



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA - PPGQB**



IQB

WALDOMIRO PINHO JÚNIOR

**ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS A PARTIR DE NANOTUBOS DE CARBONO
E NITROANILINAS E SUA APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE
IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA**

Maceió – AL

2016

WALDOMIRO PINHO JÚNIOR

ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS A PARTIR DE NANOTUBOS DE CARBONO E NITROANILINAS E SUA APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, para obtenção do título de mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Marília Oliveira Fonseca Goulart**

Maceió - AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

P654e Pinho Júnior, Waldomiro.
Eletrodos quimicamente modificados a partir de nanotubos de carbono e nitroanilinas e sua aplicação na determinação de antioxidantes de importância biológica / Waldomiro Pinho Júnior. – 2016.
93 f.: il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 89-93.

1. Nanotubos de carbono. 2. Nitroanilinas. 3. Atioxidantes. 4. Sensor eletroquímico. 5. Determinação. I. Título.

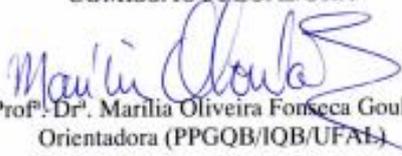
CDU: 543.553



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de tese do mestrando **Waldomiro Pinho Júnior** intitulada: “Eletrodos quimicamente modificados a partir de nanotubos de carbono e nitroanilinas e sua aplicação na determinação de antioxidantes de importância biológica”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 30 de novembro de 2016, às 9h, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora (PPGOB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Josealdo Tonholo
(PPGOB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Cleylton Bezerra Lopes
(IFAL, Campus Murici)


Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima
(PPGOB/IFAL, Campus Maceió)

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus por me fazer acreditar;

À minha irmã, Luciana, pelo apoio, amor e dedicação;

Aos meus sobrinhos, Felipe e Miguel, pelo carinho e sorriso constante;

À Samara, minha esposa, pelo apoio e carinho durante todos esses anos;

À Professora Marília Oliveira Fonseca Goulart, pela atenção, confiança, muita paciência e, sobretudo, pela oportunidade concedida desde do tempo de iniciação científica Jr;

Ao Professor Valdeci, por acreditar em mim ainda nos tempos de ensino médio;

Ao professor Josealdo Tonholo pela importantíssima contribuição intelectual para a concepção deste trabalho e otimismo;

Ao Professor Dimas, pelo apoio, paciência e ajuda na realização das sínteses;

Aos professores: Fabiane Caxico, Francine Santos e Hugo Juarez que me ajudaram e incentivaram durante a graduação;

Ao casal, Erivaldo e Jhosianna, pela amizade construída durante todo esse tempo, trocas de conhecimentos e muitas risadas;

À Thaissa Lúcio, pela amizade, disposição e contribuição para a realização deste trabalho;

A Cleylton e Rosanny pelas corridas e incentivo em muitos aspectos;

Ao Leonardo, pelo apoio e ajuda para produção deste trabalho;

Aos companheiros do Laboratório de Eletroquímica (Andréia, Fred, Jadriane, Nicholas, Maryana, Mônica, Junia, Fabiana Camatari, Angladis, Andresa) pelo apoio, compartilhamento de experiências e a convivência proporcionada durante esse período;

À Bruna Granja, pela confiança, risadas, incentivo, sinceridade, companheirismo e orações;

Aos amigos de graduação: Elton, Ricardo, Walney e Penélope;

Aos velhos amigos de laboratório Cícero, Paulo, Aristides e Antônio que me ajudaram bastante no começo de tudo;

Aos professores, técnicos e corpo administrativo do Instituto de Química e Biotecnologia, em especial ao Anderson pela sua eficiência e Aldir, por ser tão prestativo;

Aos velhos e novos amigos, Lucas, Diego, Luiz, Juninho, Maurilio e bem como os familiares, Tia Nete e família Cavalcante, e meus irmãos Luana e Alex que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho;

A FAPEAL, CAPES e a CNPq, pelo apoio.

RESUMO

Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de um sensor eletroquímico simples e eficiente à base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês MWNCT) e quimicamente modificado com nitroanilinas polimerizadas e seus produtos de redução, no intuito de desenvolver um sensor para determinar simultaneamente ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA) e dopamina (DO). As nitroanilinas sobre o MWNCT depositado em carbono vítreo, são reduzidas, gerando o par redox hidroxilamina/nitroso, originando o eletrodo quimicamente modificado (EQM). As técnicas empregadas para a realização deste trabalho foram voltametria cíclica e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para estudar o comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados, detecção dos analitos em amostras biológicas, obtenção dos parâmetros cinéticos e caracterização analítica da plataforma. Com o intuito de verificar a influência da posição do grupo nitro na série das nitroanilinas, os isômeros *orto*-nitroanilina (oNA) e *meta*-nitroanilina (mNA) foram avaliados em relação à sensibilidade e resposta para a detecção de AA e AU, seguindo a mesma metodologia de modificação e ativação do sensor modificado com *para*-nitroanilina (pNA), que apresentou maior variação de corrente, indicativa de maior sensibilidade. Os estudos cronoamperométricos foram realizados com o objetivo de obter maiores informações acerca dos processos redox entre AA e a plataforma funcionalizada, uma vez que este demonstrou ser um processo catalítico. Assim, por meio de gráficos e equações de Cottrell, foi possível obter os valores aparentes para o coeficiente de difusão (D_{AA}) e a constante catalítica (k_{cat}) da reação para o AA. Os valores do D_{AA} e de k_{cat} , determinados para AA, foram de $3,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,88 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O sensor amperométrico apresentou como figuras de mérito relativas à determinação de AA, DO e AU, os seguintes valores: em relação ao AA apresentou faixa linear de 5 a 80 μM e limite de detecção 9,84 μM ; para DO, faixa linear de 5 a 80 μM e limite de detecção de 2,13 μM e, em relação a AU, faixa linear de 5 a 80 μM , e limite de detecção de 2,30 μM . A partir do desempenho obtido, justifica-se a utilização da plataforma nanoestruturada fundamentada em MWNCT e pNA ativado como sensor principalmente para a determinação simultânea de AA, DO e AU. O estudo comparativo entre os isômeros evidenciou que os sensores formados por pNA e mNA mostraram maior sensibilidade frente aos analitos AA e AU quando comparados com a plataforma formada por oNA. O estudo com os sais de diazônio, utilizando os mesmos parâmetros da oxidação e ativação, mostrou que a *para*-nitroanilina adere a superfície do eletrodo por grafitação.

Palavras-Chave: Nanotubos de carbono. Nitroanilinas. Antioxidantes. Sensor eletroquímico.

ABSTRACT

This paper describes the development of simple and efficient electrochemical sensors, based on multi-walled carbon nanotubes (MWNCT) chemically modified with nitroanilines (NA), and electroreduced products. These sensors were developed for the simultaneous determination of uric acid (UA), ascorbic acid (AA) and dopamine (DO). NAs, on the MWCNT-modified glassy carbon, suffer reduction, where the nitro group is reduced irreversibly generating the redox couple hydroxylamine/nitroso, originating the chemically modified electrode (CME). The techniques employed for this work were cyclic voltammetry and chronoamperometry, which were used to study the electrochemical behavior of the modified electrode, for detection of analytes in biological samples, obtaining the kinetic parameters and analytical characterization of the platform. In order to assess the effect of the nitro group position in the series of nitroanilines, the isomers *ortho*-nitroaniline (oNA) and *meta*-nitroaniline (mNA) were evaluated for sensitivity and response toward AA and UA detection, following the same procedure applied for *para*-nitroaniline (pNA), which showed the highest current variation, indicating greater effectiveness. The chronoamperometric studies were used, in order to obtain more information about the redox process between AA and the functionalized platforms, since this proved to be a catalytic process. Thus, by means of graphs and Cottrell equation, it was possible to obtain values for the apparent diffusion coefficient (D_{AA}) and the catalytic constant (k_{cat}) for the reaction with AA. The values of k_{cat} and D_{AA} determined for AA were $3.83 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $1.879 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The amperometric sensor allowed the determination of AA, DO and UA. The following figures of merit were obtained: for AA: linear range 5 to 80 μM and detection limit of 9.84 μM ; for DO, linear range of 5 to 80 μM and detection limit of 2.13 μM and, for UA, linear range of 5 to 80 μM and detection limit of 2.30 μM . From the obtained performance, the use of nanostructured platform composed of MWNCT and activated pNA is justified, mainly for the simultaneous determination of AA, DO and UA. The comparative study of the isomers showed that the pNA and mNA chemically modified sensors showed increased sensitivity toward the analytes AA and UA, compared to oNA. The study with diazonium salts showed that *para*-nitroaniline adheres to the surface of the electrode by grafting.

Keywords: Carbon Nanotubes. Nitroanilines. Antioxidants. Electrochemical sensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais dispositivos e aplicações dos sensores.	20
Figura 2 -	Esquema geral dos principais componentes de um sensor químico.	21
Figura 3 -	Modelo de catálise redox em EQM, onde S_{Ox}/S_{Red} e Med_{Ox}/Med_{Red} são as formas oxidadas e reduzidas do analito (S) a ser detectado e do mediador (Med), respectivamente.	26
Figura 4 -	Representação esquemática: (1) SWCNT e (2) MWCNT.	29
Figura 5 -	Representação para formação do par redox hidroxilamina/nitroso.	31
Figura 6 -	Estruturas Químicas das <i>para</i> -, <i>meta</i> - e <i>orto</i> -nitroanilinas (pNA, mNA e oNA).	34
Figura 7 -	Estrutura Química do Ácido L-Ascórbico.	36
Figura 8 -	Estrutura Química do Ácido Úrico.	37
Figura 9 -	Estrutura Química da Dopamina.	37
Figura 10 -	Mecanismo previsto para a oxidação de <i>orto</i> , <i>meta</i> e <i>para</i> -nitroanilina.	45
Figura 11 -	Mecanismo para oxidação dos isômeros pNA (Figura 10-A), oNA (Figura 10-B) e mNA (Figura 10-C).	46
Figura 12 -	Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl ⁻ para gerar ECV/MWCNT/pol-pNA, a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦).	49
Figura 13 -	Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação da pol-pNA, gerando ECV/MWCNT/pol-at-pNA, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $E_{inicial} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{final} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl ⁻ , tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0. Voltamogramas 1 (♦) e 7 (♦).	49
Figura 14 -	Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,25 V vs. Ag/AgCl/Cl ⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com pNA a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M, e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦).	51

- Figura 15 - Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0,4 a 1,3 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com pNA a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦). 52
- Figura 16 - Voltamogramas cíclicos para a modificação ECV/MWNCT com pNA a 3,6 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ em pH (A) 7,0; (B) 10,0. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦). 53
- Figura 17 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de pNA, após incorporação ao eletrodo, gerando ECV/MWCNT/at-pol-pNA, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 para modificação em pH 7,0 (A) e pH 10 (B). Voltamogramas 1 (♦), 2 (♦), 3 (♦), 4 (♦), 5 (♦), 6 (♦) e 7 (♦). 54
- Figura 18 - ΔI vs pH para ECV/MWNCT/pol-at-pNA, em diferentes condições e valores de pH, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na presença de AA e AU. (♦) pH 1,2, pH 7,0 (♦) e pH 10,0 (♦). 55
- Figura 19 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWNCT/pol-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na presença de AA, DO e AU. Branco 1 (♦), 400 μM AA (♦), 400 μM AA + 200 μM AU (♦), 400 μM AA + 200 μM AU + 100 μM DO (♦). 56
- Figura 20 - ΔI para ECV/MWNCT/pol-pNA e ECV/MWNCT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, na presença de AA, AU e DO. (♦) ECV/MWNCT/pol-pNA e (♦) ECV/MWNCT/pol-at-pNA. 57
- Figura 21 - Voltamogramas cíclicos de ECV (A), ECV/MWNCT (B) e ECV/MWNCT/pol-at-pNA (C), em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na presença de AA, DO e AU Branco 1 (♦), 400 μM AA (♦), 400 μM AA + 200 μM AU (♦), 400 μM AA + 200 μM AU + 100 μM DO (♦). 58
- Figura 22- Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com oNA a 3,6 mM, em solução de HCl 0,1 M, e $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦). 60
- Figura 23 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de oNA, gerando o ECV/MWCNT/pol-at-oNA, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Voltamogramas 1 (♦) e 7 (♦). 61

- Figura 24 - Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com a mNA a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M, e $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (◆), 10 (◇) 15 (♦) e 20 (◆). 62
- Figura 25 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de mNA, gerando o ECV/MWCNT/pol-at-mNA, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Voltamogramas 1 (◆) e 7 (♦). 62
- Figura 26 - ΔI para de ECV/MWNCT/pol-at-pNA, ECV/MWNCT/pol-at-oNA e ECV/MWNCT/pol-at-mNA, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, na presença de AA e AU. pNA (♦), oNA (◆) e mNA (◆). 64
- Figura 27 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWCNT/pol-at-pNA em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (10- 90 mV s⁻¹), $E_{\text{inicial}} = -0,4 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,5 \text{ V}$, varredura no sentido anódico. 65
- Figura 28 - Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. 66
- Figura 29 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWCNT/pol-at-pNA em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na presença 0,4 mM AA. 67
- Figura 30 - Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no ECV/MWCNT/ pol- at-pNA, em solução contendo 0,4 mM de AA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e $v: 0,005-0,021 \text{ V s}^{-1}$. 68
- Figura 31 - Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/pol-at-pNA em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{\text{inicial}} = 0,05 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. Branco (♦), 100 μM AA (◆), 200 μM AA (◇), 300 μM AA (♦), 400 μM AA (◆), 500 μM AA (◆), 600 μM AA (♦), 700 μM AA (◆), 800 μM AA (♦), 900 μM AA (◆) e 1000 μM AA (◆). 69
- Figura 32 - Integração dos cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/ pol-at-pNA em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $E_{\text{inicial}} = 0,05 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. Branco (♦), 100 μM AA (◆), 200 μM AA (◇), 300 μM AA (♦), 400 μM AA (◆), 500 μM AA (◆), 600 μM AA (♦), 700 μM AA (◆), 800 μM AA (♦), 900 μM AA (◆) e 1000 μM AA (◆). 70

- Figura 33 - Gráfico de I vs. $t^{-1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 32 em ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. AgAgCl, respectivamente. Branco (♦), 100 μ M AA (♦), 200 μ M AA (♦), 300 μ M AA (♦), 400 μ M AA (♦), 500 μ M AA (♦), 600 μ M AA (♦), 700 μ M AA (♦), 800 μ M AA (♦), 900 μ M AA (♦) e 1000 μ M AA (♦). 71
- Figura 34 - Gráfico de inclinação ($I/t^{-1/2}$) versus a concentração de AA obtidos a partir da Figura 34 do ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. AgAgCl, respectivamente. 72
- Figura 35 - Dependência de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$ provenientes dos cronoamperogramas da figura 32 ($I \times T$) em ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. Ag/AgCl/Cl-, respectivamente. 100 μ M AA (♦), 200 μ M AA (♦), 300 μ M AA (♦), 400 μ M AA (♦), 500 μ M AA (♦), 600 μ M AA (♦), 700 μ M AA (♦), 800 μ M AA (♦), 900 μ M AA (♦) e 1000 μ M AA (♦). 73
- Figura 36 - Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_{lim} vs. concentração de AA em ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. Ag/AgCl/Cl-, respectivamente. 73
- Figura 37 - Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AA (Figura 37-A), DO (Figura 37-B) e AU (Figura 37-C) no ECV/MWCNT/pol-at-pNA, obtidas em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0. 75
- Figura 38 - Curvas analíticas para a eletrooxidação de AA (Figura 38-A), DO (Figura 38-B) e AU (Figura 38-C) no ECV/MWCNT/pol-at-pNA com potenciais aplicados de +0,100 V, +0,225 V e +0,325 V vs. Ag/AgCl/Cl- respectivamente. 76
- Figura 39 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWCNT/pol-at-pNA e solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5$ mV s⁻¹, na ausência e presença de soro. Branco (♦), 300 μ L de soro (♦) e 300 μ L de soro + 50 μ M de AU (♦). 81
- Figura 40 - Voltamogramas Cíclicos de ECV/MWCNT/at-pol-pNA e solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5$ mV s⁻¹, na ausência e presença de urina. Branco (♦), 200 μ L de urina (♦) e 200 μ L de urina + 200 μ M de AU (♦). 82
- Figura 41 - Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AU no ECV/MWCNT/pol-at-pNA obtidas em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 na presença de urina. 83

- Figura 42 - Curva $I \times [AU]$ relacionando as quantidades da substância adicionada com as correntes obtidas. 84
- Figura 43 - Voltamogramas cíclicos de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para gerar o eletrodo grafitado, em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦) e 20 (◆). 85
- Figura 44 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de pNA, gerando ECV/graf-at-pNA, $v = 20 \text{ m.V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 (A) primeira ativação (B) segunda ativação. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais técnicas eletroquímicas utilizadas para sensores eletroquímicos.....	23
Tabela 2	Métodos de modificação de superfície de eletrodos.....	25
Tabela 3	Sensores utilizando mediadores com grupo nitro.....	32
Tabela 4	Potenciais referentes a AA, DO e AU.....	59
Tabela 5	Potenciais referentes à oxidação de AA e AU.....	63
Tabela 6	Parâmetros analíticos de eletrodos modificados para a determinação simultânea de AA, DO e AU.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

σ	Desvio padrão
v	Velocidade de varredura de potencial
ΔI	Varição de corrente
A	Área geométrica do eletrodo
AA	Ácido ascórbico
Ag/AgCl/Cl ⁻	Eletrodo de prata, cloreto de prata
AU	Ácido úrico
b	Coefficiente angular
C _o	Concentração do analito, no seio da solução
D	Coefficiente de difusão
DO	Dopamina
DPR	Desvio padrão relativo
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
E	Potencial
E λ	Potencial de inversão
E _{final}	Potencial final
E _{inicial}	Potencial inicial
E _p	Potencial de pico
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
F	Constante de Faraday
I	Corrente
I _{pa}	Corrente de pico anódica
AFM	Microscópio de força atômica
ECV/MWCNT	Eletrodo modificado com nanotubos de carbono
ECV/MWCNT/pol-pNA	Eletrodo modificado com nanotubo de carbono polimerizado com pNA
ECV/MWCNT/pol-at-pNA	Eletrodo modificado com nanotubos de carbono polimerizado com pNA e ativado por redução
ECV/graf-pNA	Eletrodo grafitado com pNA

ECV/graf-at-pNA	Eletrodo grafitado com pNA e ativado por redução
<i>k</i> _{cat}	Constante de velocidade da reação
LD	Limite de detecção
Med	Mediador
mNA	<i>Meta</i> -nitroanilina
MWCNT	“Multi-walled carbon nanotubes” Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
SWCNT	“Single walled carbon nanotubes” Nanotubos de carbono de paredes simples
<i>n</i>	Número de elétrons
NTC	Nanotubos de carbono
oNA	<i>Orto</i> -nitroanilina
Ox	Oxidado
S	Analito
pNA	<i>Para</i> -nitroanilina
R	Coefficiente de correlação
Red	Reduzido
T	Temperatura
VC	Voltametria cíclica
α	Coefficiente de transferência de elétrons

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
		8
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
		0
2.1	Sensores Químicos	2
		0
2.1.1	Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM).....	2
		4
2.1.2	Modificadores de superfície eletródica.....	2
		7
2.1.2.	Nanotubos de carbono (NTC).....	2
1		7
2.1.3	Mediadores.....	2
		9
2.1.3.	Nitroaromáticos.....	3
1		0
2.2	Analitos	3
		5
2.2.1	Ácido <i>L</i> -Ascórbico.....	3
		5
2.2.2	Ácido Úrico.....	3
		6
2.2.3	Dopamina.....	3
		7
3.	OBJETIVOS	3
		8
3.1	Objetivo geral	3
		8
3.2	Objetivos específicos	3
		8
4.	PARTE EXPERIMENTAL	4
		0
4.1	Reagentes	4
		0

4.2	Equipamentos e materiais.....	4
		0
4.3	Métodos.....	4
		0
4.3.1	Preparo das soluções de pNA, oNA e mNA.....	4
		0
4.3.2	Tratamento dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT).....	4
		0
4.3.3	Preparação da dispersão de MWCNT.....	4
		1
4.3.4	Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e pNA, originando o ECV/MWCNT/pol-pNA.....	4
		1
4.3.5	Geração do eletrodo quimicamente modificado ECV/MWCNT/at-pol-pNA.....	4
		1
4.3.6	Determinação da área ativa do EQM.....	4
		2
4.3.7	Emprego do ECV/MWCNT/pol-at-pNA na análise de AU em urina e soro.....	4
		2
4.3.8	Estudo com os isômeros oNA e mNA.....	4
		2
4.3.8.1	Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e oNA e mNA, com geração de ECV/MWCNT/pol-oNA e ECV/MWCNT/pol-mNA.....	4
		2
4.3.8.2	Modificação de ECV/MWCNT/pol-oNA e ECV/MWCNT/pol-mNA, por redução gerando ECV/MWCNT/pol-at-oNA e ECV/MWCNT/pol-at-mNA.....	4
		3
4.9	Estudos Cronoamperométricos.....	4
		3
4.10	Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AU, AA e DO no ECV/MWCNT/pol-at-pNA.....	4
		3
4.11	Preparo dos sais de diazônio.....	4
		3
4.12	Preparo do eletrodo grafitado ECV/graf-pNA.....	4
		3
4.13	Preparo do eletrodo quimicamente modificado ECV/graf-at-	4
		4

	pNA.....	
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	4
5.1	Previsão de reatividade.....	4
5.2	Preparação dos eletrodos modificados.....	4
5.2.1	A partir de pNA.....	4
5.3	Comportamento Eletroquímico da p-nitroanilina (pNA) em diferentes valores de pH.....	5
5.4	Análise dos eletrodos modificados quanto à eletroanálise de AA e AU.....	5
5.5	Oxidação de AA, DO e AU em ECV/MWCNT/pol-pNA.....	5
5.6	Oxidação de AA, DO e AU em ECV/MWCNT/pol-at-pNA.....	6
5.7	Estudo com os isômeros o-nitroanilina (oNA) e m-nitroanilina (mNA).....	6
5.8	Análise dos eletrodos modificados quanto à eletroanálise de AA e AU.....	6
5.9	Características Cinéticas do ECV/MWCNT/pol-at-pNA.....	6
5.10	Estudos cronoamperométricos.....	6
5.11	Detecção de AA, AU e DO.....	7
5.12	Detecção de Ácido Úrico (AU) em amostras biológicas.....	4
5.13	Quantificação de ácido úrico na urina.....	8
5.14	Estudo com os sais de diazônio.....	2
5.14.1	Preparo do eletrodo grafitado ECV/graf-pNA.....	8
		4

5.14.2	Preparo do eletrodo quimicamente modificado ECV/graf-at-pNA.....	8
		6
6.	CONCLUSÃO	8
		8
7.	REFERÊNCIAS	8
		9

1. INTRODUÇÃO

Métodos eletroquímicos têm aplicações importantes na análise de amostras. A própria superfície do eletrodo pode ser uma ferramenta poderosa. Ao controlar o potencial, o eletrodo pode ser utilizado como uma fonte de elétrons de energia livre variável (CIUCU, 2014).

Apesar disso a utilização da superfície do eletrodo para análises com moléculas biológicas pode ser limitada, devido ao envenenamento superficial, ocasionado por adsorção irreversível, limitando assim a sensibilidade do método.

O uso de Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM), em análises químicas, tem sido de grande importância, já que esses têm como objetivo contornar essas limitações. Com a modificação, pode-se obter efeitos eletrocatalíticos e prevenir passivação superficial.

Em eletroanalítica, a busca por sensibilidade e seletividade estimulam a busca por sensores eletroquímicos, mas apesar da versatilidade, a utilidade de um sensor muitas vezes é limitada devido à passivação gradual da superfície, consequência da adsorção de produtos da própria oxido-redução utilizada para detecção, além disso os próprios subprodutos desta reação podem se polimerizar e aderir na superfície do eletrodo, o que pode ter consequências positivas ou negativas nas diferentes medidas (KUBOTA et al., 2000).

Dentre os métodos eletroquímicos, as técnicas voltamétricas e amperométricas constituem uma ferramenta importante no estudo de analitos de importância ambiental, alimentar, farmacêutica e medicinal, devido às informações qualitativas e quantitativas e até a possibilidade de estabelecer um mecanismo de redução e oxidação de um sistema. Os métodos eletroanalíticos têm algumas vantagens em relação a outros métodos analíticos, pois apresentam especificidade para um estado redox particular de um elemento e instrumentação barata e de fácil compreensão (SKOOG et al. 2002).

Existem vários trabalhos na literatura propondo técnicas eletroanalíticas para determinação de antioxidantes como ácido ascórbico (AA), úrico (AU) e dopamina

(DO) como por exemplo, o uso de Azure A em MWCNT modificado com nanopartículas de ouro (FILIK et al., 2015), eletrodo de grafite modificado com grafeno (MALLESHA et al., 2011), nanocompósitos de óxido de grafeno reduzidos com base em Au@Pd [Jiang e Du, 2014], eletrodo modificado com nanopartículas de ouro- β -ciclodextrina-grafeno (TIAN et al., 2012) e eletrodo de pasta de carbono modificado com multicamadas de nanotubos de carbono, líquido iônico e nanopartículas de paládio (RAFATI et al., 2014), entre outros. Porém muitas destas técnicas tem elevado custo e requerem um amplo tratamento.

Sendo assim o emprego de técnicas eletroquímicas para determinação dos antioxidantes como AU, AA e DO tem sido proposto como alternativa viável e promissora.

As nitroanilinas tem sido investigadas eletroquimicamente sobre várias superfícies eletródicas, como por exemplo, a *orto*-nitroanilina (oNA) que foi utilizada para modificar a superfície de aço contra a corrosão (SACHIN et al., 2007), a *meta*-nitroanilina (mNA) junto de alguns nanomateriais modificando a superfície de eletrodo de carbono vítreo, para determinação de íons cobre (DEDELAITE et al., 2015), aplicando técnicas como espectroscopia de impedância eletroquímica [SACHIN et al., 2007] e voltametria de pulso diferencial (DEDELAITE et al., 2015).

O presente trabalho visa, portanto, utilizar eletrodos de carbono vítreo quimicamente modificados com MWNCT (ECV/MWCNT) e nitroanilinas, polimerizadas, polimerizadas e ativadas por redução de grupos nitro, assim como submetidas a processos que geram grafitação de superfície, na análise de antioxidantes e neurotransmissores de importância biológica.

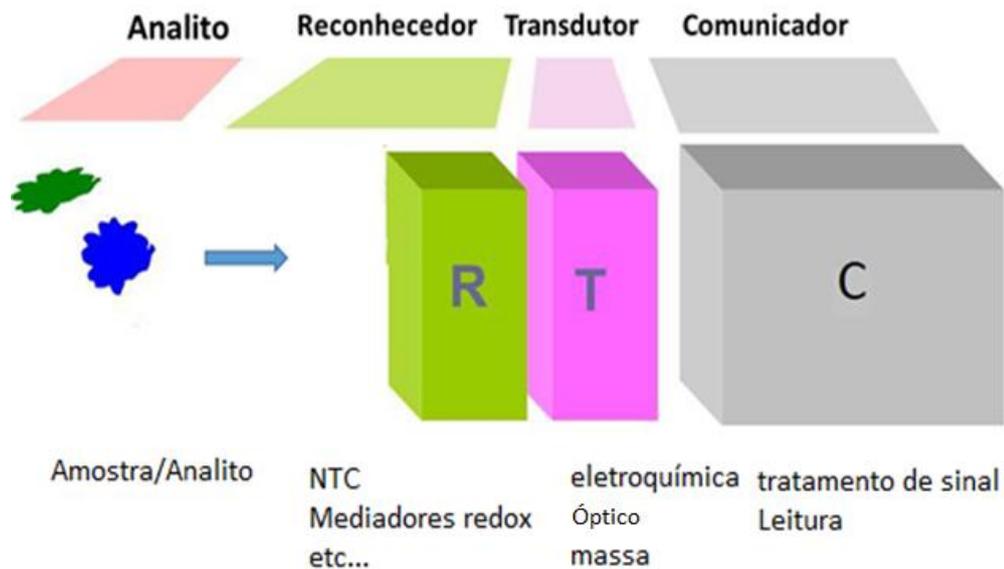
Os eletrodos modificados são representados pelas seguintes siglas:

ECV/MWCNT: eletrodos de carbono vítreo quimicamente modificados com MWNCT; ECV/MWCNT/pol-pNA: eletrodos de carbono vítreo quimicamente modificados com MWNCT e pNA submetido à oxidação, levando à polimerização;

ECV/MWCNT/pol-at-pNA: eletrodos de carbono vítreo quimicamente modificados com MWNCT e pNA submetido à oxidação, levando à polimerização, com redução do grupo nitro; ECV/graf-pNA: eletrodos de carbono vítreo grafitado com pNA e ECV/graf-at-pNA: Eletrodo grafitado com pNA e ativado por redução.

A figura 2 apresenta um esquema geral dos principais componentes de um sensor químico. A obtenção de informação analítica depende basicamente da capacidade do agente de reconhecimento, que comumente fica posicionado na extremidade do dispositivo, em reconhecer a espécie de interesse de maneira seletiva. São vários os agentes de reconhecimento em termos de sensores: mediadores redox, NTCs entre outros (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

Figura 2 - Esquema geral dos principais componentes de um sensor químico.



Fonte: Adaptado de MERKOÇI, 2016.

Existem várias alternativas para imobilizar os agentes de reconhecimento na superfície do sensor e um aspecto relevante associado a esta operação relaciona-se à necessidade de acesso a algum processo químico que viabilize a transdução do sinal para o detector. Por sua vez, o sinal transmitido deve ser maximizado em relação às informações sobre o analito, ou seja, deseja-se minimizar o efeito de contribuições estranhas como, por exemplo: interferentes, ruídos eletrônicos ou erros experimentais.

Neste sentido, a efetiva capacidade do dispositivo em discriminar o analito constitui-se um aspecto de grande importância na fabricação de sensores de uso geral e em larga escala, deve-se ressaltar, entretanto, que aspectos referentes ao baixo custo, eficiência, sensibilidade, especificidade, estabilidade, rapidez e robustez

também devem ser considerados (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006), juntamente com a portabilidade, uso in situ, especialmente se não precisar de equipamentos caros e de transporte difícil.

Os sensores eletroquímicos têm como características, sensibilidade, seletividade, rapidez, precisão, tendo ainda como vantagens a facilidade de automação, de operação, possibilidade de miniaturização e o baixo custo. Devido a essas características, tiveram um crescimento rápido entre a classe de sensores químicos e mantêm uma posição de liderança entre os sistemas atualmente disponíveis (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006; CIUCU, 2014).

As principais técnicas utilizadas em sensores eletroquímicos (LABIB et. al. 2016) podem ser classificadas em cinco tipos: voltametria/amperometria, impedância eletroquímica, condutometria, potenciometria e transistores de efeito de campo (Tabela 1).

Nesse trabalho foram escolhidas as técnicas voltamétricas e amperométricas por serem mais amplamente utilizadas, mais flexíveis e os sinais gerados serem fáceis de interpretar.

Tabela 1 – Principais técnicas eletroquímicas utilizadas para sensores eletroquímicos.

Técnica	Conceito	Parâmetros
Voltametria/ Amperometria	Aplicação de um potencial em eletrodo de trabalho contra um eletrodo de referência, com medida de corrente. A corrente surge a partir de eletrólise através da oxidação ou redução eletroquímica no eletrodo de trabalho e é limitada pela taxa de transporte de massa das moléculas do reagente a partir de uma solução padrão/estoque para a interface do eletrodo.	Potencial (E); Corrente (I); Carga (Q); Tempo (t).
Espectroscopia de impedância eletroquímica	Determina as propriedades resistivas e capacitivas de materiais sobre perturbação do sistema por um pequeno sinal de excitação AC senoidais amplitude (2-10 mV).	Potencial (E); Corrente (I)
Condutometria	Mede alterações na condutividade elétrica de uma amostra da solução, tal como muda a composição da solução durante uma reação química.	Corrente (I) (condutância)
Potenciometria	Determina concentração de uma espécie iônica através da medida do potencial.	Potencial (E)
Transistores de efeito de campo	Detecta uma alteração na fonte-dreno condutividade canal provenientes do campo elétrico do seu ambiente.	

Fonte: Adaptado de Labib *et al*, 2016.

2.1.1 Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)

A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizada na eletroquímica, por Murray e colaboradores, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas em sua superfície (MOSES et al., 1975; PEREIRA et al., 2002). Essa modificação tem como principal objetivo, pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até as transferências de elétrons de interesse.

Para gerar tais modificações podem ser utilizados metais eletrodepositados, nanopartículas, espécies orgânicas adsorvidas, óxidos, filmes poliméricos condutores e não condutores, macromoléculas, compósitos e outras misturas.

Avanços tecnológicos na área dos EQMs encontram aplicações nas mais diversas áreas de atuação, como na saúde pública, em hospitais ou laboratórios satélites, como por exemplo o *point of care*; nas indústrias de alimentos e bioprocessos, onde o monitoramento em tempo real é muito valioso e em aplicações ambientais, como a indústria e os órgãos de vigilância ambiental, que tem interesse e necessidade de sensores para análise quantitativa de inúmeras substâncias tóxicas e/ou poluentes emitidos pelas indústrias. (PEREIRA et al., 2002, BRUGNERA et al., 2006, RAZMI-NERBIN et al., 2002).

EQMs têm atraído considerável interesse nas últimas décadas, com a possibilidade de maior controle sobre a natureza química da superfície do eletrodo (CIUCU, 2014).

EQMs são formados, de modo geral, por duas partes, eletrodo base e uma camada do modificador químico. Sua preparação depende das características analíticas desejadas do sensor.

Os métodos mais importantes utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base consistem em adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes

poliméricos ou ainda a preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com um modificador pouco solúvel em água, como mostrado na Tabela 2 (PEREIRA, 2002).

Tabela 2- Métodos de modificação de superfície de eletrodos

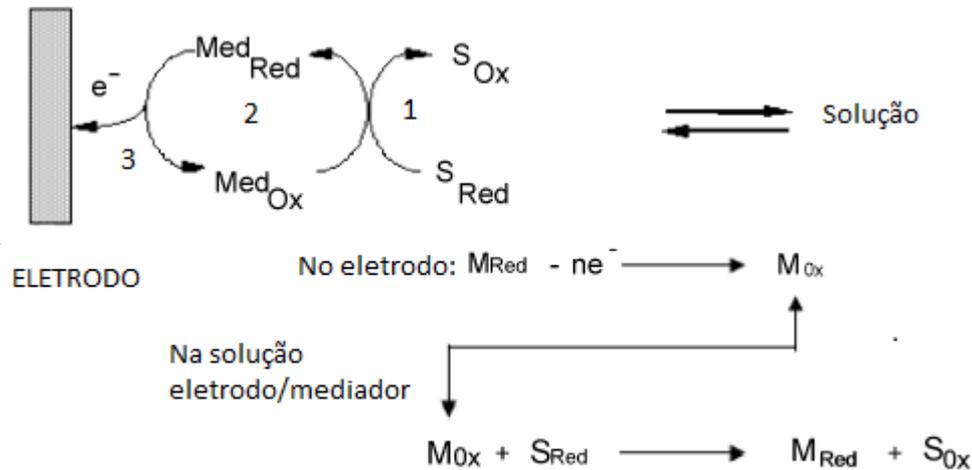
Modificações	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos em uma ampla gama de eletrodos base
Ligação covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através de manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo ou por grafitação, utilizando sais de diazônio, principalmente (MOHAMED et al., 2015).
Filmes poliméricos	Imobilização de polícamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo – ampliação da resposta eletroquímica
Materiais compósitos	Possibilidade de modificação interna do material eletródico.

Fonte: Adaptado de Pereira *et al.*, 2002.

Uma importante motivação para modificar a superfície do eletrodo é a possibilidade de eletrocatalise, e, ainda da catálise redox. Eletrodos quimicamente modificados que empregam mediadores redox imobilizados podem facilitar a transferência de elétrons para uma série de analitos (CIUCU, 2014), alterando o potencial redox.

O princípio básico da catálise redox para os EQMs com mediadores confinados na superfície do eletrodo é ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Modelo de catálise redox em EQM, onde S_{Ox}/S_{Red} e Med_{Ox}/Med_{Red} são as formas oxidadas e reduzidas do analito (S) a ser detectado e do mediador (Med), respectivamente.



Fonte: Adaptado de CIUCU, 2014.

Nesta sequência, 1- o analito se difunde, por gradiente de concentração ou outros tipos de transporte, a partir da solução, para a superfície do eletrodo. 2- O analito é oxidado numa reação puramente química pela forma oxidada do mediador (Med_{Ox}), regenerando Med_{Red} . O potencial do eletrodo é mantido a um valor suficientemente positivo para a re-oxidação à forma cataliticamente ativa. 3- Assim, a transferência heterogênea de elétrons ocorre entre o eletrodo e o mediador e não diretamente entre o eletrodo e o analito. Essencialmente, o mediador pode ser considerado como um meio de transporte de elétrons entre o eletrodo e o analito.

Todas as propriedades analíticas importantes dos eletrodos (sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e mesmo aplicabilidade) têm se mantido e melhorado com a utilização da modificação química, tudo isto pode oferecer muitas aplicações práticas como já mencionado (PEREIRA, 2002).

2.1.2 Modificadores de superfície eletródica

2.1.2.1 Nanotubos de carbono (NTC)

Os nanotubos de carbono (NTC) têm atraído muita atenção desde sua descoberta, devido à sua boa condutividade elétrica, ausência de toxicidade, alta área superficial, significativa resistência mecânica, boa estabilidade química, possibilidade de funcionalização e excelente adsorção (LOPES et al., 2015).

Os dois principais tipos de nanotubos de carbono são os nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) (do inglês single-wall carbon nanotubes) (Figura 4-1) de diâmetros de 1 a 2 nm e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) (do inglês multi-wall carbon nanotubes) (Figura 4-2) de diâmetro de 2 a 25 nm (LIJIMA,1993).

Os MWCNTs são produzidos com baixo custo, e comparando com a maior parte dos sensores disponíveis comercialmente, baseados normalmente em óxidos metálicos, silício e outros materiais, os sensores baseados em NTC apresentam as seguintes vantagens:

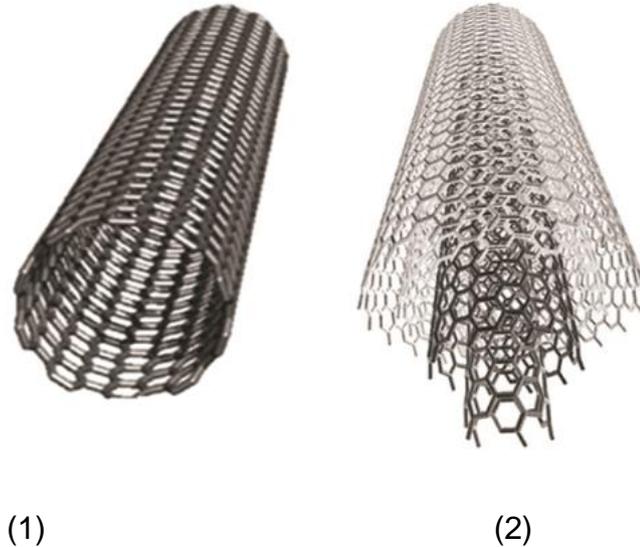
- i) Alta condutividade elétrica, e conseqüente diminuição da resistência à transferência de carga (MINNIKANTI, 2009);
- ii) Excelente estabilidade química;
- iii) Amplo potencial de aplicação como componentes eletrônicos moleculares (KRIVENKO, 2005);
- iv) Possibilidade de funcionalização devido à presença de grupos carboxílicos (XIA, 2009);
- v) Aumento da área superficial (SUNI, 2008);
- vi) Alta sensibilidade, por causa da grande área de superficial, o NTC pode ser utilizado para imobilizar enzimas, de modo a manter uma elevada atividade biológica;
- vii) Tempo de resposta rápido, os NTCs têm uma notável capacidade para mediar rapidamente a cinética de transferência de elétrons;
- viii) Menor potencial de reação redox e menores efeitos de incrustação da superfície;
- ix) Alta estabilidade e maior tempo de vida.

Eletrodos à base de carbono têm sido utilizados devido ao seu baixo custo, boa cinética na transferência de elétrons, e biocompatibilidade. NTCs têm sido incorporados em sensores eletroquímicos. Sensores baseados em NTC geralmente são mais sensíveis, possuem menores limites de detecção e cinética de transferência de elétrons mais rápida do que eletrodos de carbono tradicionais. O desempenho do eletrodo depende do método de síntese do nanotubo de carbono, da modificação da superfície de NTC e do modo de fixação de mediadores no eletrodo (JACOBS, PEAIRS E VENTON, 2010)

A literatura registra uma série de trabalhos com a utilização de plataformas modificadas com NTC. YANG e colaboradores descrevem recentes tendências de sensores eletroquímicos à base de nanotubos de carbono para diversas biomoléculas, eletrodos modificados com MWCNT com nitrocompostos substituídos encapsulados (MOSCOSO et al., 2014), eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono para determinação de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico (BI et al., 2012), sensor baseado em NTCs e L-DOPA para determinação de ácido ascórbico, adrenalina e tirosina (ZARE et al., 2016), entre outros.

É intenso o uso de nanotubos de carbono em sensores eletroquímicos devido aos vários benefícios já relatados. Normalmente os NTCs são incorporados sobre eletrodos por crescimento direto na superfície do eletrodo, encaixando-os em revestimentos de polímero, ou combinando com um ligante para formar pastas, a serem incorporadas em eletrodos. Os métodos eletroquímicos comuns utilizados em sensores modificados com NTC incluem voltametria, amperometria, espectroscopia de impedância elétrica e potenciometria (RIVAS, 2007).

Figura 4 - Representação esquemática: (1) SWCNT e (2) MWCNT



Fonte: Adaptado de Carbon Nanotubes – Polymer Nanocomposites e <http://www.intechopen.com/books/carbon-nanotubes-polymer-nanocomposites>, acessado em 11/01/2016.

2.1.3 Mediadores

Há grande interesse no desenvolvimento de sensores com o emprego de mediadores, que são agentes para facilitar a transferência de elétrons (Figura 3). O mediador geralmente é um composto com baixa massa molecular, cujo par redox catalisa reações, facilitando seletivamente a transferência de elétrons entre os analitos e o eletrodo (LIMA et al., 2008).

Este mediador geralmente deve possuir um potencial redox mais baixo (menos negativo ou menos positivo, dependendo se o processo é redução ou oxidação, respectivamente) que os interferentes eletroquimicamente ativos na amostra, apresentando como vantagens, medidas com menor dependência ou completa independência da concentração do oxigênio e de outras substâncias presentes nas amostras (ROSATTO et al., 2001). Deve ser atóxico, de baixo custo e pouco reativo como nucleófilo ou eletrófilo.

2.1.3.1 Nitroaromáticos

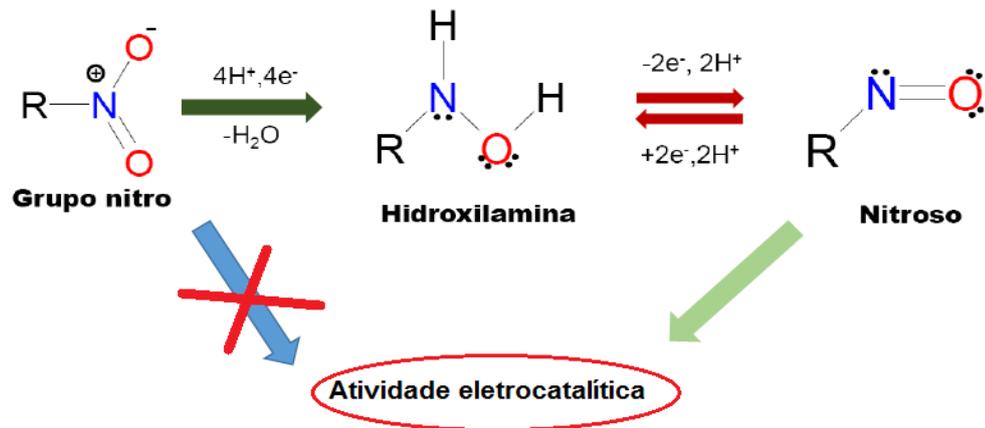
Compostos aromáticos contendo substituintes nitro são amplamente conhecidos. São comumente utilizados na indústria petrolífera, têxtil, farmacêutica, de celulose, de química fina e também na manufatura de explosivos. Estes compostos são intermediários importantes na indústria de produtos químicos (SANTOS et al., 2011).

A eletroquímica de compostos nitroaromáticos tem sido amplamente estudada em eletrodos convencionais, no entanto, alguns estudos têm sido dedicados a aplicação de compostos nitro em nanotubos de carbono (HAMMERICH et al., 2015).

Nos últimos anos, a modificação de eletrodos com grupos nitroaromáticos foi descrita em eletrodos convencionais, incluindo eletrodo de ouro e de carbono vítreo. Vários trabalhos com modificação da superfície com grupo nitro foram feitos nas últimas décadas, eletrodos modificados com NTCs e nitroaromáticos em meio aquoso (R. MOSCOSO et al. 2011), atividade electrocatalítica do eletrodo modificado com 4-nitroftalonitrila para a detecção de L-glutaciona (LIMA et al. 2008), eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-nitroftalonitrila para detecção de NADH (LIMA et al. 2008), entre outros. A tabela 3 lista uma série de sensores que utilizam mediadores nitrados em eletroanálise.

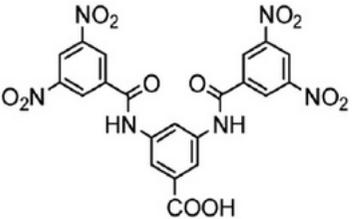
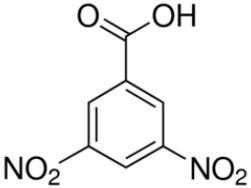
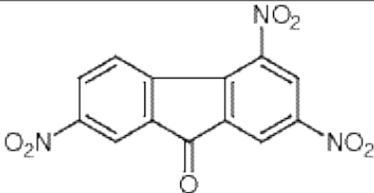
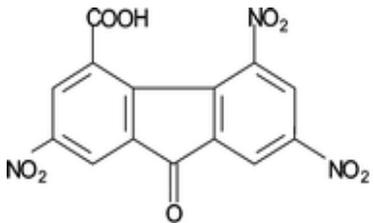
Adicionalmente, alguns autores estão explorando o par redox hidroxilamina/nitroso (Figura 5) eletrogerado na superfície do eletrodo como ferramenta para a construção de sensores [LIMA, et al., 2008; MUNTEANU et al. 2004; LIMA et al., 2009; SANTHIAGO et al., 2010].

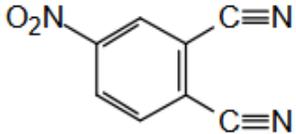
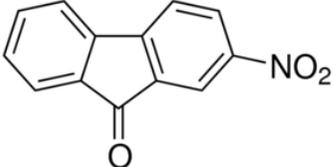
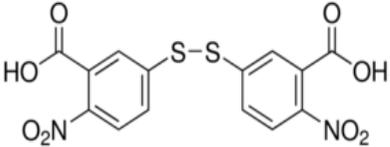
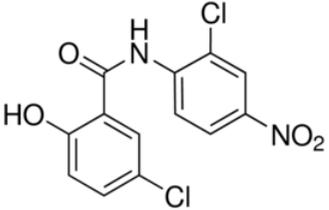
Figura 5 - Representação para formação do par redox hidroxilamina/nitroso.



Fonte: autor desta dissertação, 2016.

Tabela 3 - Sensores utilizando mediadores com grupo nitro

Mediador	Estrutura	Analito	Técnica	pH	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
Ácido 3,5-bis(3,5-dinitrobenzoilamino) benzóico em carbono		NADH	VC	7,0	-----	-----	PAEZ et. al. 2009
Ácido 3,5-dinitrobenzóico		NADH	Amperometria	7,0	2,0 - 35	0,6	CORRÊA et. al. 2013
		NADH	VC	8,0	4,0 - 42,0	1,2	SANTHIAGO et. al. 2009
2,4,7- Trinitro-9-fluorenona		NADH	VC	8,0	-----	-----	MANO et. al. 2001
Ácido 2,5,7-Trinitro-9-fluorenona-4-carboxílico		NADH	VC	8,0	-----	-----	MANO et. al. 2000
		Desidrogenase	VC	8,0	-----	-----	MANO et. al. 2001
		Glicose/	VC	8,0	-----	-----	MANO et. al. 2001

		NADH						
4-Nitroftalonnitrila		NADH	Amperometria	7,0	0,8 - 8,5	0,25	LIMA et al. 2008	
		L-Gutaciona	Amperometria	7,0	0,8 - 83,0	2,7		
2-Nitro-9-fluorenona		NADH	VC	8,0	-----	-----	MANO et. al. 1999	
Ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzóico)		L-cisteina	Amperometria	7,0	9,0 - 250	2,7	SANTHIAGO et. al. 2010	
Niclosamida		NADH	Amperometria	7,0	10 - 280	3,0	LOPES et al. 2015	

Fonte:

Autor

desta

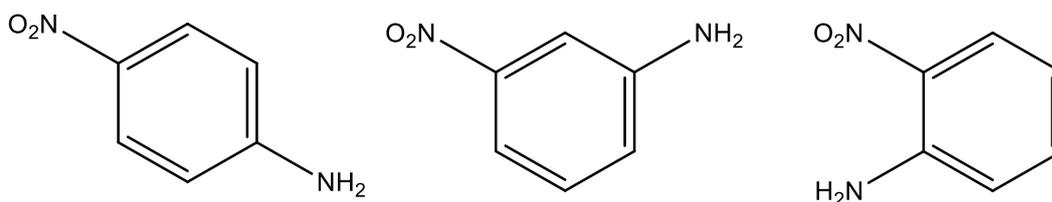
dissertação,

2016

Várias aminas aromáticas, anilinas e derivados tiveram estudos eletroquímicos mais extensivos nos últimos anos. O objetivo comum desses estudos foi explicar o mecanismo complexo de formação de uma série de produtos de oxidação, em diferentes condições de eletrólise e usando reagentes com vários substituintes. Muitos investigadores concentraram seu interesse em entender as fases iniciais das reações nos eletrodos, que produzem polianilinas, com amplas e importantes aplicações (HAMMERICH et al., 2015).

Compostos bifuncionais, como as nitroanilinas (Figura 5) têm atraído a atenção por causa de efeitos específicos do grupo nitro, eletroatraente, e um grupo amino, eletrodoador (HAJAR NEJATIPOUR, MEHRDAD DADSETANI, 2016). Isso resulta em transições eletrônicas de baixa energia com migração de carga dentro da molécula.

Figura 6 - Estruturas Químicas das *para*-, *meta*- e *orto*-nitroanilinas (pNA, mNA e oNA)



Fonte: Autor desta dissertação, 2016

Devido às particularidades desses isômeros, alguns trabalhos foram realizados ao longo dos anos, como o estudo de propriedades ópticas de cristais moleculares de mNA e oNA (HAJAR NEJATIPOUR e MEHRDAD DADSETANI, 2016), determinação eletroquímica de íons cobre a partir de eletrodos de carbono vítreo modificado com nanomateriais e mNA (DEDELAITE et al., 2015), caracterização por espectroscopia Raman de polímeros derivados a partir de mPA e pNA (ANDO et al., 2007) e estudo comparativo do comportamento de eletrossorção de pNA, oNA e mNA, que servem como ponto de referência para estudos espectroeletroquímicos de nitroanilina polivinilamina substituídas (JBARAH et al., 2006; ROTH et al., 2006)

2.2 Analitos

A detecção de moléculas clinicamente relevantes é fundamental para entender as suas funções biológicas, fisiológicas e desenvolvimento de diagnósticos clínicos, já que essas moléculas desenvolvem várias funções nos organismos. Nas últimas décadas, a análise não são realizadas exclusivamente em laboratórios clínicos. Ao contrário, vem sendo efetivadas em vários ambientes como: hospitais, por cuidadores e até mesmo pelos próprios pacientes em sua própria casa.

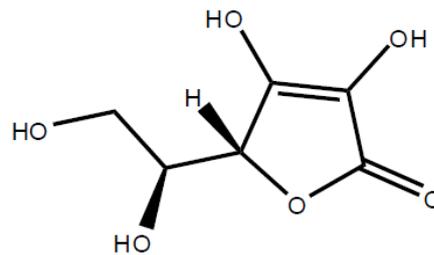
Devido à importância biológica dos antioxidantes ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e do neurotransmissor dopamina (DO), é necessário desenvolver ferramentas para suas análises que apresentem baixo custo, portabilidade, alta sensibilidade, baixo limite de detecção e resposta em um curto período de tempo.

AA, DO e AU são pequenas biomoléculas cruciais para processos fisiológicos no metabolismo humano. Esses analitos geralmente coexistem em matrizes biológicas, onde seus níveis anormais contribuem para várias doenças e distúrbios (FILIK et al, 2015).

2.2.1 Ácido *L*-Ascórbico

O ácido *L*-ascórbico (AA) (Figura 7) ou vitamina C é uma vitamina solúvel presente em muitos sistemas biológicos e em preparações de multivitaminas, comumente usada como antioxidante (AGUI et al., 2007). Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95 % da vitamina C (AA) encontra-se na forma de ascorbato, que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H[•] ou [H⁺ + e⁻] para um radical (SILVA., 2012). Tem sido utilizado também para a prevenção e tratamento de resfriado comum, doenças mentais, infertilidade, câncer, AIDS, entre outras (REFSUM et al., 1998).

Figura 7 - Estrutura Química do Ácido L-Ascórbico



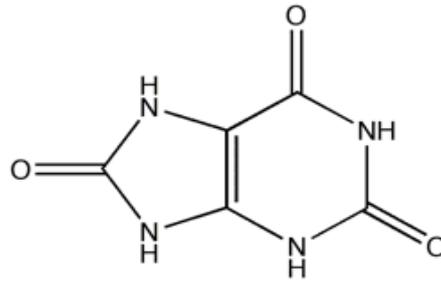
Fonte: Autor desta dissertação, 2016

O ascorbato (AsCH^-) atua como antioxidante sobre espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato (Asc^\bullet), ou ascorbila, pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hipoclorito (ClO^-) e os radicais hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) e hidroperoxila ($^{\bullet}\text{OOH}$). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, impedindo a iniciação da peroxidação lipídica ou, indiretamente, por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana (BARREIROS et al., 2006; LIMA, 2009; SILVA 2012).

2.2.2 Ácido Úrico

O ácido úrico (AU) (Figura 8), é o principal produto final do metabolismo da purina no corpo humano. Ele surge como resultado da quebra dessas moléculas a partir da ação da enzima xantina oxidase (NOROOZIFAR et al., 2014). O AU, em fluidos biológicos, desempenha papéis determinantes não só no metabolismo humano, mas também nos sistemas nervosos central e renal. Seu nível anormal é indicativo de doenças como: gota, isquemia cerebral, insuficiência renal e outras condições patológicas, incluindo a obesidade, a diabetes, a hipertensão e doenças cardíacas (LABID et al., 2016). Apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E (GHISELLI et al., 2000; SILVA et al., 2012).

Figura 8- Estrutura Química do Ácido Úrico

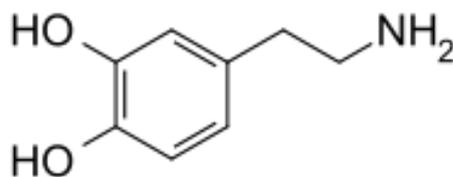


Fonte: Autor desta dissertação, 2016

2.2.3 Dopamina

A dopamina (DO) (Figura 9) é um dos mais importantes neurotransmissores da classe das catecolaminas. Desempenha papel importante no funcionamento do sistema nervoso central, renal, sistemas hormonal e cardiovascular (MORENO et al., 2010) e ainda influencia uma variedade de comportamentos como atenção e plasticidade neuronal e ainda desempenha um papel crítico na memória e aprendizagem (LABID et al., 2016). A determinação da DO é de grande importância na investigação de suas funções fisiológicas e para o diagnóstico de doenças do sistema nervoso resultantes de metabolismo anormal de DO, tais como a epilepsia, esquizofrenia e doença de Parkinson.

Figura 9 - Estrutura Química da Dopamina



Fonte: Autor desta dissertação, 2016

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Visa o desenvolvimento de sensores fundamentados em nanotubos de carbono modificados com *p*-nitroanilina (pNA), ativados de diferentes maneiras, e isômeros para determinação simultânea de ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e dopamina (DO), em diferentes matrizes.

3.2 Específicos

- Estudar o comportamento da pNA em diferentes valores de pH;
- Preparar o eletrodo quimicamente modificado com base em nitroanilinas e nanotubos de carbono;
- Estudar o comportamento eletroquímico dos sensores:
 - ECV/MWCNT;
 - ECV/MWCNT/pol-pNA;
 - ECV/MWCNT/pol-at-pNA;
 - ECV/graf-pNA;
 - ECV/graf-at-pNA;
- Escolher o melhor processo de ativação na ausência de AA, AU e DO;
- Calcular parâmetros cinéticos na ausência de AA, AU e DO;
- Estudar o comportamento eletrocatalítico da plataforma nano-estruturada ECV/MWCNT/at-pNA na detecção de AA, AU e DO;
- Determinar os parâmetros analíticos tais como: limite de detecção e faixa linear de resposta para AA, AU e DO;
- Verificar a estabilidade e repetibilidade das medidas e no preparo do sensor;
- Obter uma curva analítica de detecção de AA, AU e DO sobre a plataforma ECV/MWCNT/at-pNA;

- Utilizar o sensor em matrizes biológicas, tais como plasma e urina, para quantificação de substâncias com relevância biológicas;
- Verificar o efeito da posição do substituinte nitro, nos isômeros *orto*- (oNA) e *meta*- (mNA) em relação à fabricação do EQM e na detecção de AA e AU.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram adquiridos de seus respectivos fornecedores e utilizados sem tratamento prévio: 4-nitroanilina (pNA), 3-nitroanilina (mNA), 2-nitroanilina (oNA), ácido *L*-ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e dopamina (DO) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), fosfato de sódio monobásico monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO_3) foram obtidos da Vetec.

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) obtidos da Sigma passaram por tratamento prévio com ácido nítrico (HNO_3).

4.2 Equipamentos e materiais

Um potenciostato modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, The Netherlands), interfaceado a um microcomputador (software: GPES 4.9) foi empregado para as medidas eletroquímicas. Nos estudos amperométricos para obtenção da curva analítica foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR), com uma velocidade de rotação otimizada (100 rpm).

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita por borbulhamento de um fluxo de nitrogênio ($\text{N}_2(\text{g})$) nas soluções, durante 5 minutos, antes das análises.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparo das soluções de pNA, oNA e mNA

Em um eppendorf, foram pesados 2 mg da substância (3,6 mM) e adicionados 4,0 mL de solução HCl (0,1 M). Esta solução foi preparada antes das modificações, foi armazenada em temperatura ambiente e utilizada por até sete dias.

4.3.2 Tratamento dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram pesados 50 mg de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. A seguir, adicionou-se 20 mL de ácido nítrico

concentrado. Deixou-se o sistema em aquecimento entre 140 - 150 °C, sob refluxo, durante 4 h. Transferiu-se a mistura para um funil de Buchner no qual foi filtrada e lavada sucessivamente com água Milli-Q, até obter uma solução com valor de pH 7,0.

4.3.3 Preparação da dispersão de MWCNT

Em um eppendorf, foi pesado 1 mg de MWCNT (obtido após tratamento com ácido nítrico) e adicionado 1,0 mL de DMF. Esta mistura ficou sob agitação no ultrassom por 2 h para uma melhor dispersão. Esta solução foi preparada antes das análises e pôde ser utilizada durante um mês. Esta dispersão pode ser armazenada em temperatura ambiente e utilizada em outros experimentos.

4.3.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e pNA, originando ECV/MWCNT/pol-pNA

Foram adicionadas 5,0 µL da dispersão de MWCNT, em 5 frações sucessivas de 1,0 µL, com o auxílio de uma micropipeta à superfície do eletrodo. Em cada adição, o DMF foi evaporado lentamente em estufa a 80 °C, durante 10 minutos, para só então serem adicionadas as próximas frações. Para a geração da espécie eletroativa na plataforma nano-estruturada ECV/ MWCNT, o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT foi imerso em uma solução de pNA 3,6 mM e realizadas 20 ciclagens na faixa de 0 a 1,0 V versus Ag/AgCl/Cl⁻ em 4,0 mL de solução de HCl 0,1 M em velocidade de 20 mV s⁻¹. Este eletrodo modificado recebeu a denominação de ECV/MWCNT/pol-pNA, ou seja, eletrodo de carbono vítreo modificado por eletropolimerização de pNA, sobre MWCNT.

4.3.5 Geração do eletrodo quimicamente modificado ECV/MWCNT/at-pol-pNA

O ECV/MWCNT/pol-pNA, após lavagem e secagem, foi imerso em 5 mL de solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e realizadas 7 ciclagens na faixa de 0,5 a -1,0 V versus Ag/AgCl/Cl⁻, em velocidade de 20 mV s⁻¹, com redução do grupo nitro presente na molécula. O eletrodo gerado é denominado ECV/MWCNT/pol-at-pNA, ou seja, eletrodo de carbono vítreo modificado por ativação do grupo nitro, após polimerização sobre MWCNT.

4.3.6 Determinação da área ativa do EQM

A área ativa do ECV/MWCNT/at-pol-pNA foi calculada, utilizando-se ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica e a equação de Randles-Sevcik (Equação 1):

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} \nu^{1/2} C_o \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo D e C_o , o coeficiente de difusão e a concentração do ferricianeto de potássio no seio da solução, respectivamente. Experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram realizados no ECV/MWCNT/at-pNA, em uma solução de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ em KCl 0,1 M. A partir das inclinações de I_p vs. $\nu^{1/2}$ e utilizando $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $n = 1$, a área ativa foi então obtida, a qual apresentou um valor de $0,19 \text{ cm}^2$ (SANTHIAGO et al., 2009; SILVA et al., 2010).

4.3.7 Emprego do ECV/MWCNT/pol-at-pNA na análise de AU em amostra real

O eletrodo modificado ECV/MWCNT/pol-at-pNA foi imerso em uma solução (0,1 M) de tampão fosfato pH 7,0, sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de AA, AU e DO, em diferentes concentrações e alíquotas de urina e soro diluídas 25 vezes e 16 vezes respectivamente e os sinais destas foram comparados com o sinal do branco (ausência dos analitos). Nestes experimentos, foi selecionada uma faixa de potencial entre -0,4 a 0,5 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, por voltametria cíclica no sentido anódico, a uma velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} .

4.3.8 Estudo com os isômeros oNA e mNA

4.3.8.1 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e oNA e mNA, com geração de ECV/MWCNT/pol-oNA e ECV/MWCNT/pol-mNA

Foram adicionadas 5 frações sucessivas de $1,0 \mu\text{L}$ da dispersão de MWCNT, em DMF com o auxílio de uma micropipeta, à superfície do eletrodo. Em cada adição, o DMF foi evaporado lentamente em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos para só então serem adicionadas as próximas frações. Para a geração da espécie

eletroativa na plataforma nano-estruturada ECV/MWCNT, o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT foi imerso em soluções da oNA e mNA 3,6 mM, em experimentos separados, e realizadas 20 ciclagens na faixa de 0 a 1,0 V versus Ag/AgCl/Cl⁻ em 4,0 mL de solução de HCl 0,1 M em velocidade de 20 mV s⁻¹.

4.3.8.2 Modificação de ECV/MWCNT/pol-oNA e ECV/MWCNT/pol-mNA, por redução gerando ECV/MWCNT/pol-at-oNA e ECV/MWCNT/pol-at-mNA

Os eletrodos modificados foram imersos em 5 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e realizadas 7 ciclagens na faixa de 0,5 a -1,0 V versus Ag/AgCl/Cl⁻ em velocidade de 20 mV s⁻¹, com redução do grupo nitro presente na molécula, gerando o par redox hidroxilamina/nitroso, responsável pela mediação redox.

4.9 Estudos Cronoamperométricos

O eletrodo modificado ECV/MWCNT/pol-at-pNA foi imerso em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0 onde as curvas de corrente versus tempo foram obtidas com $E_{\text{inicial}} = +0,050$ V e $E_{\text{final}} = -0,100$ V, em várias concentrações de AA.

4.10 Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AU, AA e DO no ECV/MWCNT/pol-at-pNA

O sensor ECV/MWCNT/pol-at-pNA foi imerso em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0). Os amperogramas para a oxidação de AA, DO e AU foram obtidos em diferentes concentrações e potenciais aplicados de +0,100 V, +0,225 V e +0,325 V versus Ag/AgCl/Cl⁻ respectivamente.

4.11 Preparo dos sais de diazônio

Em um béquer foram adicionados 0,6906 g (10 mmol) de pNA e 5 mL de água. Foram acrescentados, com vigorosa agitação magnética e em um banho de gelo, 3 mL de HCl 6 mol L⁻¹. A seguir, adicionou-se gota-a-gota, uma solução previamente gelada contendo 7 mL de água destilada e 0,414 g (12 mmol) de nitrito de sódio (CUNHA et al., 2013). Esse sistema ficou sob agitação durante 30 min.

4.12 Preparo do eletrodo grafitado ECV/graf-pNA

Para a preparo da espécie eletroativa no ECV, o eletrodo de carbono vítreo foi imerso em uma solução contendo 1 mL da solução de sal de diazônio a partir da

pNA, de 5,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7 e realizadas 20 ciclagens na faixa de 0 a 1,0 V versus Ag/AgCl/Cl⁻ em velocidade de 20 mV s⁻¹.

4.13 Preparo do eletrodo quimicamente modificado ECV/graf-at-pNA

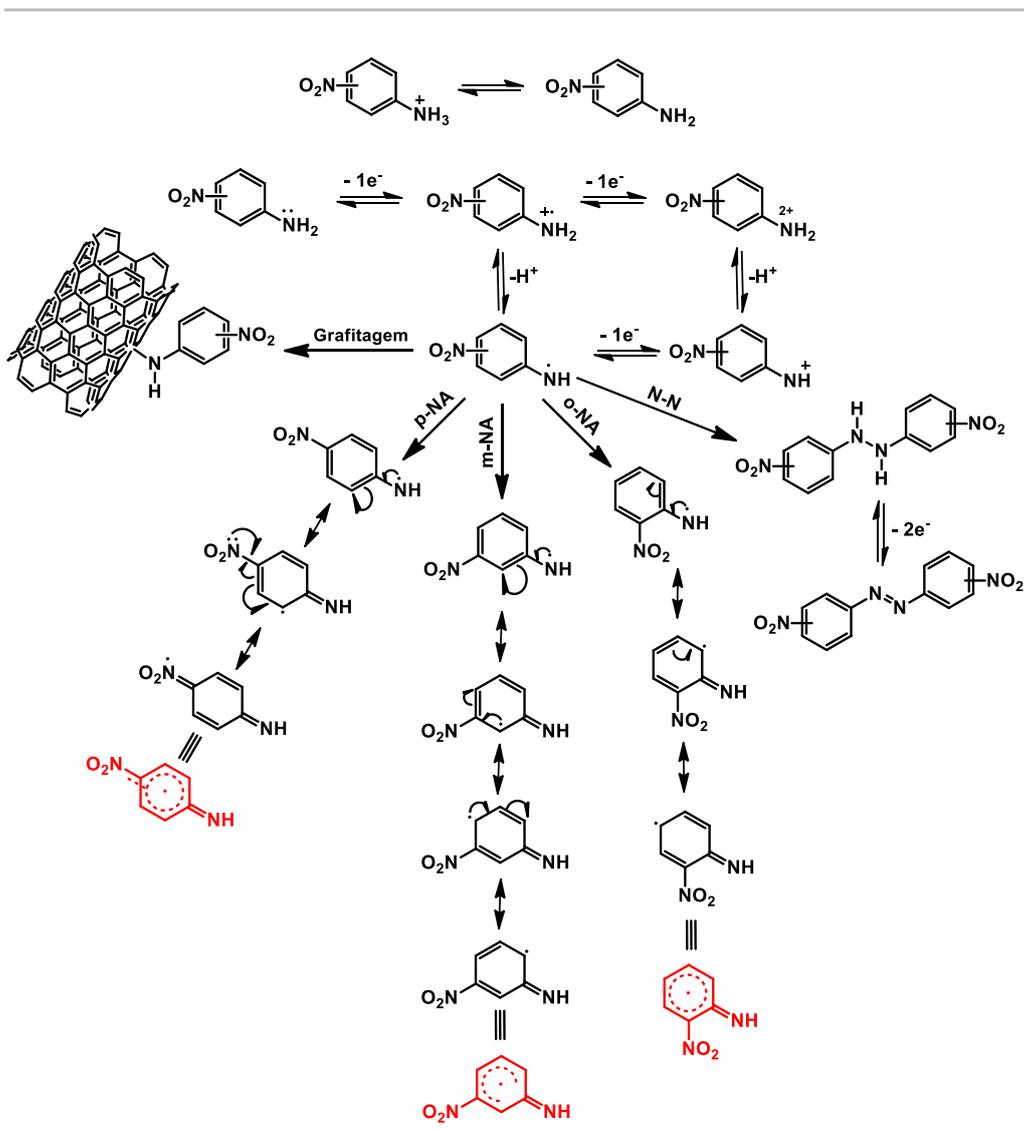
O ECV/graf-pNA foi imerso em 5 mL de solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e realizadas 7 ciclagens na faixa de 0,5 a -1,0 V versus Ag/AgCl/Cl⁻, em velocidade de 20 mV s⁻¹, gerando o eletrodo grafitado ativado, ECV /graf-at-pNA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Previsão de reatividade, na oxidação de nitroanilinas

É possível prever a reatividade das nitroanilinas a partir da oxidação, via 1 elétron, após desprotonação (Figura 10, parte A), em meio aprótico, com as devidas estruturas canônicas de ressonância. São previstos intermediários diferentes que levarão a polímeros diferenciados.

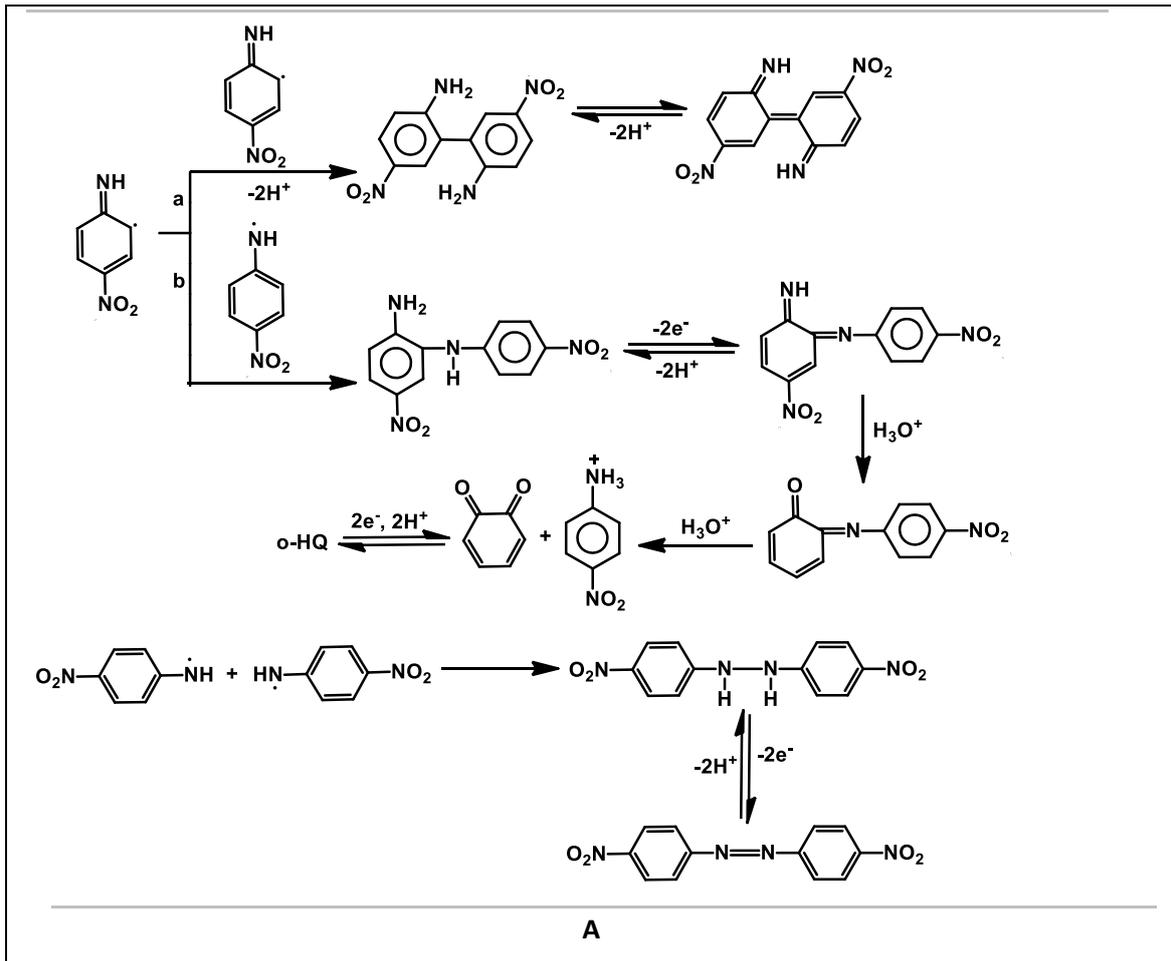
Figura 10 - Mecanismo previsto para a oxidação de *orto*, *meta* e *para*-nitroanilina.

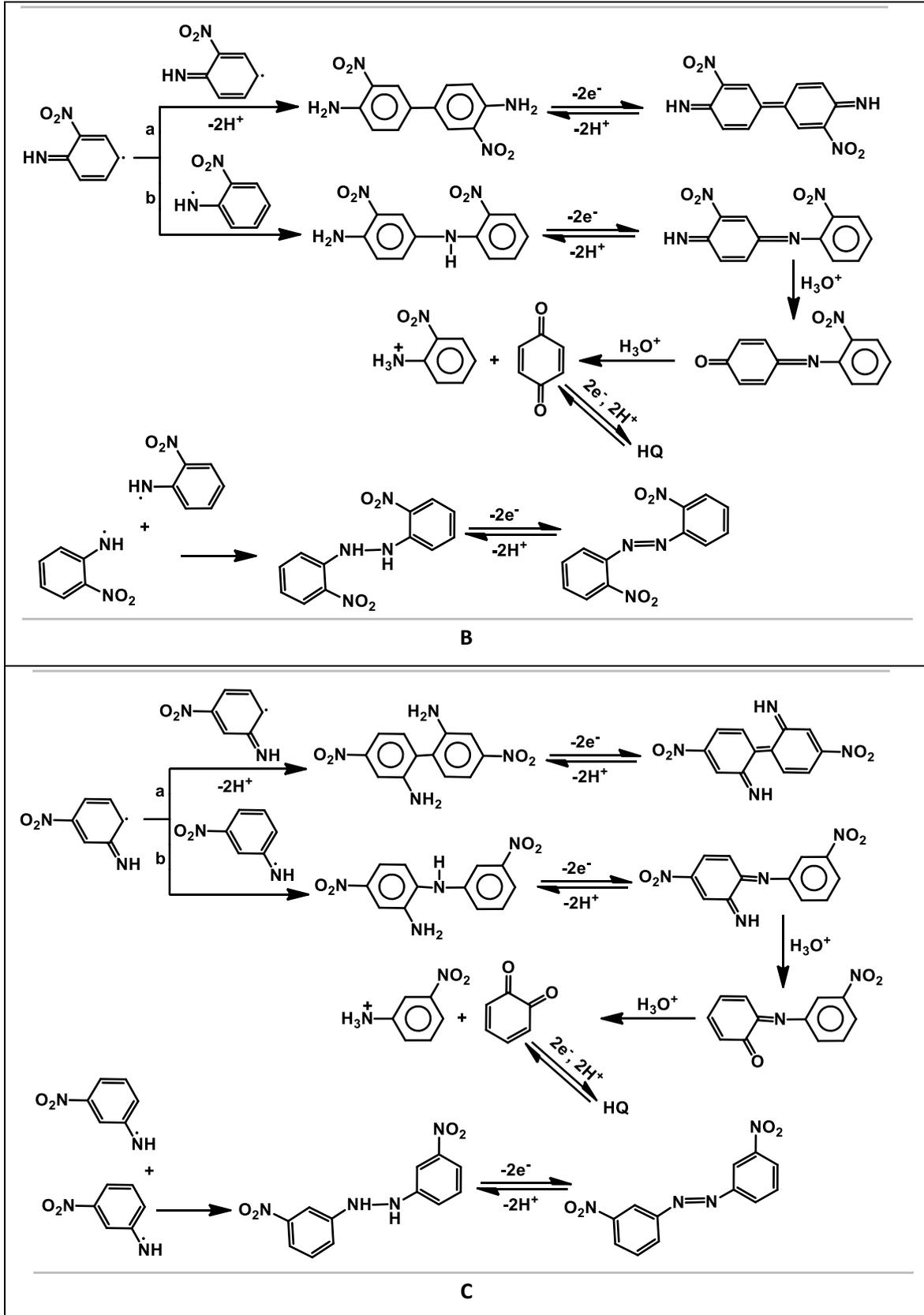


Fonte: Hammerich. O. et al, 2015.

Com base na literatura, também foi possível sugerir possíveis mecanismos para o acoplamento entre os radicais oriundos de cada isômero (Figura 10), sendo a figura 11-A, o mecanismo esperado para os radicais de pNA, 11-B, de oNA e 11-C, de mNA. Oxidações e reduções sucessivas são possíveis e não foram mostradas.

Figura 11 - Mecanismo para oxidação dos isômeros pNA (Figura 11-A), oNA (Figura 11-B) e mNA (Figura 11-C).





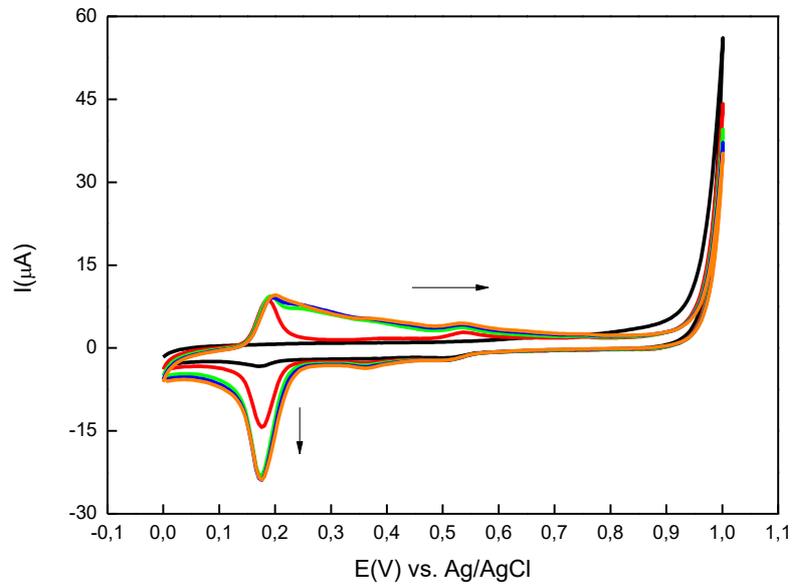
5.2 Preparação dos eletrodos modificados

5.2.1 A partir de pNA

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado, depositando-se 5 μL de uma dispersão 1 mg mL^{-1} de nanotubos de carbono (MWCNT) tratados, em DMF. Posteriormente, a pNA foi eletrodepositada *in situ* sobre ECV/MWCNT, a partir de uma solução 3,6 mM, através de sucessivas varreduras de potencial com $E_{\text{inicial}} = 0,0 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl^{-} (20 ciclos, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$) (Figura 12). Observa-se um par de picos ($E_{\text{pa}} = 0.186 \text{ V}$; $E_{\text{pc}} = 0.173 \text{ V}$), muito próximos, com perfil característico de adsorção. Os picos se intensificam até a saturação, após 5 varreduras. Picos menos intensos são observados em potenciais mais anódicos. Embora, sem confirmação estrutural, é possível que o dímero *orto*-di-iminoquinonametídeo (Figura 11A) tenha sido formado.

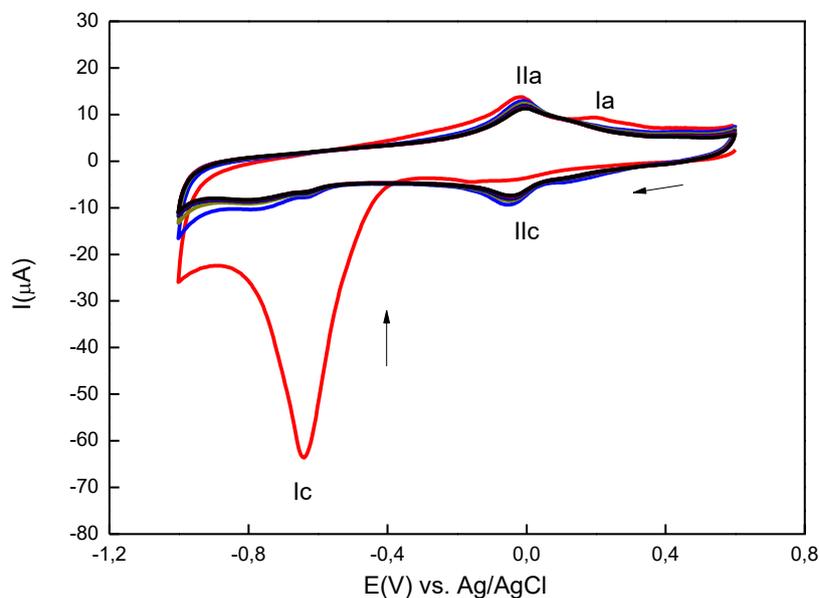
Em seguida, o ECV/MWCNT/pol-pNA obtido foi lavado e imerso em uma nova solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. Houve redução do grupo nitro, em potencial relativo ao pico I_{c} , gerando, entre outros sistemas, o par redox hidroxilamina/nitroso ($I_{\text{la}} = -0,012 \text{ V}$ / $I_{\text{lc}} = -0,05 \text{ V}$) com $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl^{-} (Figura 13) e o eletrodo modificado foi designado ECV/MWCNT/pol-at-pNA.

Figura 12- Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para gerar ECV/MWCNT/pol-pNA, a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (◆), 10 (◇), 15 (◆) e 20 (◆).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação da pol-pNA, gerando ECV/MWCNT/pol-at-pNA, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Voltamogramas 1 (◆) e 7 (◆).



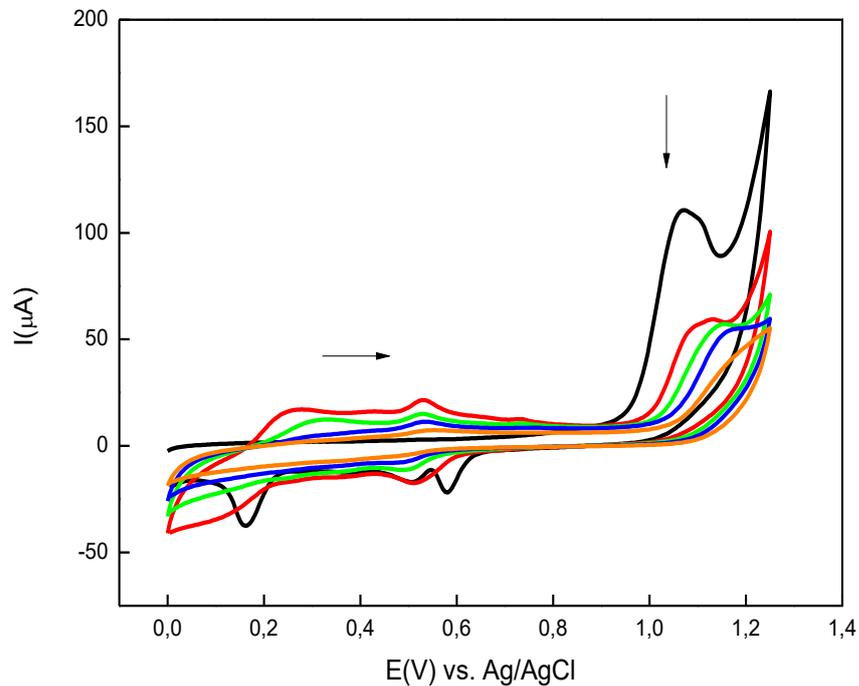
Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

No intuito de otimizar a eletrodeposição *in situ* da fase sensora do eletrodo modificado e a eficiência eletrocatalítica na presença dos analitos alvos: AA, DO e AU, bem como avaliar a importância das espécies eletrogeradas nas varreduras sucessivas de potencial apresentadas nos voltamogramas da Figura 12, foram selecionadas, estrategicamente, algumas faixas de potencial de inversão.

A primeira janela de potencial teve uma faixa de 0 a 1,25 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ como pode ser observado na Figura 14, temos o surgimento de novos picos referentes à oxidação da pNA, em meio ácido. Após 20 varreduras, estes praticamente desaparecem. O pico anódico, relativo à pNA, decresce em intensidade e sofre deslocamento anódico.

Além disso, a fase sensora apresentou resposta eletrocatalítica inferior para a detecção de AA, AU e DO, quando comparado com a primeira faixa de potencial estudada apresentada na Figura 12, bem como uma diminuição na estabilidade do pNA eletrogerado *in situ* sobre a plataforma nano-estruturada ECV/MWCNT. Há forte probabilidade de ter acontecido um processo de grafitação, o que tornou a superfície do eletrodo menos disponível ao processo de transferência de elétrons.

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,25 V vs. Ag/AgCl/Cl- para a modificação do ECV/MWNCT com pNA a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M, e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Após serem realizados novos experimentos na faixa de potencial de 0,4 a 1,3 V (Figura 15), observou-se uma menor estabilidade da plataforma eletrogerada. Constatou-se que era desnecessário alcançar potenciais mais anódicos.

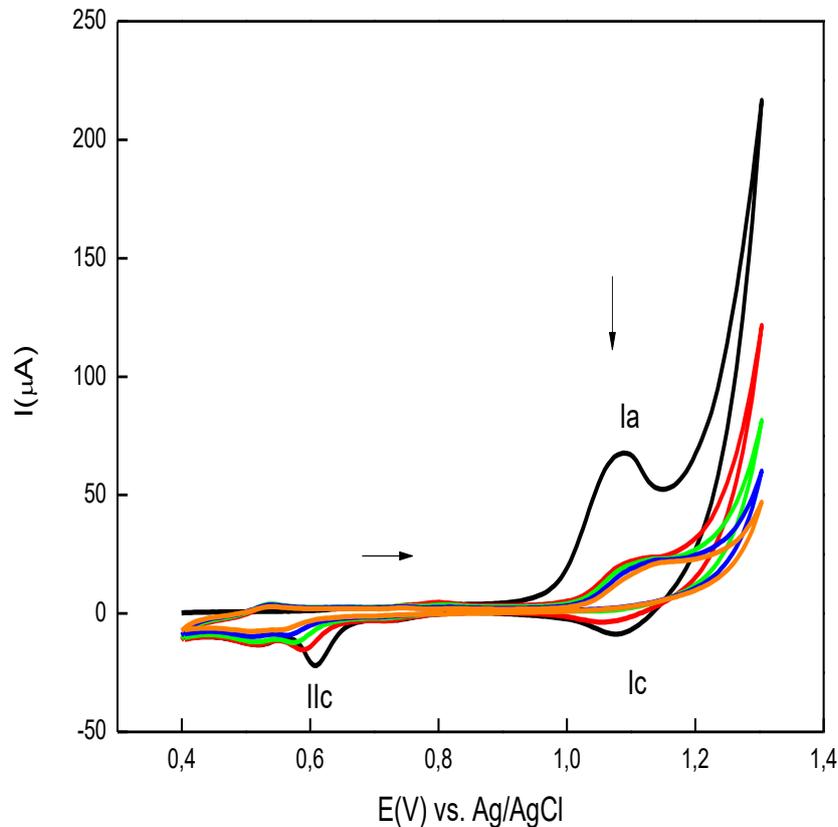
Portanto, a faixa de potencial compreendida entre 0 a 1,0 V (Figura 12) mostrou-se a mais eficiente para se obter uma melhor resposta na eletrocatalise de AA, DO e AU e uma maior separação entre os potenciais de oxidação desses analitos para sua determinação simultânea.

Por essa razão, esta faixa de potencial foi selecionada para os estudos seguintes, levando-se, portanto, em consideração, a estabilidade e eficiência na resposta eletrocatalítica.

Como pode ser observado, os processos interfaciais, neste trabalho, são bastante complexos, sugerindo, a necessidade de lançar mão de técnicas de

superfície na tentativa de compreender a dinâmica dos eventos eletroquímicos. A elucidação destes eventos foge ao escopo da presente dissertação.

Figura 15 - Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0,4 a 1,3 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com pNA a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (◆), 5 (◆), 10 (◆) 15 (◆) e 20 (◆).



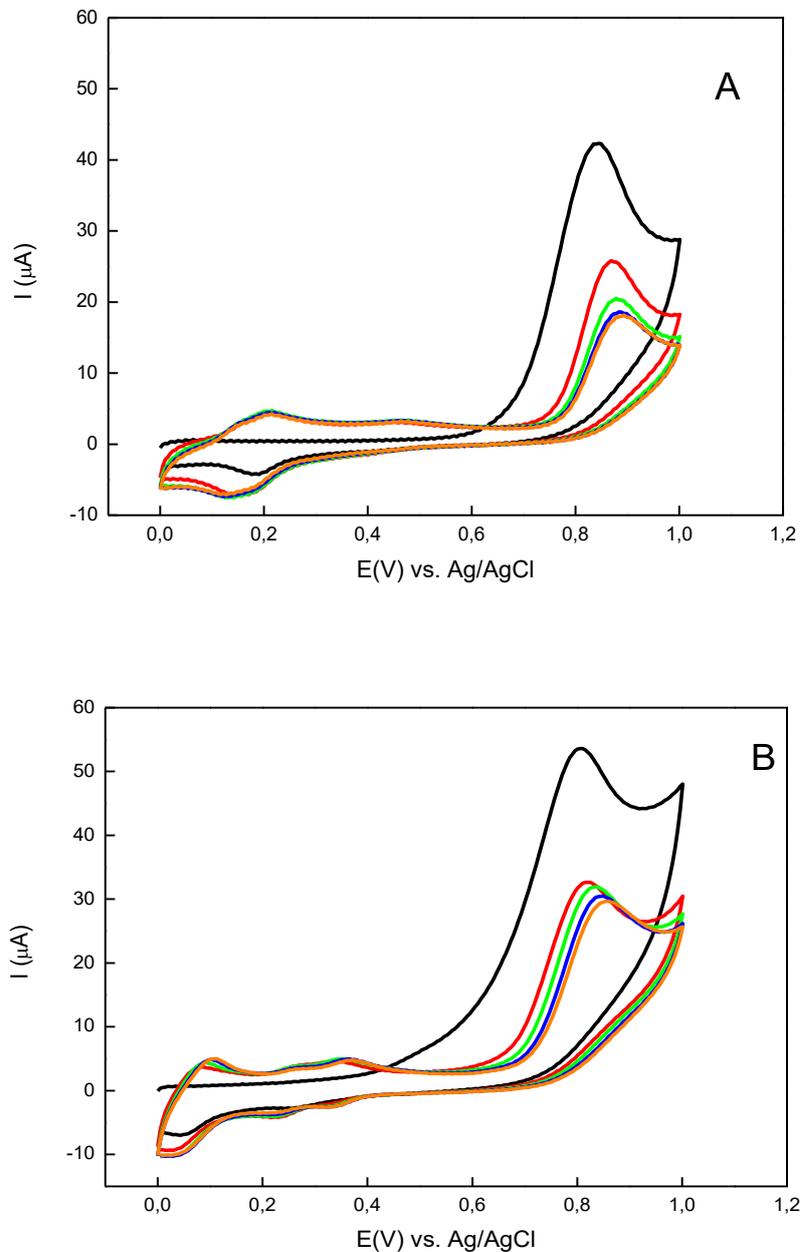
Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.3 Comportamento Eletroquímico da p-nitroanilina (pNA) em diferentes valores de pH

O pH influencia diretamente no comportamento eletroquímico de compostos que trazem em sua estrutura grupos ionizáveis. O pKa ou coeficiente de ionização é uma das principais propriedades físico-químicas de moléculas. Ele descreve a extensão da ionização de grupos funcionais (LIMA et al., 2001; AVDEEF et al., 1999).

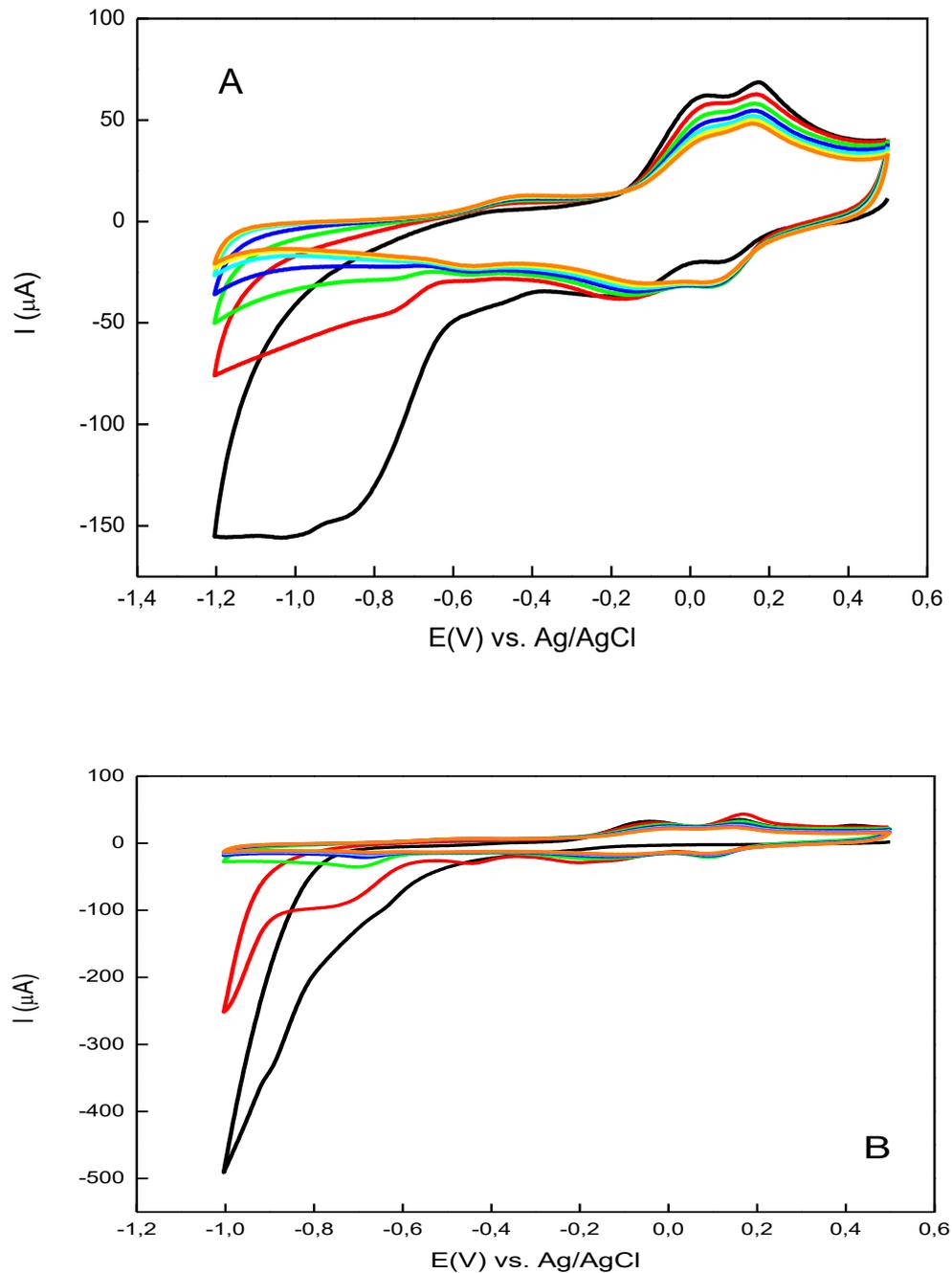
Fez-se necessário verificar a influência do pH (Figura 16) no processo de modificação da pNA no sistema ECV/MWNCT, para alcançar melhores respostas na determinação dos analitos.

Figura 16 - Voltamogramas cíclicos para a modificação ECV/MWNCT com pNA a 3,6 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ em pH (A) 7,0; (B) 10,0. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 17- Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de pNA, após incorporação ao eletrodo, gerando ECV/MWCNT/at-pol-pNA, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 para modificação em pH 7,0 (A) e pH 10 (B). Voltamogramas 1 (◆), 2 (◆), 3 (◆), 4 (◆), 5 (◆), 6 (◆) e 7 (◆).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

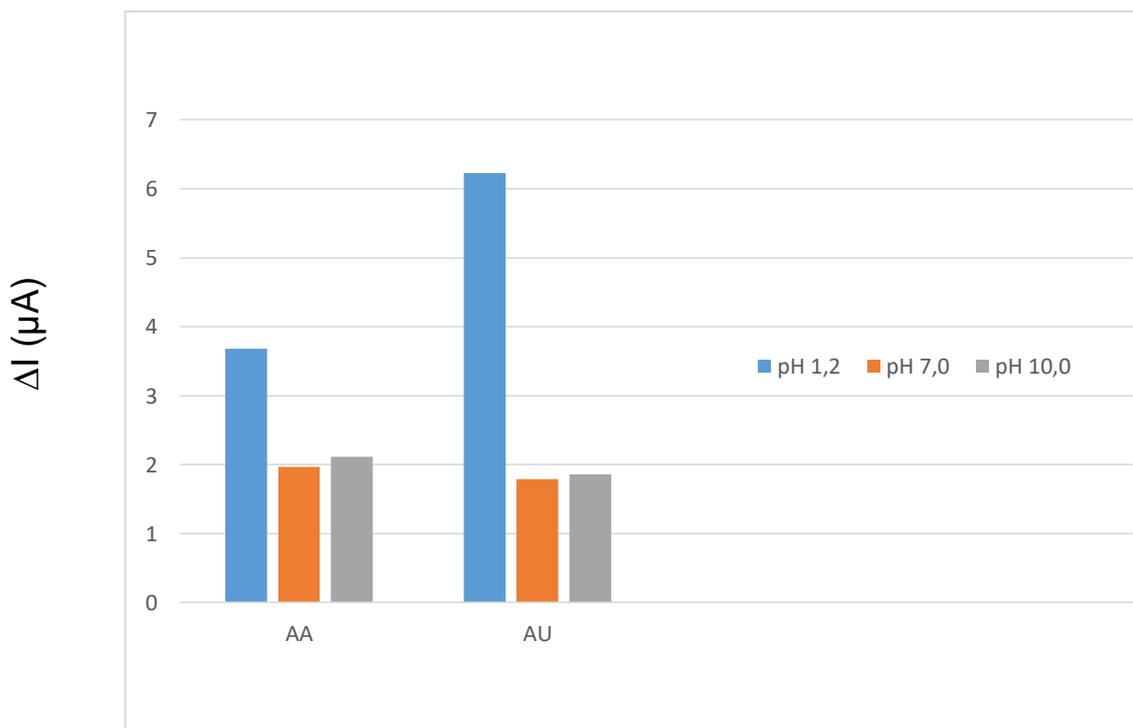
A partir desse estudo de comparação de pH na etapa de modificação da plataforma ECV/MWCNT, verifica-se que não há variação significativa entre os potenciais de oxidação para os analitos estudados.

5.4 Análise dos eletrodos modificados quanto à eletroanálise de AA e AU

Os EQM preparados conforme mostrado nos itens anteriores foram utilizados na eletroanálise de AA e AU, em tampão fosfato, pH 7,0, e as correntes de oxidação comparadas.

Os valores de variação de corrente (ΔI) são mostrados na figura 18. Com base na comparação, o sensor ECV/MWCNT/pol-at-pNA, com polimerização realizada em condições ácidas e ativação em valor de pH neutro (ítems 4.3.4 e 4.3.5), demonstrou maior ganho de corrente, para o pH utilizado neste trabalho (1,2).

Figura 18 - ΔI vs pH para ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em diferentes condições e valores de pH, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na presença de AA e AU. (♦) pH 1,2, pH 7,0 (♦) e pH 10,0 (♦).

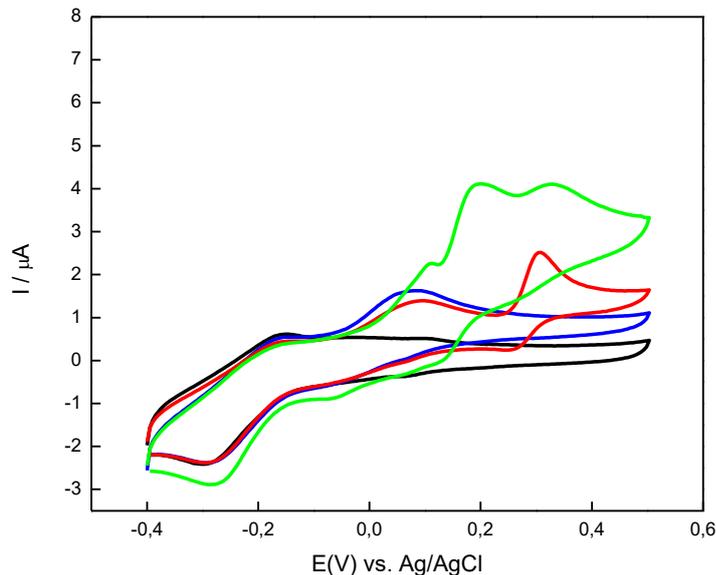


Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.5 Oxidação de AA, DO e AU em ECV/MWCNT/pol-pNA

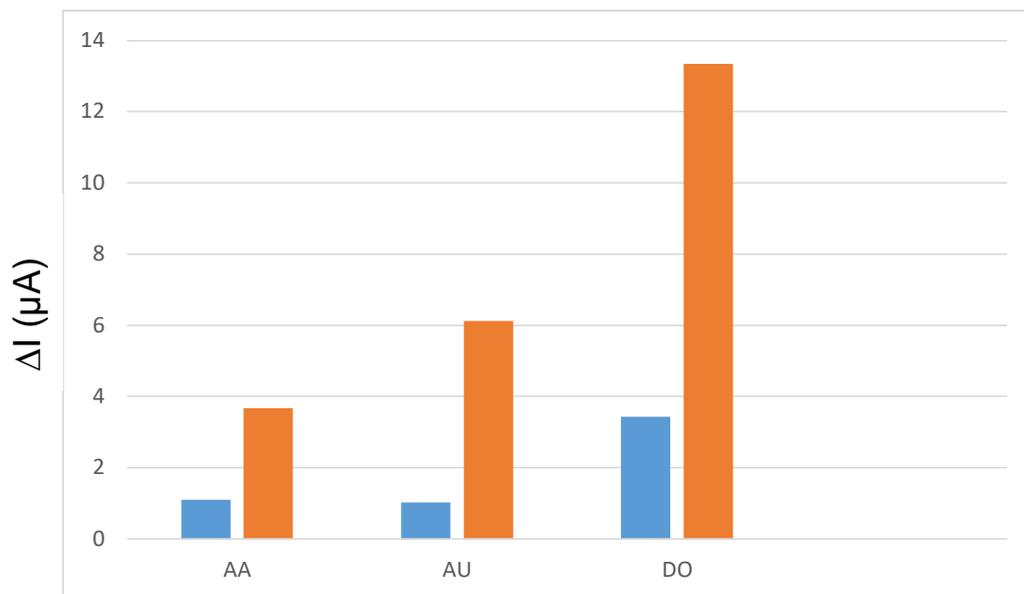
No intuito de comprovar a eficácia do ECV/MWCNT/pol-at-pNA, foram feitas análises com o sensor sem a etapa de redução do grupo nitro (ECV/MWCNT/pol-pNA). A figura 19 mostra os voltamogramas para a determinação simultânea de AA, AU e DO em ECV/MWCNT/pol-pNA que apresentou $E_{pa_{AA}}$, $E_{pa_{DO}}$ e $E_{pa_{AU}}$ próximos. A partir da tabela 4, observou-se que para o sistema ECV/MWCNT/pol-pNA, não houve variação significativa de potencial de oxidação para os três analitos quando comparado com os potenciais de ECV/MWCNT/pol-at-pNA. Mas quando comparadas as variações de corrente (Figura 20), observou-se que os valores de ECV/MWCNT/pol-pNA são menores do que em ECV/MWCNT/pol-at-pNA (Figura 21-C), indicando que o sistema analisado é menos sensível.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWNCT/pol-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na presença de AA, DO e AU. Branco 1 (♦), 400 μM AA (♦), 400 μM AA + 200 μM AU (♦), 400 μM AA + 200 μM AU + 100 μM DO (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 20 - ΔI para ECV/MWNCT/pol-pNA e ECV/MWNCT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, na presença de AA, AU e DO. (♦)ECV/MWNCT/pol-pNA e (◆)ECV/MWNCT/pol-at-pNA.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.6 Oxidação de AA, DO e AU em ECV/MWCNT/pol-at-pNA

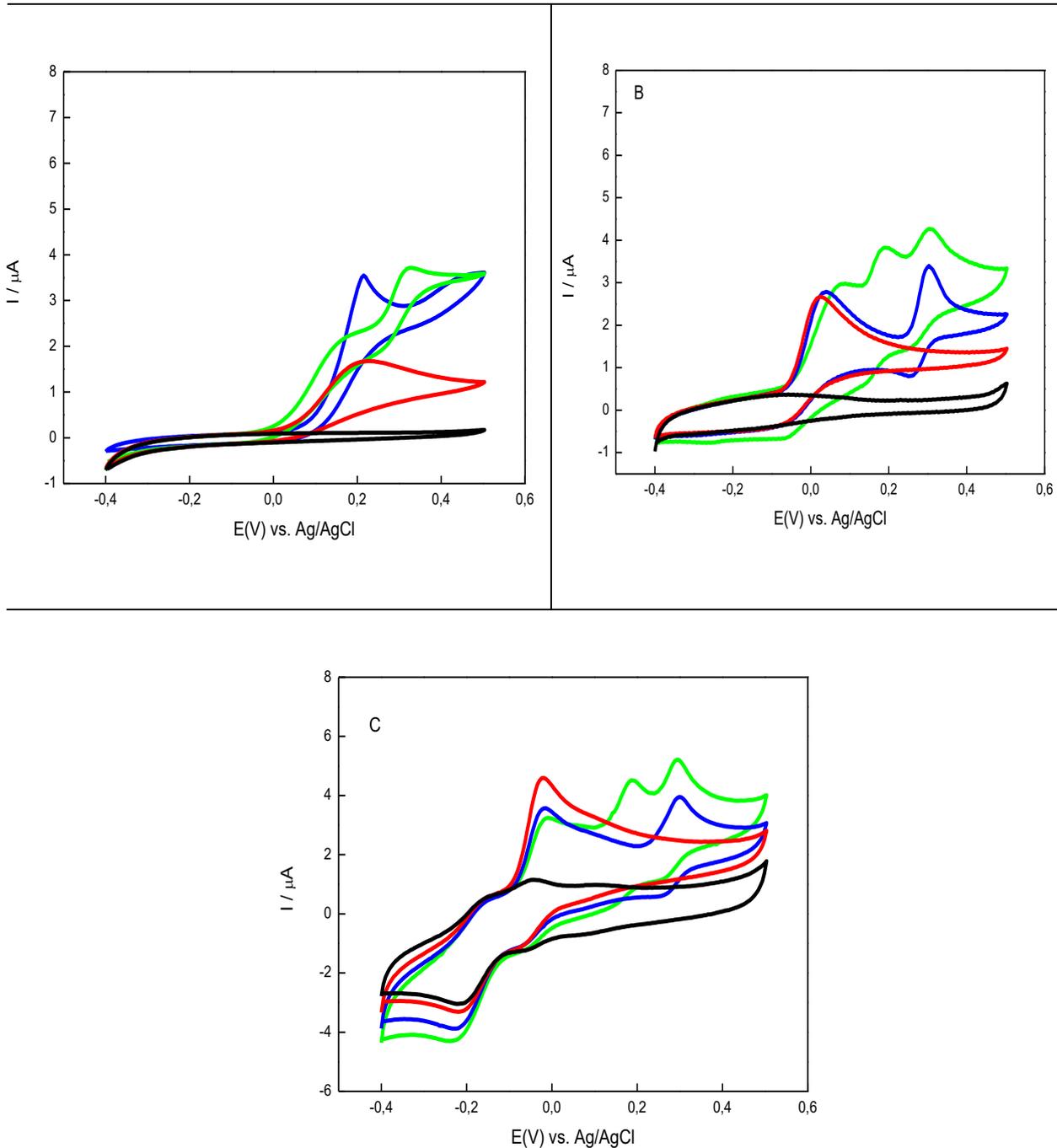
A atividade eletroanalítica do ECV/MWCNT/pol-at-pNA foi avaliada na oxidação de AA, DO e AU.

Na figura 21, o voltamograma cíclico representa o ECV/MWCNT/pol-at-pNA, no qual, o polímero ativado, pol-at-pNA tem papel como mediador redox, baseado em um sistema eletrogerado hidroxilamina/nitroso.

Observou-se efeito eletrocatalítico na oxidação de AA, uma vez que o potencial de oxidação de AA em ECV (Figura 21-A) é em torno de 0,2 V, porém em ECV/MWNCT e ECV/MWNCT/pol-at-pNA, o potencial de oxidação diminui para -0,009 e -0,019 V respectivamente, indicando, desta forma, um efeito eletrocatalítico para a oxidação de AA, oriundo de plataformas nano-estruturadas. Também se observou efeito eletrocatalítico na oxidação de AU, sendo seu potencial de oxidação em ECV (Figura 21-A) de 0,433 V, porém em ECV/MWNCT e ECV/MWNCT/pol-at-pNA, o potencial de oxidação diminui para 0,314 e 0,273 V, respectivamente, indicando efeito eletrocatalítico para oxidação de AU. Nenhum efeito eletrocatalítico foi observado na determinação de DO, uma vez que seus potenciais de oxidação

permaneceram praticamente inalterados nos três sistemas representados na Tabela 3.

Figura 21 - Voltamogramas cíclicos de ECV (A), ECV/MWNCT (B) e ECV/MWNCT/pol-at-pNA (C), em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na presença de AA, DO e AU Branco 1 (\blacklozenge), 400 μM AA (\blacklozenge), 400 μM AA + 200 μM AU (\blacklozenge), 400 μM AA + 200 μM AU + 100 μM DO (\blacklozenge).



Quando uma solução de AA é adicionada, o pico de oxidação, $E_{pa_{AA}} = -0,019$ V vs. Ag/AgCl/ Cl^- aumenta significativamente com o desaparecimento concomitante dos picos de redução (Figura 21-C). Para confirmar a atividade catalítica do eletrodo modificado para a oxidação de AA, soluções de AA e AU foram adicionadas simultaneamente. A análise da figura 21 permite sugerir a natureza catalítica da oxidação de AA, com efeitos menos pronunciados sobre a oxidação de DO e AU. Além disso, a diferença entre os dois potenciais de pico de AA e DO está próxima de 200 mV vs Ag / AgCl, e a de DO e AU em torno de 105 mV vs Ag/AgCl, suficientes para permitir a determinação simultânea e seletiva destes 3 analitos. Em ECV, onde os potenciais de picos de oxidação AA, DO e AU são muito próximos (Tabela 3) é praticamente impossível analisar a contribuição de cada composto na mistura (Figura 21-A). No entanto, na figura 21-B, com ECV modificado com nanotubos de carbono apenas (ECV/MWCNT), $E_{pa_{AA}}$, $E_{pa_{DO}}$ e $E_{pa_{AU}}$ estão separados. Entretanto, o eletrodo modificado com nanotubos de carbono e pNA (Figura 21-C) apresentou maior reprodutibilidade e melhor resposta quando comparado com ECV e ECV/MWNCT.

Tabela 4 – Potenciais referentes a AA, DO e AU

	$E_{pa}(AA)$	$E_{pa}(AU)$	$E_{pa}(DO)$
ECV	0,247 V	0,433 V	0,234 V
ECV/MWNCT	-0,009 V	0,314 V	0,206 V
ECV/MWNCT/pol-pNA	0,078 V	0,283 V	0,190 V
ECV/MWNCT/pol-at-pNA	-0,019 V	0,273 V	0,193 V

Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

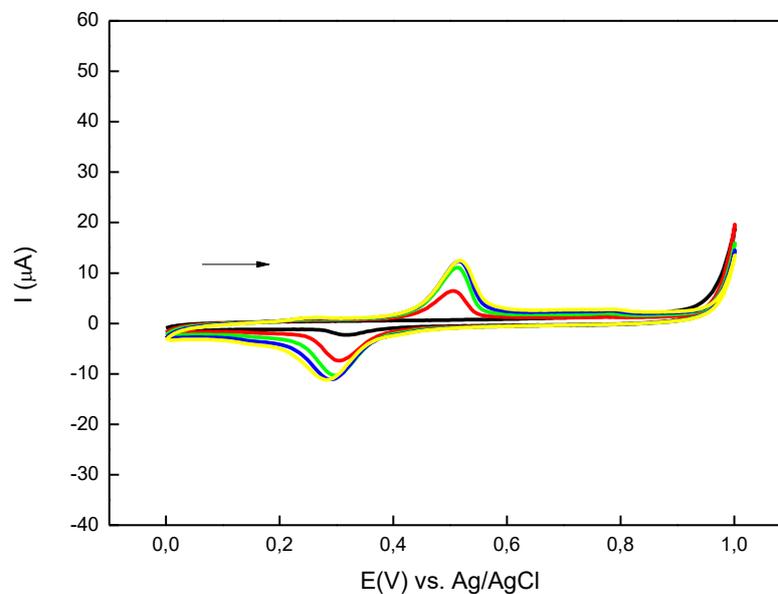
Este resultado mostra um efeito sinérgico entre os nanotubos de carbono e a superfície modificada com pol-at-pNA, para a oxidação catalítica de AA e AU e determinação simultânea de AA, AU e DO. Este comportamento pode ser explicado por uma taxa mais rápida de transferência de elétrons na superfície quimicamente modificada. Adicionalmente, em virtude da diferença estrutural e superficial dos

nanotubos de carbono, o processo de polimerização e ativação torna o sensor mais reprodutível.

5.7 Estudo com os isômeros *o*-nitroanilina (oNA) e *m*-nitroanilina (mNA)

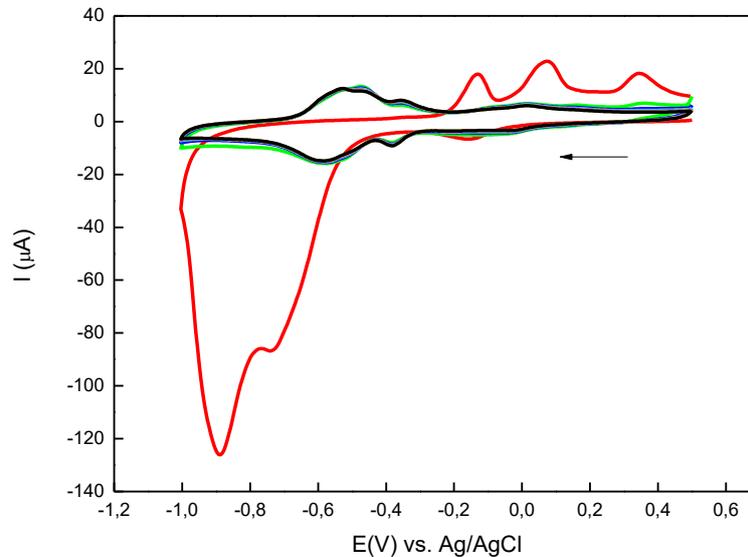
Com o intuito de verificar a influência da posição do grupo nitro na série das nitroanilinas, os isômeros oNA e mNA foram avaliados em relação à sensibilidade e resposta para a detecção de AA e AU, seguindo a mesma metodologia de modificação e ativação do sensor ECV/MWCNT/ pol-at-pNA. A figura 21 evidencia a presença de um sistema quase-reversível, muito diferente do perfil voltamétrico do obtido para pNA (Figura 12), com pico de redução (na segunda varredura) em 0,296 V, associado ao pico de oxidação em 0,516 V, mostrando uma nítida modificação do material eletrodepositado, como já se previa nos esquemas mostrados na figura 11 B, com possível geração de um di-iminoquinonametideo, em posição *para*. Não há indício de adsorção. No processo de ativação (Figura 23), uma série de picos (3) são evidentes, mas, com a sucessão de varreduras (scan 7), um perfil menos complexo é evidenciado, constituído de 2 sistemas redox principais.

Figura 22 - Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com oNA a 3,6 mM, em solução de HCl 0,1 M, e $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦) 15 (♦) e 20 (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

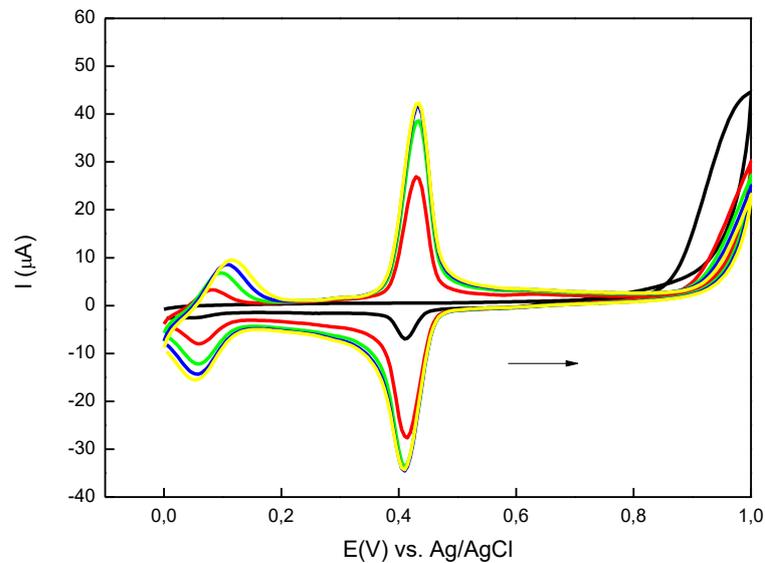
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de oNA, gerando o ECV/MWCNT/pol-at-oNA, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻ tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Voltamogramas 1 (♦) e 7 (◆).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

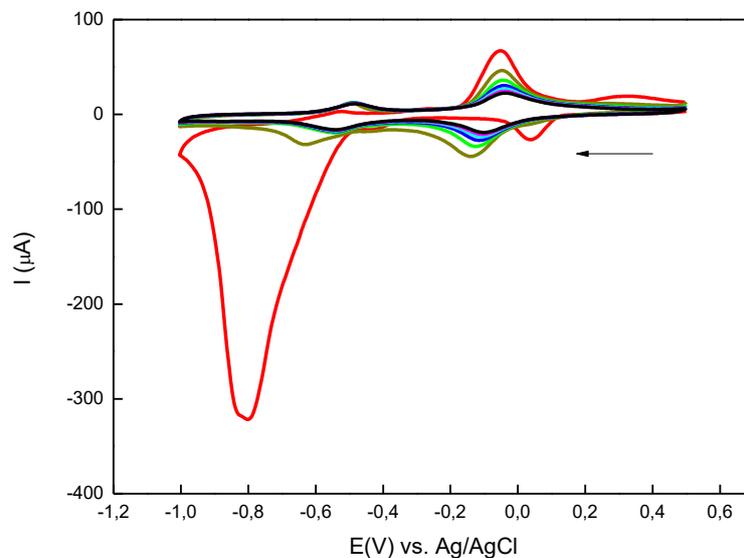
Os resultados dos experimentos realizados com o mNA são mostrados nas figuras 24 e 25. No caso do mNA, por não haver ressonância com o grupo nitroaromático, a oxidação do grupo amina aromático, ocorre mais facilmente. Aparece um pico anódico, na primeira varredura, em $+0,988 \text{ V}$, o que diferencia este sistema dos outros. Conforme visto na figura 12 (C x A), há forte similaridade entre os sistemas mNA e pNA. Há formação de um sistema redox que se adsorve na superfície, com diferença em termos de potenciais, no caso de $E_{\text{pa}_{\text{mNA}}}$ ($0,437 \text{ V}$) e $E_{\text{pc}_{\text{mNA}}}$ ($0,414 \text{ V}$), bem próximos entre si, evidenciando maior dificuldade de oxidação, em relação ao pNA. Há aumento das correntes de pico, até saturação. Há o aparecimento de um sistema redox adicional, difusional, quase reversível, em potenciais pouco positivos. O processo de ativação, por redução do grupo nitro é mostrado na figura 25 e o material resultante apresenta 2 sistemas redox bem comportados.

Figura 24 - Voltamogramas das ciclagens de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a modificação do ECV/MWNCT com a mNA a 3,6 mM, em solução HCl 0,1 M, e $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦), 5 (♦), 10 (♦), 15 (♦) e 20 (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 25 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de mNA, gerando o ECV/MWCNT/pol-at-mNA, $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Voltamogramas 1 (♦) e 7 (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

A partir desse estudo inicial de comparação entre as diferentes plataformas nanoestruturadas, fez-se a investigação destas em presença dos analitos.

5.8 Análise dos eletrodos modificados quanto à eletroanálise de AA e AU

Investigou-se o efeito da superfície dos eletrodos em relação à análise de AA e AU. Os dados foram apresentados na tabela 4.

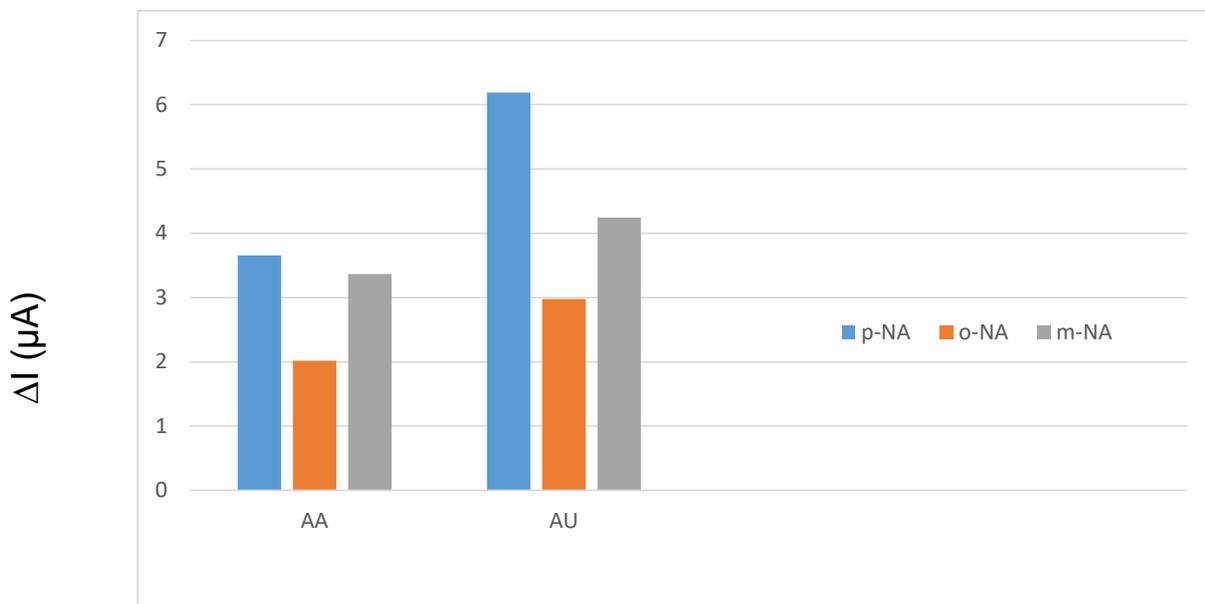
Verifica-se que não há variação significativa entre os potenciais de oxidação para os analitos estudados. Quando comparados os valores de variação de corrente (ΔI) (figura 26), o sensor ECV/MWCNT/pol-at-pNA demonstrou maior ganho, em relação aos ECV/MWCNT/pol-at-oNA e ECV/MWCNT/ pol-at-mNA, principalmente para a análise de AU.

Tabela 5 – Potenciais referentes à oxidação de AA e AU

Analitos	pol-at-pNA	pol-at-oNA	pol-at-mNA
AA	-0,019 V	-0,006 V	-0,008 V
AU	0,273 V	0,284 V	0,276 V

Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 26 - ΔI para de ECV/MWNCT/pol-at-pNA, ECV/MWNCT/pol-at-oNA e ECV/MWNCT/pol-at-mNA, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, na presença de AA e AU. pNA (\blacklozenge), oNA (\blacklozenge) e mNA (\blacklozenge).



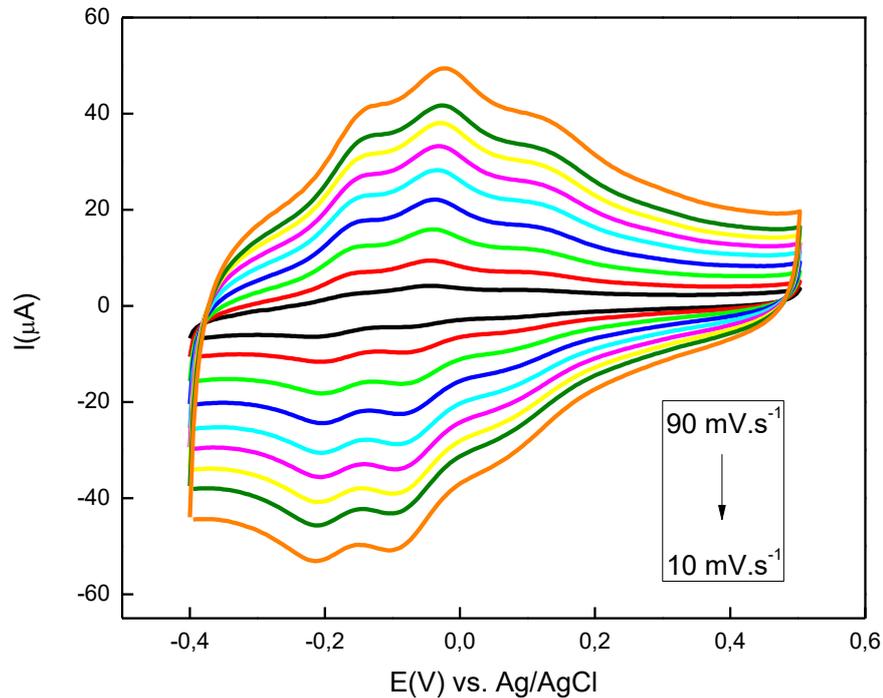
Fonte: Autor desta dissertação, 2016

5.9 Características Cinéticas do ECV/MWCNT/pol-at-pNA

O sucesso do processo eletrocatalítico frente à detecção de AA, DO e AU depende primariamente da eficiência de transferência de elétrons entre o mediador eletrodepositado na plataforma nanoestruturada e o analito.

Para isto, após o processo de modificação *in situ*, a faixa de potencial do par redox foi selecionada, e usando a voltametria cíclica, as características cinéticas do ECV/MWCNT/pol-at-pNA foram estudadas, como pode ser observado na Figura 27.

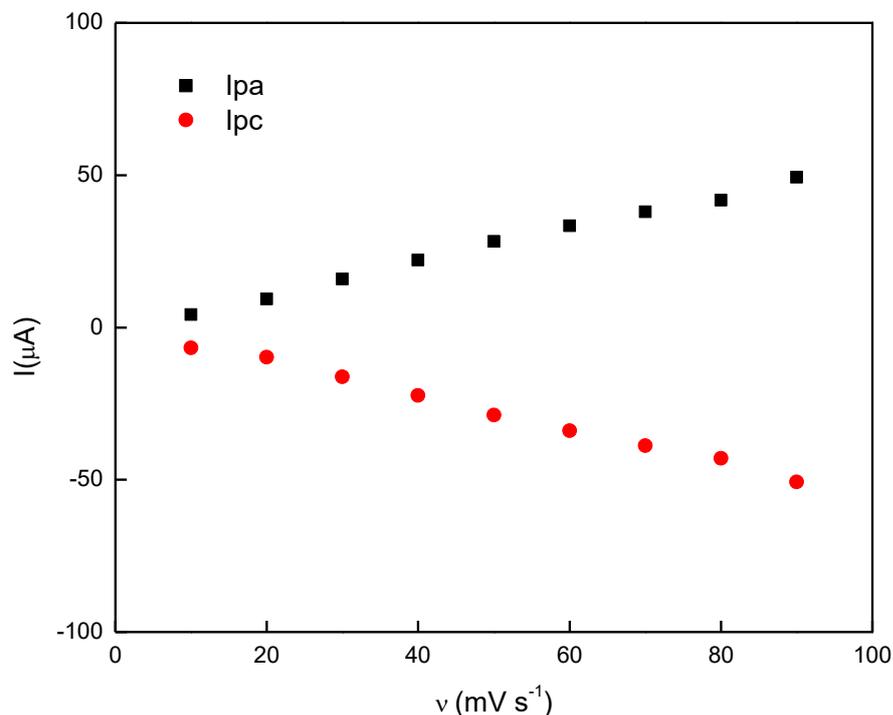
Figura 27 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWCNT/pol-at-pNA em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (10- 90 mV s⁻¹), E_{inicial} = -0,4 V e E_λ = 0,5 V, varredura no sentido anódico.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o ECV/MWCNT/ pol-at-pNA são mostrados na Figura 27, para várias velocidades de varredura de potencial (0,01 – 0,09 V s⁻¹). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos indica que o processo redox exibe características de espécies confinadas na plataforma nanoestruturada à base de nanotubos de carbono, o que pode ser confirmado com a correlação linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura (Figura 28).

Figura 28 - Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

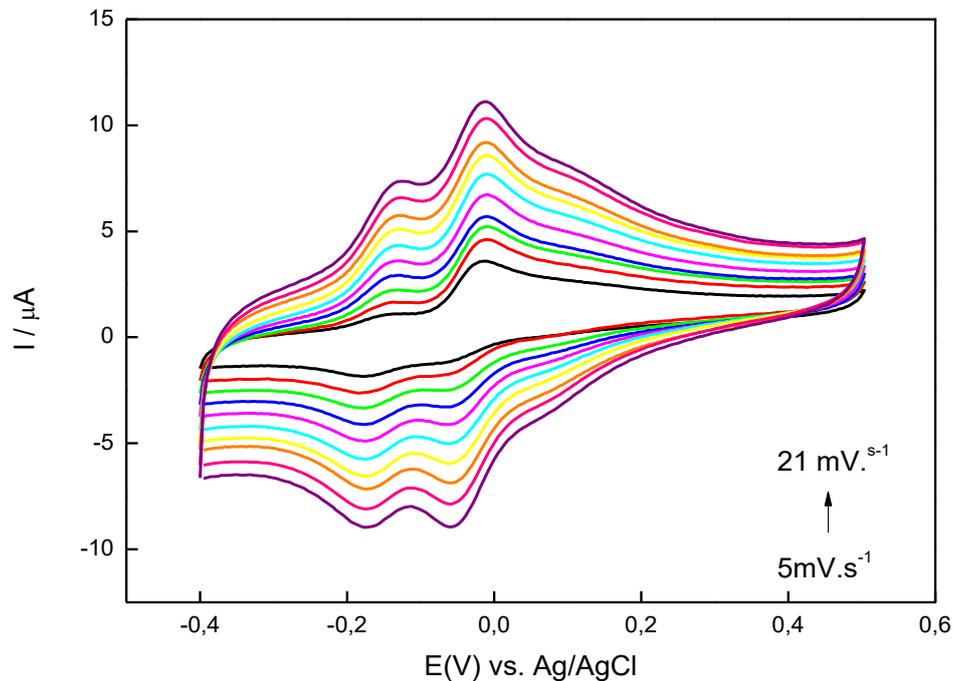
Após o processo de modificação *in situ* da pNA, a estabilidade do par redox (ECV/MWCNT/pol-at-pNA) foi checada por meio de voltamogramas cíclicos sucessivos. A variação da corrente de pico, depois de estabilizada, foi avaliada, com o desvio padrão relativo (DPR) como observado em vários trabalhos (LIMA *et al.*, 2008, LIMA *et al.*, 2009, SANTHIAGO *et al.*, 2009). Assim, após 50 ciclos, foi observado um DPR menor do que 5%, ou seja, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas voltamétricas, sugerindo uma excelente estabilidade da plataforma nanoestruturada à base de MWCNT e pNA.

De maneira a verificar a atividade eletrocatalítica do sensor na presença de AA, alguns ensaios foram realizados.

Após a adição de AA à solução, o pico referente à oxidação de AA aumenta gradualmente de forma significativa como foi visto na Figura 29, com o aumento da velocidade de varredura ocorre também o aumento da corrente de pico da oxidação

de AA, assim como o deslocamento do potencial de oxidação com aumento da velocidade de varredura (Figura 29).

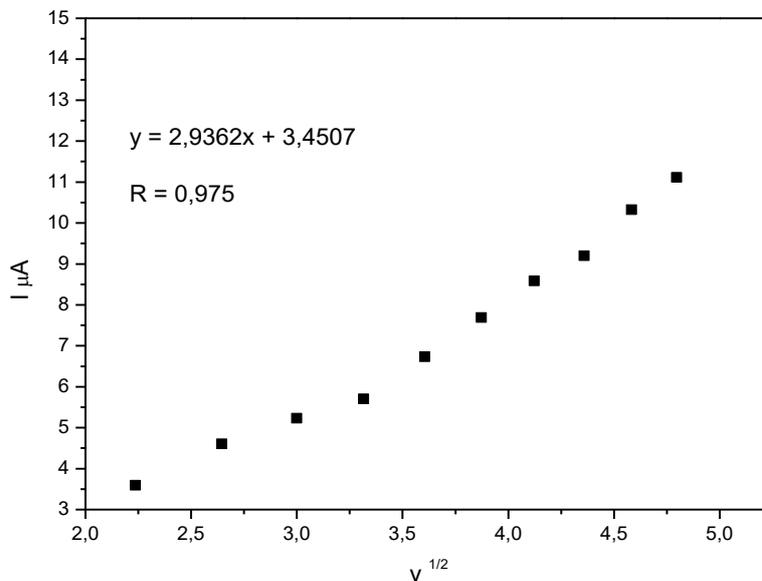
Figura 29 - Voltamogramas cíclicos de ECV/MWCNT/pol-at-pNA em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na presença 0,4 mM AA.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Com o aumento da velocidade de varredura, o pico de oxidação desloca-se gradualmente para potenciais mais positivos, sugerindo uma limitação cinética na reação entre os grupos eletroativos e AA. Por outro lado, um gráfico da corrente catalítica I_{pa} versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) na faixa de velocidade de 0,003 a 0,023 $V s^{-1}$ foi construído e resultou numa dependência linear (Figura 30).

Figura 30 - Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no ECV/MWCNT/ pol-at-pNA, em solução contendo 0,4 mM de AA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e v : 0,005-0,021 $V s^{-1}$.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Assim, esta dependência linear com $v^{1/2}$ sugere que o processo seja controlado por difusão, na faixa de velocidade de varredura de potencial estudada.

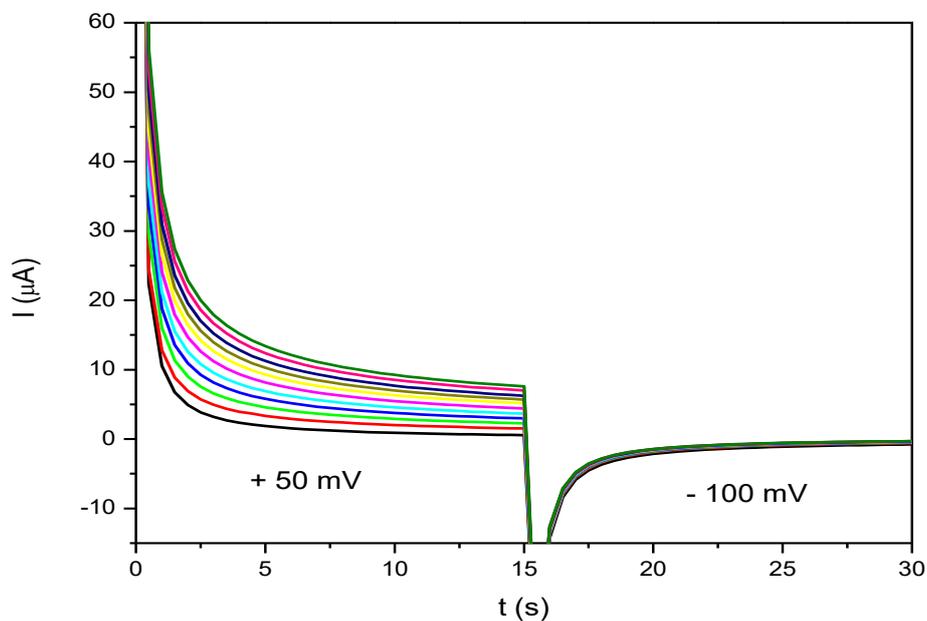
5.10 Estudos Cronoamperométricos

Para a avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de AA frente ao ECV/MWCNT/ pol-at-pNA, no intuito de obter alguns parâmetros cinéticos, foi empregada a cronoamperometria de duplo salto de potencial. A Figura 31 mostra as curvas de corrente *versus* tempo, obtidos com ECV/MWCNT/ pol-at-pNA, $E_{inicial} = +0,050 V$ e $E_{final} = -0,100 V$ *versus* Ag/AgCl/Cl⁻ para várias concentrações de AA, em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador, na presença de AA.

Neste contexto, experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como avaliar as constantes de velocidade do referido processo eletrocatalítico.

Assim sendo, os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de AA, mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície do ECV/MWCNT/ pol-at-pNA. Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de AA, os valores da corrente anódica associada aos amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo reverso (Figura 31).

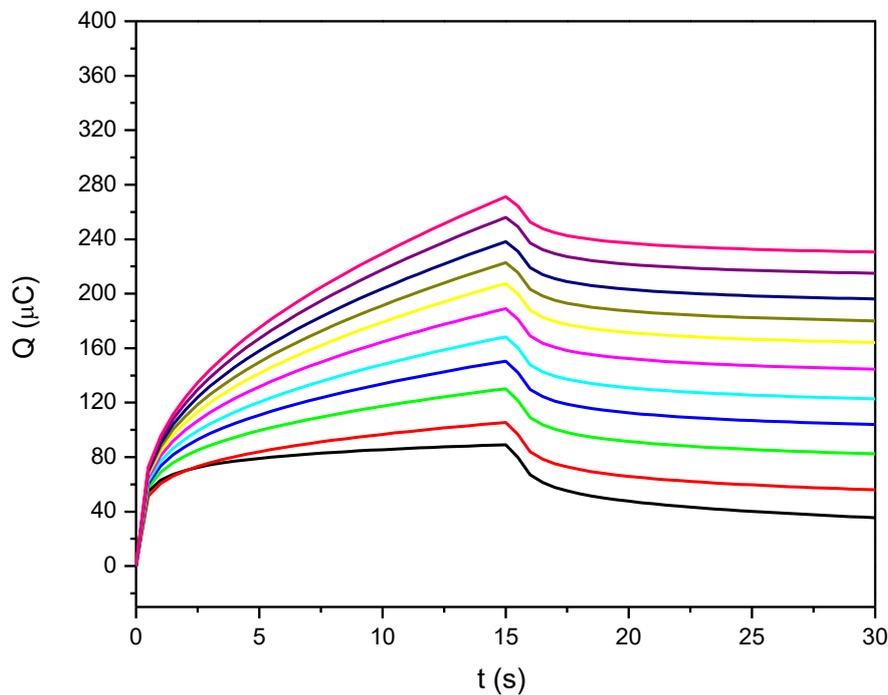
Figura 31 - Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/pol-at-pNA em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. Branco (♦), 100 μ M AA (♦), 200 μ M AA (♦), 300 μ M AA (♦), 400 μ M AA (♦), 500 μ M AA (♦), 600 μ M AA (♦), 700 μ M AA (♦), 800 μ M AA (♦), 900 μ M AA (♦) e 1000 μ M AA (♦).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

A partir da integração dos cronoamperogramas, é possível visualizar melhor a carga, tanto do processo catódico, quanto do anódico. Nestes, há um aumento significativo da carga do referido processo anódico e uma diminuição no processo catódico (Figura 32).

Figura 32 - Integração dos cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/ pol-at-pNA em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. Branco (♦), 100 μ M AA (♦), 200 μ M AA (♦), 300 μ M AA (♦), 400 μ M AA (♦), 500 μ M AA (♦), 600 μ M AA (♦), 700 μ M AA (♦), 800 μ M AA (♦), 900 μ M AA (♦) e 1000 μ M AA (♦).



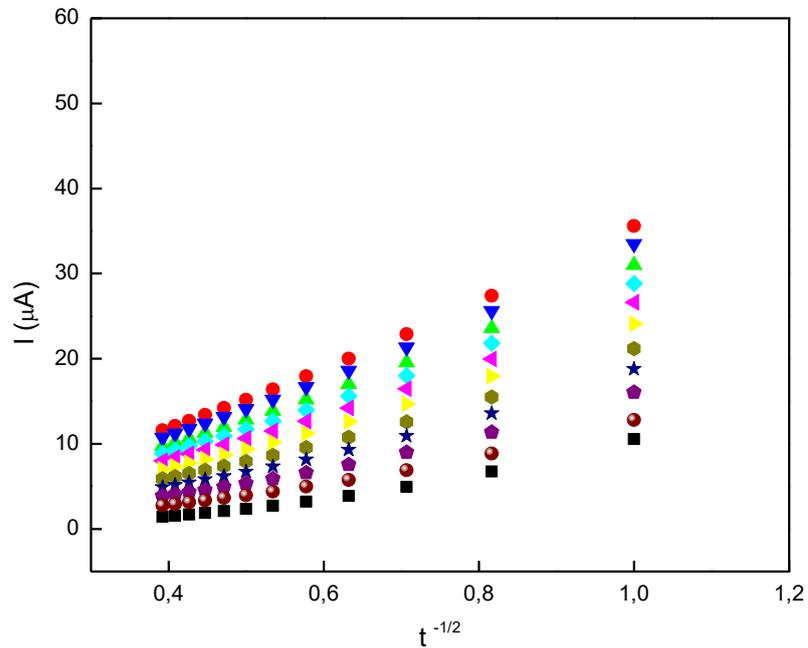
Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Também foi possível usar a cronoamperometria para estimar o coeficiente de difusão de AA em solução. Para um material eletroativo com coeficiente de difusão, D_{AA} , a corrente correspondente à reação química (sob controle difusional) é descrita pela Equação de Cottrell, Equação 2 (BARD e FAULKNER, 2001):

$$I = nFAD_{AA}^{1/2}C_0\pi^{-1/2}t^{-1/2} \text{ (Equação 2)}$$

Sendo D_{AA} e C_0 o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e a concentração de AA no seio da solução ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$), respectivamente. A figura 33 mostra os gráficos de I versus $t^{1/2}$ com o melhor ajuste linear para diferentes concentrações de AA, o qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de AA em solução.

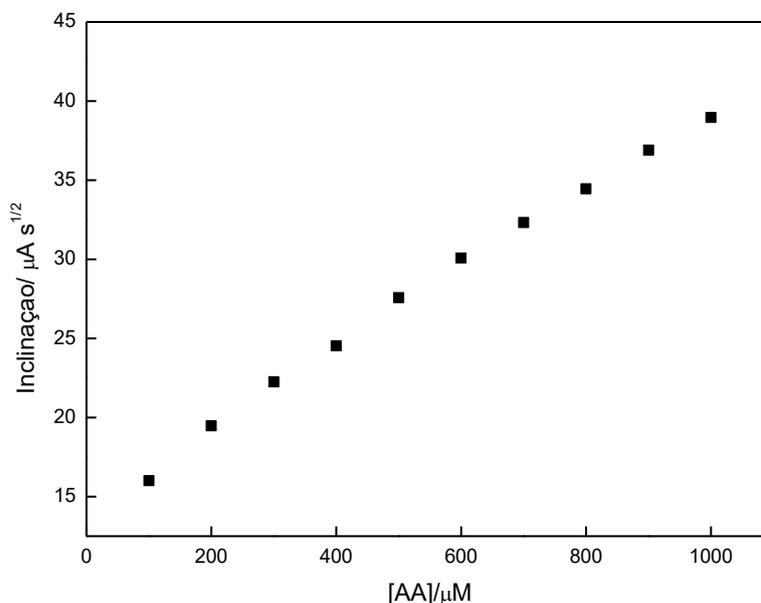
Figura 33- Gráfico de I vs. $t^{-1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 31 em ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. AgAgCl, respectivamente. Branco (◻), 100 μ M AA (◈), 200 μ M AA (◊), 300 μ M AA (◄), 400 μ M AA (◀), 500 μ M AA (◈), 600 μ M AA (◊), 700 μ M AA (◄), 800 μ M AA (◀), 900 μ M AA (◈) e 1000 μ M AA (◊).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Um gráfico a partir das inclinações obtidas das linhas retas *versus* a concentração de AA, foi construído (Figura 34). A partir da inclinação da figura 30 e usando a Equação de Cottrell (Equação 2), um coeficiente de difusão de $3,83 \times 10^{-6}$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ foi obtido para a faixa de concentração de AA estudada. Este valor está próximo aos valores registrados na literatura (LIMA, 2009; SILVA et al., 2012).

Figura 34 - Gráfico de inclinação ($I/t^{-1/2}$) versus a concentração de AA obtidos a partir da Figura 33 do ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7, na ausência e presença de AA, $E_{inical} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. AgAgCl, respectivamente.



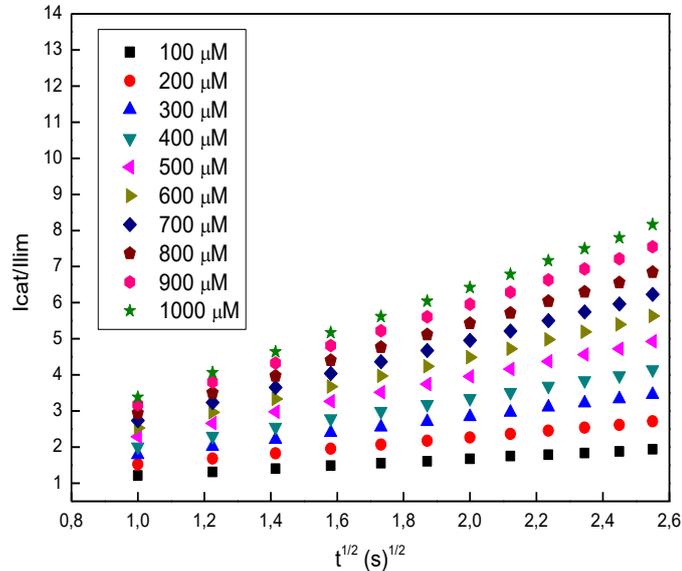
Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

A constante de velocidade, k_{cat} , para a reação química entre o AA e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliada. Este cálculo foi possível através da cronoamperometria com base no método descrito na literatura (GALUS, 1976; LIMA *et al.*, 2008, SANTHIAGO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

$$\frac{I_{cat}}{I_{lim}} = \pi^{1/2} (KC_s T)^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

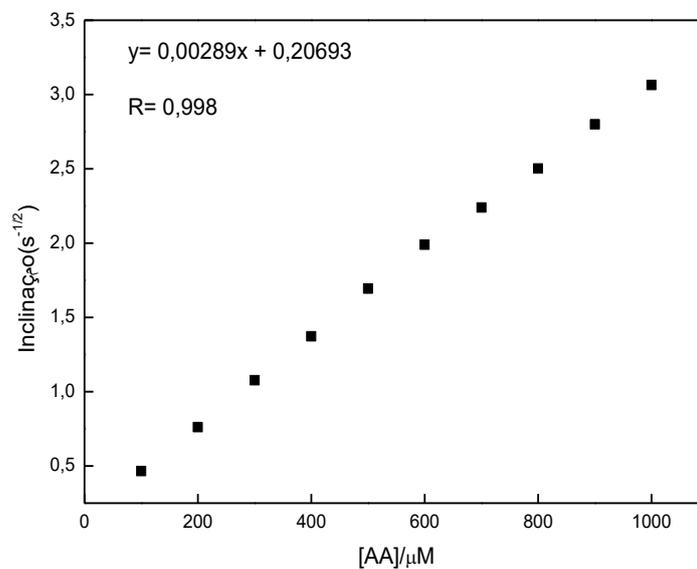
A partir das inclinações do gráfico I_{cat}/I_{lim} versus $t^{1/2}$ (Figura 35), foi possível obter o gráfico da Figura 36 (inclinações vs. [AA]). Assim, usando o novo coeficiente angular da Figura 35 e a Equação 3, determinou-se de forma simples, o valor de k_{cat} , o qual apresentou um valor calculado para k_{cat} na faixa de concentração estudada de $1,879 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Figura 35 - Dependência de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$ provenientes dos cronoamperogramas da figura 31 (IxT) em ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. 100 μ M AA (\blacksquare), 200 μ M AA (\bullet), 300 μ M AA (\blacktriangle), 400 μ M AA (\blacktriangledown), 500 μ M AA (\blacktriangleleft), 600 μ M AA (\blacktriangleright), 700 μ M AA (\blacklozenge), 800 μ M AA (\blacklozenge), 900 μ M AA (\blacklozenge) e 1000 μ M AA (\blacklozenge).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 36 - Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_{lim} vs. concentração de AA em ECV/MWCNT/pol-at-pNA, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = 0,05$ V e $E_{final} = -0,1$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.11 Detecção de AA, AU e DO

Para obter curvas analíticas para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de AA, DO e AU foram realizados em diferentes concentrações em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e potenciais aplicados de +0,100 V, +0,225 V e +0,325 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ apresentados na Figura 37, sendo 37-A para AA, 37-B para DO e 37-C para AU.

Figura 37 - Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AA (Figura 37-A), DO (Figura 37-B) e AU (Figura 37-C) no ECV/MWCNT/pol-at-pNA, obtidas em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0.

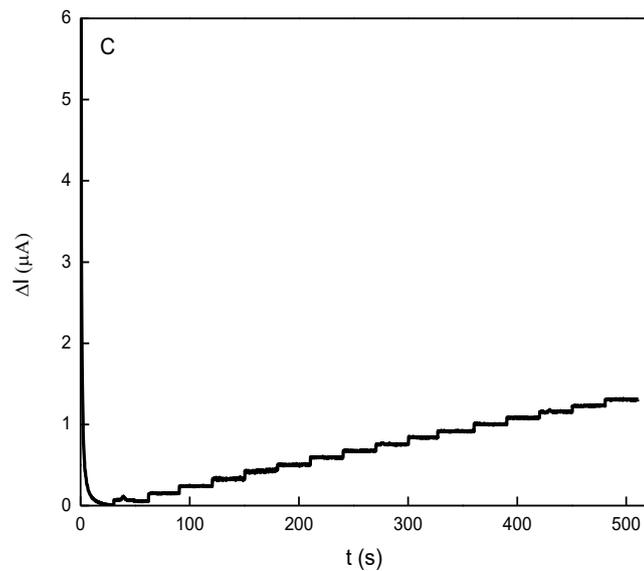
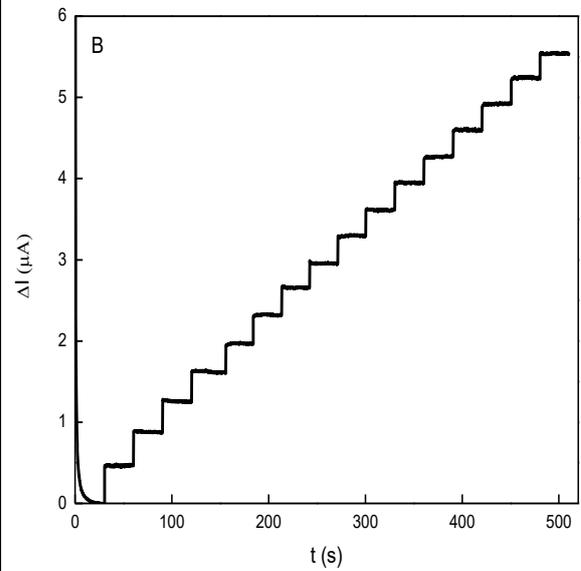
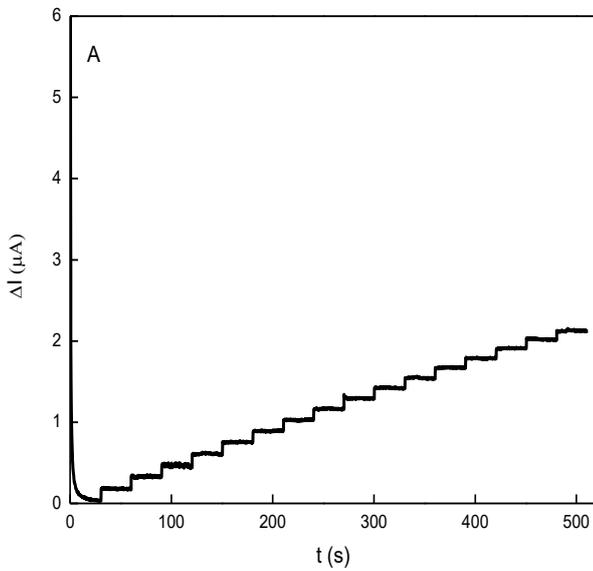
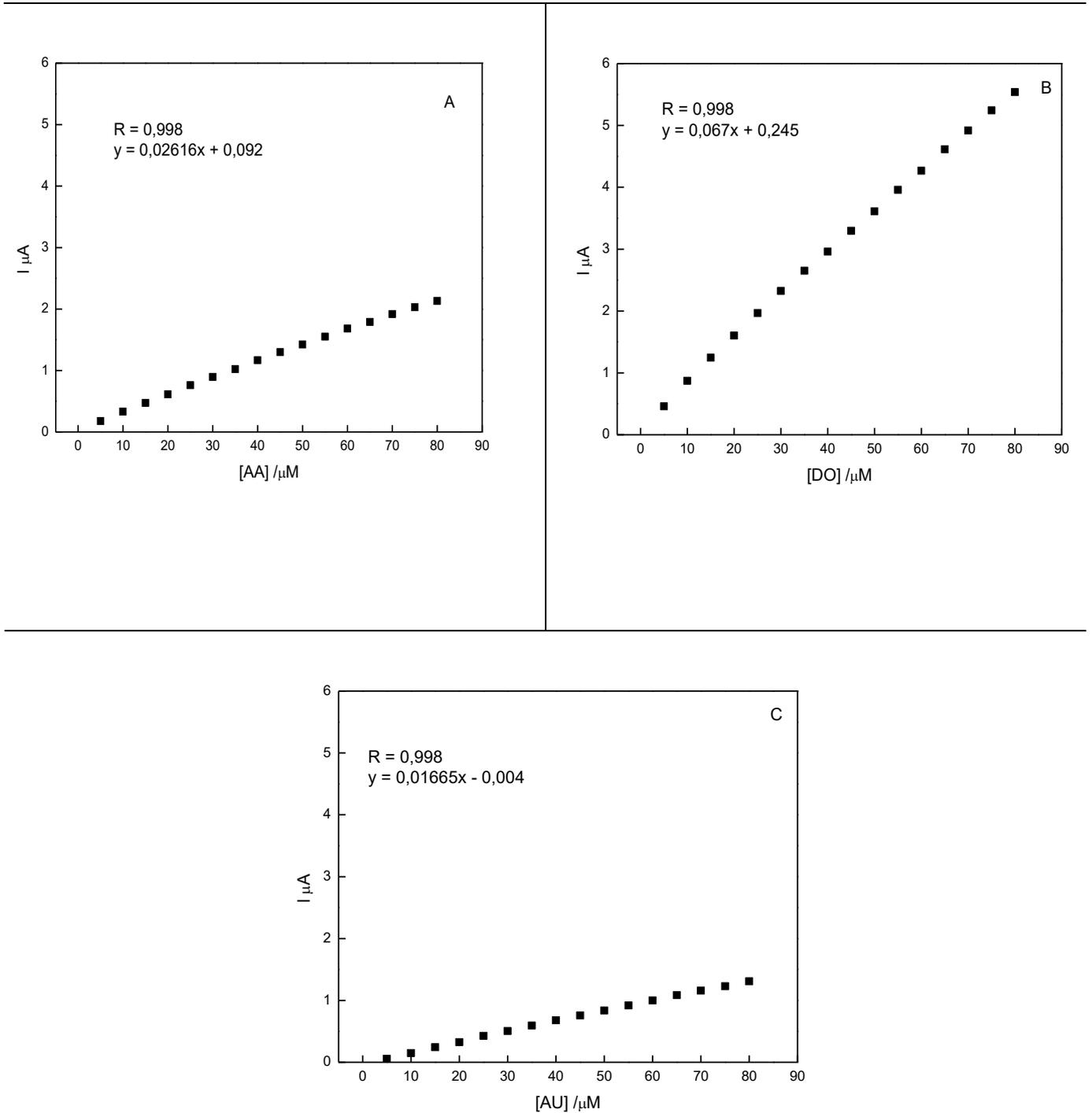


Figura 38 - Curvas analíticas para a eletrooxidação de AA (Figura 38-A), DO (Figura 38-B) e AU (Figura 38-C) no ECV/MWCNT/pol-at-pNA com potenciais aplicados de +0,100 V, +0,225 V e +0,325 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ respectivamente.



Para a determinação de AA, o sensor amperométrico apresentou uma faixa linear de resposta de 5 a 80 μM , com um coeficiente de correlação de 0,998 para $n=10$ (figura 38-A).

Para a determinação de DO, o sensor amperométrico apresentou uma faixa linear de resposta de 5 a 80 μM , com um coeficiente de correlação de 0,998 para $n=10$ (figura 38-B).

Para a determinação de AU, o sensor amperométrico apresentou uma faixa linear de resposta de 5 a 80 μM , com um coeficiente de correlação de 0,998 para $n=10$ (figura 38-C).

Os limites de detecção foram calculados para AA, DO e AU e foram respectivamente 9,84 μM , 2,13 μM e 2,30 μM , os quais foram determinados, usando uma razão $3\sigma/b$ e sendo σ o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco e b o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

A resposta para este sensor foi rápida, considerando que o eletrodo utilizado é feito à base de nanotubos de carbono, onde a difusão das espécies deve ser mais dificultada. Sabe-se que uma condição para o sensor responder é que haja difusão da solução através da plataforma, sendo que esta etapa influi no tempo de resposta.

Provavelmente, o procedimento usado para construir a plataforma MWCNT e pNA gerado *in situ* resultou em um sistema bem empacotado, tornando difícil a difusão mais profunda da solução através da plataforma, levando a uma resposta mais rápida, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta (SILVA, 2011).

A preparação do sensor é relativamente simples, e os reagentes utilizados são disponíveis comercialmente e de relativo baixo custo e a técnica empregada apresenta maior sensibilidade e tempo de resposta curto quando comparado com a técnica de voltametria cíclica (VC).

A maioria dos trabalhos relatados na literatura para determinação simultânea de AA, AU e DO não trabalha desta forma como foi relatada neste trabalho (Tabela

6), já que provavelmente há perda da resposta quando são analisados em mesma concentração, devido à sobreposição das correntes de pico na VPD (SEKLI-BELAIDI, GALINIER e GROS, 2013) fato este que prejudica a determinação destes analitos em uma mesma concentração por VC e VPD.

Tabela 6 - Parâmetros analíticos de eletrodos modificados para a determinação simultânea de AA, DO e AU.

Plataforma	Técnica	pH	Faixa Linear (μM)	LD (μM)	Referência
NFC/CPE	VPD	4.5	AA: 2–64 DO: 0,04–5.6 AU: 0.8–16.8	AA: 2 DO: 0.04 AU:0.2	(LIU et al., 2008)
HO-MWCNT/GCE	VPD	7.4	-	AA: 50 DO:1 AU:50	(BI et al., 2012)
HOOC-MWCNT/GCE	VPD	7.4	-	AA:10 DO:0.5 AU:10	(BI et al., 2012)
BMPTB/CPE	VPD	6.6	-	AA:- DO: 0.01 AU:-	(PANDURANGACHAR et al., 2011)
TBQ/CPE	VPD	7.0	AA:10-100 DO:10-100 AU:10-100	AA: 0.62 DO:- AU:-	(ZARE; NASIRIZADEH; ARDAKANI, 2005)
GMO/GCE	VPD	6.0	AA: 5–1300 DO: 0.5–170 AU: 0.1–20	AA: 2.2 DO: 0.25 AU:0.045	(SHENG et al., 2012)
AMT/GCE	Amperometria	5.0	-	AA:0.075 DO:0.04 AU:0.06	(KALIMUTHU; JOHN, 2009)
GF/GE	VPD	7.0	AA: - DO: 0.5 - 50 AU: 1.75 – 90	AA: - DO: 0.25 AU:0.45	(MALLESHA et al., 2011)
GCE¹	VPD	7.0	AA: 25–300 DO: 3–30 AU: 5–70	AA: 23.38 DO: 2.67 AU: 4.70	(TEMOÇIN, 2013)

PVA/GCE	VPD	7.0	AA: 10–250 DO: 2–70 AU: 2–50	AA:7.6 DO:1.4 AU:0.6	(LI; LIN, 2006)
SP/MWCNT/GE	Amperometria	7.0	AA:50-1000 DO:50-350 AU:50-800	AA:0.5 DO:0.15 AU:0.8	(MANJUNATHA et al., 2010)
Poly-BE/GCE	VPD	4.5	AA:5-105 DO:1-10 AU:30-110	AA:0.3 DO:0.25 AU:2.0	(LIN et al., 2008)
ECLI	VPD	6.8	AA:50-7400 DO:2-1000 AU:2-220	AA:20 DO:1.0 AU:1.0	(SAFAVI et al., 2006)
Poly-tyr/MWCNT/GCE	VPD	7.4	AA:50-1000 DO: 0.1-30 AU: 1-350	AA:2.0 DO:0.02 AU:0.3	(WANG; BI, 2013)
ACAK/GCE	VPD	4.0	AA: 50–1000 DO: 1–200 AU: 1–120	AA: 10 DO:0.5 AU:0.5	(ZHANG et al., 2009)
PEDOT/Au-Micro	VPD	-	AA: 5-200 DO: - AU: 3-700	AA:4,2 DO:- AU:2,0	(SEKLI-BELAIDI; GALINIER; GROS, 2013)
Poly-VA/MWCNT/GCE	Amperometria	7.0	AA: 150 -600 DO: 150 -600 AU: 50-450	AA:3.5 DO:4.5 AU:1.5	(SILVA et al., 2009)
ECV/MWCNT/at-pNA	Amperometria	7.0	AA: 5-80 DO: 5-80 AU: 5-80	AA:9.8 DO:2.1 AU:2.3	Este trabalho

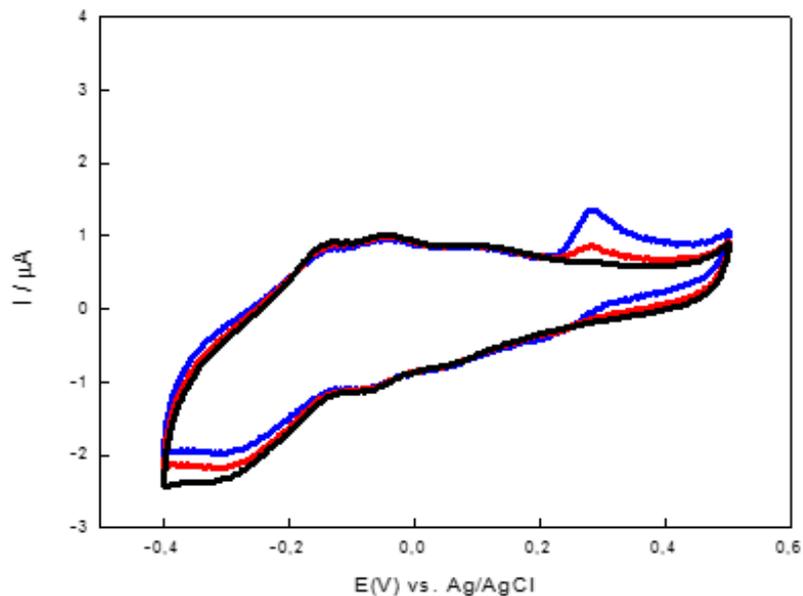
CPE: Eletrodo de pasta de carbono; DPV : Voltametria de Pulso Diferencial; NFC: Nanofibras de carbono; HO-MWCNT: Multicamadas de nanotubos de carbono hidroxilados; HOOC-MWCNT: multicamadas de nanotubos de carbono carboxilado; BMPTB: 1-Butil-4- metilpiridínio tetrafluoroborato; TBQ:Tetrabromo-*p*-benzoquinona; GMO: óxido de grafite e melanina; AMT: 5- Amino-2-mercapto-1,3,4-tiadiazole; GE: Eletrodo de grafite; GF: grafeno funcionalizado; GCE¹: eletrodo de carbono vítreo modificado em meio alcalino; PVA: Álcool polivinílico; SP: poliestireno sulfonado; Poly-BE: polímero de azul de Evans; ECLI: eletrodo de carbono e líquido iônico; Poly-tyr: polímero tirosina; ACAK: Ácido cromo azul K; Poly-AV: polímero de ácido vanílico; PEDOT: poli(3,4- etilenodioxitiofeno); Au-Micro: microeletrodos de ouro; ECV/MWCNT/at-pNA: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono e *p*-nitroanilina ativada.

Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.12 Detecção de Ácido Úrico (AU) em amostras biológicas

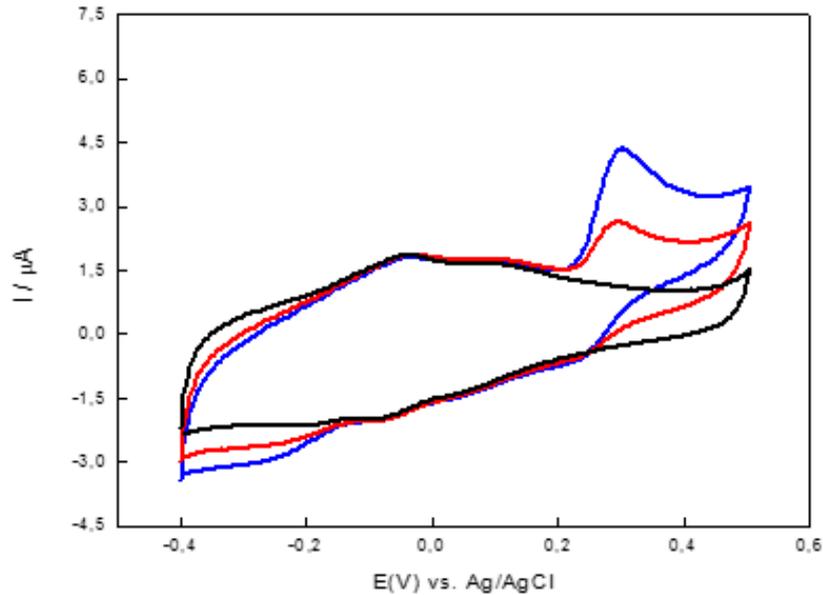
Com o intuito de detectar AU em amostras biológicas como: urina e soro, foi preparado o sensor ECV/MWCNT/ pol-at-pNA que foi imerso em uma nova solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, onde foram adicionados 300 μL de soro (Figura 26) e 200 μL de urina (Figura 27). O aparecimento do pico anódico em torno de 0,290 V é referente ao AU, presente nas amostras biológicas. Para comprovar, uma segunda alíquota de solução padrão de ácido úrico foi adicionada ao sistema, com o aumento da corrente de pico.

Figura 39. Voltamogramas cíclicos de ECV/MWCNT/pol-at-pNA e solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na ausência e presença de soro. Branco (\blacklozenge), 300 μL de soro (\blacklozenge) e 300 μL de soro + 50 μM de AU (\blacklozenge).



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Figura 40 - Voltamogramas Cíclicos de ECV/MWCNT/at-pol-pNA e solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$, na ausência e presença de urina. Branco (♦), 200 μL de urina (♦) e 200 μL de urina + 200 μM de AU (♦).

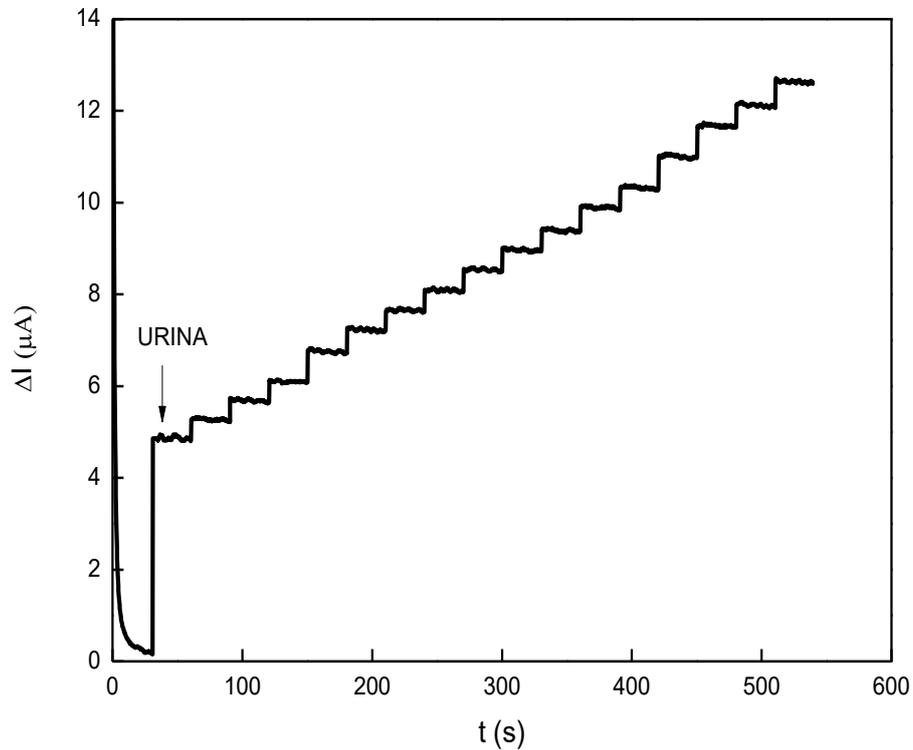


Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.13 Quantificação de ácido úrico na urina

Com o intuito de verificar a quantidade de ácido úrico em amostras de urina, utilizou-se o sensor ECV/MWCNT/pol-at-pNA, via amperometria de potencial pulsado. A oxidação de AU foi realizada em $E = 0,325 \text{ V versus Ag/AgCl/Cl}^-$ (Figura 40).

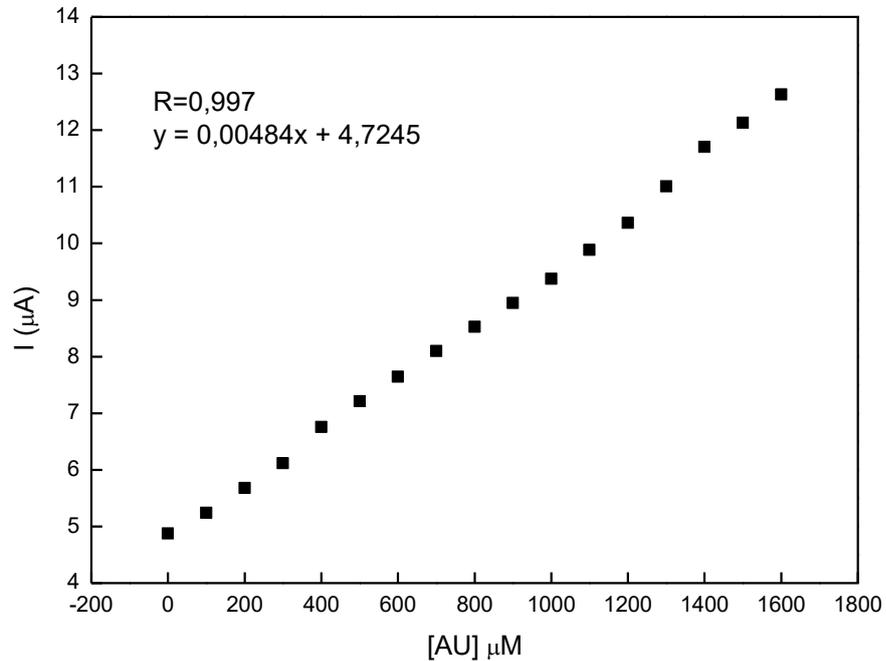
Figura 41 - Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AU no ECV/MWCNT/pol-at-pNA obtidas em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 na presença de urina.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

Para a quantificação de AU em amostras de urina, foi utilizado o método da adição padrão (CASSIANO *et al.* 2009), com construção de uma curva, $I \times [\text{AU}]$, relacionando as quantidades da substância adicionada com as correntes obtidas (FIGURA 42). A extrapolação da reta, no eixo das abcissas, define a concentração da substância na amostra analisada, obtendo-se uma concentração de 976,15 μM de ácido úrico.

Figura 42 - Curva $I \times [AU]$ relacionando as quantidades da substância adicionada com as correntes obtidas.



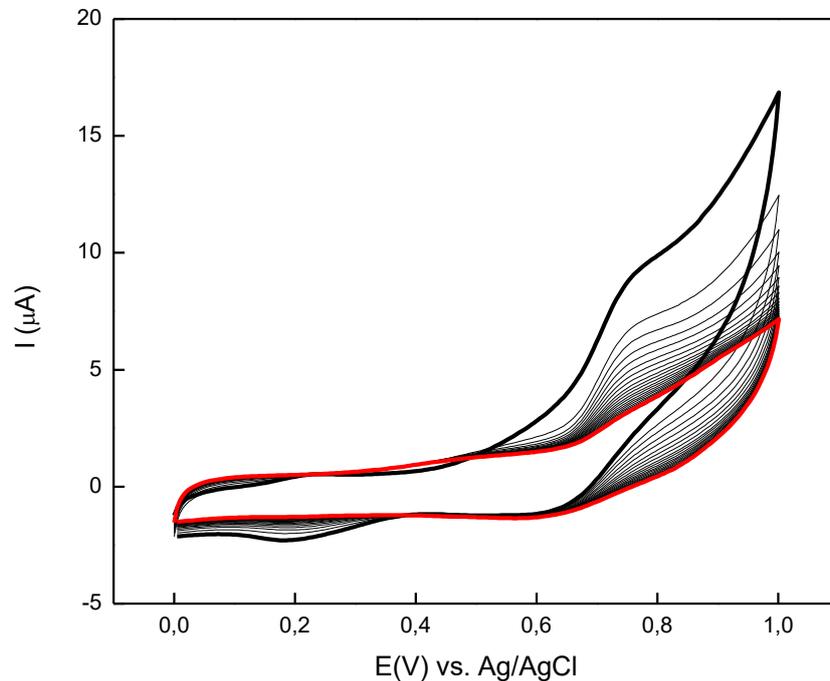
Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

5.14 Estudo com os sais de diazônio

5.14.1 Preparo do eletrodo grafitado ECV/graf-pNA

A figura 43 mostra o voltamograma do sal de diazônio gerado a partir da pNA para modificar o ECV, gerando o eletrodo grafitado (ECV/graf-pNA). O primeiro voltamograma apresenta uma onda de natureza irreversível, cuja corrente sofre decréscimos sucessivos, até praticamente desaparecer, o que seria um indicativo de bloqueio da superfície pelos grupos orgânicos que se ligam à superfície.

Figura 43 - Voltamogramas cíclicos de 1 a 20, na faixa de 0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para gerar o eletrodo grafitado, em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Voltamogramas 1 (♦) e 20 (◆).

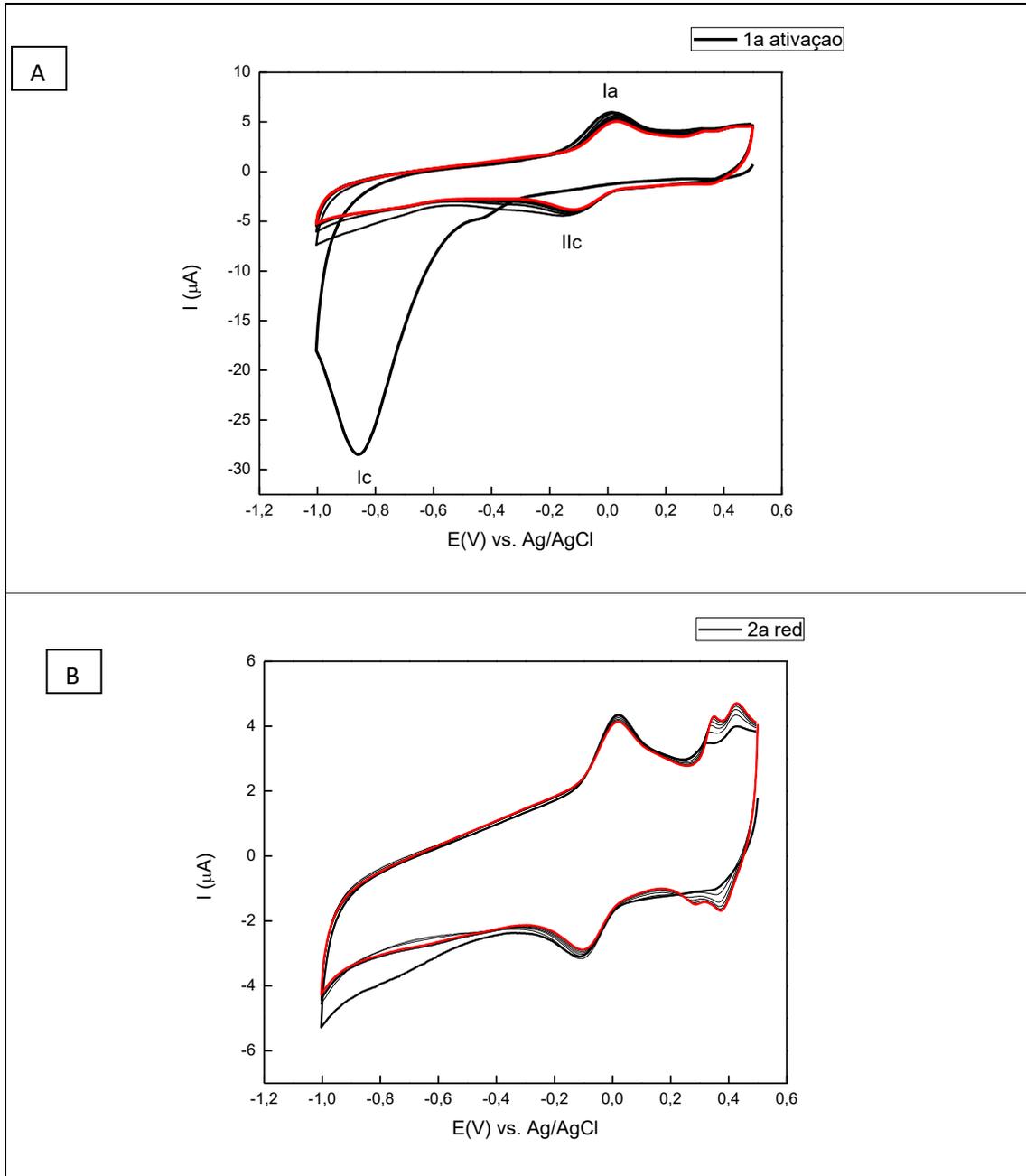


Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

A oxidação eletroquímica de sais de diazônio aromáticos em carbono conduz a uma forte ligação de grupos arila com a superfície. A ligação mais provável que ocorreu entre o sal de diazônio e o ECV é a covalente (PINSON J. E PODVORICA F. 2005).

5.14.2 Preparo do eletrodo quimicamente modificado ECV/graf-at-pNA

Figura 44 - Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação de pNA, gerando ECV/graf-at-pNA, $v = 20 \text{ m.V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 (A) primeira ativação (B) segunda ativação.



Fonte: Autor desta dissertação, 2016.

A figura 44-A mostra o voltamograma de ativação do grupo nitro do eletrodo grafitado na superfície do eletrodo, onde houve redução desse grupo, gerando, entre

outros sistemas, o par redox hidroxilamina/nitroso ($i_a = 0,02 \text{ V} / i_{lc} = -0,11 \text{ V}$) com $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = -1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻ semelhante à Figura 13. A figura 44-B mostra uma segunda ativação, que foi feita com o intuito de mostrar que a substância estaria aderida a superfície do eletrodo em um segundo procedimento. O perfil do voltamograma mostrou a presença do par redox hidroxilamina/nitroso ($i_a = 0,014 \text{ V} / i_{lc} = -0,106 \text{ V}$) e outros sistemas.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho relata a construção de plataformas nanoestruturadas, simples, fundamentadas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados com pNA e ativadas *in situ*. Este processo de ativação promove a formação do par redox (hidroxilamina/nitroso), entre outros, sendo uma alternativa viável para a determinação simultânea de AA, DA e AU.

Essa plataforma pode ser uma alternativa viável para a determinação analítica da ácido úrico em amostras de urina e soro.

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do AA por meio da cronoamperometria empregando o sistema desenvolvido ECV/MWCNT/pol-at-pNA comprovaram a eficiência deste sistema em mediar a transferência de elétrons, envolvendo a molécula de AA.

A plataforma nanoestruturada modificada por pNA constitui um excelente sistema para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de AA, DA e AU com boa sensibilidade e estabilidade, bem como um tempo de resposta curto.

O estudo comparativo entre os isômeros evidenciou que os sensores formados por pNA e mNA mostraram maior sensibilidade frente aos analitos AA e AU quando comparados com a plataforma formada por oNA.

O estudo com os sais de diazônio mostrou que a *para*-nitroanilina adere à superfície do eletrodo por grafitação.

7. REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, B. et al. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**. v. 29, p. 699 – 766, 2004.
- AVDEEF, A. et al. PH-metric log P 11. pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 20, p. 631-641, 1999.
- BI, H. et al. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid: The effect of functional groups. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 171-172, p. 1132–1140, ago. 2012.
- BINTEIN, S. et al. Qsar organic chemical sorption in soils and sediments. **Chemosphere**. V. 28, p.1171-1188, 1994.
- BRUGNERA, M.F.; SANTOS, D.P.; ZANONI, M.V.B. Eletrodo modificado com filme de poli aminoácido para determinação de hidrazina em água de caldeira; **Eclética Química**, v. 31, n. 4, p. 63 – 68, 2006.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. v. 32, p. 1021-1030, 2009.
- CIUCU, A. A. Chemically Modified Electrodes in Biosensing. **Journal Biosens Bioelectron**, v.5, p. 1-10, 2014.
- CUNHA, S. et al. Acoplamento de cloreto de 4-nitrofenildiazônio com nucleófilos alifáticos: experimento integrado de síntese orgânica e cristalografia de raio x. **Química Nova**, v. 36, p. 1453-1457, 2013.
- DEDELAITE. L. et al. Electrochemical determination of Cu(II) ions using glassy carbono electrode modified by some nanomaterials and 3-nitroaniline. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 483, p. 279 – 284, 2015.
- FIERZ-DAVID. H. E. et al. **Fundamental Processes Dye Chemistry**, p. 113, 5th, ed. 1949.
- FILIK. H. et al. Simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan with Azure A-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticles composite modified electrode. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 471- 480, 2016.
- GALUS, Z..**Fundamentals of Electrochemical Analysis**, Ellis Horwood Press, New York, p.313, 1976.
- GHISELLI, A. et al. Total antioxidante capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 106 –1114, 2000.
- HAMMERICH. O. et al. **Organic Electrochemistry Revised and Expanded**, 5th, ed. 2015.
- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v.354, p.56-58, 1991.
- JACOBS, C. B. et al. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 105-127, 2010.

- JAWORSKI, J. S. Aromatic Nitrogen-Containing Compounds. In: HAMMERICH, O. et al. (Org.) **Organic Electrochemistry Revised and Expanded**. p.1121-1145, 5th, ed. 2015
- JBARAH, A. A. et al. A comparative spectroelectrochemical study of the redox electrochemistry of nitroanilines. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 10, p. 360 – 372, 2006.
- JIANG, J.; DU, X. Sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on Au@Pd-reduced graphene oxide nanocomposites. **Nanoscale**. v. 6, p. 11303- 11309, 2014.
- KALIMUTHU, P.; JOHN, S. A. Electropolymerized film of functionalized thiadiazole on glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 13–18, 2009.
- KOVAL'CHUK, E.P. et al. Co-polymers of aniline and nitroanilines. Part I. Mechanism of aniline oxidation polycondensation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 69, p. 154 – 162, 2001.
- KOVAL'CHUK, E.P. et al. Copolymers of aniline and nitroanilines Part II. Physicochemical properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 70, 38 – 48, 2001.
- LABIB, M. et al. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 9001–9090, 2016.
- LIMA, P.R. et al. Electrocatalytic activity of 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the l-glutathione detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.47, p.758-764, 2008.
- LIMA, P. R. et al. Modified Carbon Paste Electrode for Kinetic Investigation and Simultaneous Determination of Ascorbic and Uric Acids. **Electroanalysis**,v. 21, No. 21, p.2311 – 2320, 2009.
- LIMA, P. R. Tese. Eletrodo Modificado à Base de 4-Nitroftalonitrila: Sensor Amperométrico para Quantificação de Alguns Antioxidantes de Relevância Biológica. Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- LI, Y.; LIN, X. Simultaneous electroanalysis of dopamine, ascorbic acid and uric acid by poly (vinyl alcohol) covalently modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 115, p. 134–139, 2006.
- LIU, Y. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode. **Electrochemistry Communications**, v.10, p. 1431–1434, 2008.
- LOWINSOHN, D. et al. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismo de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, No. 6, p. 1318-1325, 2006.
- MALLESHA, M. et al. Functionalized-graphene modified graphite electrode for the selective determination of dopamine in presence of uric acid and ascorbic acid. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 81, n. 2, p. 104–108, jun. 2011.
- MANJUNATHA, R. et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound

to graphite electrode through layer-by-layer technique. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 2, p. 643–650, 19 mar. 2010.

MOHAMED, A. A. et al. Functionalization of nanomaterials with aryldiazonium salts. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 225, p. 16-36, 2015.

MORENO, M. et al. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using carbon nanotube modified screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 80, p. 2149-2156, 2010.

MOSCOSO, R. et al. A simple derivatization of multiwalled carbon nanotubes with nitroaromatics in aqueous media: Modification with nitroso/hydroxylamine groups. **Electrochemistry Communications**, v. 13, p. 217-220, 2011.

NEJATIPOUR, H.; DADSETANI, M. Excitonic effects in the optical properties of molecular crystals of *meta*- and *para*-nitroaniline: A comparative theoretical exploration. **Journal of Luminescence**, v. 172, p. 14-22, 2016.

NOROOZIFAR, M. et al. Sensitive and selective determination of uric acid in real samples by modified glassy carbon electrode with holmium fluoride nanoparticles/multi-walled carbon nanotube as a new biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 65-72, 2013.

OZTEKIN, Y. et al. Electrochemical modification of glassy carbon electrode by poly-4-nitroaniline and its application for determination of copper (II). **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 387–395, 2010.

ORTIZ, B. et al. Electrochemical modification of a carbon electrode using aromatic diazonium salts. 2. Electrochemistry of 4-nitrophenyl modified glassy carbon electrodes in aqueous media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 455, p. 75-81, 1998.

PANDURANGACHAR, M. et al. Electrochemical deposition of 1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate ionic liquid on carbon paste electrode and its application for the simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 158, p. 13–17, 2011.

PAULA. F. R. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**. v. 32, p. 1013-1020, 2009.

PEREIRA, A. C. et al. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**. v. 25, p.1012-1021, 2002.

PINSON, J; PODVORICA, F. Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts. **Chemical Society Reviews**, v. 34, p. 429-439, 2005.

RAFATI, A. A. et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using a carbon paste electrode modified with multiwalled carbon nanotubes, ionic liquid, and palladium nanoparticles. **Microchimica Acta**. v. 181, p 1999–2008, 2014.

RANDO. A. A. et al. Spectroscopic investigation of conjugated polymers derived from nitroanilines. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 69, p. 319 – 326, 2008.

RAZMI-NERBIN, H.; POURNAGHI-AZAR M.H. Nickel pentacyanonitrosylferrate film modified aluminum electrode for electrocatalytic oxidation of hidrazine. **Journal Solid State Electrochem**, v. 6, p.126–133, 2002.

ROTH, I. et al. 2-Nitro-1,4-diaminobenzene-Functionalized Poly(vinyl amine)s as Water-Soluble UV-Vis-Sensitive pH Sensors. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, p. 193–199, 2006.

SACHIN, H.P. et al. Protection of mild steel against corrosion by polynitroaniline films. **Materials Chemistry and Physics**, v. 104, p. 422 – 428, 2007.

SAFAVI, A. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. **Analytical biochemistry**, v. 359, n. 2, p. 224–9, 15 dez. 2006.

SANTHIAGO, M. et al. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v.54, p. 6609-6616, 2009.

SEKLI-BELAIDI, F.; GALINIER, A.; GROS, P. Simultaneous assay of ascorbate and urate antioxidants in human blood serum using PEDOT-based electrochemical microsensor. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 16, n. 2, p. 84–91, 2013.

SHENG, Z. et al. Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, p. 125– 131, 2012.

SILVA, F. A. S. et al. Poly xanthurenic acid modified electrodes: An amperometric sensor for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids. **Sensors and Actuators B**, v. 168, p. 289– 296, 2012.

SILVA, F. A. S. et al. Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 450 – 454, 2010.

SILVA, L. V. Dissertação. Sensor Amperométrico a Base de Nanotubos Carbono e Ácido Vanílico para Determinação Simultânea de Ácido Ascórbico, Dopamina e Ácido Úrico. Universidade Federal de Alagoas, 2012.

SILVA, L. V. et al. Amperometric sensor based on carbon nanotubes and vanillic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, p. 2389 - 2393, 2016.

SILVA, T. L. Dissertação. Avaliação de Substâncias de Interesse Biológico com Propriedades anti e Pró-Oxidantes. Universidade Federal de Alagoas, 2014.

SKOGG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5 ed. Porto Alegre .: Bookman, 2002. Cap. 22.

TEMOÇIN, Z. Modification of glassy carbon electrode in basic medium by electrochemical treatment for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 176, p. 796–802, 2013.

TIAN, X. et al. Simultaneous determination of L-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles-of L-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold wave voltammetry. **Talanta**. v. 93, p. 79-85, 2012.

WANG, Y.; BI, C. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly (tyrosine)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode. **Journal of Molecular Liquids**, v. 177, p. 26–31, jan. 2013.

WOODFORD, J. N. et al. Solvent Dependence of the First Molecular Hyperpolarizability of *p*-Nitroaniline Revisited. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 101, p. 1889-1992, 1997.

YANG, C. et al. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 887, p. 17-37, 2015.

ZHANG, R. et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly(acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 138, p. 174–181, 2009.

ZARE, H. R.; NASIRIZADEH, N.; ARDAKANI, M. M. Electrochemical properties of a tetrabromo-*p*-benzoquinone modified carbon paste electrode. Application to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577, p. 25–33, 2005.