculada por:

$$A = \frac{I}{v^2} \times (2,69 \times 10^5 n^3 D^{\frac{1}{2}} C)^{-1} \quad (5)$$

Para o par $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ as variáveis são: $n = 1$, $C = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ e o coeficiente de difusão do par Rutênio em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, é igual a $9,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Com base nisso, as áreas eletroativas calculadas foram: $0,0097 \text{ cm}^2$, $0,0098 \text{ cm}^2$ e $0,0104 \text{ cm}^2$, para SPE, GQD-SPE e AuGQD-SPE, respectivamente, indicando que o melhor resultado apresentado pelo dispositivo pode estar relacionado, também, ao o ligeiro aumento da área.

Para investigar a natureza do processo das reações envolvidas no comportamento da AFLB₁, um estudo de variação da velocidade de varredura foi realizado, e os resultados apresentados na FIGURA 62.

FIGURA 62 – A) VOLTAMOGRAMAS LINEARES OBTIDOS PARA O ESTUDO DE VELOCIDADE DE VARREDURA EMPREGANDO AuGQD-SPE NA PRESENÇA DE AFLB₁. B) VARIÇÃO DA CORRENTE EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE VARREDURA; C) GRÁFICO DE $\log I$ vs $\log v$. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ELETRÓLITO: TAMPÃO B-R pH = 5,0; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$.



Como discutido anteriormente, tem-se que para uma reação em que o processo de transporte de massa é regido pela difusão das espécies, o sistema segue a equação de Randles (5), e a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Ainda, quando a regressão do gráfico de $\log I$ vs $\log v$ é obtida, a inclinação da curva é 0,5 para sistemas difusionais.

Quando a corrente de pico varia linearmente com a velocidade de varredura, tem-se que o que rege o sistema é a adsorção das moléculas na superfície do eletrodo; corroborando com este resultado, o valor de *slope* da curva em C é 1,01, característico de processos adsortivos. Esse comportamento já era esperado, uma vez que uma etapa de condicionamento e pré concentração do analito é realizada antes da varredura linear. O valor de 100 mV s^{-1} foi o escolhido para os demais experimentos por apresenta boa relação entre corrente e largura de pico.

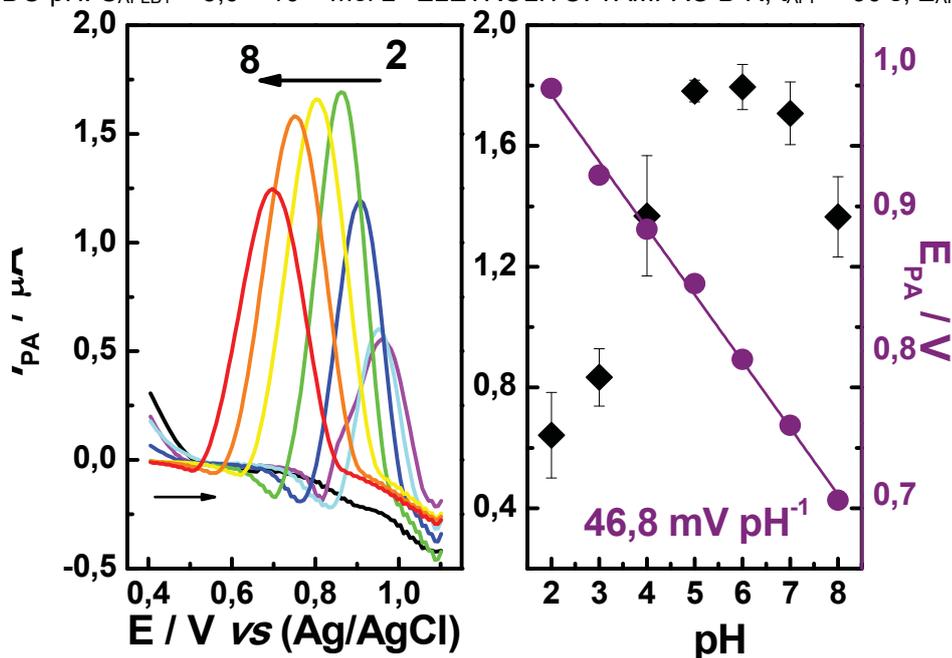
6.3.3 Otimização da Metodologia Analítica

Para alcançar o melhor desempenho do dispositivo, alguns parâmetros foram otimizados e serão discutidos a seguir.

6.3.3.1 Avaliação do pH

O primeiro parâmetro avaliado foi a variação do pH. Para isso, diferentes soluções tampão Britton-Robinson foram preparadas e ajustada em uma faixa de 2,0 a 9,0. Os resultados obtidos são detalhados na FIGURA 63.

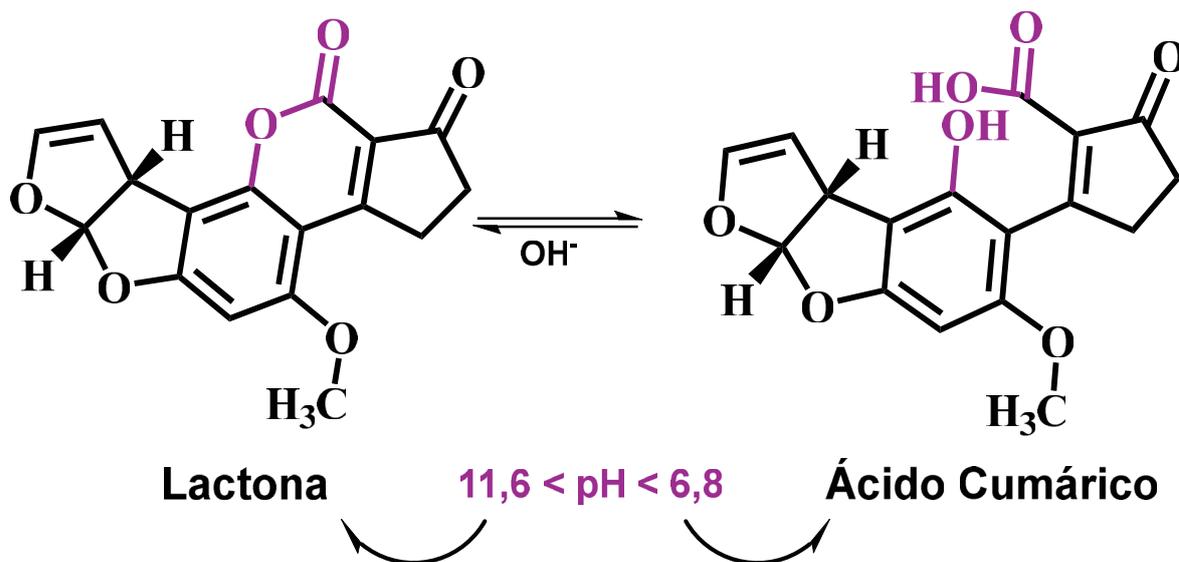
FIGURA 63 – A) VOLTAMOGRAMAS LINEARES DE AFLB₁ OBTIDOS PARA O ESTUDO DO pH EMPREGANDO AuGQD-SPE; B) CORRELAÇÃO ENTRE CORRENTE E POTENCIAL DE PICO EM FUNÇÃO DO pH. C_{AFLB₁} = 5,0 × 10⁻⁸ mol L⁻¹ ELETROLITO: TAMPÃO B-R; t_{APP} = 90 s; E_{APP} = -0,2 V .



É possível observar que há um aumento da corrente de pico para a oxidação de AFLB₁, que atinge o máximo em pH = 5,0, e depois desse valor há um decréscimo da corrente. Esse comportamento pode estar relacionado à forma que a micotoxina pode estar em cada um desses meios.

Estudos na literatura [225,232] descrevem que a forma da cumarina é dependente do pH, ou seja, o anel pode estar aberto ou fechado de acordo com pH do meio, e as formas principais que estas espécies podem adotar são representadas na FIGURA 64.

FIGURA 64 – FORMAS pH DEPENDENTES PROPOSTAS PARA AFLB₁ COM BASE NO COMPORTAMENTO DAS CUMARINAS.



FONTE: A Autora (2019).

Quando em pH mais básico, maior que 11,6 a cumarina assume a forma de lactona, e tem seu anel mantido original, fechado. Já em valores de pH menores de 6,8 a forma mais estável é a de ácido, a partir da abertura do anel. Já entre 6,8 e 11,6 as duas formas coexistem, não sendo possível distingui-las.

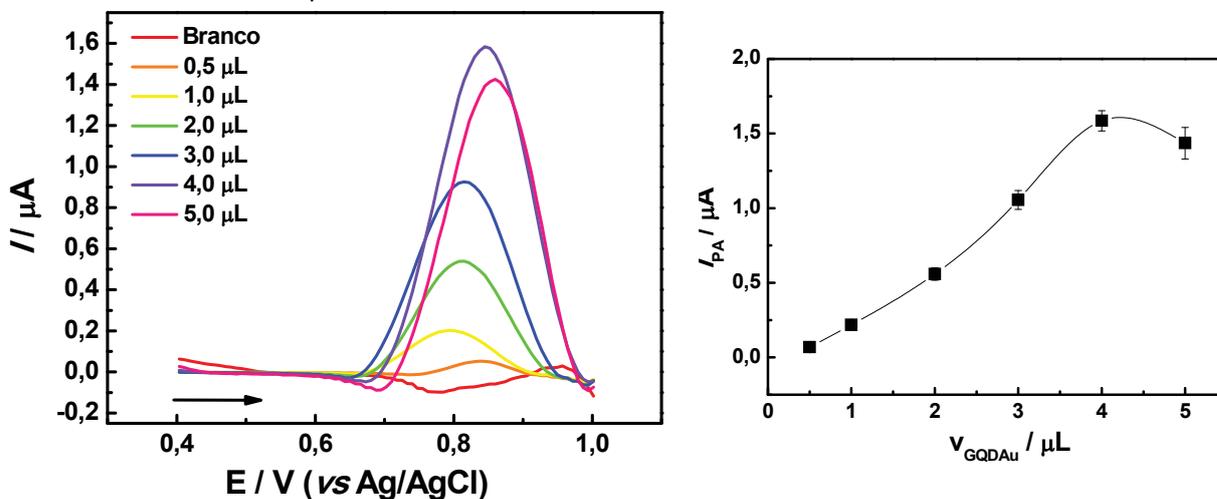
A partir disso, então, pode se sugerir que em pH = 5,0 tem-se a melhor condição uma vez que a forma predominante é a de ácido, que pode ser oxidado formando a carbonila, conforme discutido anteriormente. Já com o aumento do pH, como as duas formas coexistem, o decréscimo da corrente pode estar relacionado ao fato de uma parte do ácido ser convertido a lactona, e não ser passível de sofrer nenhuma reação redox nessas condições.

Novamente, não há na literatura mecanismos de como as reações da AFLB₁ acontecem, sendo essas discussões sugestões levando em consideração que ela pertence à classe das cumarinas.

6.3.3.2 Avaliação da Quantidade de Modificador

A influência da quantidade de modificador utilizado na preparação do AuGQD-SPE na resposta da AFLB₁ foi avaliada a partir da construção de diferentes dispositivos empregando diferentes volumes da suspensão do compósito, sendo os resultados apresentados na FIGURA 65.

FIGURA 65 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE MODIFICADOR (AuGQD) NA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DE AFLB₁. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; ELETRÓLITO: TAMPÃO B-R pH=5,0; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$.



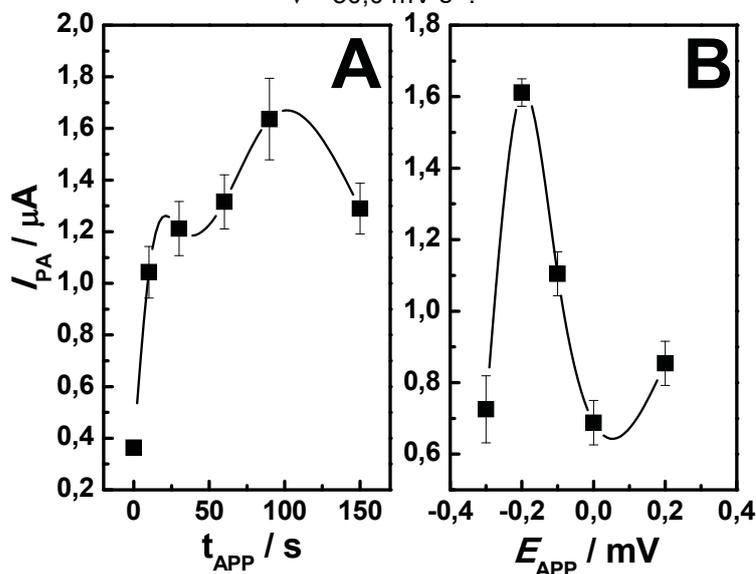
É possível observar a amplificação do sinal de corrente de oxidação da AFLB₁ com o aumento do volume de modificador empregado na construção do AuGQD-SPE. Tem-se um aumento até o volume de 4,0 μL, e após esse valor a corrente se mantém sem variação significativa. Pode-se sugerir que valores elevados do nanomaterial sobre a superfície do eletrodo pode formar agregados na superfície do SPE, dificultando os processos na interface eletrodo/solução.

A fim de obter elevada sensibilidade e condições robustas para a amplificação do sinal, 4,0 μL foi o volume escolhido da dispersão da síntese do nanomaterial para a construção dos eletrodos.

6.3.3.3 Avaliação do Potencial e Tempo de Condicionamento

Um estudo para avaliar a influência de uma etapa de pré concentração do analito ou condicionamento do eletrodo foi realizado, com base em literatura, que sugere que as correntes de pico podem ser aumentadas quando esta etapa é realizada. Foram avaliados o tempo e o potencial, e os resultados apresentados na FIGURA 66.

FIGURA 66 – RESULTADOS PARA OS ESTUDOS DE A) TEMPO E B) POTENCIAL DE CONDICIONAMENTO DO ELETRODO AuGQD-SPE EM FUNÇÃO DA RESPOSTA EM CORRENTE OBTIDA NA PRESENÇA DE AFLB₁ C_{AFLB₁} = 5,0 × 10⁻⁸ mol L⁻¹; ELETROLITO: TAMPÃO B-R pH=5,0; v = 50,0 mV s⁻¹.



É possível observar, em FIGURA 66B, o aumento da corrente de pico para a oxidação para a AFLB₁ quando o potencial aplicado varia de -0,3 para -0,2 V vs Ag/AgCl, atingindo o máximo em -0,2 V. Quando o potencial de acumulação foi variado de -0,2 a 0,2 V vs. Ag / AgCl, o pico de corrente diminui gradativamente quanto menos negativo é o potencial.

A aplicação de potenciais mais negativos favorece as interações com a AFLB₁, acumulando mais espécies na superfície do eletrodo, que serão posteriormente oxidadas, sendo quanto maior o número de espécies na interface, maior se espera a corrente obtida posteriormente.

Também foi investigada a influência do tempo de acumulação variando de 0 a 150 s na oxidação da AFLB₁ na superfície do AuGQD-SPE. A corrente de pico aumentou gradualmente à medida que o tempo de acumulação aumentou de 0 para 90 s, sendo este o valor escolhido, e a partir deste valor houve o decréscimo da corrente, que pode estar associado ao bloqueio da superfície eletródica pelas espécies de AFLB₁ adsorvidas.

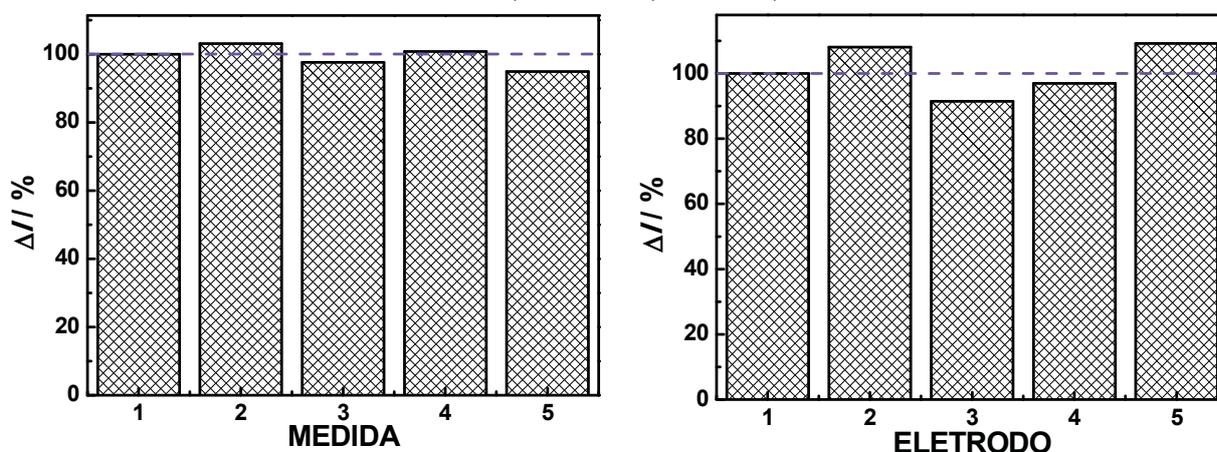
Sendo estes dois os últimos estudo de otimização, a Tabela 13 traz um resumo de todos os valores otimizados durante o desenvolvimento da metodologia.

TABELA 13. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLB₁

PARÂMETRO	FAIXA ESTUDADA	OTIMIZADO
ELETRÓLITO	TAMPÃO B-R	TAMPÃO B-R
PH	2,0 – 8,0	5,0
QUANTIDADE DE MODIFICADOR / μL	0,5 – 5,0	4,0
POTENCIAL DE ACUMULAÇÃO / V	-0,3 – 0,2	-0,2
TEMPO DE ACUMULAÇÃO / S	0 – 150	90
VELOCIDADE DE VARREDURA / MV S^{-1}	5 – 150	50

A repetibilidade do eletrodo na determinação de AFLB₁ foi avaliada através da realização de cinco determinações com as mesmas soluções padrão da toxina usando o mesmo eletrodo, AuGQD-SPE. O desvio padrão relativo (RSD) para a resposta do eletrodo na presença de 50,0 nmol L⁻¹ de solução de AFLB₁ foi de 3,13%. A reprodutibilidade da resposta do eletrodo também foi estudada. Cinco eletrodos foram preparados a partir da mesma dispersão de AuGQD e mesmo lote de SPE, também empregando a solução de 50,0 nmol L⁻¹ de solução de AFLB₁. O RSD para as respostas entre os eletrodos foi de 7,51%. Os resultados mostram que a repetibilidade e reprodutibilidade do sensor para a determinação do AFLB₁ é aceitável, e indicam uma boa confiabilidade e concordância obtida para os eletrodos construídos.

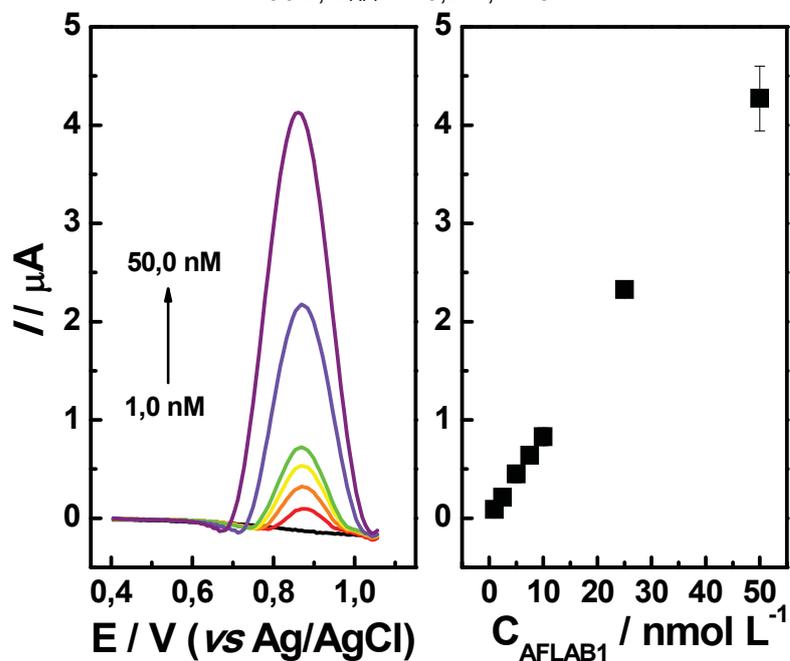
FIGURA 67 – GRÁFICO DE BARRAS OBTIDOS PARA OS ESTUDO DE A) REPETIBILIDADE; E B) REPRODUTIBILIDADE. $C_{\text{AFLB}_1} = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$; ELETRÓLITO: TAMPÃO B-R pH=5,0; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$; $t_{\text{APP}} = 90 \text{ s}$; $E_{\text{APP}} = -0,2 \text{ V}$.



6.3.4 Curva analítica e Análise da Amostra

Com todos os parâmetros otimizados, foi possível a construção da curva analítica para a determinação de AFLB₁. Para isso, foi estudado um intervalo de concentração de toxina de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e a partir disso pode-se obter a região linear de trabalho e a respectiva curva analítica, representada na FIGURA 68.

FIGURA 68 – A) VOLTAMOGRAMAS OBTIDOS PARA A REGIÃO LINEAR DE TRABALHO NA DETERMINAÇÃO DE AFLB₁ EMPREGANDO AuGQD-SPE; B) CORRELAÇÃO ENTRE CORRENTE DE PICO E CONCENTRAÇÃO DE AFLB₁. ELETRÓLITO: TAMPÃO B-R pH=5,0; $v = 50,0$ mV s⁻¹; $t_{APP} = 90$ s; $E_{APP} = -0,2$ V; N=3.



A partir dessa condição foi possível obter as demais figuras de mérito analítico, as quais estão descritas na Tabela 14. Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações (1) e (2), descritas anteriormente [178].

TABELA 14. DESEMPENHO ANALÍTICO OBTIDO COM O AuGQD-SPE PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLB₁

Região Linear / nmol L⁻¹	1,0 a 50,0
R²	0,99
Sensibilidade / A mol⁻¹ L	92,4
LOD / nmol L⁻¹	0,47
LOQ / nmol L⁻¹	1,5

O método desenvolvido foi avaliado na determinação de amostras fortificadas de malte, empregando o valor máximo permitido estabelecido pela legislação brasileira (RDC 07/2011 [222]), com os resultados apresentados na Tabela 15.

TABELA 15. RESULTADOS OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLB₁ EM AMOSTRAS DE MALTE. N=3

C_{AFLB1}	AMBER	PILSEN	RED
1,5 nM	90,5	76,6	90,4
5,0 nM	89,4	98,7	103,2
10,0 nM	76,7	79,8	83,4

Em todos os casos, foram obtidas boas recuperações, variando de 76 a 103%, valores bastante satisfatórios levando em consideração o nível de concentração que está sendo analisado, sugerindo a utilidade do método proposto para o controle analítico de rotina.

6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A obtenção de nanocompósito entre grafeno *quantum dots* e nanopartículas de ouro inspirada em rota descrita na literatura foi realizada com sucesso, não sendo necessária a utilização de agente redutor e passivante, com tempo de reação bastante favorável. Foi possível realizar a caracterização do material obtido por meio de diferentes técnicas.

O compósito foi empregado como modificador de um eletrodo impresso a partir do gotejamento e posterior evaporação do solvente da dispersão. Esse eletrodo modificado pode ser caracterizado por técnicas eletroquímicas, e teve seu desempenho comparado com outros eletrodos.

A determinação de AFLAB₁ empregando o dispositivo proposto foi realizada, apresentando magnitudes de corrente superiores aquelas obtidas para o SPE sem modificação e SPE modificado apenas com GQD.

A partir da otimização dos parâmetros da metodologia analítica, foi possível obter os parâmetros de mérito analítico, sendo LDR, LOQ e LOD, os quais são comparáveis com outros trabalhos descritos na literatura (Tabela 16), tendo em vista a metodologia simples, rápida, sem a necessidade de utilização de enzimas específicas para tal espécie.

Foi possível, também, a análise da micotoxina em amostras de malte e cerveja fortificadas, com boas taxas de recuperação, indicando que não há efeito significativo de matriz, levando em consideração os baixos valores de concentração utilizados.

TABELA 16. COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO OBTIDO EMPREGANDO AuGQD-SPE COM OUTROS DISPOSITIVOS ELETROANALÍTICOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA A DETERMINAÇÃO DE AFLB₁.

Eletrodo	Técnica	LDR / nmol L ⁻¹	LOD / nmol L ⁻¹	REF
HDME	SWV	1,28 a 128,0	0,48	[220]
BSA/anti-AFB₁/MWCNT/ITO	CV	0,80 a 4,4	0,25	[233]
BSA/anti-AFB₁/AuNP/PEDT-GO/GCE	DPV	1,6 a 64,0	3,55	[234]
BSA/anti-AFB₁/AuNP/PEDT/ITO	DPV	0,64 a 176,0	0,014	[235]
AuGQD-SPE	LSV	1,0 a 50,0	0,47	**

BSA/anti-AFB₁/AuNPs/PEDT/ITO: Ito modificado com Pedot funcionalizado com nanopartículas de ouro como suporte para Anti-AFLB₁; BSA/anti-AFB₁/MWCNT/ITO: Ito modificado com Nanotubos de carbono de parede múltipla Carboxilado funcionalizado com anticorpo monoclonal Anti-AFLB₁; BSA/anti-AFB₁/AuNP/PEDT-GO: compósito entre poli-Pedot e óxido de grafeno decorados com nanopartículas de ouro; GCE: eletrodo de carbono vítreo; **este trabalho.

CAPÍTULO 7

7 ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO ELETROQUIMICAMENTE PARA A DETERMINAÇÃO DE FENAMIFÓS

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar óxido de grafeno empregando o Método de Hummers melhorado;
- Caracterizar morfológicamente e estruturalmente o material obtido através de técnicas de microscopia e espectroscopia;
- Utilizar o material para a modificação de eletrodos impressos;
- Caracterizar o material por técnicas voltamétricas;
- Avaliar o dispositivo modificado com ERGO para a determinação voltamétrica de fenamifós;
- Desenvolver uma metodologia analítica empregando o eletrodo impresso modificado com ERGO para a determinação de FNP;
- Determinação de FNP empregando o dispositivo desenvolvido em amostras de tomate.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Reagentes e Soluções

O eletrólito empregado foi tampão Britton-Robinson (CH_3COOH $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; H_3BO_3 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; H_3PO_4 $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, B-R), sendo que para o estudo da variação de pH, as soluções foram ajustadas na faixa de 2,0 a 9,0, com NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de fenamifós (FNP) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada pela dissolução de uma quantidade do pesticida em acetonitrila, estocada e mantida sob refrigeração até sua utilização. Diluições até as concentrações desejadas foram realizadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque, e guardadas em geladeira até a utilização.

7.2.2 Síntese e Caracterização do GO

O óxido de grafeno foi preparado segundo metodologia modificada do método de Hummers [236] usando grafite em pó como material de partida, gentilmente realizada e cedida pelo Dr. Maurício A. P. Papi. A síntese foi realizada através da oxidação química de 1,0 g de grafite com a mistura de 133 mL de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4$ (9:1) e posterior adição de 6,0 g de KMnO_4 e mantido sob agitação e aquecimento a 50°C por 12 horas. Posteriormente a mistura é cuidadosamente adicionada à 130 mL de água (com adição de 1 mL de H_2O_2 30%). O material é decantado por 24h, o sobrenadante retirado, e o precipitado lavado duas vezes com 60 mL de HCl 30% (v/v), uma vez com água destilada e uma vez com etanol. Por fim, o material é seco a 50°C por 24h.

O material foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) realizadas no microscópio JEOL, modelo JEM 1200, realizado no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Por Difratoimetria por Raios-X (DRX) utilizando Difrátômetro Shimadzu®, modelo XRD-3A selecionando a radiação $\text{Cu K}\alpha$ em voltagem e corrente de 40 KV e 40 mA respectivamente e resolução de 0.02θ . Também foram realizadas medidas de Espectroscopia na Região do Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy* – FTIR – BOMEN MB100).

Com o intuito de verificar a presença de grupamentos da superfície do GO, bem como quantificá-los, foram realizadas titulações de Boehm. Para tal, amostras de GO ($n=3$) foram pesadas (50,0 mg) e volumes de 5,0 mL de soluções padronizadas de bases com diferentes forças (NaOH , Na_2CO_3 e NaHCO_3) foram adicionadas nas amostras sendo deixadas sob agitação durante 24 horas. Posteriormente, adicionou-se alíquotas de 10,0 mL de uma solução padronizada de HCl, realizando-se em seguida uma retrotitulação potenciométrica. Nas amostras tratadas inicialmente com Na_2CO_3 e NaHCO_3 antes da adição do ácido um fluxo constante de N_2 por 5 minutos foi borbulhado na amostra.

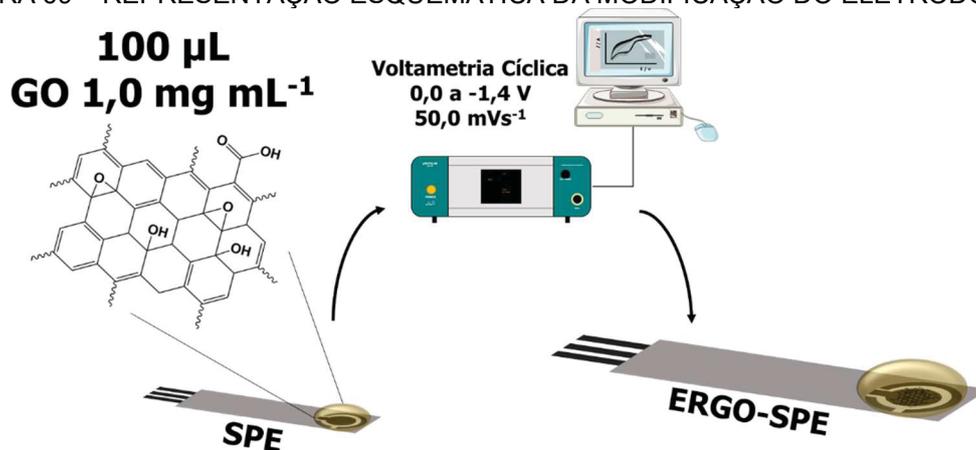
As caracterizações eletroquímicas do material e do eletrodo modificado foram realizadas empregando as técnicas de EIS e CV. As medidas de EIS foram realizadas em um intervalo de 100 kHz a 1 mHz e amplitude de 10 mV (rms), em potencial contínuo, referente ao potencial de pico. O experimento de variação da velocidade de varredura foi realizado no intervalo de 5 a 150 mV s^{-1} , com o objetivo de avaliar a

natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo, empregando tampão BR pH = 6,0 como eletrólito e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de FNP.

7.2.3 Procedimento Voltamétrico e Formação do ERGO

A formação do GO reduzido foi realizada por uma etapa eletroquímica, semelhante à descrita anteriormente. Uma dispersão de GO ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi gotejada sobre os eletrodos do SPE, que foi conectado ao potenciostato e submetido a varredura cíclica, em velocidade de $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ no intervalo de potencial de 0,0 a -1,5 V, durante 50 ciclos. Ao final da varredura, a gota de GO é cuidadosamente retirada da superfície do eletrodo, o eletrodo é lavado com água destilada, dando origem ao ERGO-SPE, pronto para o uso. A FIGURA 69 traz uma representação da obtenção do ERGO-SPE.

FIGURA 69 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MODIFICAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO.



FONTE: A Autora (2019).

As medidas eletroquímicas foram realizadas por um potenciostato/galvanostato μ Autolab® Type III, gerenciado pelo software NOVA 1.20, empregando uma célula de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho e auxiliar de carbono e um eletrodo de pseudo-referência de prata. Conforme descrito anteriormente, nessa configuração de cela eletroquímica, os volumes empregados para as medidas foi de $100,0 \mu\text{L}$, e as técnicas empregadas foram voltametria cíclica (CV), linear (LSV) e onda quadrada (SWV).

7.2.4 Otimização da Metodologia Analítica

7.2.4.1 Comportamento eletroquímico do FNP e Avaliação da potencialidade do ERGO-SPE como sensor para a determinação de FNP

O comportamento voltamétrico do pesticida foi avaliado através da técnica de voltamétrica cíclica, no intervalo de potencial de 0,0 a 1,4 V (vs. Ag/AgCl), a fim de avaliar a presença de processos faradáicos referentes ao analito.

A potencialidade do emprego do ERGO como modificador para a construção de um sensor para a determinação de FNP foi avaliada pela comparação da resposta obtida para o dispositivo proposto (ERGO-SPE) com a resposta obtida para um SPE sem a modificação, na presença do FNP, na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os eletrodos foram submetidos a medidas de LSV e EIS e as respostas obtidas, de corrente e R_{CT} , para cada um dos eletrodos foram coletadas e comparadas.

7.2.4.2 Estudo da Influência da Variação do pH

Para avaliar a influência do pH nos processos redox do FNP, foram preparadas soluções tampão BR, na faixa de 2,0 a 8,0, que foram utilizadas no preparo das soluções de FNP ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). O perfil voltamétrico para cada valor de pH foi obtido a partir de varreduras lineares, e posteriormente comparados para a escolha do melhor pH.

7.2.4.3 Estudo do Número de Ciclos de Eletrodeposição

O número de ciclos para a eletrodeposição do ERGO na superfície do eletrodo foi avaliado no intervalo de 5 a 100 ciclos. Para cada modificação foi realizada a medida de voltametria linear na presença de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de FNP, e os perfis e correntes obtidos foram posteriormente comparados para a escolha do melhor n° de ciclos.

7.2.4.4 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade

Para o estudo de repetibilidade, foram feitas 5 medidas de SWV com a mesma superfície de ERGO-SPE e para o estudo da reprodutibilidade foram realizadas medidas de SWV com 5 ERGO-SPE diferentes, na presença de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de FNP, e as correntes obtidas foram comparadas com média das correntes obtidas para cada estudo, podendo-se obter o desvio padrão relativo para cada estudo.

7.2.5 Construção da Curva Analítica e Análise da Amostra

Após a otimização dos parâmetros experimentais e de técnica, foi realizado o estudo para avaliar a região de resposta linear do ERGO-SPE para FNP, com a construção de uma curva analítica, de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, sendo possível obter a região linear de trabalho, bem como o desempenho analítico do método, através do cálculo dos limites de detecção e quantificação e da obtenção da sensibilidade através da equação da reta.

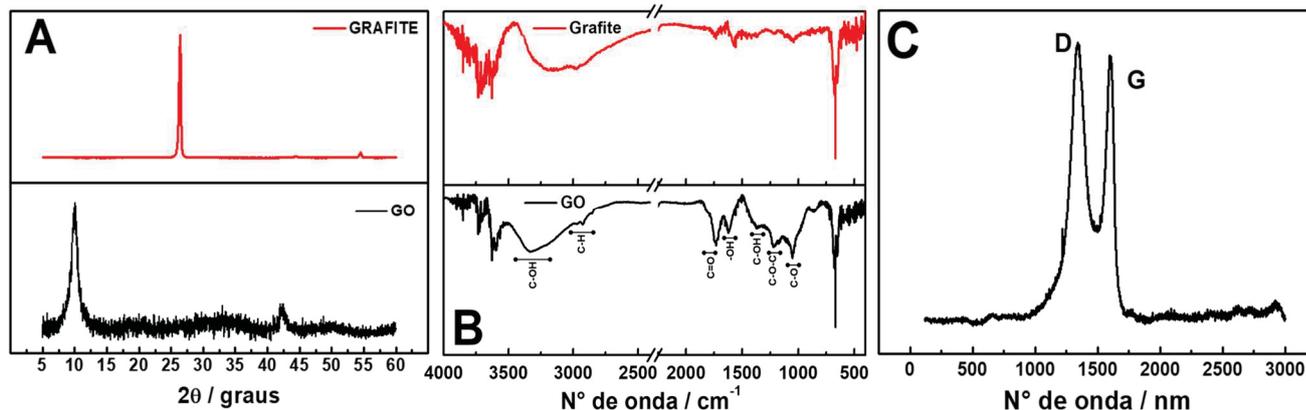
As amostras de tomate, cerca de 200,0 g, foram homogeneizadas em liquidificador. A partir dessa amostra, 3 porções de 10,0 g foram retiradas e colocadas em acetonitrila, 10,0 mL. Esse conjunto ficou em banho ultrassônico por 1 hora, e posterior a isso, o sobrenadante foi fortificado com FNP $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. A partir dessa solução fortificada, foram realizadas as demais diluições, em eletrólito suporte, e posteriormente as amostras foram analisadas empregando a metodologia desenvolvida.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Caracterização do Óxido de Grafeno e Formação do ERGO

A fim de verificar se houve a formação do óxido de grafeno a partir da rota empregada, algumas caracterizações foram realizadas, e estão demonstradas na FIGURA 70.

FIGURA 70 – CARACTERIZAÇÕES REALIZADAS PARA O ÓXIDO DE GRAFENO OBTIDO PELA METODOLOGIA DE HUMMERS MELHORADA: A) DRX; B) FTIR E C) RAMAN.



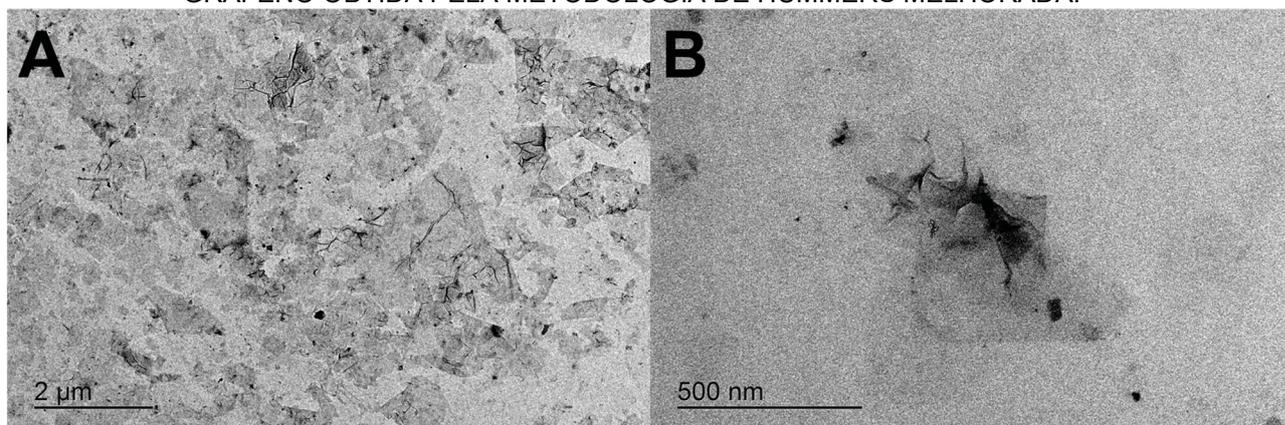
Os difratogramas de Raios X do grafite e do óxido de grafeno estão representados na FIGURA 70A, na qual é possível observar os picos característicos de ambos os materiais. Para o grafite precursor é possível observar pico de reflexão característico e bastante agudo em $2\theta = 26,6^\circ$ e $54,7^\circ$ referentes aos planos (002) e (004) do grafite, respectivamente, que não são vistas no difratograma obtido para a amostra de GO, indicando que todo o grafite não oxidado foi removido durante as etapas de limpeza. E, ainda, é possível observar o pico em $2\theta=10^\circ$, referente ao empilhamento das folhas de óxido de grafeno.

Os espectros de infravermelho para grafite e óxido de grafeno estão apresentados na FIGURA 70B. A banda larga entre 3500 e 3000 cm^{-1} está relacionada aos modos de estiramento da ligação -OH . As bandas em 2849 e 2919 cm^{-1} correspondem aos estiramentos de grupamentos -CH . Em 1730 cm^{-1} aparecem os modos associados à vibração da ligação C=O de grupos carbonilas e carboxilas, e em 1622 cm^{-1} pode ser associado a modos de C=C em aromáticos, ou ainda à presença de água. A banda em 1376 cm^{-1} pode ser referente a ligação de C-O e as outras, em 1230 e 1059 cm^{-1} de ligação C-O de expóxidos.

Já o espectro Raman do GO (FIGURA 70C) apresenta duas bandas características, sendo a banda D, em torno de 1345 cm^{-1} , que está relacionada à defeitos na estrutura grafítica, com a presença de heteroátomos, e também aos efeitos de borda. E a banda G, em 1590 cm^{-1} , relacionada aos átomos de carbono sp^2 remanescentes.

Além destas, foram realizadas medidas de TEM, para verificar a dispersão de GO obtida. As imagens estão demonstradas na FIGURA 71.

FIGURA 71 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO ÓXIDO DE GRAFENO OBTIDA PELA METODOLOGIA DE HUMMERS MELHORADA.

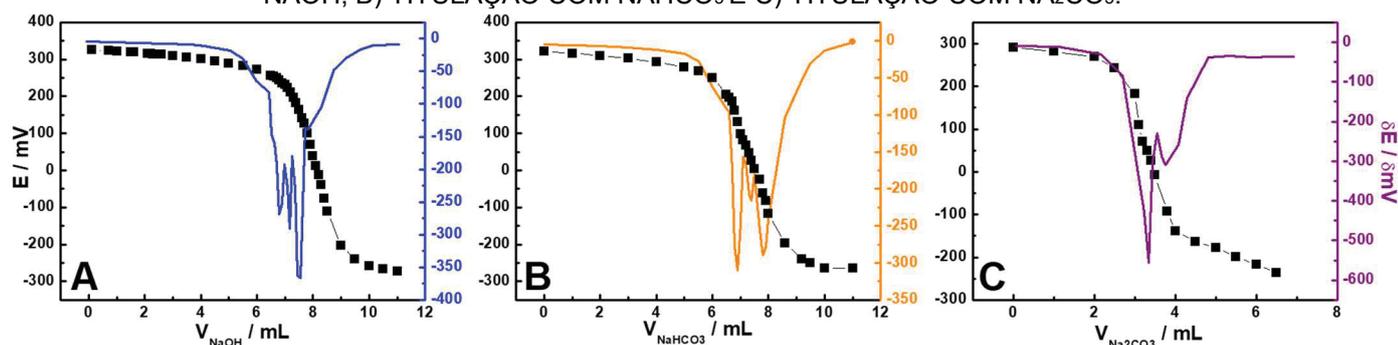


Fonte: A Autora (2019).

As imagens de TEM mostram que a dispersão de GO obtida é homogênea, com a dispersão das folhas por todo o substrato, bem como folhas sobrepostas em alguns pontos.

Ainda, a fim de quantificar os grupos oxigenados presentes no material, foram realizadas titulações empregando o método de Boehm, uma retrotitulação potenciométrica. As curvas de titulação, bem com as respectivas derivadas estão representadas na FIGURA 72.

FIGURA 72 – CURVAS TITULOMÉTRICAS E PRIMEIRA DERIVADA PARA: A) TITULAÇÃO COM NaOH, B) TITULAÇÃO COM NaHCO_3 E C) TITULAÇÃO COM Na_2CO_3 .



De acordo com a acidez apresentada pelo grupo, ocorrerá ou não a neutralização dele pela adição da base, com diferentes forças. O grupamento que apresenta maior acidez é o carboxílico, seguido do lactônico e por último o fenólico. Para as bases, a mais forte é o NaOH, seguido pelo Na_2CO_3 e como mais fraca o NaHCO_3 [237].

Seguindo o raciocínio, a amostra preparada com bicarbonato de sódio irá ter apenas os grupamentos carboxílicos neutralizados, sendo possível sua quantificação direta a partir do volume gasto na titulação do HCl em excesso pelo NaOH e cálculos de retrotitulação. Quando o carbonato de sódio é empregado no preparo da amostra, é alcançada a neutralização dos grupamentos carboxílicos e lactônicos, sendo possível quantificar o último pela diferença de valores obtidas nas titulações das amostras tratadas com NaHCO_3 e Na_2CO_3 . Já na amostra tratada com o hidróxido de sódio ocorre a neutralização de todos os grupamentos ácidos presentes na superfície do material, sendo assim, é possível encontrar a quantidade de grupamentos fenólicos pela subtração das quantidades obtidas pela titulação das amostras tratadas com o Na_2CO_3 . A Tabela 17 traz os resultados obtidos.

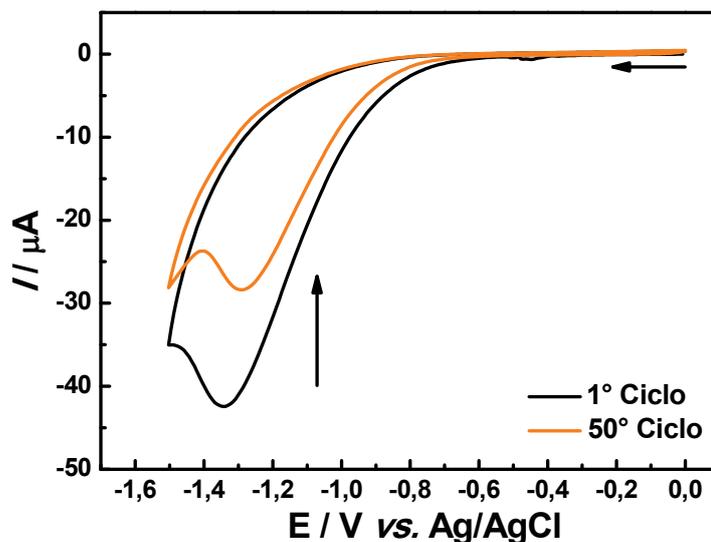
TABELA 17. QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS SUPERFICIAIS ÁCIDOS DO GO PELO MÉTODO DE BOEHM.

	TOTAIS	CARBOXÍLICOS	FENÓLICOS	LACTÔNICOS
mEq g⁻¹	5,79	3,47	2,93	0,61

A presença desses grupos é bastante importante, pois eles são responsáveis por muitas características do material, como as excelentes atividades electrocatalíticas, além de serem responsáveis pelas interações entre o analito e a superfície do eletrodo, facilitando as reações redox.

Como discutidos anteriormente, diferentes abordagens podem ser empregadas para a obtenção de RGO, sendo que para esse trabalho a via electroquímica foi utilizada. Sendo assim, a obtenção do ERGO foi realizada a partir de um experimento de voltametria cíclica, diretamente na superfície do SPE, obtendo-se ao final o ERGO-SPE. A FIGURA 73 traz um voltamograma cíclico com o perfil característico de formação de ERGO.

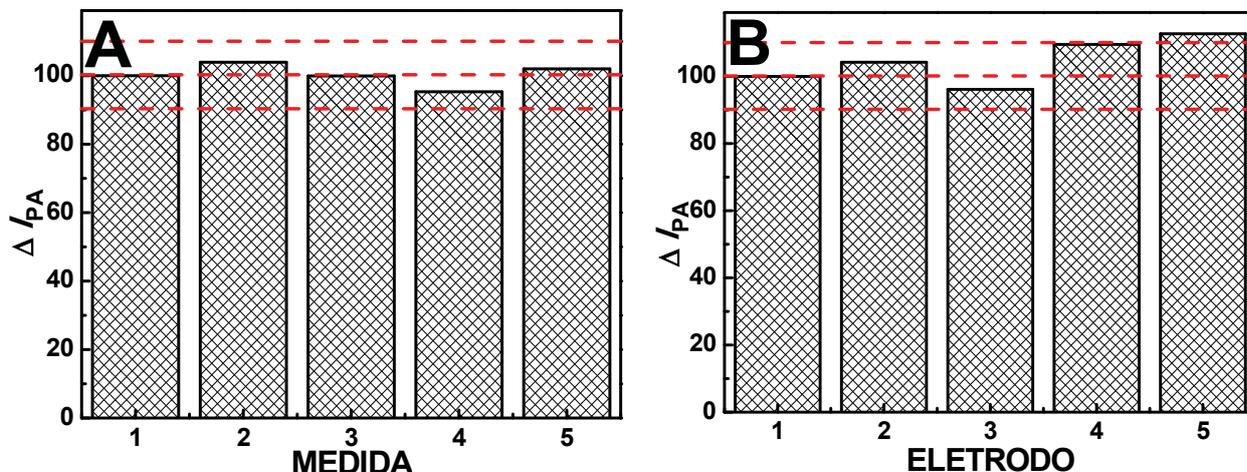
FIGURA 73 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS CARACTERÍSTICOS PARA A FORMAÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO ELETROQUIMICAMENTE.



O perfil voltamétrico observado nos voltamogramas acima são característicos para a formação de ERGO a partir de experimentos de voltametria cíclica, sendo que a literatura reporta o pico em torno de 1,3 V referente à redução dos grupamentos oxigenados na superfície do GO [56,204]. A diminuição do sinal, como observado nos voltamogramas, é associada com a diminuição dos grupos oxigenados, pelas sucessivas ciclagens, e formação da espécie reduzida na superfície do SPE.

Para avaliar a estabilidade da superfície eletródica e a confiabilidade da resposta do dispositivo, foram realizados estudos de repetibilidade e reprodutibilidade das medidas voltamétricas, com o intuito de avaliar a variação de corrente para FNP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), para medidas consecutivas com uma mesma superfície ($n = 5$ - repetibilidade) e para medidas com diferentes superfícies ($n = 5$ - reprodutibilidade).

FIGURA 74 – GRAFICOS DE BARRA OBTIDOS PARA O ESTUDO DE A) REPETIBILIDADE; E B) REPRODUTIBILIDADE DO ERGO-SPE NA PRESENÇA DE FENAMIFÓS. $C_{\text{FNP}} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TAMPÃO BR pH=6,0. $f = 50 \text{ Hz}$; $\Delta E_P = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_S = 10 \text{ mV}$

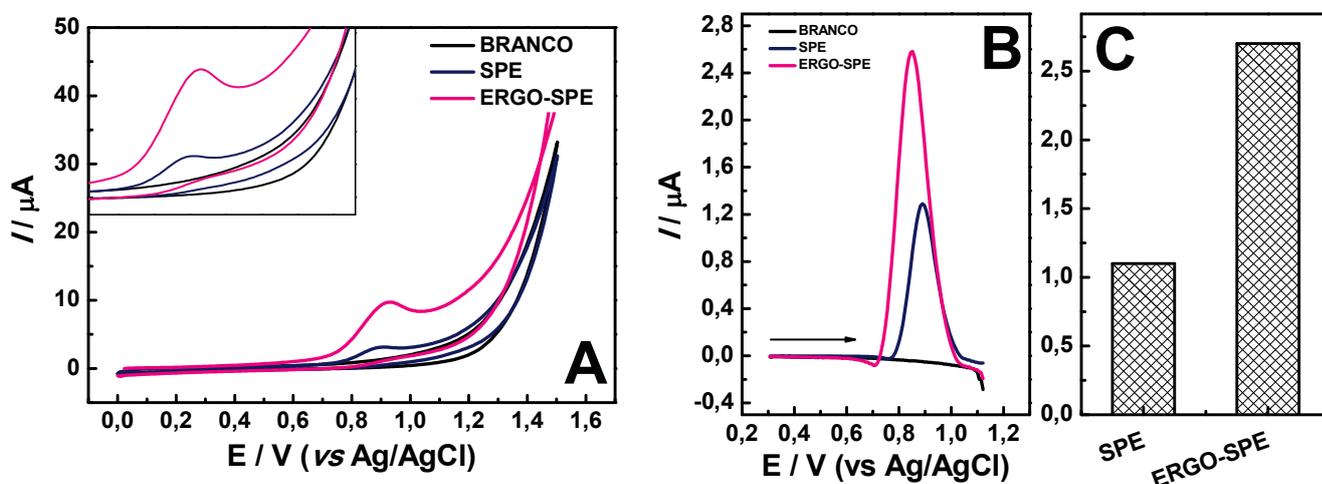


Para ambos os estudos (FIGURA 74), o valor de desvio padrão relativo foi menor que 10% (3,2 % para repetibilidade e 6,7% para reprodutibilidade), calculados a partir da média das correntes. Estas características garantem a utilização de uma mesma superfície eletródica, ou de diferentes superfícies eletródicas (construídas a partir de diferentes modificações, quando necessário), não prejudicando o desempenho da metodologia desenvolvida.

7.3.2 Comportamento Voltamétrico do Fenamifós

Primeiramente foi realizado um estudo a fim de investigar o comportamento voltamétrico do FNP e para tal experimentos de voltametria cíclica foram realizados, representados na FIGURA 75A.

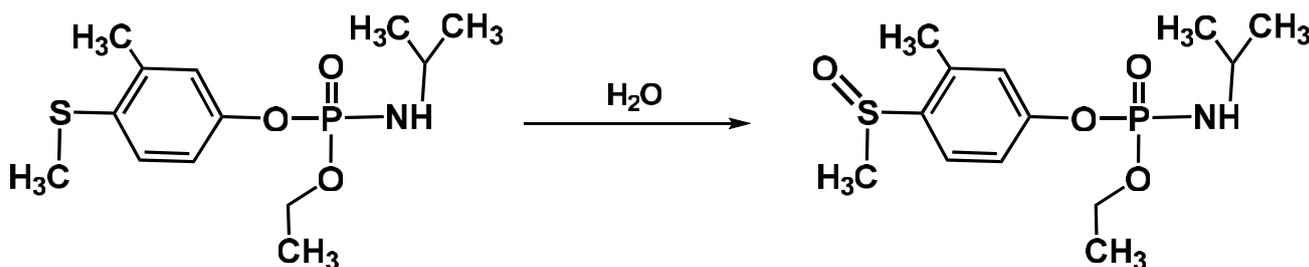
FIGURA 75 – A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS; B) VOLTAMOGRAMAS DE VARREDURA LINEAR C) CORRELAÇÃO ENTRE A CORRENTE DE PICO E ELETRODO OBTIDOS PARA ERGO-SPE E SPE NA PRESENÇA DE $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ DE FNP. ELETRÓLITO: TAMPÃO BR pH = 6,0; $v = 50,0$ mV s⁻¹



Apesar de ser classificado como pertencente do grupo de organofosforados, o FNP não apresenta comportamento eletroquímico semelhante ao paraoxon, por exemplo. Isso se deve ao fato de que o paraoxon é um nitro composto, e as reações redox são referentes a este grupo, enquanto o fenamifós é classificado como tiofosfato, e as reações são relacionadas ao enxofre.

Não há na literatura descrição do mecanismo redox do FNP, especificamente, Sendo assim, sabendo que ele é um tioéter derivado do ácido fosfórico, com base em compostos semelhantes e sabendo que a oxidação via enzimática dá via formação de sulfóxido, uma reação global bastante simplificada é sugerida e representada na FIGURA 76 [238–240]. Segundo a literatura, a oxidação de um tioéter ocorre pela formação de um sulfóxido, a partir do par de elétrons presente no enxofre, em um mecanismo catalítico através de um radical catiônico [241].

FIGURA 76 – REAÇÃO REDOX PROPOSTA PARA O FENAMIFÓS.



FONTE: A Autora (2019).

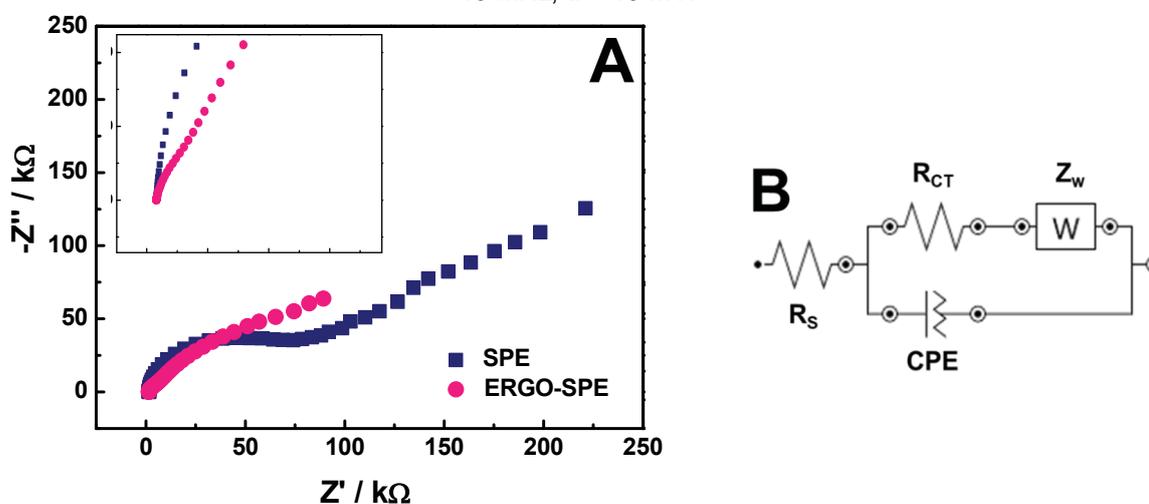
A partir dos voltamogramas da FIGURA 75A, é possível observar que na região estudada o eletrodo não apresenta espécies eletroativas, indicado pela ausência de picos no branco, e quando na presença de FNP ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) ocorre o surgimento de um único processo faradáico no sentido da oxidação, sem a presença de picos no sentido reverso de varredura, indicando um processo irreversível.

É possível observar, também, a melhora no incremento de corrente apresentada pelo dispositivo modificado, ERGO-SPE, em relação ao eletrodo sem modificação, comportamento melhor evidenciado pela FIGURA 75B. Além do aumento de corrente, é possível ver uma leve diminuição no potencial de pico, para valores menos positivos, o que pode sugerir um efeito catalítico relacionado a presença do ERGO.

Os voltamogramas mostrados em B evidenciam fortemente as premissas da construção de EQMs, de que a presença do modificador na superfície do eletrodo causa uma melhora da resposta deste, que pode ser atribuída a diferentes processos relacionadas à natureza do material modificador. Em relação ao ERGO, essa melhora pode acontecer a diversos fatores, como elevada área superficial, boa condutividade e facilidade nos processos de transferência eletrônica, bem como a presença de grupos oxigenados que podem interagir com o analito [242].

Para investigar essa melhora de resposta, medidas de EIS foram realizadas, e o resultado apresentado na FIGURA 77.

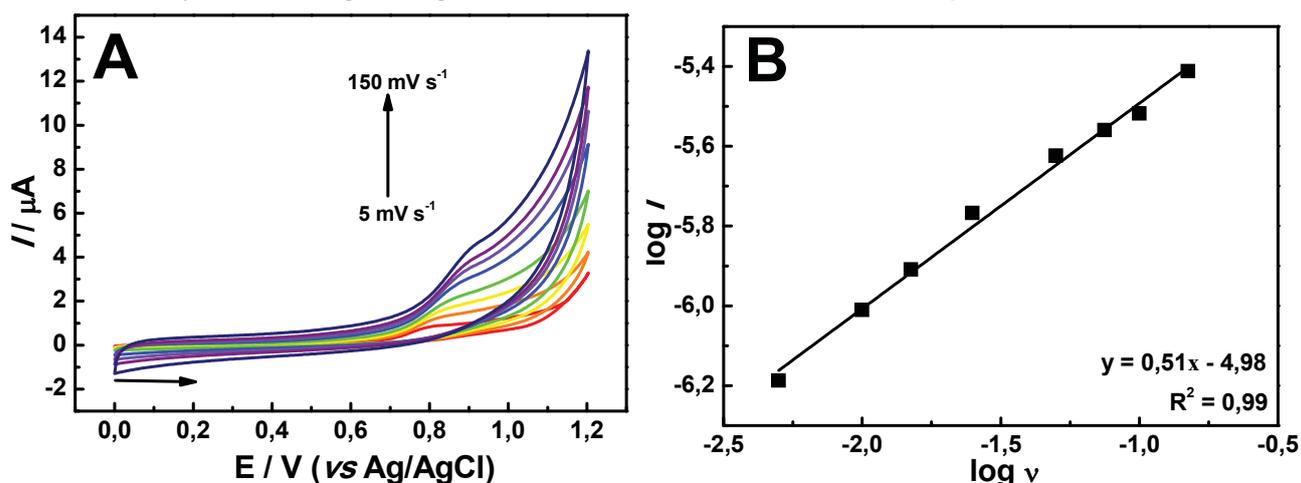
FIGURA 77 – A) DIAGRAMAS DE NYQST OBTIDOS PARA SPE (AZUL) E ERGO-SPE (ROSA) NA PRESENÇA DE FNP ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); B) CIRCUITO EQUIVALENTE DE Randles. $f = 0,1 \text{ mHz}$ A 10 mHz ; $a = 10 \text{ mV}$.



A partir do ajuste dos semicírculos, empregando o circuito apresentado em B, foi possível o cálculo da resistência a transferência de carga (R_{CT}) para ambos os eletrodos, sendo 60,5 e 17,5 k Ω para SPE e ERGO-SPE, respectivamente. A diminuição do valor de R_{CT} apresentado pelo dispositivo proposto sugere uma maior facilidade das reações redox do FNP ocorrerem causadas pelas características do modificador, anteriormente discutidas, como elevada condutividade e melhora na transferência eletrônica, além de efeitos eletrocatalíticos mais pronunciadas por conta das dimensões do material.

A fim de avaliar a natureza do processo envolvido na reação redox do fenamifós, um experimento de variação de velocidade de varredura foi realizado, e os resultados demonstrados na FIGURA 78.

FIGURA 78 – A) VOLTAMOGRAMAS CICLICOS PARA FENAMIFÓS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE VELOCIDADE DE VARREDURA EMPREGANDO ERGO-SPE NA PRESENÇA DE FENAMIFÓS; B) PLOT DE $\log I$ vs $\log v$. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TAMPÃO BR pH=6,0.



Quando o gráfico de Randles é apresentado na forma de logaritmo da corrente de pico vs. logaritmo da velocidade de varredura, o valor de inclinação da curva é que indica a natureza que rege os processos redox, sendo que para valor próximo de 0,5 o processo é governado por difusão, e para valor próximo de 1 o processo é governado por adsorção. A partir disso, tem-se que o processo redox do FNP sobre ERGO-SPE é governado pela difusão das espécies até a superfície do eletrodo, já que o valor de inclinação é de 0,51, sendo essa a etapa determinante do processo [193].

7.3.3 Otimização da Metodologia Analítica

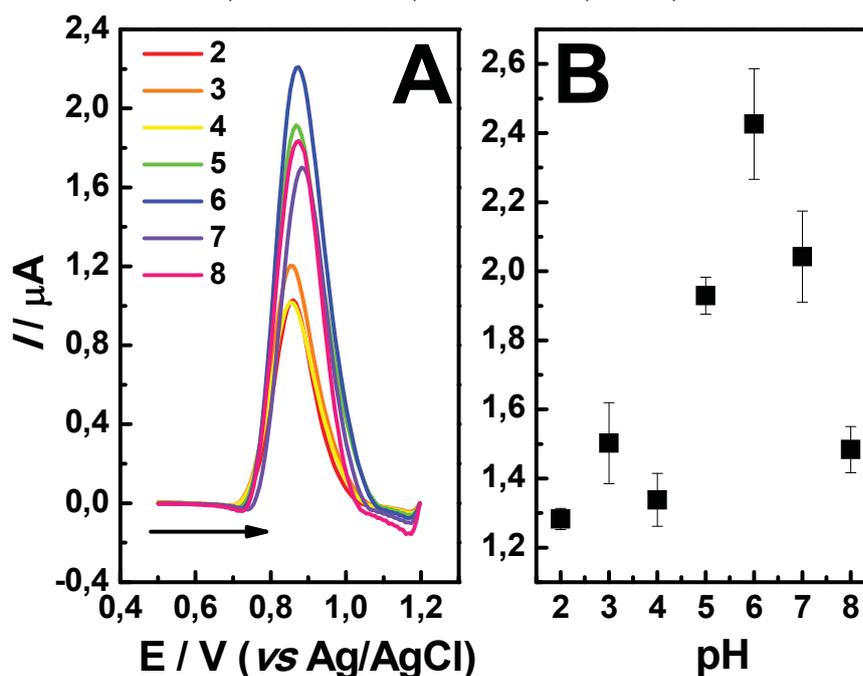
A fim de se obter o melhor desempenho do ERGO-SPE, alguns parâmetros relacionados à metodologia foram estudados e os resultados discutidos a seguir.

7.3.3.1 Avaliação do pH

O valor do pH da solução muitas vezes tem um efeito expressivo nas características superficiais de materiais carbonáceos. Quando o material contendo átomos de carbono é submerso em meio aquoso, ele desenvolve sobre sua superfície uma carga proveniente da dissociação de grupos funcionais superficiais. Além disso, o valor de pH e sua variação muitas vezes exercem efeitos direto nas reações redox do analito que está sendo estudado, uma vez que as interações interfaciais podem ser alteradas, favorecendo ou não que uma reação aconteça.

Dessa maneira, um estudo foi realizado a fim de verificar qual a influência exercida sobre a resposta do sensor quando há variação do pH das soluções que compõem o eletrólito suporte, apresentados na FIGURA 79.

FIGURA 79 – A) VOLTAMOGRAMAS LINEARES PARA FENAMIFÓS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE pH EMPREGANDO ERGO-SPE; B) CORRELAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO E O PH. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; TAMPÃO BR; $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$



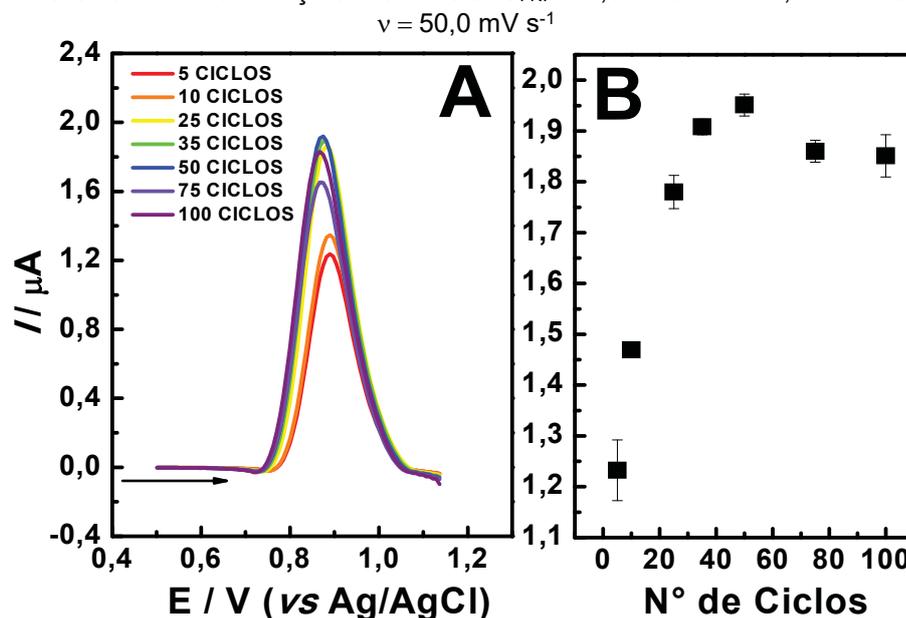
É possível observar que há um aumento da corrente de pico com o aumento do valor do pH, alcançando o máximo em pH = 6,0 e decrescendo para valores superiores.

Essa melhora pode ser justificada por dois motivos complementares: o primeiro deles é que nessa condição de redução, os grupos oxigenados remanescentes estão desprotonados (os ácidos carboxílicos apresentam $pK_a < 5,0$), e há a presença de grupos aromáticos restaurados pela redução. O segundo motivo é que nessa condição o FNP encontra-se protonado ($pK_a 10,34$ [238]) e a literatura sugere que o processo de transferência de elétrons resultante, tipicamente envolvendo dois elétrons, é significativamente facilitado por grupos vizinhos ricos em elétrons dispostos apropriadamente, que auxiliam na estabilização do enxofre, em decorrência da oxidação. Essa estabilização pode ser pela presença de estruturas aromáticas restauradas pelo processo de redução e formação do ERGO [239]. Assim, o pH = 6,0 foi empregado para os demais estudos.

7.3.3.2 Avaliação do Grau de redução do ERGO

A fim de avaliar a influência do grau de redução do ERGO em relação ao FNP, foi realizado um estudo no intervalo de potencial de 0,0 a -1,4 V, variando-se a quantidade de números de varreduras cíclicas consecutivas empregados para a modificação e obtenção do ERGO-SPE, sendo que para cada n° de ciclos empregado foi avaliado o desempenho em função da resposta frente ao analito. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 80.

FIGURA 80 – A) VOLTAMOGRAMAS LINEARES PARA FENAMIFÓS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE QUANTIDADE DE MODIFICADOR (ERGO); B) CORRELAÇÃO ENTRE CORRENTE DE PICO E NÚMERO DE CICLOS DE FORMAÇÃO DO ERGO. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TAMPÃO BR pH=6,0.



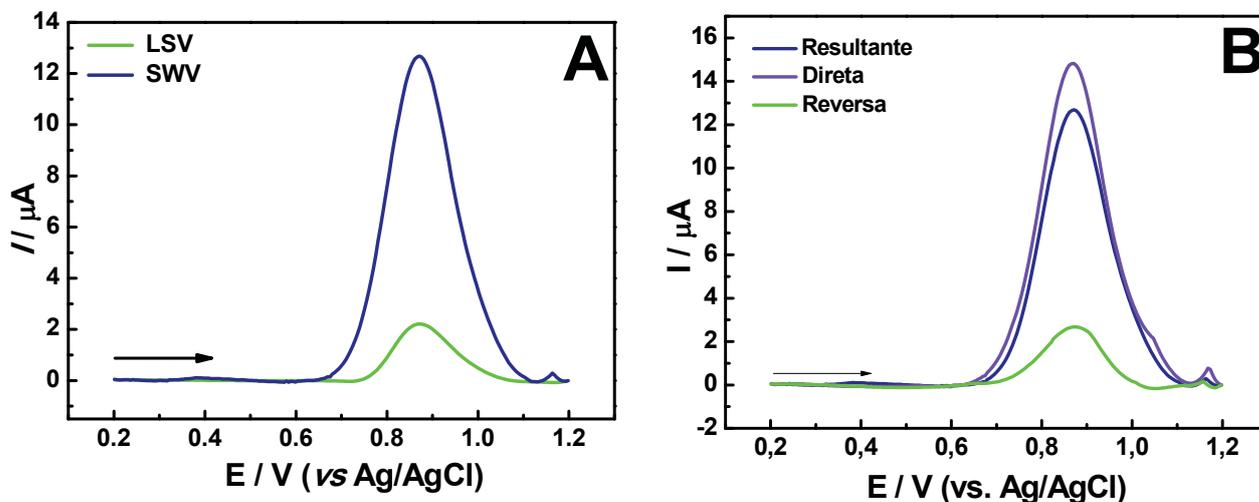
É possível observar que a corrente de pico aumenta com o aumento do número de ciclos, sendo que a partir de 50 ciclos não há variação significativa de corrente. E sabe-se que quanto maior o número de ciclos, maior grau de redução do material e menor presença de grupos oxigenados.

Sendo assim, levando em consideração a resposta, bem como a frequência analítica, foi escolhido o valor de 50 ciclos de eletrodeposição, em que se tem de maneira simultânea e eficiente a presença de grupos oxigenados e estruturas aromáticas. Valores superiores implicam em mais tempo para a modificação do dispositivo, sem um ganho significativo de corrente e sensibilidade do dispositivo construído.

7.3.3.3 Comparação de técnicas

Até este momento, a técnica empregada foi voltametria de varredura linear, porém a fim de melhorar a performance do dispositivo, melhorando a sensibilidade da metodologia, foi avaliado a utilização de voltametria de onda quadrada. Sendo assim, os perfis obtidos empregando LSV e SWV em uma mesma condição estão representados na FIGURA 81.

FIGURA 81 – A) COMPARATIVO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DE FNP POR LSV E SWV; B) PERFIL DE ONDA QUADRADA COM AS 3 COMPONENTES OBTIDO PARA FNP. $C_{\text{FNP}} = 1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, TAMPÃO BR pH=6,0.



A partir dos perfis apresentados em FIGURA 81A, é possível perceber que para uma mesma condição experimental (i.e. velocidade de varredura, pH e concentração de FNP) o perfil obtido para onda quadrada apresenta uma melhora significativa de corrente, o que está associado ao fato de ser uma técnica pulsada e por isso apresenta uma melhor sensibilidade [177].

Apesar de ser uma molécula com perfil irreversível, conforme discutido anteriormente, e como pode ser observado em FIGURA 81B, em que se observa uma contribuição da componente reversa e por isso tem-se a diminuição da corrente resultante, o perfil e magnitude de correntes obtidos para o FNP empregando a SWV se mostrou bastante sensível, e por isso foi empregado para a construção da curva analítica e aplicação na amostra.

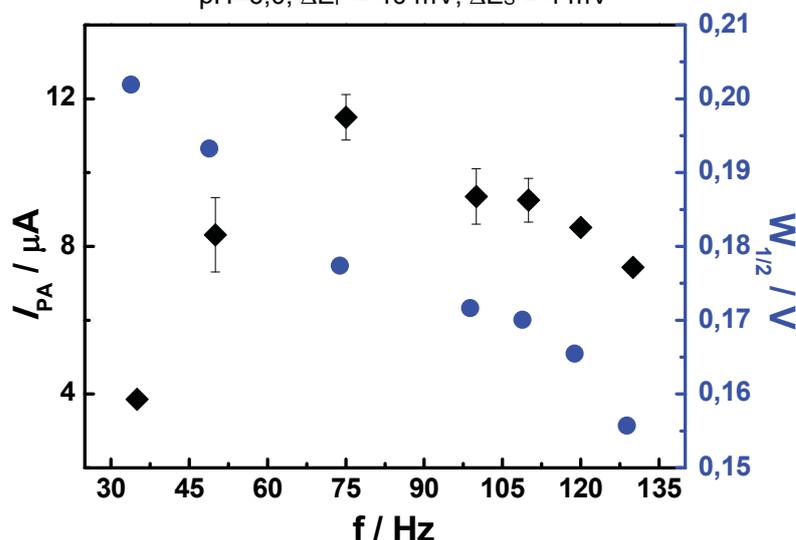
7.3.3.4 Parâmetros da técnica de Voltametria de Onda Quadrada

Após ser escolhida como ferramenta analítica, foram estudados e otimizados os parâmetros referentes à SWV e que influenciam diretamente no sinal obtido. Sendo assim, os parâmetros otimizados foram amplitude de pulso, frequência e incremento de potencial, empregando o ERGO-SPE na presença de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de FNP, em tampão BR pH=6,0.

O primeiro parâmetro avaliado foi a frequência, parâmetro relacionado à velocidade em que as ondas de pulso são aplicadas, sendo esta a responsável pela

magnitude do sinal analítico e conseqüentemente a sensibilidade do método. A FIGURA 82 traz os resultados obtidos para esse estudo.

FIGURA 82 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE FREQUÊNCIA EMPREGANDO ERGO-SPE PARA A DETERMINAÇÃO DE FENAMIFÓS. $C_{\text{FNP}} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TAMPÃO BR pH=6,0; $\Delta E_{\text{P}} = 40 \text{ mV}$; $\Delta E_{\text{S}} = 4 \text{ mV}$



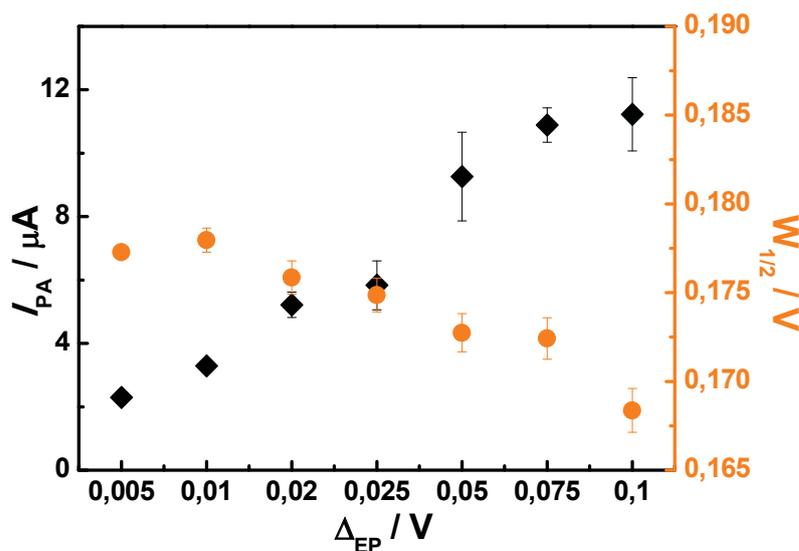
É possível observar que há um acréscimo de corrente ao passo que a frequência é aumentada, alcançando valor máximo em 75 Hz, e após tem-se o decréscimo da corrente. Como a frequência está diretamente relacionada à velocidade em que os pulsos são aplicados, e com o aumento da frequência tem-se um aumento proporcional da velocidade em que o experimento ocorre. Dessa maneira, valores elevados de frequência implicam em uma elevada velocidade de varredura, e caso a cinética da reação seja rápida para acompanhar esse aumento de velocidade, tem-se um aumento da corrente de pico linear com o aumento da frequência. Porém, caso a cinética seja lenta ao ponto de não conseguir acompanhar a velocidade em que o experimento está acontecendo, uma diminuição da corrente de pico será observada [177].

Apesar de ser um parâmetro bastante importante da SWV, a frequência tem maiores implicações em sistemas reversíveis, que não é o caso do FNP. A literatura sugere que o emprego de valores mais brandos de frequência, como 75 Hz por exemplo, permite que os outros dois parâmetros – amplitude e incremento de potencial – sejam melhor explorados. Esse fato se deve, principalmente, que estes parâmetros não sofrem influência da largura de pico, ou seja, a largura mantém uma

certa constância com a variação dos parâmetros, garantindo além de sensibilidade, que a seletividade não seja afetada.

O segundo parâmetro estudado foi a amplitude de pulso, Δ_{EP} , e o resultado obtido está na FIGURA 83.

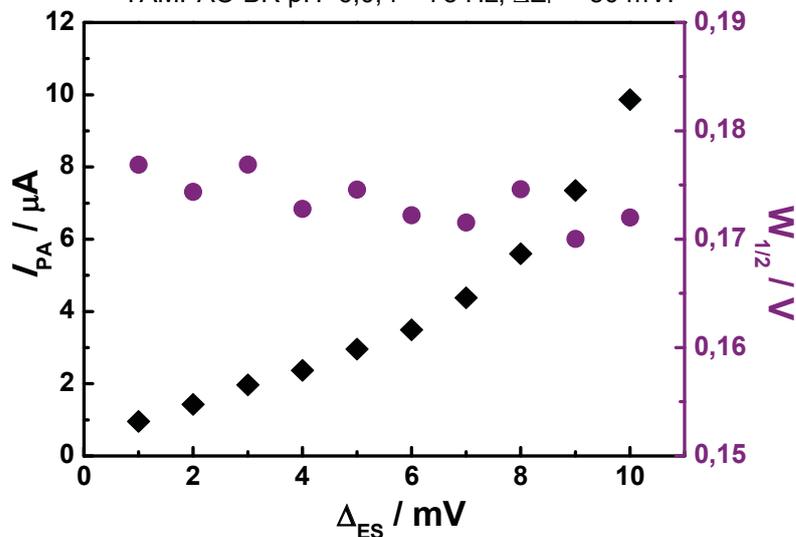
FIGURA 83 – ESTUDO DA AMPLITUDE DE PULSO EMPREGANDO ERGO-SPE PARA A DETERMINAÇÃO DE FENAMIFÓS. $C_{FNP} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TAMPÃO BR pH=6,0; $f = 75 \text{ Hz}$; $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



É possível observar o aumento da corrente de pico com o aumento da amplitude de aplicação de pulso, e que não há variação significativa na largura de meia altura, conforme descrito anteriormente. Com valores maiores de amplitudes, há uma maior perturbação do sistema, e conseqüentemente maior corrente de pico e sensibilidade. Sendo assim, o valor de 75,0 mV foi o escolhido por apresentar menor desvio entre as réplicas, já que não há variações significativas de corrente a partir de 50,0 mV.

E o terceiro parâmetro a ser otimizado em SWV é o incremento de potencial, ou seja, o valor de potencial sobre qual os pulsos de amplitude serão sobrepostos. A velocidade de varredura na SWV é resultado do produto entre frequência de aplicação do pulso e o incremento de potencial, e detém influência com respeito à sensibilidade das análises. Os resultados estão apresentados na FIGURA 84.

FIGURA 84 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE INCREMENTO DE POTENCIAL EMPREGANDO ERGO-SPE PARA A DETERMINAÇÃO DE FENAMIFÓS. $C_{\text{FNP}} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, TAMPÃO BR pH=6,0; $f = 75 \text{ Hz}$; $\Delta E_P = 50 \text{ mV}$.



Para sistemas reversíveis, o aumento do incremento de potencial nem sempre acarreta no aumento da corrente, uma vez que como ambas as componentes contribuem, com o aumento do incremento elas acabam por se tornar muito positivas, fazendo com que a corrente resultante não se altere. Já em sistemas irreversíveis, o comportamento é oposto, conforme visualizado na figura acima. Tem-se um aumento da corrente de pico com o aumento do incremento de potencial, sendo o máximo de 10,0 mV o maior valor usual empregado. Esse comportamento está relacionado aos valores baixos de coeficientes de transferência eletrônica, α , que gera picos amplos espaçados, sem a necessidade de coleta de dados tão próximos para que se tenha um pico com resolução, uma vez que a contribuição do sentido reverso é menor [243].

7.3.4 Curva analítica e Análise da Amostra

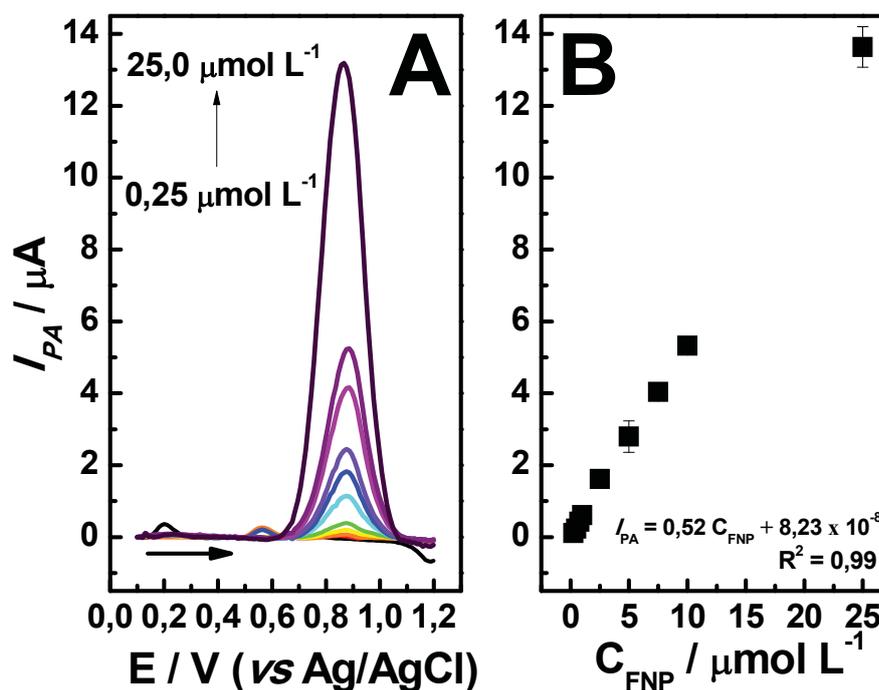
A construção da curva analítica para FNP empregando ERGO-SPE foi obtida posteriormente à otimização de vários parâmetros, os quais estão descritos na Tabela 18.

TABELA 18. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FNP.

pH do Eletrólito	Tampão BR pH = 6,0
N° de Ciclos de Eletrodeposição	50 ciclos
Técnica	SWV
Amplitude de Pulso	75 mV
Frequência	75 Hz
Incremento de Potencial	10 mV

Para a construção da curva analítica foi estudado o intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de FNP, e a partir dos resultados foi possível encontrar a região linear de trabalho, na faixa de $2,5 \times 10^{-7}$ a $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ representada na FIGURA 85.

FIGURA 85 – A) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA PARA FENAMIFÓS OBTIDOS PARA A REGIÃO LINEAR DE TRABALHO; B) CURVA ANALÍTICA. TAMPÃO BR pH=6,0. $f = 75$ HZ; $\Delta E_p = 50$ mV; $\Delta E_s = 10$ mV, N=3.



Em posse da curva analítica e da regressão linear, pode-se obter os demais parâmetros de mérito analítico, resumidos na Tabela 19. Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações (1) e (2) descritas nos capítulos passados [178].

TABELA 19. PARÂMETROS DE MÉRITO ANALÍTICO OBTIDOS EMPREGANDO O ERGO-SPE PARA A DETERMINAÇÃO DE FNP.

R^2	0,99
LDR / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,25 a 25,0
LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,067
LOQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,22
Sens. / A L mol^{-1}	0,52

Para fins comparativos, uma curva analítica empregando a LSV foi construída e os parâmetros de mérito analítico obtidos. Os resultados estão demonstrados na FIGURA 86 e na Tabela 20, com um comparativo entre LSV e SWV.

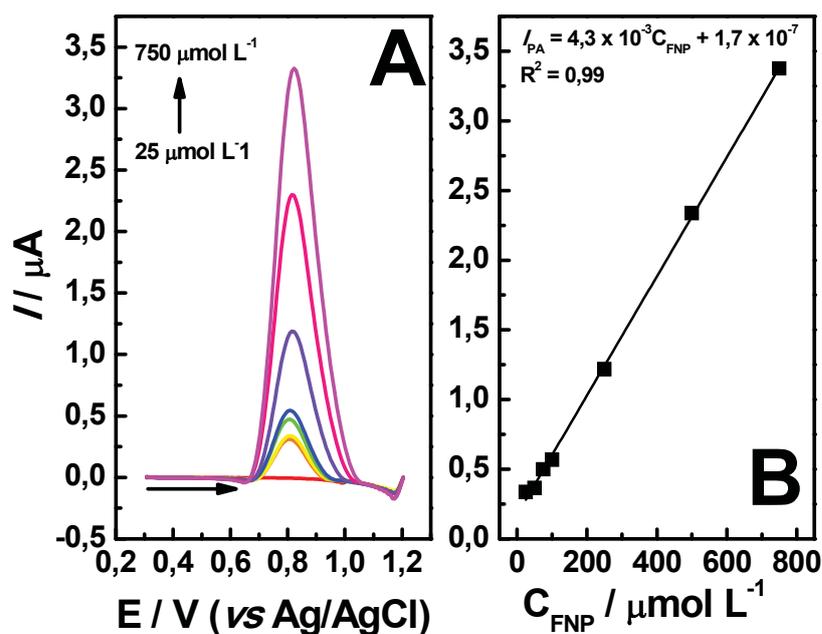
FIGURA 86 – A) VOLTAMOGRAMAS LINEARES PARA FENAMIFÓS OBTIDOS PARA A REGIÃO LINEAR DE TRABALHO; B) CURVA ANALÍTICA OBTIDA EMPREGANDO LSV. $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$.

TABELA 20. TABELA DE COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS DE MÉRITO ANALÍTICO OBTIDOS PARA ERGO-SPE PARA A DETERMINAÇÃO DE FNP EMPREGANDO LSV E SWV.

	LSV	SWV
R^2	0,99	0,99
LDR / $\mu\text{mol L}^{-1}$	25,0 a 750,0	0,25 a 25,0
LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	7,9	0,067
LOQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	26,3	0,22
Sens. / A L mol^{-1}	$4,3 \times 10^{-3}$	0,52

É possível observar que os valores obtidos empregando a LSV são bastante inferiores aqueles obtidos para SWV, comportamento já esperado, uma vez que as técnicas voltamétricas pulsadas tem sensibilidade superior por conta das características de perturbação, coleta de corrente e contribuição da corrente faradáica ser superior.

O método desenvolvido foi avaliado na determinação de fenamifós em amostras fortificadas tomate, com os resultados apresentados na Tabela 21.

TABELA 21. RESULTADOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE DA AMOSTRA FORTIFICADA DE TOMATE. N=3

	Add / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Rec / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Rec / %
Amostra	10,0	10,8	108
1:1	5,0	5,2	102,4
1:10	1,0	0,97	97,6
LOQ	0,22	0,16	82,0

Em todos os casos, foram obtidas boas recuperações, com variação de 82 a 108%, valores bastante satisfatórios levando em consideração a concentração do analito na amostra, bem como o preparo simples da amostra que foi empregado.

Para o estudo de possíveis interferentes, mostrado na Tabela 22, foram testadas substâncias que podem ser encontradas na matriz da amostra analisada, como o conservante ácido ascórbico (AC), bem como outras substâncias que podem ser encontradas por serem empregadas no mesmo cultivo.

TABELA 22. RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE INTERFERENTES NA DETERMINAÇÃO DE FENAMIFÓS.

C_{FNP} / mol L⁻¹	INT	CBZ	PX	AC
	C_{INT} / mol L⁻¹	% de Variação da I em função da C_{INT}		
1,0 × 10⁻⁵	1,0 × 10 ⁻⁶	1,6	3,0	3,4
	1,0 × 10 ⁻⁵	11,0	3,0	2,8
	1,0 × 10 ⁻⁴	0,1	0,5	5,0

A partir das variações de resposta para o fenamifós pode-se observar que nenhuma das espécies testadas promove interferência significativa, mesmo em concentrações 10 vezes superiores à concentração de FNP, sugerindo a viabilidade de aplicação da metodologia desenvolvida.

7.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que o emprego do óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido como modificador de eletrodos impressos é uma ferramenta bastante interessante para a construção de dispositivos eletroquímicos, com elevada sensibilidade.

A obtenção do GO a partir da oxidação de grafite em uma rota bastante consolidada na literatura foi possível, obtendo-se um material com características bastante semelhantes com os descritos em literatura. Ainda, foi possível a caracterização deste material por diferentes técnicas.

A eletrodeposição do GO diretamente sobre a superfície do SPE se mostrou uma estratégia simples de formação do ERGO, dando origem a superfícies com elevada repetibilidade e reprodutibilidade. A partir disso, foi possível desenvolver uma metodologia para a determinação de FNP, além de obtenção dos parâmetros de mérito analítico, como região linear (0,25 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), LOD (0,067 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e LOQ (0,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Apesar de não existir muitos trabalhos na literatura, para a determinação de fenamifós, esses valores são bastante satisfatórios quando comparados com outros trabalhos, descritos na Tabela 23.

TABELA 23. COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO OBTIDO PARA ERGO-SPE COM OUTROS TRABALHOS DESCRITOS NA LITERATURA.

ELETRODO	TÉCNICA	SENS. / A L mol ⁻¹	LDR / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	REF
BDD	SWV	0,21	4,95 a 36,7	4,1	[244]
Au-Pt S-CF	CV	-	1,64 a 120,6	29,6	[245]
BDD	SWV	0,14	0,5 a 25,0	0,10	[246]
ERGO-SPE	SWV	0,52	0,25 a 25,0	0,067	**

BDD: Eletrodo de Diamante dopado com Boro; Au-Pt S-CF: Eletrodo de fibra de carbono modificado com Nanopartículas de Ouro e Platina; **Este trabalho

CAPÍTULO 8

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de nanomateriais de carbono como modificadores para a construção de dispositivos eletroanalíticos é muito dinâmica e apresenta muitas vantagens, que estão relacionadas às suas características, como área superficial, condutividade elétrica, efeitos eletrocatalíticos, etc., além da possibilidade de diferentes aplicações, explorando as potencialidades das características desses, o que permite alcançar baixos limites e elevada sensibilidade.

Esse conjunto se mostra bastante favorável como solução de novos ou antigos problemas em relação a diferentes espécies, com as premissas de baixo custo – principalmente em relação às técnicas mais usuais, facilidade de construção e obtenção dos dispositivos, portabilidade e miniaturização, permitindo baixo consumo de reagentes e análises em campo, microfluídica e análise em fluxo, dentre outras tantas.

O óxido de grafeno se mostrou bastante flexível, podendo ser utilizado em duas metodologias: em uma delas foi explorado a presença de grupos oxigenados empregados para a funcionalização do material com o grupo imidazol, um resíduo de aminoácido que pode mimetizar o centro ativo de enzimas. Esse material foi empregado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo e utilizado com sucesso na determinação de progesterona, devido ao forte sinergismo entre GO e IMZ, podendo-se propor um mecanismo pelo qual a reação procede. Foi possível, então, o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de progesterona em formulação farmacêutica, que apresentou resultados concordantes com a metodologia oficial.

Ainda, o óxido de grafeno foi empregado para dar origem ao derivado óxido de grafeno reduzido, obtido a partir da eletrodeposição do GO diretamente sobre um eletrodo impresso de carbono, apresentando desempenho superior quando comparado ao eletrodo não modificado para a determinação de fenamifós. A metodologia analítica foi desenvolvida empregando a técnica pulsada de onda quadrada, e foi possível comparar os méritos analíticos desta modalidade com a voltametria de varredura linear, para a qual obtiveram-se resultados satisfatórios, porém bastante inferiores que aqueles obtidos para a onda quadrada.

Nanotubos de carbono também foram utilizados para o desenvolvimento de uma metodologia, utilizando o paraoxon como analito. Nessa abordagem os

nanotubos de carbono passaram por uma etapa de oxidação química, sendo o método de Hummers modificado a que apresentou melhores resultados, e o produto desta oxidação foi então funcionalizado com imidazol. O CNT-H-IMZ-GCE teve seu desempenho eletroquímico comparado com outros eletrodos, apresentando-se superior, fato atribuído à forte interação entre o imidazol e o pesticida. A partir disso, os parâmetros foram otimizados e a metodologia foi aplicada na determinação de PX em amostras de suco de laranja fortificadas, em que não foram necessárias etapas de preparo de amostra ou pré concentração do analito, obtendo-se boas taxas de recuperação.

Outro nanomaterial estudado foi da classe emergente dos QD a base de carbono, o grafeno *quantum dot*. Esse nanomaterial também teve suas propriedades exploradas em duas diferentes metodologias desenvolvidas. A primeira delas foi a utilização direta do material, o qual foi obtido por uma rota simples de pirólise do ácido cítrico, para a modificação de um eletrodo impresso de carbono a partir da eletrodeposição do GQD, empregado na determinação do hormônio sintético dietilestilbestrol. Quando comparado com um eletrodo não modificado, o GQD-SPE apresentou desempenho bastante satisfatório que possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de DES em amostras de água e urina fortificadas. Os parâmetros de mérito obtidos para esse dispositivo são comparáveis com aqueles descritos em literatura, por vezes superiores, apresentando baixos limites e elevada sensibilidade.

Na outra metodologia, os GQD foram utilizados como plataforma para o ancoramento de nanopartículas de ouro, formados por uma térmica simples, dando origem ao compósito AuGQD após 80 minutos de reação. Esse compósito foi empregado para a modificação de um eletrodo impresso de carbono, por *drop casting*, e utilizado para a determinação de Aflatoxina B1 em amostras de malte de três tipos diferentes. O dispositivo também apresentou desempenho bastante superior aos demais testados, obtendo parâmetros de mérito bastante competitivos com aqueles descritos na literatura. Foi possível, então, a determinação da micotoxina em amostras fortificadas de malte, empregando o valor estabelecido pela legislação brasileira, com bons limites de recuperação.

REFERÊNCIAS

- [1] RICHARDSON, S.D.; KIMURA, S.Y. Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. **Environmental Technology and Innovation**, v. 8, p. 40–56, 2017.
- [2] AGÜERA, A.; MARTÍNEZ BUENO, M.J.; ET AL. New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. **Environmental science and pollution research international**, v. 20, n. 6, p. 3496–515, 2013.
- [3] ALEIXO, L. Voltametria: conceitos e técnicas. **Universidade Estadual de Campinas, São Paulo**, 2003.
- [4] WANG, J. **ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY**. 2000.
- [5] COMPTON, R.G.; WILDGOOSE, G.G.; ET AL. Design, fabrication, characterisation and application of nanoelectrode arrays. **Chemical Physics Letters**, v. 459, n. 1–6, p. 1–17, 2008.
- [6] WALCARIUS, ALAIN ROZANSKA, SANDRA WANG, J. Screen-printed zeolite-modified carbon electrodes. **The Analyst**, v. 124, p. 1185–1190, 1999.
- [7] TAN, F.; METTERS, J.P.; ET AL. Electroanalytical properties of screen printed graphite microband electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 454–462, 2013.
- [8] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L.T. Tendências em Modificação de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012–1021, 2002.
- [9] ALKIRE, K.; LIPKOWSKI, R. **Chemically Modified Electrodes**. 2009.
- [10] PILLAI, P., SOUZA, M.M. DE Carbon-based nanomaterials (Chapter 8). In: **Modeling, Characterization and Production of Nanomaterials**. Elsevier Ltd., 2015, p. 203–231.
- [11] RAY, S.C., JANA, N.R. Application of Carbon-Based Nanomaterials as Biosensor (Chapter 3). In: **Carbon Nanomaterials for Biological and Medical Applications**. 2017, p. 87–127.
- [12] SCIDA, K.; STEGE, P.W.; ET AL. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 691, n. 1–2, p. 6–17, 2011.
- [13] ZARBIN, A.J.G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.
- [14] MADURAVEERAN, G.; JIN, W. Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 13, p. 10–23, 2017.

- [15] YADAV, S.K.; CHANDRA, P.; ET AL. A review on determination of steroids in biological samples exploiting nanobio-electroanalytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 762, p. 14–24, 2013.
- [16] RAMNANI, P.; SAUCEDO, N.M.; ET AL. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 143, p. 85–98, 2016.
- [17] XU, L.; QI, X.; ET AL. Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. **Talanta**, v. 146, p. 1–13, 2015.
- [18] POPOV, V. Carbon nanotubes: properties and application. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 43, n. 3, p. 61–102, 2004.
- [19] REILLY, R.M. Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 48, n. 7, p. 1039–1042, 2007.
- [20] MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; ET AL. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 826–838, 2005.
- [21] IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991.
- [22] GONG, K.; CHAKRABARTI, S.; ET AL. Electrochemistry at carbon nanotube electrodes: Is the nanotube tip more active than the sidewall? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 29, p. 5446–5450, 2008.
- [23] GAO, C.; GUO, Z.; ET AL. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1948–1963, 2012.
- [24] WANG, Z.; YU, J.; ET AL. Carbon nanomaterials-based electrochemical aptasensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 136–149, 2016.
- [25] WALLACE, G.G.; CHEN, J.; ET AL. Nanostructured carbon electrodes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 18, p. 3553–3562, 2010.
- [26] SALEH AHAMMAD, A J.; LEE, J.-J.; ET AL. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 4, p. 2289–319, 2009.
- [27] JIANG, X.; GU, J.; ET AL. The influence of acid treatment on multi-walled carbon nanotubes. **Pigment and Resin Technology**, v. 38, n. 3, p. 165–173, 2009.
- [28] WEPASNICK, K.A.; SMITH, B.A.; ET AL. Surface and structural characterization of multi-walled carbon nanotubes following different oxidative treatments. **Carbon**, v. 49, n. 1, p. 24–36, 2011.
- [29] MORAES, F.C.; CABRAL, M.F.; ET AL. The electrochemical effect of acid functionalisation of carbon nanotubes to be used in sensors development. **Surface Science**, v. 605, n. 3–4, p. 435–440, 2011.

- [30] BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M.; ET AL. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. **Small**, v. 1, n. 2, p. 180–192, 2005.
- [31] HU, C.; HU, S. Surface design of carbon nanotubes for optimizing the adsorption and electrochemical response of analytes. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 24, n. 16, p. 8890–7, 2008.
- [32] WANG, J.; LIN, Y. Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 619–626, 2008.
- [33] SOUZA FILHO, A.G. DE; FAGAN, S.B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695–1703, 2007.
- [34] ZHENG, D.; HU, H.; ET AL. Application of graphene in electrochemical sensing. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 20, n. 5–6, p. 383–405, 2015.
- [35] GEIM, A.K.; NOVOSELOV, K.S. The Rise of Graphene. **Nature Materials**, v. 6, p. 183–191, 2007.
- [36] PUMERA, M. Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: Review. **Electrochemistry Communications**, v. 36, p. 14–18, 2013.
- [37] COMPTON, O.C.; NGUYEN, S.T. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: Versatile building blocks for carbon-based materials. **Small**, v. 6, n. 6, p. 711–723, 2010.
- [38] PEI, S.; CHENG, H.M. The reduction of graphene oxide. **Carbon**, v. 50, n. 9, p. 3210–3228, 2012.
- [39] ROCHA, D.P.; DORNELLAS, R.M.; ET AL. Chemically versus electrochemically reduced graphene oxide: Improved amperometric and voltammetric sensors of phenolic compounds on higher roughness surfaces. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 254, p. 701–708, 2018.
- [40] SUVARNAPHAET, P.; PECHPRASARN, S. Graphene-based materials for biosensors: A review. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1–24, 2017.
- [41] SALEEM, H.; HANEEF, M.; ET AL. Synthesis route of reduced graphene oxide via thermal reduction of chemically exfoliated graphene oxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 204, n. October, p. 1–7, 2018.
- [42] AMBROSI, A.; PUMERA, M. Precise tuning of surface composition and electron-transfer properties of graphene oxide films through electroreduction. **Chemistry - A European Journal**, v. 19, n. 15, p. 4748–4753, 2013.
- [43] CAMARGO, M.N.L. DE; SANTHIAGO, M.; ET AL. Tuning the electrochemical reduction of graphene oxide: Structural correlations towards the electrooxidation of nicotinamide adenine dinucleotide hydride. **Electrochimica Acta**, v. 197, p. 194–199, 2016.
- [44] TOH, S.Y.; LOH, K.S.; ET AL. Graphene production via electrochemical reduction

of graphene oxide: Synthesis and characterisation. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 422–434, 2014.

[45] ZHANG, Z.; YAN, J.; ET AL. Tuning the reduction extent of electrochemically reduced graphene oxide electrode film to enhance its detection limit for voltammetric analysis. **Electrochimica Acta**, v. 139, p. 232–237, 2014.

[46] X. XU, R. RAY, Y. GU, H.J. PLOEHN, L. GEARHEART, K. RAKER, W. A. SCRIVENS Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

[47] BACON, M.; BRADLEY, S.J.; ET AL. Graphene quantum dots. **Particle and Particle Systems Characterization**, v. 31, n. 4, p. 415–428, 2014.

[48] SHEN, J.; ZHU, Y.; ET AL. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. **Chemical Communications**, v. 48, n. 31, p. 3686, 2012.

[49] SUN, H.; WU, L.; ET AL. Recent advances in graphene quantum dots for sensing. **Materials Today**, v. 16, n. 11, p. 433–442, 2013.

[50] CHOI, S.-H. Unique properties of graphene quantum dots and their applications in photonic/electronic devices. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 10, p. 103002, 2017.

[51] LI, L.; WU, G.; ET AL. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. **Nanoscale**, v. 5, n. 10, p. 4015–39, 2013.

[52] SHEHAB, M.; EBRAHIM, S.; ET AL. Graphene quantum dots prepared from glucose as optical sensor for glucose. **Journal of Luminescence**, v. 184, p. 110–116, 2017.

[53] NAMDARI, P.; NEGAHDARI, B.; ET AL. Synthesis , properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, n. 88, p. 209–222, 2017.

[54] SONG, Y.; ZHU, S.; ET AL. Bioimaging based on fluorescent carbon dots. **RSC Advances**, v. 4, n. 52, p. 27184–27200, 2014.

[55] LEE, H.U.; PARK, S.Y.; ET AL. Photoluminescent carbon nanotags from harmful cyanobacteria for drug delivery and imaging in cancer cells. **Scientific reports**, v. 4, p. 4665, 2014.

[56] HASHEMZADEH, N.; HASANZADEH, M.; ET AL. Graphene quantum dot modified glassy carbon electrode for the determination of doxorubicin hydrochloride in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 235–241, 2016.

[57] ZHAO, X.; HE, D.; ET AL. Au nanoparticles and graphene quantum dots co-modified glassy carbon electrode for catechol sensing. **Chemical Physics Letters**, v. 647, p. 165–169, 2016.

- [58] JIAN, X.; LIU, X.; ET AL. Graphene quantum dots modified glassy carbon electrode via electrostatic self-assembly strategy and its application. **Electrochimica Acta**, v. 190, p. 455–462, 2016.
- [59] JIAN, X.; LIU, X.; ET AL. Graphene quantum dots modified glassy carbon electrode via electrostatic self-assembly strategy and its application. **Electrochimica Acta**, v. 190, p. 455–462, 2016.
- [60] ORTH, E.S.; FONSACA, E.S.; ET AL. Functionalized graphene oxide as a nanocatalyst in dephosphorylation reactions : pursuing artificial enzymes †. **Chemical communications**, p. 9891–9894, 2014.
- [61] KUILA, T.; BOSE, S.; ET AL. Chemical functionalization of graphene and its applications. **Progress in Materials Science**, v. 57, n. 7, p. 1061–1105, 2012.
- [62] DREYER, D.R.; PARK, S.; ET AL. The chemistry of graphene oxide. **Chem Soc Rev**, v. 39, p. 228–240, 2010.
- [63] CHEN, D.; FENG, H.; ET AL. Graphene oxide: Preparation, functionalization, and electrochemical applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 6027–6053, 2012.
- [64] ZHOU, L.; MAO, H.; ET AL. Label-free graphene biosensor targeting cancer molecules based on non-covalent modification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 701–707, 2017.
- [65] FENG, L.; ZHANG, Z.; ET AL. Functionalized graphene as sensitive electrochemical label in target-dependent linkage of split aptasensor for dual detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 52–58, 2014.
- [66] FENG, L.; CHEN, Y.; ET AL. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2930–2937, 2011.
- [67] WANG, X.; ZHANG, F.; ET AL. Modification of electrode surface with covalently functionalized graphene oxide by l-tyrosine for determination of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 738, p. 203–208, 2015.
- [68] HOFMANN, K. **Imidazole and Its Derivatives**. 2009.
- [69] MANOCHA, P.; WAKODE, S.; ET AL. Imidazole and its biological activities : A review. **Der Pharmacia Sinica**, v. 1, n. 3, p. 36–47, 2010.
- [70] KUMAR, M.; KUMAR, D.; ET AL. Studies on Imidazole and Its Derivatives with Particular Emphasis on Their Chemical/biological Applications as Bioactive Molecules/Intermediated to Bioactive Molecule. **Current Synthetic and Systems Biology**, v. 05, n. 01, p. 1–10, 2017.
- [71] GRIMMETT, M.R. Imidazoles and their Benzo Derivatives: (ii) Reactivity. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**, v. 5, n. ii, p. 345, 1984.
- [72] JIN, W.; MADURAVEERAN, G. Electrochemical detection of chemical pollutants based on gold nanomaterials. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 14,

n. May, p. 28–36, 2017.

[73] YEH, Y.C.; CRERAN, B.; ET AL. Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1871–1880, 2012.

[74] LAKBUB, J.; POULIWE, A.; ET AL. Electrochemical Behaviors of Single Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, v. 23, n. 10, p. 2270–2274, 2011.

[75] ZANCHET, D.; HALL, B.D.; ET AL. Structure Population in Thiol-Passivated Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 47, p. 11013–11018, 2000.

[76] ZANCHET, D.; TOLENTINO, H.; ET AL. Inter-atomic distance contraction in thiol-passivated gold nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 323, n. 1–2, p. 167–172, 2000.

[77] BARON, R.; CAMPBELL, F.W.; ET AL. Facile method for the construction of random nanoparticle arrays on a carbon support for the development of welldefined catalytic surfaces. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 3, n. 5, p. 556–565, 2008.

[78] ASTRUC, D.; DANIEL, M.-C. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

[79] LECTURE, T.B.; RELATIONS, E.; ET AL. The Bakerian Lecture : Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light Author (s): Michael Faraday Source : Philosophical Transactions of the Royal Society of London , Vol . 147 (1857), pp . 145-181 Published by : Royal Society Stable URL. v. 147, n. 1857, p. 145–181, 2016.

[80] ZHOU, Y.-G.; REES, N. V; ET AL. Gold nanoparticles show electroactivity: counting and sorting nanoparticles upon impact with electrodes. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 48, n. 2, p. 224–6, 2012.

[81] GUCZI, L.; BECK, A.; ET AL. Gold catalysis: Effect of particle size on reactivity towards various substrates. **Catalysis Today**, v. 181, n. 1, p. 26–32, 2012.

[82] KRISHNENDU, S.; SARIT S., A.; ET AL. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739–2779, 2014.

[83] HERIZCHI, R.; ABBASI, E.; ET AL. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016.

[84] DOROTA WOSTEK-WOJCIECHOWSKA, JEREMIASZ K. JESZKA, P.U.; CATHERINE AMIENS, BRUNO CHAUDRET, P.L. Synthesis of gold nanoparticles in solid state by thermal decomposition of an organometallic precursor. **Materials Science-Poland**, v. 22, n. 4, p. 408–413, 2004.

[85] NGO, V.K.T.; NGUYEN, D.G.; ET AL. A low cost technique for synthesis of gold nanoparticles using microwave heating and its application in signal amplification for detecting Escherichia coli O157:H7 bacteria. **Advances in Natural Sciences:**

Nanoscience and Nanotechnology, v. 7, n. 3, 2016.

[86] TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; ET AL. A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES IN THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD. **Discussions on the Faraday Society**, v. 55, p. 55–75, 1951.

[87] BRUST, M.; WALKER, M.; ET AL. Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid System. **J Chem Soc , Chem Commun**, p. 801–802, 1994.

[88] FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20–22, 1973.

[89] GEVAERD, A.; CAETANO, F.R.; ET AL. Thiol-capped gold nanoparticles: Influence of capping amount on electrochemical behavior and potential application as voltammetric sensor for diltiazem. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 673–678, 2015.

[90] GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica chimica acta**, v. 598, n. 2, p. 181–92, 2007.

[91] CAETANO, F.R.; FELIPPE, L.B.; ET AL. Gold nanoparticles supported on multi-walled carbon nanotubes produced by biphasic modified method and dopamine sensing application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 43–50, 2017.

[92] PIOVESAN, J. V; SANTANA, E.R.; ET AL. Reduced graphene oxide / gold nanoparticles nanocomposite-modified glassy carbon electrode for determination of endocrine disruptor methylparaben. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 813, n. February, p. 163–170, 2018.

[93] LUO, P.; LI, C.; ET AL. Synthesis of gold@carbon dots composite nanoparticles for surface enhanced Raman scattering. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 20, p. 7360, 2012.

[94] NASCIMENTO, V.B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen.” **Quimica Nova**, v. 21, n. 5, p. 614–629, 1998.

[95] METTERS, J.P.; KADARA, R.O.; ET AL. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. **The Analyst**, v. 136, n. 6, p. 1067–1076, 2011.

[96] LI, M.; LI, Y.; ET AL. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays — A review. **Analytica chimica acta**, v. 734, p. 31–44, 2012.

[97] LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; ET AL. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

[98] CASTRO, C.M.B. Pertubadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 4–5, 2002.

- [99] MEYER, A.; SARCINELLI, P.N.; ET AL. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 4, p. 845–850, 1999.
- [100] LIU, Z. HUA; OGEJO, J.A.; ET AL. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 24, p. 5149–5161, 2011.
- [101] REIS FILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C. De; et al. Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817–822, 2006.
- [102] FANG, T.Y.; PRAVEENA, S.M.; ET AL. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. **Chemosphere**, v. 165, p. 358–368, 2016.
- [103] MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 9–10, p. 403–405, 2017.
- [104] HENLEY, D. V.; KORACH, K.S. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 25–32, 2006.
- [105] POSTHUMA-TRUMPIE, G.A.; Amerongen, A. van; et al. Perspectives for on-site monitoring of progesterone. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 652–660, 2009.
- [106] RUNNALS, T.J.; MARGIOTTA-CASALUCI, L.; ET AL. Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 16, n. 6, p. 1318–1338, 2010.
- [107] (2010). Farmacopeia Brasileira. *Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, 2, 899.
- [108] DODDS EC GL, LAWSAON W, R.R. Estrogenic activity of certain synthetic compounds. **Nature**, v. 141, p. 247–248, 1938.
- [109] WATKINS, O. Diethylstilbestrol in the prevention and treatment of complications of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 5, p. 821–834, 1948.
- [110] HERBST, A.L.; ULFELDER, H.; ET AL. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **N. Engl. J. Med.**, v. 181, n. 6, p. 1574–1575, 1971.
- [111] ROCHEFORT, H. Endocrine disruptors (EDs) and hormone-dependent cancers: Correlation or causal relationship? **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 9–10, p. 439–445, 2017.
- [112] BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- [113] CHEN, X.; SHI, Z.; ET AL. A novel electrochemical sensor based on Fe₃O₄-

doped nanoporous carbon for simultaneous determination of diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in toner. **Talanta**, v. 188, p. 81–90, 2018.

[114] SALES, R.; ROCHA, J.; et al. Utilização de hormônios e antibióticos em produtos alimentícios de origem animal: aspectos gerais e toxicológicos. Artigo de revisão. **Nutrire.**, v. 40, n. 3, p. 409–420, 2015.

[115] SPISSO, B.F.; NÓBREGA, A.W. DE; ET AL. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2091–2106, 2009.

[116] GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

[117] **The United States Pharmacopeia – The National Formulary – USP 30; NF-25**. 2004.

[118] **European Pharmacopeia**. 2007.1417p.

[119] ORTH, E.S.; ALMEIDA, T.G.; ET AL. Mechanistic insight on the catalytic detoxification of Paraoxon mediated by imidazole: Furnishing optimum scaffolds for scavenging organophosphorus agents. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 403, p. 93–98, 2015.

[120] AMOLI-DIVA, M.; POURGHAZI, K. Gold nanoparticles grafted modified silica gel as a new stationary phase for separation and determination of steroid hormones by thin layer chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 2, p. 279–286, 2015.

[121] HANSEN, M.; JACOBSEN, N.W.; ET AL. Determination of steroid hormones in blood by GC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 10, p. 3409–17, 2011.

[122] LIU, H.; LIN, T.; ET AL. Simultaneous determination of anabolic steroids and β -agonists in milk by QuEChERS and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 176–186, 2017.

[123] HAN, H.; KIM, B.; ET AL. An optimised method for the accurate determination of zeranol and diethylstilbestrol in animal tissues using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 44–51, 2013.

[124] WANG, J.; YE, H.; ET AL. Determination of diethylstilbestrol by enhancement of luminol-hydrogen peroxide-tetrasulfonated cobalt phthalocyanine chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, n. 2, p. 171–176, 2004.

[125] ZHANG, Q.L.; LI, J.; ET AL. Chemiluminescence screening assay for diethylstilbestrol in meat. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 498–502, 2008.

[126] WANG, L.; ZHANG, Y.; ET AL. A time-resolved fluorescence immunoassay for the ultrasensitive determination of diethylstilbestrol based on the double-codified gold

nanoparticles. **Steroids**, v. 89, p. 41–46, 2014.

[127] LIU, X.; HU, Y.; ET AL. Rapid high-throughput detection of diethylstilbestrol by using the arrayed langasite crystal microbalance combined with gold nanoparticles through competitive immunoassay. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 247, p. 245–253, 2017.

[128] XU, Y.F.; VELASCO-GARCIA, M.; ET AL. Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk. **Biosensors & bioelectronics**, v. 20, n. 10, p. 2061–70, 2005.

[129] HART, J.P.; PEMBERTON, R.M.; ET AL. Studies towards a disposable screen-printed amperometric biosensor for progesterone. **Biosensors & bioelectronics**, v. 12, n. 11, p. 1113–21, 1997.

[130] PEMBERTON, R.; HART, J.; ET AL. An electrochemical immunosensor for milk progesterone using a continuous flow system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 9–12, p. 715–723, 2001.

[131] YAN, Z.; XIONG, P.; ET AL. A novel sandwich-type noncompetitive immunoassay of diethylstilbestrol using β -cyclodextrin modified electrode and polymer-enzyme labels. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 736, p. 30–37, 2015.

[132] WOREK, F.; THIERMANN, H.; ET AL. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 11, p. 2237–2248, 2004.

[133] BIRD, S. Organophosphate and carbamate poisoning. **UpToDate Marketing Professional**, v. 91, n. figure 1, 2017.

[134] THOTA, R.; GANESH, V. Selective and sensitive electrochemical detection of methyl parathion using chemically modified overhead projector sheets as flexible electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 227, p. 169–177, 2016.

[135] ZHU, J.; WANG, J.; ET AL. A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. October 2017, p. 26–35, 2018.

[136] Agência Nacional de Vigilância Sanitária Relatório das Análises de Amostras de Monitoradas no período de 2013 a 2015. p. 246, 2016.

[137] POHANISH, R.P. P. In: **Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens**. 2012, p. 2044–2297.

[138] Índice Monográfico. In: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2011, p. 1–2.

[139] CÁCERES, T.; MEGHARAJ, M.; ET AL. Degradation of fenamiphos in soils collected from different geographical regions: The influence of soil properties and climatic conditions. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 43, n. 4, p. 314–322, 2008.

- [140] CÁCERES, T.P.; MEGHARAJ, M.; ET AL. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure culture and groundwater. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 10, p. 2732–2736, 2009.
- [141] World Health Organization **State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals: An Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors Prepared by a Group of Experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO**. 2013.
- [142] YAN, X.; LI, H.; ET AL. Review of optical sensors for pesticides. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, p. 1–20, 2018.
- [143] KAUR, N.; PRABHAKAR, N. Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 92, p. 62–85, 2017.
- [144] GARRIDO, E.M.; DELERUE-MATOS, C.; ET AL. Electrochemical Methods in Pesticides Control. **Analytical Letters**, v. 37, n. December, p. 1755–1791, 2004.
- [145] LIANG, B.; WANG, G.; ET AL. Functional cell surface displaying of acetylcholinesterase for spectrophotometric sensing organophosphate pesticide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 279, n. July 2018, p. 483–489, 2019.
- [146] KALISIAK, J.; RALPH, E.C.; ET AL. Nonquaternary reactivators for organophosphate-inhibited cholinesterases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 465–474, 2012.
- [147] CUNHA XAVIER SOARES, S.F. DA; VIEIRA, A.A.; ET AL. NMR determination of *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase inhibition and reactivation by neutral oximes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 18, p. 5923–5930, 2013.
- [148] JIN, S.; WU, C.; ET AL. Designed inorganic nanomaterials for intrinsic peroxidase mimics: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 283, n. April 2018, p. 18–34, 2019.
- [149] MARIN, S.; RAMOS, A.J.; ET AL. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.
- [150] FLORES-FLORES, M.E.; LIZARRAGA, E.; ET AL. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**, v. 53, p. 163–176, 2015.
- [151] LOI, M.; FANELLI, F.; ET AL. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. **Toxins**, v. 9, n. 4, 2017.
- [152] ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; ET AL. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159–165, 2014.
- [153] MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.D.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 89–99, 2010.
- [154] RICHARD, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 3–10, 2007.

- [155] POHANISH, R.P. A. In: **Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens**. 2012, p. 1–304.
- [156] MALHOTRA, B.D.; SRIVASTAVA, S. Nanomaterial-Based Biosensors for Food Toxin Detection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 880–896, 2014.
- [157] LAITILA, A. **Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain**. Elsevier Ltd, 2015.
- [158] HOSTERT, L.; BLASKIEVICZ, S.F.; ET AL. Imidazole-derived graphene nanocatalysts for organophosphate destruction: Powder and thin film heterogeneous reactions. **Journal of Catalysis**, v. 356, p. 75–84, 2017.
- [159] ORTH, E.S.; FERREIRA, J.G.L.; ET AL. pKa determination of graphene-like materials: Validating chemical functionalization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 467, p. 239–244, 2016.
- [160] PARK, M.J.; LEE, J.K.; ET AL. Covalent modification of multiwalled carbon nanotubes with imidazolium-based ionic liquids: Effect of anions on solubility. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 6, p. 1546–1551, 2006.
- [161] TAN, P.; HU, C.; ET AL. Polarization properties, high-order Raman spectra, and frequency asymmetry between Stokes and anti-Stokes scattering of Raman modes in a graphite whisker. **Physical Review B**, v. 64, n. 21, p. 214301, 2001.
- [162] ORTH, E.S.; FONSACA, J.E.S.; ET AL. Targeted thiolation of graphene oxide and its utilization as precursor for graphene/silver nanoparticles composites. **Carbon**, v. 61, p. 543–550, 2013.
- [163] YANG, H.; ZHOU, W.; ET AL. Uniform decoration of reduced graphene oxide sheets with gold nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, v. 2012, 2012.
- [164] WAN, L.; WANG, X.; ET AL. Synthesis, characterization, and electrochemical properties of imidazole derivatives functionalized single-walled carbon nanotubes. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 331–336, 2009.
- [165] MAO, A.; ZHANG, D.; ET AL. Synthesis of graphene oxide sheets decorated by silver nanoparticles in organic phase and their catalytic activity. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 73, n. 8, p. 982–986, 2012.
- [166] ARÉVALO, F.J.; MOLINA, P.G.; ET AL. Novel studies about the electrochemical reduction of progesterone (P4) in acetonitrile at glassy carbon electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 619–620, n. 1–2, p. 46–52, 2008.
- [167] BOER, H.S.; HARTIGH, J. DEN; et al. Polarographic Analysis for corticosteroids: Part 1. The Electroanalytical Properties of Corticosteroids. **Analytica Chimica Acta**, v. 102, p. 141–155, 1978.
- [168] WANG, J.; FARIAS, P.A.M.; ET AL. Adsorptive stripping voltammetry of sex hormones at the static mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 171, p. 195–204, 1985.

- [169] ARÉVALO, F.J.; MOLINA, P.G.; ET AL. Studies about the adsorption of progesterone (P4) at glassy carbon electrodes in aqueous buffer solution by square wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 629, n. 1–2, p. 133–137, 2009.
- [170] KRISHNAN, R.; VANCHEESAN, S. Catalase and epoxidation activity of polynuclear manganese π III / – Schiff base complexes. **Journal of Molecular Catalysis**, p. 377–382, 1999.
- [171] BERKESSEL, A.; FRAUENKRON, M.; ET AL. Pentacoordinated manganese complexes as biomimetic catalysts for asymmetric epoxidations with hydrogen peroxide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 117, n. 1–3, p. 339–346, 1997.
- [172] LIMA, C.A. DE; SPINELLI, A. Electrochemical behavior of progesterone at an ex situ bismuth film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 542–548, 2013.
- [173] BARTON, S.S.; EVANS, M.J.B.; ET AL. Acidic and basic sites on the surface of porous carbon. **Carbon**, v. 35, n. 9, p. 1361–1366, 1997.
- [174] GRIMSHAW, J. Radical-Ion Hydrodimerization and Dehydrodimerization Reactions – Rationalization of Mechanisms. n. 1, p. 2942, 1976.
- [175] HUND, L.; HAMMERICH, O. **Organic Electrochemistry**. New York: 2001.
- [176] HAMMERICH, OLE; SPEISER, B. **ORGANIC ELECTROCHEMISTRY**. Taylor & Francis Group, 2016.
- [177] SOUZA, D. DE; MACHADO, S.A.S.; ET AL. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA. PRIMEIRA PARTE: ASPECTOS TEÓRICOS. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.
- [178] MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 2000.
- [179] ARVAND, M.; HEMMATI, S. Magnetic nanoparticles embedded with graphene quantum dots and multiwalled carbon nanotubes as a sensing platform for electrochemical detection of progesterone. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 346–356, 2017.
- [180] ARVAND, M.; HEMMATI, S. Analytical methodology for the electro-catalytic determination of estradiol and progesterone based on graphene quantum dots and poly(sulfosalicylic acid) co-modified electrode. **Talanta**, v. 174, n. May, p. 243–255, 2017.
- [181] MORAES, R.A.; MATOS, C.F.; ET AL. The Effect of Different Chemical Treatments on the Structure and Stability of Aqueous Dispersion of Iron- and Iron Oxide-Filled Multi-Walled Carbon Nanotubes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2191–2201, 2011.
- [182] CHEN, J.; CHEN, Q.; ET AL. Influence of surface functionalization via chemical oxidation on the properties of carbon nanotubes. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 370, n. 1, p. 32–38, 2012.

- [183] TENG, L.; TANG, T. IR study on surface chemical properties of catalytic grown carbon nanotubes and nanofibers. **J Zhejiang Univ Sci A**, v. 9, n. 5, p. 720–726, 2008.
- [184] BELLATO, C.R.; SOUZA, C.H.F. DE; ET AL. Synthesis, Characterization and Enhanced Photocatalytic Activity of Iron Oxide/Carbon Nanotube/Ag-doped TiO₂ Nanocomposites. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 12, p. 2301–2312, 2017.
- [185] NOSSOL, E.; ZARBIN, A.J.G. A simple and innovative route to prepare a novel carbon nanotube/prussian blue electrode and its utilization as a highly sensitive H₂O₂ amperometric sensor. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 24, p. 3980–3986, 2009.
- [186] HUSMANN, S.; NOSSOL, E.; ET AL. Carbon nanotube / Prussian blue paste electrodes : Characterization and study of key parameters for application as sensors for determination of low concentration of hydrogen peroxide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, p. 782–790, 2014.
- [187] KHAIRY, M.; AYOUB, H.A.; ET AL. Non-enzymatic electrochemical platform for parathion pesticide sensing based on nanometer-sized nickel oxide modified screen-printed electrodes. **Food Chemistry**, v. 255, n. October 2017, p. 104–111, 2018.
- [188] OLIVEIRA, P.R. DE; KALINKE, C.; ET AL. The use of activated biochar for development of a sensitive electrochemical sensor for determination of methyl parathion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, n. May, p. 602–608, 2017.
- [189] AGÜÍ, L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; ET AL. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: a review. **Analytica chimica acta**, v. 622, n. 1–2, p. 11–47, 2008.
- [190] LUIS, E.; THOBIE-GAUTIER, C.; ET AL. Preparation and modification of carbon nanotubes electrodes by cold plasmas processes toward the preparation of amperometric biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 27, p. 7916–7922, 2010.
- [191] KIM, J. IL; PARK, S.J. Effect of nitrogen-containing groups on enhanced capacitive behaviors of multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 184, n. 8, p. 2184–2189, 2011.
- [192] GEVAERD, A.; BLASKIEVICZ, S.F.; ET AL. Nonenzymatic electrochemical sensor based on imidazole-functionalized graphene oxide for progesterone detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 112, n. March, p. 108–113, 2018.
- [193] COMPTON, R.G.; BANKS, C.E. **Understanding Voltammetry**. London: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 2007.
- [194] RAJAJI, U.; MURUGAN, K.; ET AL. Graphene oxide encapsulated 3D porous chalcopyrite (CuFeS₂) nanocomposite as an emerging electrocatalyst for agro-hazardous (methyl paraoxon) detection in vegetables. **Composites Part B: Engineering**, v. 160, n. August 2018, p. 268–276, 2019.
- [195] BOEHM, H.P. Chemical Identification of Surface Groups. **Advances in Catalysis**, v. 16, n. C, p. 179–274, 1966.

- [196] ZHANG, Y.; ARUGULA, M.A.; ET AL. A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 287–295, 2015.
- [197] LI, Y.P.; ZHAO, R.X.; ET AL. Novel Acetylcholinesterase Biosensor for Detection of Paraoxon Based on Holey Graphene Oxide Modified Glass Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 30, n. 10, p. 2258–2264, 2018.
- [198] TANG, X.; ZHANG, T.; ET AL. Sensitive electrochemical microbial biosensor for p-nitrophenylorganophosphates based on electrode modified with cell surface-displayed organophosphorus hydrolase and ordered mesopore carbons. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 60, p. 137–142, 2014.
- [199] STOYTICHEVA, M.; ZLATEV, R.; ET AL. Nanostructured platform for the sensitive determination of paraoxon by using an electrode modified with a film of graphite-immobilized bismuth. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 8, p. 2707–2714, 2017.
- [200] DONG, Y.; SHAO, J.; ET AL. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. **Carbon**, v. 50, n. 12, p. 4738–4743, 2012.
- [201] RANA, S.; MITTAL, S.K.; ET AL. Schiff base modified screen printed electrode for selective determination of aluminium(III) at trace level. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 17–27, 2017.
- [202] KELARAKIS, A. Graphene quantum dots: In the crossroad of graphene, quantum dots and carbogenic nanoparticles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 20, n. 5–6, p. 354–361, 2015.
- [203] CINTI, S.; ARDUINI, F. Graphene-based screen-printed electrochemical (bio)sensors and their applications: Efforts and criticisms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 107–122, 2017.
- [204] YU, Y.; LIU, W.; ET AL. An efficient chiral sensing platform based on graphene quantum dot–tartaric acid hybrids. **RSC Advances**, v. 6, n. 87, p. 84127–84132, 2016.
- [205] YANG, N.; SWAIN, G.M.; ET AL. Nanocarbon Electrochemistry and Electroanalysis: Current Status and Future Perspectives. **Electroanalysis**, v. 28, n. 1, p. 27–34, 2016.
- [206] CALEGARI, F.; SOUZA, L.P. DE; ET AL. Construction and evaluation of carbon black and poly (ethylene co-vinyl) acetate (EVA) composite electrodes for development of electrochemical (bio) sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 253, p. 10–18, 2017.
- [207] DAVIES, T.J.; MOORE, R.R.; ET AL. The cyclic voltammetric response of electrochemically heterogeneous surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 574, n. 1, p. 123–152, 2004.
- [208] MA, L.; WANG, Z.; ET AL. Study on electrochemical oxidation behaviors and the

diffusion mechanism of hydroquinone at pre-anodized carbon paste electrode by cyclic voltammetry. **The Analyst**, v. 137, n. 2, p. 432–436, 2012.

[209] LEE, J.H.Q.; KOH, Y.R.; ET AL. The electrochemical oxidation of diethylstilbestrol (DES) in acetonitrile. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, n. May, p. 92–101, 2017.

[210] SÉQUARIS, J.; FRITZ, J. Voltammetric Detection and Analysis of the Behavior of Diethylstilbestrol oxidation products. **Electroanalysis**, v. 4, p. 121–127, 1992.

[211] PENG, L.; DONG, S.; ET AL. Sensitive simultaneous determination of diethylstilbestrol and bisphenol A based on Bi₂WO₆ nanoplates modified carbon paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 726, p. 15–20, 2014.

[212] YU, C.; JI, W.; ET AL. Graphene oxide-modified electrodes for sensitive determination of diethylstilbestrol. **Nanotechnology**, v. 24, p. 1–9, 2013.

[213] NTSENDWANA, B.; MAMBA, B.B.; ET AL. Electrochemical Detection of Bisphenol A Using Graphene- Modified Glassy Carbon Electrode. **International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE**, v. 7, p. 3501–3512, 2012.

[214] NGUNDI, M.M.; SADIK, O.A.; ET AL. First comparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 1, p. 61–67, 2003.

[215] MA, X.; CHEN, M. Electrochemical sensor based on graphene doped gold nanoparticles modified electrode for detection of diethylstilboestrol. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 215, p. 445–450, 2015.

[216] BIN, Q.; WEI, W.; ET AL. Electrochemical behaviors of diethylstilbestrol and its application in pharmacokinetics. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 196–201, 2005.

[217] ZHU, X.; LU, L.; ET AL. Efficient synthesis of graphene-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite and its application in electrochemical sensing of diethylstilbestrol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 731, p. 84–92, 2014.

[218] HUANG, Q.; ZHANG, H.; ET AL. A sensitive and reliable dopamine biosensor was developed based on the Au@carbon dots-chitosan composite film. **Biosensors & bioelectronics**, v. 52, p. 277–280, 2014.

[219] GAVRILOVA, M. A.; SLEPCHENKO, G.B.; ET AL. Voltammetric Determination of Aflatoxin B1. **Procedia Chemistry**, v. 10, p. 114–119, 2014.

[220] HAJIAN, R.; ENSAFI, A. A. Determination of aflatoxins B1 and B2 by adsorptive cathodic stripping voltammetry in groundnut. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1034–1037, 2009.

[221] AMMIDA, N.H.S.; MICHELI, L.; ET AL. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, n. 1–2, p. 159–164, 2004.

- [222] ANVISA RDC N° 07/2011. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2011.
- [223] OLIVEIRA, M.M.; ZARBIN, A.J.G. Carbon Nanotubes Decorated with both Gold Nanoparticles and Polythiophene: Influence of the Synthetic Variables, Characterization and Electrochemical Properties. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 18783–18786, 2008.
- [224] BURKE, L.D.; NUGENT, P.F. The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 43–53, 1997.
- [225] HARLE, A.J.; LYONS, L.E. The Polarographic Reduction of Some Heterocyclic Molecules. Part 2. Coumarin and Certain Derivatives. p. 1575–1578, 1950.
- [226] KANG, F.; GE, Y.; ET AL. Understanding the sorption mechanisms of aflatoxin B1 to kaolinite, illite, and smectite clays via a comparative computational study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 80–87, 2016.
- [227] DENG, Y.; SZCZERBA, M. Computational evaluation of bonding between aflatoxin B1 and smectite. **Applied Clay Science**, v. 54, n. 1, p. 26–33, 2011.
- [228] RINALDI, A.L.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; ET AL. Application of a nickel hydroxide gold nanoparticles screen-printed electrode for impedimetric sensing of glucose in artificial saliva. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 832, n. September 2018, p. 209–216, 2019.
- [229] MARITAN, A.; TOIGO, F. On skewed arc plots of impedance of electrodes with an irreversible electrode process. **Electrochimica Acta**, v. 35, n. 1, p. 141–145, 1990.
- [230] FOROUZANDEH, F.; MAHJANI, M.G.; ET AL. Impedance spectroscopy analysis of glucose electro-oxidation on Ni-modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 22, p. 6602–6609, 2008.
- [231] RINALDI, A.L.; CARBALLO, R. Impedimetric non-enzymatic glucose sensor based on nickel hydroxide thin film onto gold electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 228, p. 43–52, 2016.
- [232] WANG, L.H.; LIU, H.H. Electrochemical reduction of coumarins at a film-modified electrode and determination of their levels in essential oils and traditional Chinese herbal medicines. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3538–3550, 2009.
- [233] SINGH, C.; SRIVASTAVA, S.; ET AL. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes based biosensor for aflatoxin detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 185, p. 258–264, 2013.
- [234] SHARMA, A.; KUMAR, A.; ET AL. A highly sensitive amperometric immunosensor probe based on gold nanoparticle functionalized poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) doped with graphene oxide for efficient detection of aflatoxin B1. **Synthetic Metals**, v. 235, n. October 2017, p. 136–144, 2018.
- [235] SHARMA, A.; KUMAR, A.; ET AL. Electrochemical immunosensor based on poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified with gold nanoparticle to detect aflatoxin B1. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 802–809, 2017.

- [236] MARCANO, D.C.; KOSYNKIN, D. V.; ET AL. Improved Synthesis of Graphene Oxide. **ACS Nano**, v. 12, n. 2, p. 2078–2078, 2010.
- [237] GOERTZEN, S.L.; THÉRIAULT, K.D.; ET AL. Standardization of the Boehm titration. Part I. CO₂ expulsion and endpoint determination. **Carbon**, v. 48, n. 4, p. 1252–1261, 2010.
- [238] CÁCERES, T., MEGHARAJ, M., ET AL. Fenamiphos and Related Organophosphorus Pesticides. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v.238.2016,
- [239] BRIAN R, C.; RICHARD S, G.; ET AL. Electrochemistry of Aliphatic Thioethers as Models for Biological Electron Transfer. **Electrochemical and Spectrochemical Studies of Biological Redox Components**, v. 201, p. 417–441, 2014.
- [240] BELAL, F.; EL-ENANY, N.; ET AL. Anodic polarographic determination of lansoprazole and omeprazole in pure form and in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, n. 2, p. 102–109, 2004.
- [241] SCHÄFER, H.J. Volume 8: Organic Electrochemistry. **Encyclopedia of Electrochemistry**, v. 8, 2001.
- [242] ROWLEY-NEALE, S.J.; RANDVIIR, E.P.; ET AL. An overview of recent applications of reduced graphene oxide as basis of electroanalytical sensing platforms. **Applied Materials**, v. 10, p. 218–226, 2018.
- [243] NUWER, M.J.; O'DEA, J.J.; ET AL. Analytical and kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 251, n. 1–2, p. 13–25, 1991.
- [244] LIMA, T.; SILVA, H.T.D.; ET AL. An Experimental Design for Simultaneous Determination of Carbendazim and Fenamiphos by Electrochemical Method. **Electroanalysis**, v. 28, n. 4, p. 817–822, 2016.
- [245] DENG, L.; GUO, S.; ET AL. A silk derived carbon fiber mat modified with Au@Pt urchinlike nanoparticles: A new platform as electrochemical microbial biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2189–2193, 2010.
- [246] FRANÇA, R.F.; OLIVEIRA, H.P.M. DE; ET AL. Electroanalytical determination of carbendazim and fenamiphos in natural waters using a diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 27–28, p. 54–59, 2012.

ANEXO 1

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Gevaerd, A.; Banks, Craig E.; Bergamini, Márcio F.; Marcolino-Junior, Luiz H. *Graphene Quantum Dots Modified Screen-Printed Electrodes as Electroanalytical Sensing Platform for Diethylstilbestrol*. **Electroanalysis**, v. 31, (2019) 838-843.

Gevaerd, Ava; Blaskievicz, Sirlon. F., Bergamini, Márcio F.; Zarbin, Aldo J.G.; Orth, Elisa S.; Marcolino-Junior, Luiz H. *Nonenzymatic electrochemical sensor based on Imidazole-functionalized graphene oxide for progesterone detection*. **Biosensors and Bioelectronics**, v.112 (2018) 108-113.

Gevaerd, Ava; Oliveira, Paulo R.; Mangrich, Antonio S.; Bergamini, Márcio F.; Marcolino-Junior, Luiz H. *Evaluation of antimony microparticles supported on biochar for application in the voltammetric determination of paraquat*. **Materials Science and Engineering: C**, v.62 (2016) 123-129.

Gevaerd, Ava; Caetano, Fabio R.; Oliveira, Paulo R.; Zarbin, Aldo J.G.; Bergamini, Márcio F.; Marcolino-Junior, Luiz H. *Thiol-capped goLODnanoparticles: Influence of capping amount on electrochemical behavior and potential application as voltammetric sensor for diltiazem*. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.220 (2015) 673-678.

ANEXO 2

DISCIPLINAS CURSADAS

CÓDIGO	DISCIPLINA	CRÉDITO	CARGA HORÁRIA	CONCEITO
CQ285	Métodos Espectroquímicos de Análise	4	60h	B
CQ724	Seminários C	1	15h	A
CQ736B	Metodologia Científica e Redação Acadêmica/Científica	4	60h	B
CQ781	Prática de Docência	1	30h	A
CQ736C	Eletroquímica e Interfaces	4	60h	A
CQ-736	Novas Tendências no tratamento de resíduos	4	60h	A
CQ794	Seminários D	1	15h	A