

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MATERIAIS MESOPOROSOS A BASE DE SÍLICA TITÂNIA E SUA
APLICAÇÃO COMO SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS
PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

FRANCIELE DE MATOS MORAWSKI

Porto Alegre, outubro de 2017.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ**

FRANCIELE DE MATOS MORAWSKI

**MATERIAIS MESOPOROSOS A BASE DE SÍLICA TITÂNIA E SUA
APLICAÇÃO COMO SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS
PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

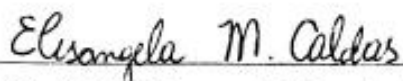
Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Química

Prof^a. Dr^a. Leliz Ticona Arenas
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Tania Maria Haas Costa
Co-Orientadora

Porto Alegre, outubro de 2017.

A presente Dissertação de Mestrado foi desenvolvida inteiramente pela aluna Franciele de Matos Morawski, exceto nas colaborações as quais estão citadas na seção de agradecimentos, no período de março de 2016 a outubro de 2017 no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a Orientação da Prof^a. Dr^a. Leliz Ticona Arenas. A dissertação foi julgada adequada pela seguinte banca examinadora:



Prof^a Dra Elisangela Muncinelli Caldas



Prof^a Dra Jacqueline Ferreira Leite Santos



Prof^a Dra Roberta da Silva Bussamara Rodrigues



Prof^a Dra Tania Maria Haas Costa

(coorientadora)



Prof^a Dra Leliz Ticona Arenas

(orientadora)

Dedicatória

“Aprender com o ontem, viver o hoje e ter esperança no amanhã. O importante é não parar de questionar”

(Albert Eisten)

Dedico este trabalho a minha família, especialmente a minha mãe Marisa e a minha avó Délia pela compreensão, estímulo e paciência. O apoio imensurável de vocês foi essencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Leliz Ticona Arenas, pelas oportunidades e pelo incentivo desde o começo na minha jornada acadêmica, seus ensinamentos foram essenciais no direcionamento das minhas escolhas dentro da pesquisa. Obrigada pela atenção dedicada, a disponibilidade e o otimismo nas situações mais difíceis no desenvolvimento do trabalho, que me fizeram prosseguir.

Agradeço a minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Tania Maria Haas Costa, a qual teve imensa contribuição em todas as etapas do trabalho. Obrigada por compartilhar sua sabedoria e experiência, pelo incentivo nos momentos de escrita e ao apoio ao encarar novos desafios.

Ao Prof. Dr Edilson Valmir Benvenuti, pelos seus ensinamentos, experiências compartilhadas, disponibilidade e incentivo durante todo o meu período no LSS.

À Prof^ª Dr^ª. Eliana Weber de Menezes, por toda a sua ajuda, suporte e colaborações realizadas.

Às amigas, Andressa e Monique pela compreensão, ajuda e orientações recebidas durante esse período. O companheirismo de vocês foi essencial para superar os momentos mais difíceis.

A todos os colegas do Laboratório de Sólidos e Superfícies, pelos momentos de descontração proporcionados. Em especial a Brenda Borges pela dedicação e responsabilidade, sua contribuição foi muito importante para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Andrey, meu companheiro nessa jornada acadêmica, sua empolgação e dedicação são exemplos para mim.

A minha avó Delia, minha segunda mãe, por sempre estar presente, pelo carinho, atenção e preocupação. Obrigada por ser abrigo e conforto durante todos os momentos.

À minha mãe Marisa, por ter em muitos momentos, abdicado de suas conquistas pessoais em virtude da minha educação. Palavras não conseguiriam explicar a tua importância mas saibas que serei eternamente grata a ti por toda compreensão durante os muitos momentos difíceis que enfrentei. Tu és meu exemplo de coragem, determinação e caráter e o teu apoio impulsionou essa conquista.

Agradeço por fim, à Universidade Federal de Rio Grande do Sul pelos pela formação e estrutura disponibilizada, necessárias ao desenvolvimento deste trabalho e as agências de fomento, em especial à Capes pela bolsa outorgada.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS

Trabalhos Publicados em Eventos Científicos Internacionais

Morawski, F. M.; Deon, M.; Dias, S. L. P.; de Menezes, E. W.; Benvenuti, E. V.; Nicolodi, S.; Costa, T. M. H.; Arenas, L.T. Development of new mesoporous magnetic silica/titania and its application as electrochemical biosensor. In: XVI Encontro da SBPMat, MRS Meeting, 2017, Gramado.

Morawski, F. M.; Xavier, B. B.; de Menezes, E. W.; Dias, S. L. P.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T. Synthesis of sílica/titania materials employed as electrochemical devices. In: XVI Encontro da SBPMat, MRS Meeting, 2017, Gramado.

Deon, M.; Morawski, F. M.; de Andrade, R.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; de Menezes, E. W.; Benvenuti, E. V. Gold nanoparticles supported on silica/titania magnetic xerogel. In: XVI Encontro da SBPMat, MRS Meeting, 2017, Gramado.

Deon, M.; Morawski, F. M.; Arenas, L.T.; Costa, T. M. H.; de Menezes, E. W.; Benvenuti, E. V.; Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for dopamine and catechol. In 19th International Sol-Gel conference, 2017, Liege-Belgium

Trabalhos Publicados em Eventos Científicos Nacionais

Morawski, F. M.; Arenas, L. T.; Laranjo, M. T.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Benvenuti, E. V. Desenvolvimento de um material condutor a base de sílica-titânia-grafite e sua aplicação na detecção de compostos fenólicos. In: 1^o Multimat, 2016, Porto Alegre. PGCIMAT, 2016.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Materiais de sílica/titânia	8
3.1.1. Método sol gel	8
3.1.2. Materiais mesoporosos	10
3.1.3. Materiais de sílica/titânia organofuncionalizados	11
3.2. Sensores e biossensores eletroquímicos.....	11
3.3. Eletrodos quimicamente modificados	13
3.3.1. Tirosinase	13
3.3.2. Magnetita	16
3.3.3. Nanopartículas de ouro.....	18
3.3.4. Eletrodos de pasta de carbono	19
3.4. Detecção eletroanalítica: técnicas voltamétricas	20
3.4.1. Voltametria Cíclica.....	20
3.4.2. Voltametria de pulso diferencial.....	21
3.4.3. Voltametria de onda quadrada.....	22
3.5. Compostos Fenólicos	23
3.5.1. Catecol.....	24
3.5.2. Catecolaminas.....	24
3.5.3. Dopamina, norepinefrina e epinefrina	25
3.5.4. Determinação eletroanalítica de catecolaminas.....	26
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
4.1. Reagentes	28
4.2. Síntese dos materiais de sílica/titânia	28
4.2.1. Síntese dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50.....	28
4.2.2. Modificação da amostra SiTi30 com nanopartículas de ouro	29
4.2.3. Síntese do material magnético sílica titânia SiTiMPs	30

4.2.4.	Imobilização da enzima tirosinase na amostra SiTiMPs	30
4.3.	Técnicas de caracterização	31
4.3.1.	Difração de raios X	31
4.3.2.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
4.3.3.	Análise termogravimétrica	31
4.3.4.	Magnetização	32
4.3.5.	Espectroscopia na região do UV-Visível	32
4.3.6.	Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂	32
4.3.7.	Microscopia eletrônica de transmissão	32
4.4.	Medidas eletroquímicas	32
4.4.1.	Preparo dos eletrodos de pasta de carbono	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
PARTE I	35	
Material mesoporoso sílica/titânia modificado com nanopartículas de ouro e sua aplicação como sensor eletroquímico para dopamina e norepinefrina		
5.1.	Caracterização dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50	36
5.1.1.	Análise textural e morfológica	36
5.1.2.	Análise termogravimétrica	39
5.1.3.	Análise estrutural	40
5.2.1.	Análise textural	45
5.2.3.	Espectroscopia na região do Uv-Vis	47
5.2.4.	Microscopia eletrônica de transmissão	48
5.2.5.	Caracterização eletroquímica	49
5.3.	Aplicação do EPC SiTi30-Au como sensor eletroquímico para norepinefrina e dopamina	51
5.3.1.	Voltametria cíclica na presença de norepinefrina	51
5.3.2.	Estudo de pH	52
5.3.3.	Análise norepinefrina e dopamina por voltametria de onda quadrada	53
5.3.4.	Análise simultânea de norepinefrina e dopamina por voltametria de onda quadrada	56

5.3.5. Análise de interferentes	59
5.3.6. Reprodutibilidade	60
PARTE II	61
Xerogel magnético de sílica/titânia modificado com tirosinase e sua aplicação como biossensor eletroquímico	
5.4. Caracterização dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty	62
5.4.1. Análise textural.....	62
5.4.2. Análise termogravimétrica	63
5.4.3. Análise estrutural e morfológica.....	64
5.4.4. Magnetização.....	66
5.4.5. Caracterização eletroquímica	67
5.5. Aplicação do EPC SiTiMPs-Ty como biossensor eletroquímico para catecol e catecolaminas.....	70
5.5.1. Resposta eletroquímica para catecol e catecolaminas	70
5.5.2. Análise de catecol, epinefrina e dopamina por voltametria de pulso diferencial.....	74
5.5.3. Análise Simultânea de catecol e dopamina	79
5.5.4. Reprodutibilidade	82
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das reações e etapas envolvidas no processo sol gel	9
Figura 2. Sistema eletroquímico convencional de três eletrodos	12
Figura 3. Representação da estrutura da tirosinase e mecanismo de oxidação de fenóis catalisada pela enzima adaptado da referência75.	15
Figura 4. Representação da estrutura de um EPC convencional.	20
Figura 5. Comparação do sinal eletroanalítico de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.	22
Figura 6. Estrutura do catecol.....	24
Figura 7. Estruturas da epinefrina, dopamina e norepinefrina.	25
Figura 8. a) Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e b) Curvas de distribuição de tamanho de poros; das amostras com diferentes proporções sílica/titânia.	36
Figura 9. Imagens de MEV das amostras a) SiTi30 b) SiTi40 c) SiTi50 com aproximação de 15,00 kx e d) SiTi30 e) SiTi40 e f) SiTi50 com aproximação de 5,00 kx.....	38
Figura 10. Curvas termogravimétricas das amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50 obtidas entre 50 a 850 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	39
Figura 11. Difratoogramas de raios X dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50.....	41
Figura 12. VCs dos EPCs das amostras a) SiTi30; b) SiTi40 c) SiTi50 variando as velocidades de varredura de 5 a 150 mV s ⁻¹ em solução K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 μmol L ⁻¹ ; Relações lineares entre v ^{1/2} e I _{pa} e I _{pc} para as amostras d) SiTi30; e) SiTi40 e f) SiTi50.....	42
Figura 13. VC comparativa das amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50 na presença de solução K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mmol L ⁻¹ e velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	43
Figura 14. Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ e b) Curvas de distribuição de tamanho de poros; das amostras SiTi30 e SiTi30-Au.	45
Figura 15. Curvas termogravimétricas dos materiais SiTi30 e SiTi30-Au obtidas entre 50 a 850 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	46
Figura 16. Espectro de Uv-Vis da a) dispersão de ouro oferecida b) da solução residual sobrenadante c) primeira lavagem e d) segunda lavagem.	47
Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão da amostra SiTi30-Au a) barra de 50 nm e b) barra de 100 nm.....	48
Figura 18.VC das amostras SiTi30 e SiTi30-Au na presença de solução K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mmol L ⁻¹ e velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	49

Figura 19. a) VC da amostra SiTi30-Au na presença de solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} a diferentes velocidade de varredura de 20 a 150 mV s^{-1} b) Relação linear entre $v^{1/2}$ e I_{pa} e I_{pc}	50
Figura 20. a) VC dos EPCs SiTi30 e SiTi30-Au na presença de solução $5 \text{ } \mu\text{mol}$ de norepinefrina b) VC do EPC SiTi30-Au na presença de diferentes concentrações de norepinefrina.....	52
Figura 21. a) Voltamogramas do EPC SiTi30-Au na presença de $5 \text{ } \mu\text{mol}$ de norepinefrina em diferentes pHs b) Relação Epc e pH de estudo.....	52
Figura 22. Comportamento eletroquímico do EPC SiTi30-Au na presença de $5 \text{ } \mu\text{mol}$ de norepinefrina e $5 \text{ } \mu\text{mol}$ de dopamina em tampão fosfato pH 5.	53
Figura 23. Otimização da frequência de pulso em VOQ avaliando a faixa de 3 até 10 Hz na presença de $5 \text{ } \mu\text{mol}$ de norepinefrina.....	54
Figura 24. a) VOQ do EPC SiTi30-Au a diferentes concentrações de norepinefrina; b) Curva de calibração analítica para determinação de norepinefrina; tampão fosfato pH 7.	55
Figura 25. a) VOQ do EPC SiTi30-Au a diferentes concentrações de dopamina; b) curva de calibração analítica para determinação de dopamina, tampão fosfato pH 7.....	56
Figura 26. VOQs do EPC SiTi30-Au na presença a) de concentração fixa de norepinefrina e diferentes concentrações de dopamina; b) de concentração fixa de dopamina e diferentes concentrações de norepinefrina, tampão fosfato pH 7.	57
Figura 27. a) Análise simultânea de dopamina e norepinefrina por VOQ; b) Curvas de calibração analítica para dopamina e norepinefrina, tampão fosfato pH 7.	58
Figura 28. VOQ do EPC SiTi30-Au na presença de norepinefrina e interferentes ácido ascórbico, ácido úrico e glicose.....	59
Figura 29. Reprodutibilidade de resposta de 4 diferentes eletrodos EPC SiTi30-Au na presença de $2,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de norepinefrina.	60
Figura 30. a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 b) Curvas de distribuição de tamanho de poros; dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty.	62
Figura 31. Curvas termogravimétricas dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty na faixa de $50 \text{ a } 850 \text{ } ^\circ\text{C}$	64
Figura 32. Difratogramas de raios X das Fe_3O_4 , das partículas magnéticas MPs e do xerogel magnético SiTiMPs.	65
Figura 33. MEV do material SiTiMPs com aproximação de a) 2.0 kx e b) 5.0 kx	66

Figura 34. Curvas de magnetização das amostras Fe ₃ O ₄ , MPs e SiTiMPs. Figura inserida: Curvas de magnetização normalizadas.....	67
Figura 35. VC dos EPCs modificados com SiTiMPs e SiTiMPs-Ty na presença de solução K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mmol L ⁻¹ e velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	68
Figura 36. a) Voltamogramas do EPC SiTiMPs-Ty na presença de solução K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mmol L ⁻¹ a diferentes velocidades de varredura na faixa de 10 a 150 mV s ⁻¹ b) relação linear entre v ^{1/2} e I _{pa} e I _{pc}	69
Figura 37. Voltamogramas do EPC SiTiMPs e EPC SiTiMPs-Ty na presença de 38 μmol L ⁻¹ de catecol e velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	70
Figura 38. Voltamogramas do EPC SiTiMPs-Ty a diferentes velocidades de varredura de 10 a 150 mV s ⁻¹ na presença de 38 μmol L ⁻¹ de catecol.....	71
Figura 39. VCs do EPC SiTiMPs-Ty na presença de 38 μmol L ⁻¹ de catecol a diferentes pHs e b) na presença de diferentes atmosferas, na velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	72
Figura 40. Voltamogramas do EPC SiTiMPs-Ty a diferentes velocidades de varredura de 10 a 150 mV s ⁻¹ na presença de 38 μmol L ⁻¹ em pH 7,5 de a) dopamina b) epinefrina. Figuras inseridas: Retas de velocidade de varredura (mV s ⁻¹) versus I _{pa} e I _{pc} (μA). ...	73
Figura 41. VPD comparativo do EPC SiTiMPs-Ty na presença de 38 μmol L ⁻¹ de catecol, dopamina e epinefrina em pH 7,5.....	74
Figura 42. Mecanismo de ciclização da dopamina.....	75
Figura 43. VPDs na presença de diferentes concentrações de a) catecol b) epinefrina e c) dopamina; curvas de calibração I _{pc} versus concentração d) catecol e) epinefrina e f) dopamina.	77
Figura 44. VPD do EPC SiTiMPs-Ty em pH 7,5 na presença de diferentes concentrações de a) catecol mantendo a concentração de epinefrina constante b) epinefrina mantendo a concentração de catecol constante.....	80
Figura 45. Análise simultânea por VPD do EPC SiTiMPs-Ty na presença de diferentes concentrações de catecol e epinefrina em pH 7,5.....	81
Figura 46. Curvas eletroanalíticas obtida por VPD do EPC SiTiMPs-Ty em análise simultânea de catecol e epinefrina.....	82
Figura 47. Resposta de intensidade relativa de pico para 5 diferentes EPC SiTiMPs-Ty em um sistema contendo 40 μmol L ⁻¹ de catecol.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclaturas das amostras e suas modificações.....	28
Tabela 2. Volumes dos precursores utilizados na síntese dos materiais sílica/titânia. ...	29
Tabela 3. Área superficial e volume de poros dos materiais de sílica/titânia.....	37
Tabela 4. Valores de perda de massa estimados com base nas curvas de TGA.....	40
Tabela 5. Parâmetros eletroquímicos determinados por VC em velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	44
Tabela 6. Perda de massa (%) para os materiais SiTi30 e SiTi30-Au estimados com base nas curvas de TGA.	47
Tabela 7. Parâmetros eletroanalíticos obtidos por VOQ para análise simultânea.....	58
Tabela 8. Perda de massa (%) obtidas através das curvas de TGA.....	64
Tabela 9. Tabela de parâmetros eletroquímicos dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty obtidos por VC.	68
Tabela 10. Comparação do EPC SiTiMPs-Ty com diferentes eletrodos modificados com tirosinase aplicados na determinação eletroanalítica de catecol e catecolaminas.	78

ABREVIATURAS

MPs- Partículas magnéticas ecobertas com sílica
EPC- Eletrodo de pasta de carbono
AuNPs – Nanopartículas de Ouro
VC- Voltametria cíclica
VPD- Voltametria de pulso diferencial
VOQ-Voltametria de onda quadrada
MEV- Microscopia eletrônica de varredura
TGA- Análise termogravimétrica
BET-Brunauer, Emmett e Teller
BJH- Barret, Joyner e Halenda
UV-Vís- Ultravioleta visível
ECS- Eletrodo de calomelano saturado
Ty- Tirosinase
Fe₃O₄- Partículas de magnetita
SiTi30- Material sílica/titânia contendo 30% em volume de titânia
SiTi40- Material sílica/titânia contendo 40% em volume de titânia
SiTi50- Material sílica/titânia contendo 50% em volume de titânia
SiTi30-Au- Material SiTi30 modificado com AuNPs
SiTiMPs- Material sílica/titânia contendo MPs
SiTiMPs-Ty- Material SiTiMPs com modificado com Ty
Ip- Intensidade de pico
Ipa- Intensidade de pico anódico
Ipc-Intensidade de pico catódico
E-Potencial
Epa-Potencial de pico anódico
Epc-Potencial de pico catódico
 ΔE_p - Separação entre picos
SDB- Desvio padrão de medidas do branco
S- Sensibilidade
LD- Limite de detecção
TEOS - Ortossilicato de tetraetila
TIPOT- Isopropóxido de titânio
KCl- Cloreto de potássio

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ – Ferricianeto de potássio/Ferrocianeto de potássio

I_{pa}/I_{pc} - Razão entre intensidade de pico anódico e intensidade de pico catódico

R^2 - Coeficiente de correlação linear

v - Velocidade de varredura

$v^{1/2}$ - Raiz quadrada da velocidade de varredura

E_a - Área eletroativa

RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos materiais mesoporosos de sílica/titânia visando sua aplicação como sensores e biossensores eletroquímicos para compostos fenólicos de interesse ambiental e medicinal. Os materiais obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas buscando avaliar suas propriedades texturais, morfológicas e estruturais. O comportamento eletroquímico foi investigado por voltametria cíclica (VC) que permitiu determinar a proporção ideal de sílica/titânia do suporte sintetizado. Após a otimização do suporte, buscou-se desenvolver materiais estruturados com partículas magnéticas e tirosinase (SiTiMPs-Ty) e, nanopartículas de ouro previamente estabilizadas com quitosana (SiTi30-Au). Os materiais modificados foram aplicados no desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono (EPCs) para determinação de compostos fenólicos, após a otimização de parâmetros como efeito de pH e atmosfera e, empregados na análise simultânea de diferentes compostos através das técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Também foi avaliada a resposta do eletrodo na presença de potenciais interferentes, bem como sua reprodutibilidade. O EPC modificado com SiTi30-Au apresentou resposta linear para a determinação simultânea de dopamina e norepinefrina na faixa de 50 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os limites de detecção foram determinados como 0,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para norepinefrina e dopamina, respectivamente. O EPC modificado com material SiTiMPs-Ty também apresentou resposta linear para análise simultânea de catecol e epinefrina na faixa de 40 a 380 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e os limites de detecção foram de 3,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,65 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para catecol e epinefrina, respectivamente. A reprodutibilidade dos eletrodos apresentou desvio padrão relativo de 5,86% para o EPC SiTi30-Au e 6,87% para o EPC SiTiMPs-Ty. Os EPCs de sílica/titânia modificados no presente trabalho apresentaram potencialidade de aplicação na determinação simultânea de compostos fenólicos com altas sensibilidades, baixos limites de detecção e boa reprodutibilidade.

ABSTRACT

In this work silica/titania materials were synthesized by sol-gel method by using different ratios of inorganic precursors and the obtained materials were applied as electrochemical sensors and biosensors. The materials were characterized using different techniques aiming to evaluate the textural, morphological and structural properties. The electrochemical behavior of the silica/titania materials was evaluated by Cyclic Voltammetry that allows estimating the optimum amount of titania in the resultant material. The electrochemical behavior guided the choice for developing modified materials containing magnetite particles (SiTiMPs-Ty) and gold nanoparticles (SiTi30-Au). After to achieve the best electrochemical conditions of pH and the best atmosphere, the resultant materials were applied in the development of modified carbon paste electrodes (CPE). The SiTi30-Au CPE and SiTiMPs-Ty CPE were applied in simultaneous electrochemical analysis of phenolic compounds by using differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV). It was also evaluated the electrochemical response of these modified CPEs in interferences analysis. The modified CPE/SiTi30-Au showed a linear response between peak current intensity and concentrations of dopamine and norepinephrine in a range from 50 to 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and its linear response was also observed in simultaneous analysis of these compounds. The limits of detection were estimated as 0.35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for norepinephrine and dopamine, respectively. The modified SiTiMPs-Ty/CPE was used for simultaneous electrochemical determination of catechol and epinephrine presenting a linear response in a range from 40 to 380 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and the limits of detection were 3.32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for catechol and 1.65 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for epinephrine. Both electrodes presented a good reproducibility with relative standard deviations of 5.86% and 6.87% for SiTiMPs-Ty/CPE and SiTi30-Au/CPE, respectively. Therefore, the modified silica/titania CPEs obtained in this work showed a good electrochemical response in electrochemical simultaneous determination of phenolic compounds presenting low limits of detection and great sensitivities in the presence of the studied analytes.

1. INTRODUÇÃO

Sensores e biossensores eletroquímicos são dispositivos usados na determinação seletiva de componentes de interesse ambiental e biomédico que podem oxidar ou reduzir em diferentes potenciais^{1,2,3}, destacando-se frente a outras técnicas analíticas por sua rápida resposta, baixo custo e portabilidade. Especificamente na área de biossensores eletroquímicos, suportes a base de sílica/titânia apresentam-se como interessante devido à alta área superficial, estabilidade térmica, mecânica⁴ e a facilidade de funcionalização aferida a acidez da titânia, que pode interagir por reações ácido-base com grupos amino e carboxílicos presentes em biomoléculas⁵. Visando a incorporação de espécies eletroativas, materiais mesoporosos de sílica/titânia são suportes ideais para o desenvolvimento de eletrodos por aumentarem a velocidade do processo difusional do analito e, a estabilidade de biocatalisadores imobilizados no poro⁶, mantendo ativo os seus sítios catalíticos.

O método sol-gel é uma excelente escolha para preparar materiais de sílica/titânia homogeneamente dispersos, permitindo mediante controle das condições de síntese, planejar as propriedades microestruturais, como a obtenção de materiais mesoporosos com alta área superficial⁷. Além disso, o método apresenta como vantagens a simplicidade de preparação, alta reprodutibilidade e versatilidade a partir da modificação de suportes em etapa única, através da incorporação de diferentes espécies⁸ durante o processo de síntese. Dessa maneira, materiais mesoporosos obtidos a partir do método sol-gel são ideias para o desenvolvimento de eletrodos modificados.

Eletrodos de pasta de carbono modificados com espécies eletrocatalíticas apresentam destaque frente a eletrodos de carbono vítreo, ITO e eletrodos impressos devido combinação de fatores como baixo custo, versatilidade, simplicidade de fabricação e boa reprodutibilidade^{9,10}. Materiais a base de sílica são suportes eficientes no desenvolvimento de EPCs, devido a estabilidade e a alta área superficial, que permitem modificação com enzimas¹¹, partículas metálicas¹¹, nanopartículas metálicas como ouro (NPs-Au)¹², e, recentemente, partículas magnéticas¹³.

A incorporação de nanopartículas de ouro em sensores e biossensores eletroquímicos é responsável por aumentar a velocidade de transferência de elétrons produzindo dispositivos com maior sensibilidade. Um biopolímero interessante para a estabilização de NPs-Au é a quitosana, que dependendo das concentrações utilizadas produz dispersões consideravelmente estáveis¹⁴. Adicionalmente, essa macromolécula

apresenta grupos amino podendo ser facilmente imobilizada no material sílica/titânia através de interações ácido-base⁵.

As partículas magnéticas destacam-se por sua eficiência eletrocatalítica, capaz de aumentar o sinal e a velocidade de resposta das medidas¹⁵. Na literatura, podem ser encontrados sensores magnéticos obtidos a partir de materiais modificados predominantemente por metodologia core-shell^{16,17}, permitindo a fácil funcionalização das partículas mas que apresentam como desvantagem a baixa área superficial. Dessa maneira, a incorporação de partículas magnéticas em uma matriz sílica/titânia obtida por sol-gel possibilita a obtenção de materiais magnéticos com alta área superficial e porosidade controlada, resultando no melhor desempenho dos eletrodos e na maior estabilidade das espécies biológicas incorporadas nos poros do suporte⁶.

Biomoléculas como DNA, anticorpos e enzimas são amplamente utilizados na modificação de eletrodos visando aumentar a seletividade na determinação eletroquímica^{18,19,20}. Apesar da resposta satisfatória de dispositivos enzimáticos, a técnica de imobilização da enzima ainda é considerada passo crítico na fabricação de eletrodos estáveis. Na literatura, muitos trabalhos utilizam como alternativa a prévia ativação do suporte, através de passos adicionais de síntese, responsáveis pela formação de interações covalentes e estáveis com a enzima²¹, porém, que resultam muitas vezes em baixa reprodutibilidade, longo tempo de produção e custos de síntese elevados. Considerando as dificuldades apresentadas, materiais de sílica/titânia consideram-se excelente alternativa para imobilização direta de enzimas, como exemplo a tirosinase, apresentando-se como matriz ainda pouco explorada para esses fins e com potencialidade no desenvolvimento de suportes para determinação seletiva de compostos fenólicos.

A enzima tirosinase é uma espécie capaz de catalisar de maneira eficiente e seletiva as reações redox de compostos fenólicos de importante quantificação em análises ambientais e biomédicas²². Dentre os compostos fenólicos de maior interesse ambiental, pode se destacar o catecol, amplamente usado em antissépticos, antifúngicos e antioxidantes e, potencial poluente ambiental devido a sua toxicidade quando presente em altas concentrações no organismo e em efluentes²³. As catecolaminas, como a dopamina, epinefrina e norepinefrina, são compostos fenólicos que apresentam um esqueleto de catecol em sua estrutura, denominados neurotransmissores essenciais ao correto funcionamento do sistema nervoso central²⁴. A determinação de pequenas

concentrações desses componentes no organismo é fundamental para o diagnóstico de patologias neurológicas como Parkinson e Alzheimer²⁵, fazendo-se importante o desenvolvimento de métodos de quantificação simultânea e seletiva desses compostos em baixas concentrações.

Dentre as técnicas eletroanalíticas mais utilizadas para a determinação seletiva e sensível, podem-se destacar as técnicas amperométricas como a cronoamperometria²⁶. Apesar da alta sensibilidade obtida, essa técnica baseia-se na aplicação de um potencial fixo que impossibilita a determinação eletroanalítica simultânea. Em contraste, técnicas voltamétricas de pulso como a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada, possibilitam a quantificação em análise simultânea^{27,28} decorrente da varredura a diferentes potenciais, resultando também excelentes valores de sensibilidade devido a eliminação do sinal de corrente capacitiva do sistema.

Nesse contexto, a proposta do presente trabalho foi desenvolver diferentes suportes mesoporosos de sílica/titânia otimizando a proporção ideal dos precursores inorgânicos através da avaliação do comportamento eletroquímico e das propriedades texturais, estruturais e morfológicas dos materiais. Após a determinação do suporte ideal, o material sílica/titânia foi modificado com espécies capazes de catalisar reações redox de compostos fenólicos como a enzima tirosinase, nanopartículas de ouro e partículas magnéticas. Os suportes modificados foram empregados no desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono para determinação simultânea de compostos fenólicos e neurotransmissores, utilizando como técnicas de quantificação a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada. Através da proposta inicial, conseguiu-se desenvolver dispositivos eletroquímicos com elevadas sensibilidades, baixos limites de detecção e boa reprodutibilidade destacando-se pela facilidade de fabricação.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

Sintetizar materiais mesoporosos a base de sílica/titânia para posterior modificação com nanoestruturas e biomoléculas e, estudar a viabilidade da utilização dos mesmos no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos.

2.2.Objetivos específicos

- Preparar materiais mesoporosos de sílica/titânia mediante a metodologia sol gel;
- Preparar um xerogel magnético mesoporoso de sílica/titânia com elevada área superficial;
- Caracterizar a estrutura e o comportamento eletroquímico dos diferentes suportes sílica/titânia sintetizados;
- Imobilizar nanopartículas de ouro no material sílica/titânia e avaliar o comportamento eletroquímico na determinação simultânea de dopamina e norepinefrina;
- Imobilizar a enzima tirosinase no xerogel magnético sílica/titânia e estudar o comportamento eletroquímico na determinação de catecol, epinefrina e dopamina;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais de sílica/titânia

As propriedades semicondutoras, fotocatalíticas e a reatividade química da titânia combinadas a excelente estabilidade térmica e mecânica da sílica são reponsáveis pela potencial de aplicação de compostos de sílica/titânia em diferentes campos da pesquisa como catálise, adsorção e, recentemente, em determinações eletroanalíticas. O grau de interação desses materiais assim como a homogeneidade e a dispersão dependem intrinsecamente da metodologia de síntese, sendo o método sol gel uma excelente estratégia na obtenção de xerógeis de sílica/titânia homogeneamente dispersos²⁹.

Em sua estrutura, a interação sílica/titânia pode ser decorrente de interações físicas do tipo Van der Waals ou interações químicas covalentes com a formação de ligações Ti-O-Si. Como consequência dessas interações, compostos de sílica/titânia covalentemente ligados apresentam estabilidade térmica e química diferenciadas, denominando-se como óxidos mistos de sílica/titânia. Estudos mostram que a diferença na proporção dos componentes influencia não somente na composição química do composto final, mas também no tipo de interação em nível atômico³⁰.

Diferentes formatos de materiais a base de sílica/titânia têm sido desenvolvidos como partículas esféricas³¹, filmes finos³², fibras e sólidos mesoporosos³³. O controle da forma, microestrutura e área específica é fundamental para melhorar as propriedades catalíticas, durabilidade química e comportamento térmico desses materiais³⁰. Além disso, as propriedades texturais como área superficial e porosidade influenciam sua área de aplicação, sendo de interesse eletroquímico a obtenção de materiais mesoporosos com altos valores de área superficial, geralmente obtidos através da metodologia sol gel.

Na literatura, alguns tipos de filmes e pós de sílica/titânia obtidos por sol gel tem sido aplicados na detecção de peróxido de hidrogênio³⁴, glicose³⁵ e, como mediadores de elétrons no desenvolvimento de novos tipos de eletrodos para determinação eletroquímica de NADH³⁶. Porém, contrastando-se com a extensa quantidade de materiais a base de sílica aplicados como suporte de eletrodos, materiais mistos de sílica, como por exemplo sílica/titânia ainda são pouco explorados em aplicações eletroquímicas, sendo esse um campo promissor de aplicação.

3.1.1. Método sol gel

O processo sol gel, foi primeiramente descrito há mais de 150 anos e continua recebendo considerável destaque por ser uma das maneiras mais fáceis de se produzir materiais modificados, que apresenta versatilidade em se obter materias homogêneos em

diferentes formatos como filmes, fibras e sólidos³⁷. Materiais a base de sílica são os mais comuns obtidos via sol gel sendo esse método também empregado na obtenção de óxidos mistos de zircônia e titânia³⁸.

O termo sol define uma dispersão estável de partículas coloidais com dimensões entre 1 e 100 nm. O gel, é definido como um sistema rígido de partículas que apresenta a fase líquida imobilizada nos seus interstícios. A agregação dessas partículas que ocorre entre a transição sol para gel depende das condições de síntese como composição e reatividade dos precursores inorgânicos, natureza e concentração dos catalisadores, pH do meio e processo de evaporação do solvente³⁷. Abaixo está apresentado um esquema das diferentes etapas ocorridas durante o processo sol gel, denominando-se como xerogel, o sólido obtido após a etapa de evaporação do solvente.

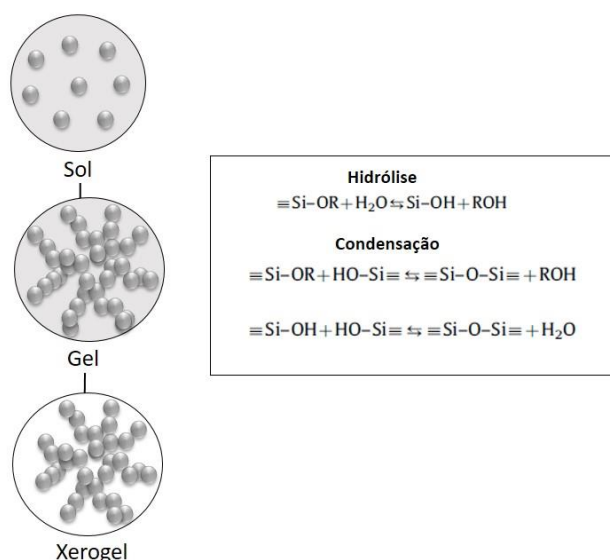


Figura 1. Representação das reações e etapas envolvidas no processo sol gel.

A reação de polimerização envolvida no processo sol gel é dividida em duas etapas: hidrólise do alcóxido com formação do silanol, seguida da policondensação dos grupos silanóis, formando inicialmente o sol (Figura 1). As reações de hidrólise e condensação ocorrem via substituição nucleofílica bimolecular do silício que apresenta cinética de reação lenta devido a baixa reatividade dos seus precursores alcóxissilanos. Dessa maneira, utilizam-se no processo de síntese diferentes catalisadores ácidos, básicos e nucleofílicos a fim de acelerar a velocidade das reações envolvidas⁸.

O sol gel, considera-se uma das estratégias mais utilizada na obtenção de materiais modificados aplicados com sensores, destacado-se pela facilidade de suas condições

experimentais e controle das características físico-químicas dos materiais sintetizados, permitindo obtenção de suportes homogeneamente dispersos, com porosidade controlada e alta área superficial. Além disso, uma de suas principais vantagens encontra-se na possibilidade de modificações, através da incorporação de diferentes espécies^{39,40,41} durante o processo de síntese como enzimas, espécies eletroativas e nanopartículas metálicas e magnéticas. Na literatura, muitos trabalhos relatam aplicações interessantes decorrentes da encapsulação de espécies via sol gel^{42,43} e, alguns apresentam também a utilização de xerógeis mesoporosos a base de sílica/titânia empregados no desenvolvimento de eletrodos modificados de carbono cerâmico e eletrodos de pasta de carbono^{44,45}.

3.1.2. Materiais mesoporosos

Materiais mesoporosos apresentam poros na região que corresponde de 2 a 50 nm, de acordo com a classificação da IUPAC. Dentre suas diferentes aplicações, são amplamente empregados como suporte no desenvolvimento de eletrodos modificados e apresentam como vantagem a facilidade de funcionalização com diferentes compostos orgânicos, principalmente macromoléculas como a quitosana e enzimas. Sua estrutura favorece o transporte de cargas, um dos principais fatores limitantes no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Além disso, materiais porosos apresentam rápido transporte de massa decorrente do fácil acesso aos sítios de ligação resultando num tempo de resposta mais rápida⁴⁶.

Diversos trabalhos relatam interessantes aplicações de materiais mesoporosos no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos⁴⁷, aumentando a estabilidade e a disponibilidade dos sítios ativos de componentes biológicos como enzimas. Grupos aminos e tiol são exemplos de grupos funcionais que podem ser conectados a materiais mesoporosos a base de sílica e aplicados como sensores. Do ponto de vista eletroquímico, essas estruturas conduzem a respostas mais sensíveis⁴⁶.

Diferentes tipos de interação podem ser explicados para a acumulação do analito no poro, como adsorção e difusão. A adsorção é o mecanismo mais simples, porém é um processo majoritariamente não seletivo. Reações redox interfaciadas por processos da adsorção do analito no poro podem ser predominantes na determinação eletroquímica de compostos como a dopamina, ácido fólico e metil paration⁴⁸.

Visando melhorar a eficiência dos processos de interação entre analito e eletrodo, trabalhos recentes indicam também a tendência de arranjos mesoporosos ordenados

ampliando os sítios de interação entre poro e analito e aumentando a seletividade na detecção de alguns compostos⁴⁹.

3.1.3. Materiais de sílica/titânia organofuncionalizados

Como relatado anteriormente, materiais mesoporos de sílica/titânia obtidos através da metodologia sol-gel de síntese podem ser facilmente organofuncionalizados, através da encapsulação de espécies orgânicas durante o processo de síntese, ou ainda, através da formação de filmes na superfície e nos poros, conhecido como método de *grafting*^{21,50}. Se por um lado, a encapsulação durante o processo de síntese pode aumentar a estabilidade de biomoléculas como enzimas, por outro lado casos específicos relatam a inviabilidade de acesso aos sítios ativos dessas moléculas dificultando o processo eletrocatalítico.

O método de *grafting* é amplamente utilizado na funcionalização de materiais de sílica e sílica/titânia. Esse método baseia-se na formação de um filme fino na superfície dos materiais através do contato direto. Sílicas organofuncionalizadas obtidas por *grafting* são aplicadas em diferentes áreas como no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Alguns dos recobrimentos mais comuns para aplicações eletroquímicas são o aminopropiltrimetoxissilano⁵¹, a quitosana⁵² e o nafion⁵³.

Em contraste com materiais de sílica, materiais de sílica/titânia apresentam maior reatividade devido à presença dos domínios ácidos provenientes da titânia. Essas características aumentam a facilidade de funcionalização dos compostos através de uma reação ácido-base com grupos amino provenientes de biomoléculas como a tirosinase e a quitosana⁵. Tais propriedades conferidas pela adição da titânia no material, contribuem na facilidade de funcionalização e evitam passos adicionais de síntese, como a necessidade de incorporação de agentes ligantes mais reativos, por exemplo o glutaraldeído⁵⁴. Através de processos de incorporação direta das espécies eletrocatalíticas pode-se alcançar maior reprodutibilidade na obtenção de materiais organofuncionalizados obtidos por *grafting*, sendo a titânia o componente predominantemente responsável pela maior reatividade dessas interações.

3.2. Sensores e biossensores eletroquímicos

Um sensor eletroquímico é um dispositivo analítico utilizado para detecção de um analito específico normalmente de interesse biomédico ou ambiental, tendo como um dos

principais exemplos na atualidade a detecção eletroanalítica de glicose^{55,56}. Um sensor eletroquímico tradicional, consiste num sistema contendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um contra eletrodo, conectados a um potenciostato. Esses sistemas são usados para a detecção eletroativa de substâncias que podem usualmente ser oxidados ou reduzidos a diferentes potenciais na superfície do eletrodo de trabalho⁵⁷. A Figura 2 apresenta uma cela eletroquímica convencional de três eletrodos, onde a transferência de corrente entre o contra eletrodo e o eletrodo de trabalho pode ser medida através do circuito construído e conectado ao equipamento.

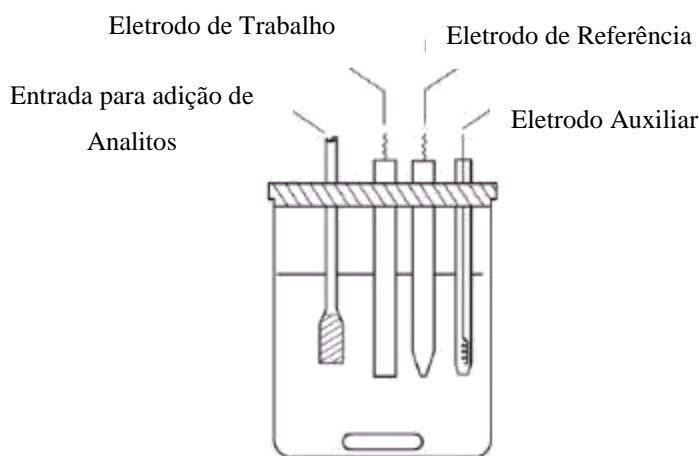


Figura 2. Sistema eletroquímico convencional de três eletrodos

O potencial do contra eletrodo é balanceado pelas reações que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho. Dessa maneira, o revestimentos de superfícies e materiais empregados como eletrodo de trabalho tem influência direta na resposta eletroquímica, sendo essa a principal área de investigação no desenvolvimento de sensores eletroquímicos mais sensíveis e seletivos. O eletrodo de referência, por sua vez, fornece um potencial estável e conhecido por onde não passa corrente, sendo o potencial do eletrodo de trabalho medido em relação a essa referência pré estabelecida. Os eletrodos de referência mais utilizados na atualidade são o eletrodo de calomelado (ECS) saturado e o eletrodo de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl)⁵⁸.

Biossensores são uma classe específica de sensores eletroquímicos que se baseiam em um dispositivo de reconhecimento biológico capaz de aumentar significativamente a seletividade das reações redox ocorridas na interface dos eletrodos. O analito é detectado por um bioreceptor específico imobilizado no eletrodo de trabalho⁵⁹. Tais dispositivos

tem demonstrado na atualidade, eficiência no desenvolvimento de imonossensores⁶⁰, citosensores⁶¹ e aptasensores de DNA⁶², considerados uma área inovadora no diagnóstico precoce de doenças.

As técnicas eletroquímicas de análise baseadas no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos tem se destacado nas últimas décadas, devido a sua facilidade de operação, baixos custos e simples construção de dispositivos. Tem se desenvolvido diferentes dispositivos eletroquímicos como sensores amperométricos⁶³, sensores de impedância⁶⁴, sensores fotoeletroquímicos⁶⁵ e sensores voltamétricos⁶⁶ com alta sensibilidade e seletividade. Essas respostas positivas devem-se principalmente ao desenvolvimento de diferentes tipos de eletrodos de trabalho modificados como eletrodos impressos, eletrodos carbono cerâmico, eletrodos de carbono vítreo, eletrodos de pasta de carbono^{67,68}, entre outros.

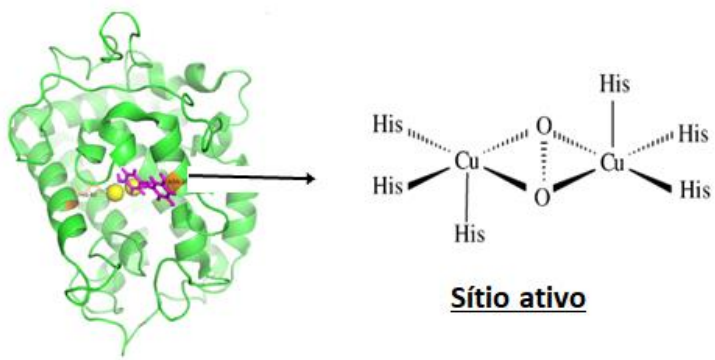
3.3. Eletrodos quimicamente modificados

A modificação de diferentes tipos de eletrodos de trabalho tem sido desenvolvida através da incorporação de espécies capazes de catalisar reações redox e aumentar a área eletroativa dos dispositivos, como nanopartículas metálicas⁶⁹, magnéticas⁷⁰ e espécies eletroativas sintéticas e biológicas⁷¹, resultando em maior sensibilidade desses dispositivos. Além disso, modificações em nível atômico e micrométrico de suportes com polímeros condutores, óxido de grafeno e nanotubos de carbono têm sido amplamente empregadas a fim de tentar melhorar a condutividade desses eletrodos⁷². A preparação da superfície do eletrodo é direcionada ao tipo de analito que se deseja determinar. Dessa maneira, encontram-se na literatura alguns eletrodos modificados com tirosinase, partículas magnéticas e nanopartículas de ouro seletivos a oxirredução de compostos fenólicos^{73,74}. Abaixo estão descritas as propriedades desses compostos catalíticos bem como seus principais avanços no desenvolvimento de eletrodos modificados.

3.3.1. Tirosinase

A modificação de dispositivos eletroquímicos com enzimas é utilizada na catálise de reações redox sendo capaz de aumentar o sinal de intensidade de corrente proveniente de elétrons gerados por uma reação redox específica. A tirosinase (E. C. 1. 14. 18.1) é uma enzima que apresenta dois átomos de cobre (II) em seu centro ativo, que formam um

complexo com difenóis e monofenóis na presença de oxigênio, através de mecanismo catalítico previamente estudado e estabelecido na literatura⁷⁵. O modelo eletrônico molecular utilizado para explicar a estrutura da tirosinase está apresentado na Figura 3, juntamente com o mecanismo de oxidação de fenóis na presença da enzima.



Estrutura da Tirosinase

Mecanismo de oxidação de fenóis na presença de tirosinase

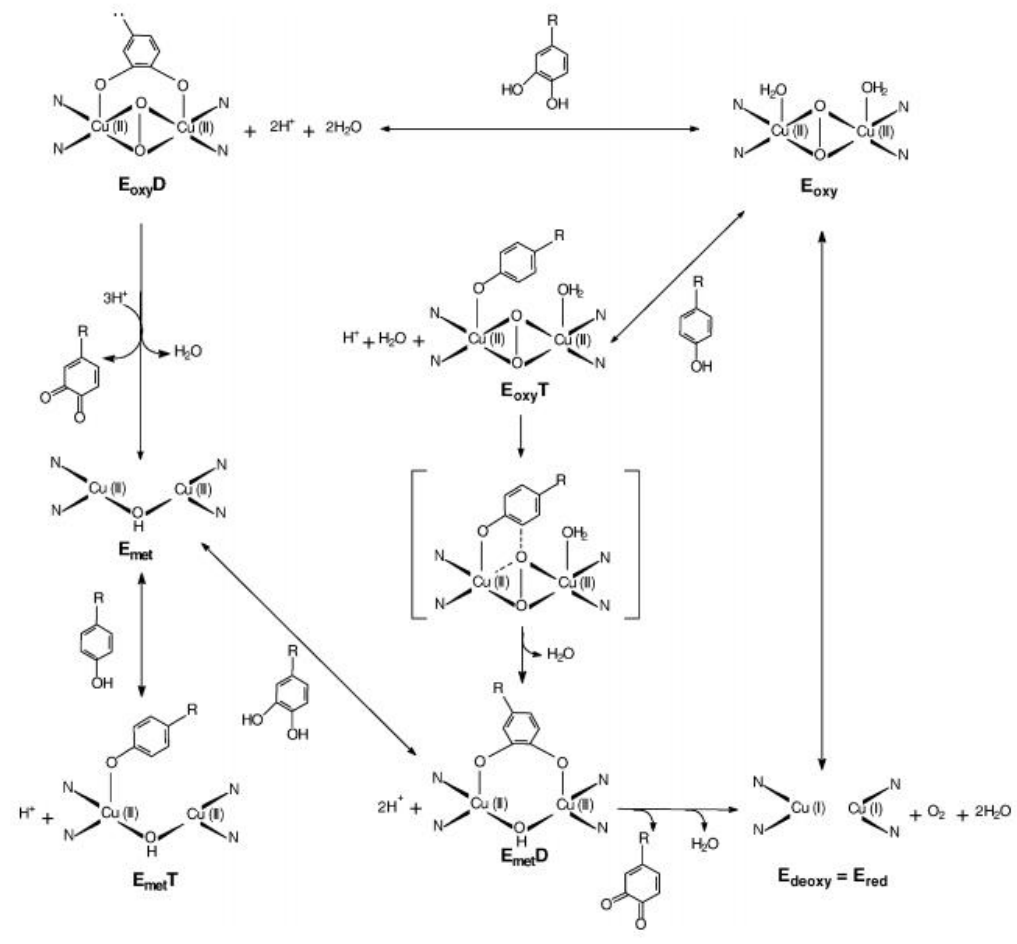


Figura 3. Representação da estrutura da tirosinase e mecanismo de oxidação de fenóis catalisada pela enzima adaptado da referência75.

Os métodos de imobilização da tirosinase têm influência direta na biocatálise dos compostos fenólicos, como na estabilidade e atividade eletrocatalítica dos sensores. Podem-se utilizar diferentes estratégias de imobilização como ligação covalente, entrapamento, encapsulação e adsorção⁷⁶. Dessa maneira, diferentes métodos de imobilização e suportes vem sendo utilizados com sucesso no aumento da estabilidade enzimática da tirosinase. Como principais suportes destacam-se os materiais porosos de sílica⁷⁷ e materiais biocompatíveis como filmes poliméricos⁷⁸ e partículas de magnetita⁷⁹.

3.3.2. Magnetita

Nos últimos anos observa-se um interesse crescente em aplicação de magnetitas (Fe_3O_4) no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, devido as suas propriedades eletrocatalíticas e a baixa resistência a transferência de massa. Recentemente, muitos materiais nanoestruturados contendo magnetitas vem sendo aplicados como eletrodos de pasta de carbono⁸⁰ e carbono vítreo⁸¹ para detecção de analitos como hormônios e íons metálicos. Além de biocompatíveis e não genotóxicas, essas partículas apresentam comportamento magnético quando expostas a um campo magnético externo. Aproveitando essa vantagem aliada ao baixo custo, partículas magnéticas (MP) tem sido utilizadas universalmente como ferramenta de separação e purificação de ácidos nucleicos, proteínas e compostos biologicamente ativos. A facilidade de separação no processo de imobilização enzimática, faz com que essas espécies não percam atividade na superfície do suporte⁸². Além disso, podem ser úteis em outras aplicações como adsorventes e catalisadores de fácil recuperação.

As propriedades físico-químicas das MPs como tamanho, magnetização e morfologia da superfície são parâmetros importantes para definir a utilidade de aplicação dessas partículas. Partículas pequenas de 1-10 nm apresentam superparamagnetismo, enquanto as maiores, na ordem de micrômetros, apresentam propriedades ferrimagnéticas. Diferentes métodos sintéticos podem ser utilizados na obtenção de MPs como microemulsão, co-precipitação e método solvotérmico, apresentando influência direta nas propriedades morfológicas da partícula formada. A co-precipitação é um método bastante empregado em larga escala para aplicações com fins biológicos. Esse método baseia-se na precipitação de cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa através da adição de uma base⁸³.

Além de servir como ferramenta de separação universal, sensores magnéticos apresentam respostas mais sensíveis fornecendo uma nova plataforma tecnológica para o desenvolvimento de biossensores. As estratégias de detecção baseadas em MPs oferecem vantagens em termos de figuras analíticas de mérito, como aumento da sensibilidade, baixos valores de limite de detecção (LOD), alta relação sinal-ruído e menor tempo de análise comparando-se a estratégias que não empregam sistemas magnéticos⁸². Nas aplicações de detecção, MPs são usados através da aplicação direta do suporte marcado ao sensor, sendo integrado nos materiais do transdutor e /ou dispersão das MPs na amostra. Para biossensores eletroquímicos com base em MPs, diferentes modos de detecção e quantificação de analitos podem ser utilizados, como voltametria cíclica, amperometria, potenciometria, eletroquimioluminescência e impedância eletroquímica. Devido à sua propriedade magnética, biocompatibilidade com anticorpos e enzimas e facilidade de preparação as MPs são mais comumente utilizadas no desenvolvimento de biossensores^{84,85}.

O revestimento das MPs com sílica, conhecido como *core-shell* ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$) é um dos mais utilizados em biossensores uma vez que contribui para a estabilidade de MPs e torna viável a funcionalização de ligantes na superfície de MPs. MPs são instáveis quando expostas a atmosfera. O *shell* de sílica formado pode retardar a reação de oxidação, aumentando a estabilidade química e térmica das MPs, a biocompatibilidade e a possibilidade de funcionalização⁸⁶. Além disso, resultados experimentais mostram MPs inseridas a sistemas eletroquímicos podem aumentar o transporte de massa e melhorar o acesso aos sítios ativos do material aumentando o sinal analítico e conseqüentemente a sensibilidade.

Dessa maneira, diferentes compósitos podem ser modificados com MPs com o objetivo de melhorar a resposta eletroquímica. Recentemente, um nanocompósito de nanotubos de carbono decorado com $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ foi sintetizado e usado para fabricar um eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado para a determinação de ácido úrico. As características do eletrodo foram estudadas por voltametria cíclica para um EPC modificado com MPs comparado a um EPC não modificado. A corrente de pico anódico do eletrodo modificado com MPs foi 2,7 vezes maior e teve uma resposta 4,6 vezes mais rápida. Embora não existam muitos trabalhos que discutam o mecanismo de influência de partículas magnéticas na eletroquímica, resultados empíricos comprovam que MPs têm estabelecido interfaces úteis na eletrocatalise de processos redox de moléculas envolvidas em muitas reações bioquímicas importantes⁸⁷.

3.3.3. Nanopartículas de ouro

Ao longo dos últimos dez anos, foram feitos progressos significativos com nanopartículas de ouro (NPs-Au) em biologia e nanomedicina, em aplicações terapêuticas e de imagem. Essas competências são baseadas em suas propriedades características, como propriedades ópticas, alta área de superfície e capacidade de modificação. Devido à sua estabilidade e recuperação em processos bioquímicos, NPs-Au são espécies catalisadoras utilizadas em inúmeros processos redox, possibilitando a miniaturização de dispositivos de detecção eletroanalítica em nanoescala e oferecendo excelentes perspectivas para detecção química e biológica⁸⁸.

Nanopartículas de metais nobres são amplamente reconhecidos como suportes ideais para a fabricação de sensores eletroquímicos. Na era atual de nanotecnologia, NP-Au possuem aplicações potencialmente anticancerígenas, antimicrobianas e biodiagnósticas. Em sensores eletroquímicos, NPs-Au facilitam a amplificação do reconhecimento e dos eventos de transdução, que podem ser usados como biossensores ultra-sensíveis para detecção de DNA ou proteínas. Os eletrodos de carbono vítreo vem sendo amplamente modificados com NPs-Au aplicados como sensores eletroquímicos, mostrando maior estabilidade e sensibilidade no desenvolvimento desses dispositivos⁸⁹.

Eletrodos modificados com NPs-Au apresentam várias vantagens como catálise efetiva, transporte de massa rápido e grande área de superfície do sensor. O tamanho de partícula e a dispersão entre partículas no suporte são características importantes no desenvolvimento de sensores eletroquímicos que contribuem para maior área eletroativa devido a relação superfície/volume. Dessa maneira, o desenvolvimento de métodos mais recentes para o controle da síntese de NPs metálicas com diferentes formas e tamanhos atrai a atenção na última década. A concentração do sal, do agente redutor e a temperatura são importantes parâmetros para determinar o tamanho das nanopartículas⁸⁸. A agregação entre as partículas também pode ser evitada utilizando agentes estabilizantes como polímeros e compostos orgânicos de cadeia longa, dentre eles a quitosana^{90,91}.

Comparados a materiais *bulk*, a presença de NPs-Au é responsável por aumentar a velocidade de transferência eletrônica decorrente do aumento da área eletroativa, facilitando as reações redox ocorridas na interface solução/eletrodo. Soluções de sonda redox como ferrocianeto de potássio/ferrocianato de potássio podem ser utilizadas na caracterização das propriedades de superfície de materiais modificados com NPs-Au, através de análises eletroquímicas como a voltametria cíclica⁹².

De um modo geral, NPs-Au podem ser aplicadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos de duas maneiras: aliadas a sistemas enzimáticos, aumentando a eficiência biocatalítica desses sistemas ou, aplicadas unicamente na modificação de superfícies, mais conhecidos como sensores não enzimáticos capazes de aumentar e sensibilidade e diminuir o limite de detecção dos dispositivos eletroquímicos. Devido a sua excelente biocompatibilidade, NPs-Au são consideradas excelente opção na construção de biossensores.

3.3.4. Eletrodos de pasta de carbono

Desde a sua invenção em 1958, os eletrodos de pasta de carbono (EPCs) significativa evolução, prosseguindo o progresso em eletroquímica, eletroanálise e análise instrumental. Da mesma forma que nas décadas anteriores, EPCs continuam sendo produzidos através de misturas feitas de pó de grafite espectroscópico, comercialmente disponível, e de óleos minerais ou fluidos de silicone. Além de pó comum de grafite, também podem ser misturados outros materiais modificados, formando pastas de carbono mais específicas. Nas últimas décadas, tais investigações utilizam novas misturas de materiais modificados com nanopartículas, espécies eletroativas e espécies de reconhecimento biológico capazes de aumentar a sensibilidade e a resposta eletroquímica desses eletrodos⁹³.

Um grande número de EPCs são aplicados com sucesso na detecção e quantificação de espécies inorgânicas, orgânicas ou biológicas como íons metálicos, compostos fenólicos, proteínas, glicose, NADH, entre outros^{94,95,96}. Comparados a outros tipos de eletrodo, os EPCs destacam-se por ser uma alternativa versátil e de baixo custo.

Materiais a base de sílica são considerados excelentes suportes no desenvolvimento de EPCs por oferecerem possibilidades de fácil funcionalização com uma variedade de compostos orgânicos. Além disso, a preparação de híbridos organo inorgânicos de sílica em um único sólido combinam a estabilidade do esqueleto inorgânico com reatividade da porção orgânica, proporcionando aos EPCs modificados maior versatilidade e reprodutibilidade.

Apesar de ter sido descoberta no século passado, a pasta de carbono ainda representa um dos materiais de eletrodos mais populares com aplicações quase ilimitadas na pesquisa em eletranalítica. Os trabalhos com EPCs já absorveram inúmeros resultados provenientes da progressiva tecnologia de novos modificadores e mediadores, até a

introdução de misturas de pasta de carbono completamente novas, nas quais as frações de grafite e aglutinante são substituídas por outras alternativas^{97,98}. Dessa maneira, os EPCs tornaram-se extremamente populares e vastamente aplicados em pesquisa no campo de eletroquímica devido a algumas características primordiais, como simples preparação, baixo custo, fácil reprodução, superfície facilmente renovável por polimento e ampla janela de potencial⁹³. Na Figura 4 está apresentada a estrutura básica de um EPC.

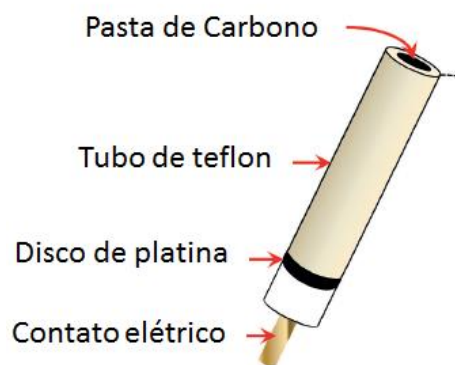


Figura 4. Representação da estrutura de um EPC convencional.

3.4. Detecção eletroanalítica: técnicas voltamétricas

Os métodos voltamétricos são as técnicas de transdução em sistemas de detecção e quantificação eletroquímica, baseados na medição da corrente resultante de um sistema redox. As abordagens voltamétricas fornecem não apenas análise quantitativa sensível e rápida, mas também revelam características do processo eletroquímico na superfície do eletrodo de trabalho. Além disso, abordagens voltamétricas podem oferecer a determinação simultânea de substâncias potencialmente interferentes⁹⁹.

Dentre os métodos voltamétricos, destacam-se como os mais utilizados a voltametria cíclica (VC), a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ). As técnicas voltamétricas mais comuns baseiam-se na alteração contínua do potencial que é aplicado a solução através do eletrodo, juntamente com a medição da corrente resultante⁹⁹.

3.4.1. Voltametria Cíclica

A técnica de onda contínua mais utilizada é a voltametria cíclica (VC), aplicada para determinar a natureza das reações redox que ocorrem em uma solução. Esta estratégia, embora não tão sensível como técnicas baseadas em pulso, é útil na

caracterização e rastreamento do comportamento redox de um analito. A VC é usada como uma ferramenta para aquisição de dados críticos, como mecanismos de oxirredução, a determinação de potenciais formais, transferência eletrônica e a cinética envolvida no processo redox. A forma de onda para VC é linear, dessa maneira, o potencial é modificado continuamente em função linear do tempo¹⁰⁰.

A VC é uma técnica de varredura de tensão rápida na qual a direção da varredura de tensão é revertida. Enquanto é aplicado o potencial no eletrodo de trabalho em direções direta e inversa, a corrente resultante é registrada. A velocidade de varredura na direção direta e inversa é normalmente a mesma e a técnica pode ser usada em modos de ciclo único ou multiciclo, permitindo avaliar parâmetros importantes como potencial de pico anódico e catódico (E_{pa} e E_{pc}), corrente de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc}) e os potenciais de meio pico ($E_{p1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$) em que as correntes catódicas e anódicas atingem a metade do seu valor máximo. A voltametria cíclica apresenta dois valores de corrente associados: a corrente faradaica decorrente da reação redox e a corrente capacitiva que está associada a dupla a carga da dupla camada e varia dependendo do eletrodo de trabalho. Devido a influência da corrente capacitiva nessa análise, a VC não é frequentemente usada para a determinação quantitativa, mas é muito útil no estudo de reações redox fornecendo informações importantes¹⁰¹.

3.4.2. Voltametria de pulso diferencial

De todas as técnicas eletroanalíticas, as estratégias de pulso destacam-se pela sensibilidade. Procedimentos como a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada mostram-se como técnicas mais eficientes e sensíveis na quantificação de analitos. Essas técnicas baseiam-se em pulsos de um potencial para outro em vez de uma varredura de potenciais, como é o caso da VC. Em VDP o potencial de pulso é fixo e é superposto ao potencial de base em mudança lenta. A corrente (i) é medida em pontos demarcados antes da aplicação do pulso, e no final do pulso. A primeira corrente é subtraída da segunda, e a diferença atual $\{\Delta i = i(t_2) - i(t_1)\}$ é plotada versus o potencial aplicado. O ponto mais alto da corrente de pico produzida é proporcional à concentração de analito⁹⁹.

O princípio central por trás das técnicas de pulso reside na diferença nas taxas de decaimento da corrente de carga e da corrente faradaica. A corrente de carga decai muito mais rapidamente do que a corrente faradaica devido à sua decadência como função

exponencial, enquanto a decomposição da corrente faradaica é inversamente proporcional à raiz quadrada do tempo. Portanto, no final de cada pulso a corrente capacitiva é insignificante comparada a corrente faradaica. Esse aumento da diferença de corrente faradaica para não-faradaica permite um menor limite de detecção bem como maior sensibilidade, e, portanto, é ideal para quantificações eletroanalíticas¹⁰².

3.4.3. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada foi introduzida pela primeira vez por Barker em 1952. É uma técnica de pulso onde a corrente é duplicada durante cada ciclo, uma vez no final do pulso direto e o outro no final do pulso inverso. A diferença entre as duas medidas é plotado versus o potencial de base. A principal vantagem da VOQ é a sua velocidade, podendo alcançar velocidades de até 1 V s^{-1} ¹⁰².

A VOQ pode ser aplicada para a análise de reações reversíveis e irreversíveis, reação com transferência eletrônica lenta e também às reações catalisadas, usada principalmente por sua capacidade de operação em altas frequências, resultando em respostas mais rápidas. Semelhante a VC, o aumento da velocidade de varredura corresponde a um aumento na corrente de pico. No entanto, isso também envolve um aumento no potencial de pico, e ao contrário da VC, este potencial de pico será proporcional ao logaritmo da frequência da onda quadrada⁹⁹.

Uma comparação das três técnicas voltamétricas principais é apresentada na Figura 5, que mostra os voltamogramas de um eletrodo de carbono vítreo para detecção de nitrofenol utilizando diferentes técnicas¹³⁴. As características desses voltamogramas seguem as tendências esperadas deles, com o pico de corrente do VOQ sendo aproximadamente quatro vezes maior que o de VPD¹⁰³.

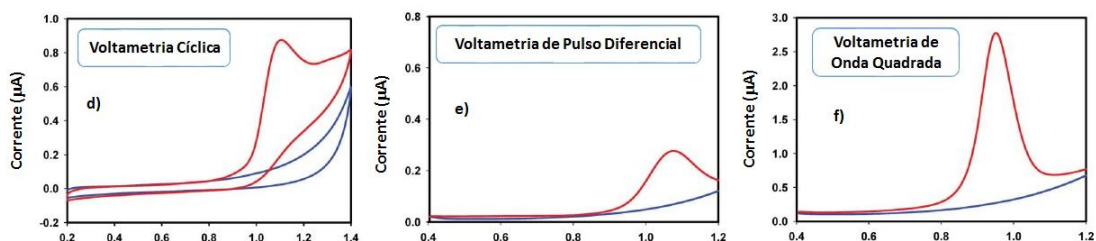


Figura 5. Comparação do sinal eletroanalítico de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.

Desse modo, a VOQ é uma técnica alternativa dinâmica e versátil que tem sido amplamente aplicada em diagnósticos médicos, análise ambiental, ciências alimentares e para a determinação de cinética enzimática. Uma pesquisa relevante que abrange os últimos dez anos, revela o aumento na popularidade do uso de VOQ como metodologia no desenvolvimento de sensores, tornando-se uma metodologia reconhecidamente útil com um crescente número de publicações bem sucedidas em aplicações eletroanalíticas¹⁰⁴.

3.5. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos (CFs) são compostos aromáticos derivados do fenol podendo apresentar um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados ao anel benzênico. O fenol por sua vez, é o membro mais simples da família dos fenóis apresentando como fórmula estrutural C_6H_5OH , altamente tóxico para humanos através do contato por vias cutâneas e respiratórias. Compostos fenólicos, possuem fórmula estrutural C_6H_4OH-R com diferentes radicais ligados a sua estrutura base, sendo amplamente encontrados em resíduos industriais, na indústria de alimentos e bebidas, produtos farmacológicos e pesticidas¹⁰⁵.

Originários de resíduos industriais, os CF são normalmente encontrados em efluentes (como resíduos de refinarias de petróleo, plásticos, corantes, produtos têxteis, detergentes e produtos farmacêuticos). A sua utilização na produção de herbicidas e pesticidas torna fácil a contaminação de águas. Alguns dos poluentes fenólicos mais encontrados em efluentes são o nitrofenol, bisfenol A, clorofenol e catecol, sendo tais compostos objeto de inúmeros estudos para tratamento e recuperação de águas a partir de novos materiais adsorventes e potenciais fotocatalisadores para degradação de CFs¹⁰⁶.

Por outro lado, compostos polifenólicos presentes em alguns tipos de alimentos e bebidas, não são considerados tóxicos ao consumo humano e possuem efeito antioxidante, antiviral e antiinflamatório. Os compostos polifenólicos mais comuns são os taninos e flavonoides, podendo os mesmos serem encontrados na chia, quinoa, amendoim e também em amostras de bebidas como cerveja e vinho¹⁰⁷. Além disso, alguns fenóis derivados do catecol como as catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina) são neurotransmissores essenciais ao sistema nervoso central, sendo importante sua determinação e quantificação em estudos de diferenças doenças neurológicas como Parkinson e Alzheimer¹⁰⁸.

Nas últimas décadas, diferentes técnicas analíticas têm sido desenvolvidas com o objetivo de monitorar e determinar seletivamente CFs. Dentre elas, destacam-se a espectrofotometria, cromatografia gasosa e cromatografia líquida. No entanto, esses métodos possuem alto tempo de análise, incluindo o pré-tratamento de amostras complexas e dependem de equipamentos caros e não portáteis. Sendo assim, nos últimos o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para determinação de CFs tem despertado o interesse científico como uma alternativa de análise simples, sensível, específica e precisa, aliada ao baixo custo¹⁰⁹.

3.5.1. Catecol

O catecol é o orto isômero do dihidroxibenzeno (Figura 6) amplamente utilizado na produção de pesticidas, perfumes e fármacos, considerado potencial poluente ambiental devido a sua baixa biodegradabilidade e alta toxicidade a saúde humana e ao eco sistema. Também é um composto carcinogênico, capaz de provocar sintomas de depressão em casos de exposição prolongada¹¹⁰.

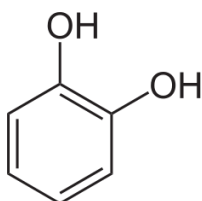


Figura 6. Estrutura do catecol

O uso de diferentes técnicas eletroanalíticas e a utilização eletrodos quimicamente modificados são estratégias utilizadas para melhorar a seletividade e sensibilidade na detecção eletroquímica de catecol. Dentre os eletrodos mais utilizados, destacam-se eletrodos impressos, eletrodos de pasta de carbono e eletrodos de carbono vítreo quimicamente modificados com tirosinase^{111,112}.

3.5.2. Catecolaminas

A catecolaminas, assim denominadas por conter em sua estrutura básica o esqueleto da molécula de catecol ligadas a um grupo amino, são neurotransmissores essenciais ao funcionamento do sistema nervoso central e periférico, capazes de inibir, excitar e influenciar a atividade celular. A biossíntese das catecolaminas é derivada de

um precursor comum (ácido amino tirosina), formando dihidroxifenilalanina (DOPA) através de uma reação catalisada pela tirosina¹⁰⁸.

3.5.3. Dopamina, norepinefrina e epinefrina

A epinefrina, dopamina e norepinefrina são catecolaminas importantes ao sistema nervoso central, cada uma com suas funções específicas. As estruturas correspondentes estão apresentadas na Figura 7.

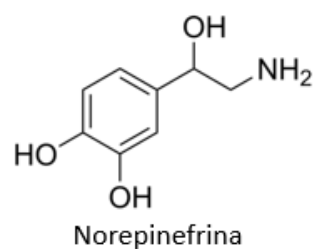
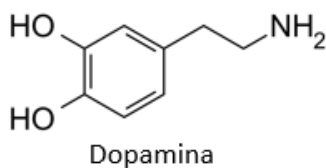
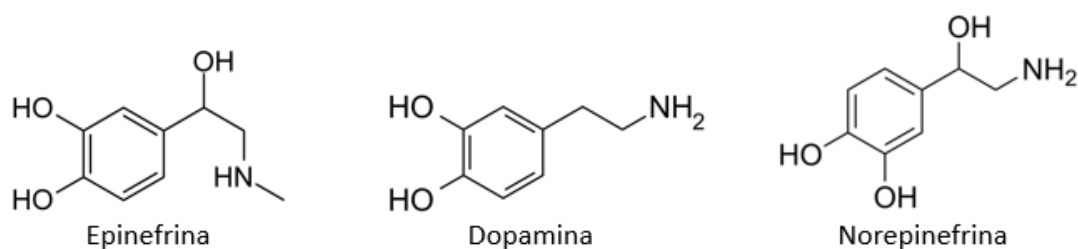


Figura 7. Estruturas da epinefrina, dopamina e norepinefrina.

Essas estruturas são assim nomeadas pois apresentam em suas estruturas, um difenol, semelhante ao catecol, conectado a um grupo amino. Devido ao envolvimento em mecanismos fisiológicos, há mais de 150 anos, relatam-se patologias relacionadas a concentração desses compostos no organismo, influenciando em desordens neurológicas como Parkinson, Alzheimer, hiperatividade, esquizofrenia e depressão¹¹³.

Cada neurotransmissor é responsável por desempenhar diferentes funções no organismo. A dopamina tem importante atividade biológica no sistema periférico central. Está associada ao sistema de recompensa do cérebro causado pela procura de estímulos assim como sentimento de satisfação e insatisfação. Receptores de dopamina foram primeiramente encontrados no cérebro, embora também existam nos rins. A norepinefrina é sintetizada a partir da dopamina através de uma reação catalisada pela β -hidroxilase capaz de influenciar o sono, a atenção e o comportamento alimentar. A epinefrina, por sua vez, é um hormônio produzido pela glândula adrenal, tendo sua produção alterada em horas de atividades físicas e situações estressantes e a sua versão sintética tem sido amplamente utilizada na área médica¹⁰⁸.

Os níveis normais apresentados no sangue correspondem a aproximadamente 150–800 ng L⁻¹ para a norepinefrina e de 10–50 ng L⁻¹ para epinefrina e dopamina¹⁰⁸.

Considerando-se os parâmetros eletroanalíticos atuais, poucos trabalhos conseguem alcançar sensibilidades necessárias para determinações nessas faixas de concentração. Por outro lado, o avanço crescente do número de dispositivos eletroquímicos e estratégias utilizadas torna mais próxima a viabilidade de detecção eletroanalítica desses compostos no futuro.

3.5.4. Determinação eletroanalítica de catecolaminas

Uma ampla faixa de dispositivos analíticos tem sido reportados para a detecção rápida, sensível e seletiva de catecolaminas, destacando-se métodos eletroquímicos, através de dispositivos de baixo custo e fácil operação na detecção desses compostos. Adicionalmente, esses sensores podem ser incorporados a um sistema robusto e miniaturizado aplicados no rápido diagnóstico de doenças¹¹⁴.

Um dos primeiros estudos envolvendo o comportamento eletroquímico de catecolaminas foi reportado em 1967, relatando-se a dependência do comportamento eletroquímico das catecolaminas em função do pH, através de intermediários formados nas etapas de oxidação¹⁰⁸.

O principal desafio na detecção eletroquímica de catecolaminas em fluídos biológicos, encontra-se na presença de substâncias coexistentes nessas matrizes como ácido ascórbico, serotonina, glicose e ácido úrico que também podem sofrer reações redox em faixas de potenciais coincidentes as catecolaminas, responsáveis por resultados de interferência na resposta eletroquímica¹⁰⁸.

Nesse sentido, eletrodos quimicamente modificados com filmes poliméricos, biomoléculas com propriedades eletrocatalíticas, nanoestruturas metálicas e magnéticas e espécies eletroativas visam eliminar os problemas de interferência associados a detecção eletroquímica desses compostos. Resultados empíricos mostram que muitas dessas alternativas são capazes de alterar os potenciais de oxidação desses compostos para valores menos afetados por interferentes¹¹⁵.

Outro desafio relacionado a detecção de catecolaminas encontra-se nas baixas quantidades presentes em fluídos biológicos, tornando-se necessário o desenvolvimento de sensores com baixos limites de detecção e altas sensibilidades, capazes de realizar leituras na faixa de concentração correspondente a nmol L^{-1} . Na literatura ainda são encontrados poucos exemplos de sensores eletroquímicos que conseguem realizar a determinação de catecolaminas na faixa de concentração necessária para determinação em amostras de fluídos biológicos¹⁰⁸. Dessa maneira, tem se buscado desenvolver novos

materiais a fim de melhorar a sensibilidade dos eletrodos tornando viável a aplicação desses dispositivos no diagnóstico de doenças.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.Reagentes

Os reagentes utilizados no desenvolvimentos da pesquisa foram: Cloreto de ferro hexahidratado (Vetec, 97%), etileno glicol (Merck, 99,5%), ortossilicato de tetraetila (TEOS) (Aldrich, 98%), acetato de sódio trihidratado (Nuclear, 99%), hidróxido de amônio (NH₄OH) (Merck, 25%), isopropóxido de titânio (TIPO) (Aldrich, 97%), etanol (Merck, 99.9%), ácido fluorídrico (HF) (Merck, 40%), ácido clorídrico (HCl) (Merck, 37%), tirosinase (Ty) (Sigma, E.C. 1.14.18.1 com atividade de 1000 U/mg), catecol (Sigma Aldrich, 99%), epinefrina (Sigma, >99%), dopamina (Sigma, 98%), (-) Norepinefrina (Sigma, >98%) cloreto de potássio (Sigma Aldrich, 99%), quitosana (Aldrich), ácido fórmico (Neon 85%), hidreto de boro e sódio (Vetec 95%). As soluções de tampão fosfato foram preparadas a partir de fosfato de sódio monobásico mono- hidratado NaH₂PO₄•H₂O (FMaia, 98%) e fosfato de sódio bibásico anidro (Na₂HPO₄) (FMaia, 99%). Óleo mineral foi obtido na forma comercial de nujol.

4.2.Síntese dos materiais de sílica/titânia

No presente trabalho foram sintetizados três amostras do material sílica/titânia contendo diferentes quantidades de titânia em volume (30, 40 e 50%) os quais foram chamados de SiTi30, SiTi40 e SiTi50, respectivamente. Também foi obtido um material sílica/titânia magnético contendo 30% de titânia em volume. Após o suporte SiTi30 foi modificado com nanopartículas de ouro e o suporte SiTiMPs com a enzima tirosinase, a Tabela 1 abaixo apresenta as etapas de modificações realizadas.

Tabela 1. Nomenclaturas das amostras e suas modificações.

Amostra	Amostra Modificada
SiTi30	SiTi30-Au
SiTi40	-----
SiTi50	-----
SiTiMP	SiTiMP-Ty

4.2.1. Síntese dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50

A síntese dos xerogéis de sílica/titânia ocorreu pela adição de TEOS em um béquer contendo 7 mL de etanol e 0,6 mL de água. Após 1h, foram adicionadas diferentes proporções de TIPO para cada material, 1,8 mL de HF e 1,2 mL de HCl. Após a

gelificação, o sistema permaneceu em condições ambientes para completa evaporação do solvente. Após 15 dias, os monólitos obtidos foram macerados e lavados com água destilada e etanol, sendo posteriormente secos sob vácuo na temperatura de 100 °C por 2 h. Os materiais resultantes foram denominados SiTi30, SiTi40 e SiTi50, contendo 30%, 40% e 50% de titânio em volume, respectivamente. Os volumes de TEOS e TIPOT usadas na síntese de cada material estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Volumes dos precursores utilizados na síntese dos materiais sílica/titânia.

Amostra	Volume (mL)	
	TEOS	TIPOT
SiTi30	5,0	2,1
SiTi40	4,2	2,8
SiTi50	3,5	3,5

4.2.2. Modificação da amostra SiTi30 com nanopartículas de ouro

A amostra SiTi30 descrita anteriormente foi modificada com nanopartículas de ouro previamente estabilizadas em quitosana. As etapas de modificação estão divididas em a) e b) como é apresentado a seguir:

a) Preparação da dispersão das nanopartículas de ouro

Para obtenção do ácido cloro áurico, 99 mg de ouro em pó foram atacadas com 1 mL de ácido nítrico e 3 mL de ácido clorídrico. Após, 1 mL da solução resultante foi reduzida utilizando 10 mL de solução de NaBH₄ 0,02 mol L⁻¹ e estabilizada em 75 mg de quitosana, 1 mL de ácido fórmico e 9 mL de água sob agitação. A solução resultante foi neutralizada com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até o pH de 6,5 com auxílio de um pHmetro.

b) Imobilização das nanopartículas de ouro na amostra SiTi30

As nanopartículas de ouro previamente estabilizadas em quitosana foram imobilizadas na amostra SiTi30 pelo método de *grafting*. Para isso 25 mL de dispersão contendo as nanopartículas de ouro foi colocada em contato com 500 mg do material SiTi30 sob agitação mecânica a temperatura ambiente durante 24h. O material resultante foi lavado com etanol e água e seco a vácuo a temperatura ambiente. O sólido resultante foi denominado SiTi30-Au.

4.2.3. Síntese do material magnético sílica titânia SiTiMPs

O material SiTiMPs foi sintetizado em duas etapas. Na primeira etapa foram sintetizadas as partículas magnéticas recobertas por sílica (MPs). Na segunda etapa foi sintetizado o xerogel magnético de sílica/titânia com proporção de 30% de titânia, contendo as MPs. A seguir estão apresentadas detalhadamente as etapas de síntese.

a) Síntese das magnetitas

A síntese de partículas de magnetita foi realizada através do método solvotérmico¹¹⁶, dissolvendo 2,16 g de cloreto de ferro em 100 mL de etilenoglicol e depois adicionando 10,88 g de acetato de sódio tri-hidratado. A mistura foi agitada durante uma hora, transferida para uma autoclave de aço inoxidável forrada com Teflon e aquecida até 180 °C durante 10 h. Depois, o precipitado preto foi separado usando um ímã, lavou-se cuidadosamente com etanol e secou-se a vácuo durante 2 h.

O recobrimento de sílica foi obtido utilizando o método Stöber adaptado¹¹⁷. As partículas de magnetita (300 mg) foram dispersas numa mistura de etanol (90 mL), água destilada (22,5 mL) e hidróxido de amônio (2,7 mL) em banho de ultrassom durante 1 h. Em seguida, adicionou-se 0,67 mL de TEOS e o sistema permaneceu em banho ultrassônico durante 2 horas adicionais. Neste ponto, as partículas de magnetita cobertas com sílica (MPs) foram separadas com um ímã, lavadas em sequência com etanol, água e etanol, depois secas ao vácuo durante 2 h.

b) Síntese do xerogel SiTiMPs

O material sílica/titânia com partículas magnéticas foi sintetizado pelo método sol gel. Na primeira etapa, foi realizada a pré hidrólise de 1,04 mL de TEOS em 1,5 mL de etanol e 0,15 mL de água sob agitação magnética a temperatura ambiente durante o período de 1h. Após, foram adicionados no sistema 0,44 mL de TIPOT gota a gota sob agitação magnética. Após verificar a homogeneidade do sistema, o mesmo foi transferido para um béquer contendo 400 mg de MPs previamente dispersadas em 2 mL de etanol. Após 5 minutos de agitação, foram adicionadas 10 gotas de HF e 4 gotas de HCl. O material resultante foi mantido sobre repouso durante 7 dias para a completa gelificação e evaporação do solvente. O xerogel obtido foi macerado e lavado com etanol e água e seco sob vácuo a temperatura ambiente e o material foi denominado como SiTiMPs.

4.2.4. Imobilização da enzima tirosinase na amostra SiTiMPs

A enzima tirosinase foi imobilizada na superfície da amostra SiTiMPs pelo método de *grafting*. Para isso, 12 mg de enzima foram dissolvidos em 10 mL de solução

tampão fosfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ pH 7. A solução resultante foi adicionada em sistema de agitação mecânica contendo 250 mg do material SiTiMPs. A imobilização foi realizada a temperatura ambiente e o sistema permaneceu sob agitação por 24h. Após, o material foi lavado com tampão fosfato e solução NaCl 1M e seco a vácuo a temperatura ambiente. O sólido obtido foi denominado SiTiMPs-Ty.

4.3. Técnicas de caracterização

Foram utilizadas diferentes técnicas de caracterização visando avaliar as propriedades texturais, estruturais e morfológicas dos materiais de sílica/titânia sintetizados antes e após as modificações. As técnicas utilizadas e os parâmetros de análise estão apresentados a seguir:

4.3.1. Difração de raios X

Os materiais de sílica/titânia e as MPs foram submetidos a análise de difração de raios X utilizando o difratômetro Siemens modelo D500. A fonte de raios X utilizada foi de CuK α ($\lambda=0,154056$ nm), e ainda empregou-se um gerador de tensão e de corrente de 40 kV e 1,75 mA, respectivamente.

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura para os materiais SiTi30, SiTi40, SiTi50 e SiTiMPs. As amostras foram dispersas em fita de carbono metalizada com um filme fino de ouro fixada a um suporte de alumínio. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura, modelo Zeiss EVO MA10. As micrografias foram obtidas operando a uma voltagem de aceleração de 10 kV. Para a análise dos materiais com magnetita foi utilizada a técnica de elétrons retro espalhados (*backscattering*).

4.3.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica dos materiais foi realizada sob fluxo de nitrogênio utilizando Shimadzu Instrument modelo TGA-50 2, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, partindo da temperatura ambiente até 850 °C.

4.3.4. Magnetização

As propriedades magnéticas foram investigadas usando um magnetômetro de amostra vibratório (VSC) a temperatura ambiente com um campo magnético ciclado entre -20 kOe e $+20$ kOe.

4.3.5. Espectroscopia na região do UV-Visível

Os espectros em solução foram obtidos utilizando Espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 50 Conc, na janela espectral de 300 a 800 nm.

4.3.6. Isotermas de adsorção e dessorção de N₂

A análises de isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram realizadas na temperatura do nitrogênio líquido (-196°C) utilizando um equipamento Tristar Krypton 3020 Micromeritics. As amostras de sílica/titânia foram submetidas a tratamento térmico a 120°C sob vácuo por 10 h. As amostras contendo partículas magnéticas, quitosana e tirosinase foram conduzidas sem prévio tratamento térmico. A área superficial específica dos materiais foi determinada pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) e as curvas de distribuição de tamanho de poros pelo método BJH (Barret, Joyner e Halenda).

4.3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

As micrografias de Microscopia Eletrônica de transmissão (TEM) do material SiTi30-Au foram obtidas utilizando um microscópio JEOL JEM 1220 operando em 120 kv. A amostra foi preparada a partir da dispersão em álcool isopropílico em ultrassom por 30 minutos. Após, duas gotas da dispersão foram adicionadas a uma grid de Cu revestida com carbono e esperou-se a secagem a condições ambientes.

4.4. Medidas eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato IviumStat e o software IviumSoft foi utilizado para aquisição e tratamento de dados. Para as medidas eletroquímicas, utilizou-se uma cela eletroquímica convencional de três eletrodos, contendo como referência o eletrodo de calomelano saturado (ECS) utilizado, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o EPC como eletrodo de trabalho. As medidas foram conduzidas a temperatura ambiente na presença de solução KCl 1 mol L^{-1} como eletrólito suporte.

Todos os materiais foram caracterizados por voltametria cíclica (VC) utilizando como sonda uma solução ferrocianeto de potássio/ferricianeto de potássio concentração 1 mmol L^{-1} . Para essas medidas a faixa de potencial utilizada foi de -0,5 até 1,0 V. As análises de voltametria de pulso diferencial foram conduzidas sob os seguintes parâmetros: tempo de pulso: $50 \mu\text{s}$, amplitude de pulso: 50 mV, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . As análises de voltametria de onda quadrada foram conduzidas utilizando a faixa de potencial de 0,5 V até -0,5 V com amplitude de pulso de 20 mV e frequência de 3 Hz.

Para análises de quantificação, foram realizadas sucessivas adições de 100 em 100 μL de uma solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ previamente preparada para cada analito. Para cada adição, a solução contida na cela permaneceu sob agitação por 30 segundos e a leitura foi realizada após repouso de 45 segundos.

4.4.1. Preparo dos eletrodos de pasta de carbono

O eletrodo de pasta de carbono (EPC) foi utilizado como eletrodo de trabalho em todas as medidas eletroquímicas apresentadas. Os mesmos foram confeccionados a partir da mistura de 8 mg do material modificado de sílica/titânia com 10 mg de pó de grafite em gral de ágata. Após, foram adicionados 3 mg de óleo mineral e a pasta resultante foi comprimida contra o disco de platina de 4 mm de diâmetro, localizado na extremidade de um tubo de vidro com 10 cm de comprimento, conectado a um fio de cobre.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I

Material mesoporoso sílica/titânia modificado com nanopartículas de ouro e sua aplicação como sensor eletroquímico para dopamina e norepinefrina

Os materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50, contendo diferentes proporções de sílica/titânia, foram caracterizados por diferentes técnicas que visaram avaliar as suas propriedades morfológicas, texturais e o seu comportamento eletroquímico. Após a caracterização, o material SiTi30 foi modificado com nanopartículas de ouro (SiTi30-Au) e aplicado como sensor para determinação simultânea de norepinefrina e dopamina. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

5.1. Caracterização dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50

As técnicas utilizadas para a caracterização dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50 foram isotermas de adsorção e dessorção de N₂, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, difratometria de raios X e o comportamento eletroquímico foi investigado através de voltametria cíclica. Os resultados estão apresentados e discutidos a seguir.

5.1.1. Análise textural e morfológica

As características texturais dos materiais a base de sílica/titânia foram avaliadas através de análises de isotermas de adsorção e dessorção de N₂, apresentadas na Figura 8a. Essa técnica baseia-se no volume adsorvido pelo gás, nesse caso o nitrogênio, em função da sua pressão e os resultados permitem estimar parâmetros relacionados ao estudo da superfície dos materiais.

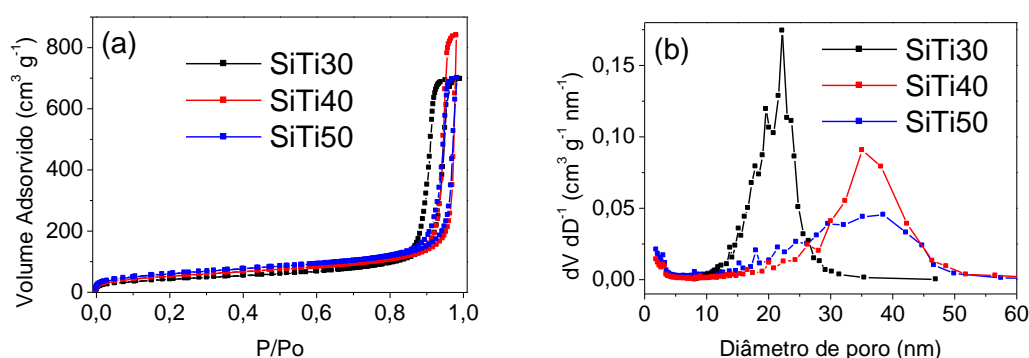


Figura 8. a) Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e b) Curvas de distribuição de tamanho de poros; das amostras com diferentes proporções sílica/titânia.

A Figura 8a mostra as isotermas de adsorção e dessorção de N₂ das amostras. Observa-se o aumento na quantidade de volume adsorvido para os três materiais em valores de P/P₀ acima de 0,8, com maior volume adsorvido para a amostra SiTi40. Adicionalmente é observado a presença de histerese em todas as amostras indicando a existência de condensação capilar de nitrogênio nos poros e o perfil das isotermas pode ser classificado como tipo IV, comportamento típico de materiais mesoporosos, que apresentam porosidade na região entre 2 a 50 nm¹¹⁸.

A Figura 8b apresenta a curva de distribuição de tamanho de poros obtida pelo método BJH, onde é possível observar uma ampla faixa de distribuição de tamanho de poros para as três amostras, com valores entre o intervalo de aproximadamente 15 e 25 nm para a amostra SiTi30 e, 25 a 50 nm, para as amostras SiTi40 e SiTi50. Apesar do material SiTi30 apresentar uma curva deslocada para região de poros menores, todos os materiais apresentam poros na faixa de mesoporos com máximos da curva de distribuição localizados em aproximadamente 20, 33 e 39 nm para os materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50, respectivamente. Esses resultados confirmam o comportamento anteriormente estimados pelas isotermas de adsorção e dessorção de N₂.

Utilizando o método BET, foi possível estimar área específica das amostras sílica/titânia. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 3, junto com os valores de volume de poros. Os resultados mostram uma tendência ao aumento da área específica proporcional ao aumento da quantidade de titânia incorporada. Quanto ao volume de poros é possível observar que não apresentaram essa tendência, sendo que a amostra SiTi40 apresentou um maior valor que as amostras SiTi30 e SiTi50.

Tabela 3. Área superficial e volume de poros dos materiais de sílica/titânia.

Amostra	Área Superficial ± 10 m ² g ⁻¹	Volume de Poros ± 0,01 cm ³ g ⁻¹
SiTi30	153	1,069
SiTi40	191	1,270
SiTi50	218	1,043

Através da análise de propriedades texturais, observa-se a presença de poros na região de mesoporos. A elevada porosidade e alta área superficial das amostras de sílica/titânia sintetizadas, indicam características promissoras para futura imobilização de

nanoestruturas e biomoléculas e aplicação desses materiais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Também avaliou-se a morfologia das diferentes amostras de sílica/titânia utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as micrografias correspondentes a cada material estão apresentadas na Figura 9.

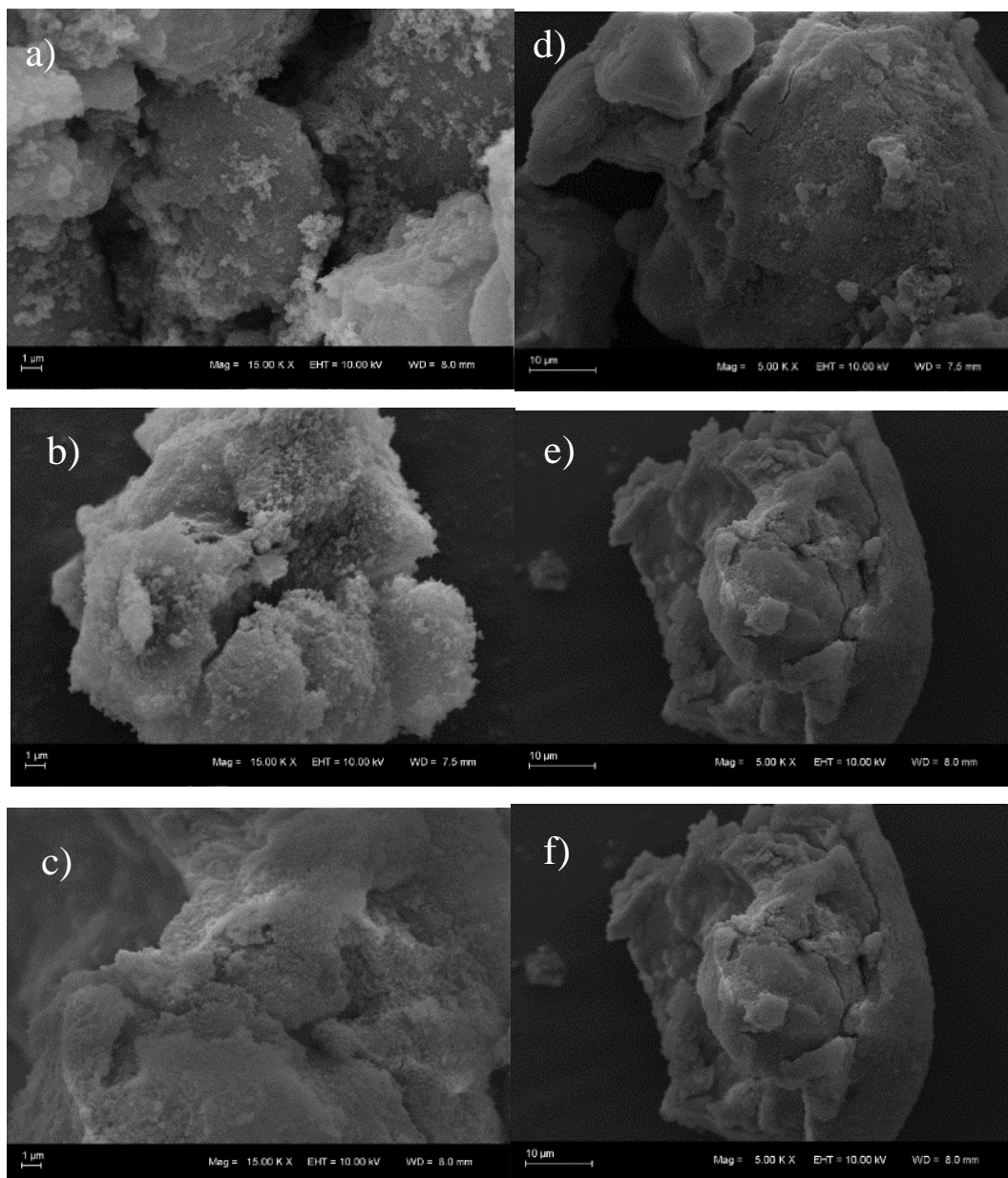


Figura 9. Imagens de MEV das amostras a) SiTi30 b) SiTi40 c) SiTi50 com aproximação de 15,00 kx e d) SiTi30 e) SiTi40 e f) SiTi50 com aproximação de 5,00 kx.

As Figuras 9a, 9b e 9c apresentam as micrografias obtidas com aproximação de 15,00 kx e as Figuras 9e, 9f e 9g as micrografias obtidas com aproximação de 5,00 kx para os materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50, respectivamente. Observa-se através das imagens uma superfície rugosa para os três materiais, com presença de poros também a nível micrométrico, além dos poros em escala nano anteriormente observados por BET. Além disso, é possível observar que as diferentes proporções de precursores inorgânicos utilizadas no processo de síntese não alterou significativamente a morfologia dos materiais resultantes que apresentaram um mesmo perfil.

5.1.2. Análise termogravimétrica

As amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50 foram submetidas a análises termogravimétricas na faixa de temperatura entre 50 °C e 850°C e as curvas correspondentes a cada amostra estão apresentadas na Figura 10. As perdas de massa na faixa de temperatura de 50° a 150°C correspondem a água adsorvida nos materiais. Acima de 150°C observa-se a dehidroxilação dos grupos -Si-OH e -Ti-OH. Analisando o perfil das curvas, pode-se perceber o aumento significativo da perda de massa acima de 150°C para as amostras com maior quantidade de titânia, SiTi40 e SiTi50. Esse aumento pode ser atribuído a cristalização da titânia no suporte responsável por acelerar as reações de dehidroxilação ocorridas nessa faixa de temperatura¹¹⁹.

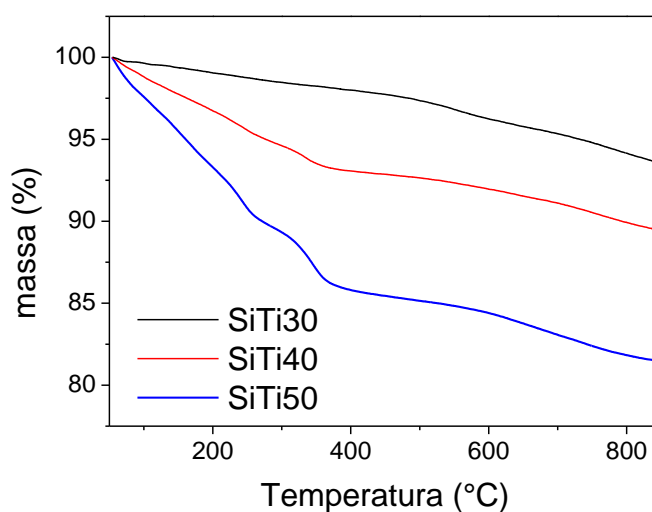


Figura 10. Curvas termogravimétricas das amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50 obtidas entre 50 a 850 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Na tabela 4, estão apresentados os valores de perda de massa em diferentes faixas de temperatura obtida a partir das curvas termogravimétricas. Como discutido anteriormente, observa-se ocorrência acelerada nas reações de dehidroxilação, através da maior perda de massa na faixa de 150 a 650°C a medida em que aumenta-se a proporção de titânia no material. Esse comportamento pode ser explicado devido a cristalização da titânia na fase anátasio que ocorre aproximadamente 350°C ¹¹⁷. Em contraste a amostra SiTi30, que apresenta menor quantidade de titânio, apresenta um processo de dehidroxilação mais lento iniciando em 150 °C e mantendo-se praticamente constante até a temperatura de 850°C. Os resultados de TGA indicam boa dispersão dos componentes na amostra SiTi30 e a medida em que se aumenta a proporção de titânia, há segregação de fases, formando domínios de titânia e esses domínios sofrem cristalização com o aumento da temperatura.

Tabela 4. Valores de perda de massa estimados com base nas curvas de TGA.

Amostra	Perda de massa (%)		
	0-150 °C	150-650 °C	650-850 °C
SiTi30	0,484	3,565	2,190
SiTi40	2,219	6,202	2,061
SiTi50	5,592	11,565	0,353

5.1.3. Análise estrutural

Para avaliar a estrutura e a organização das amostras de sílica/titânia, utilizou-se a difratometria de raios X. A Figura 11 apresenta os difratogramas correspondentes as amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50. O perfil dos difratogramas mostrou-se semelhante para os três materiais, sendo possível identificar a presença do halo amorfo da sílica com 2θ em aproximadamente 20°.

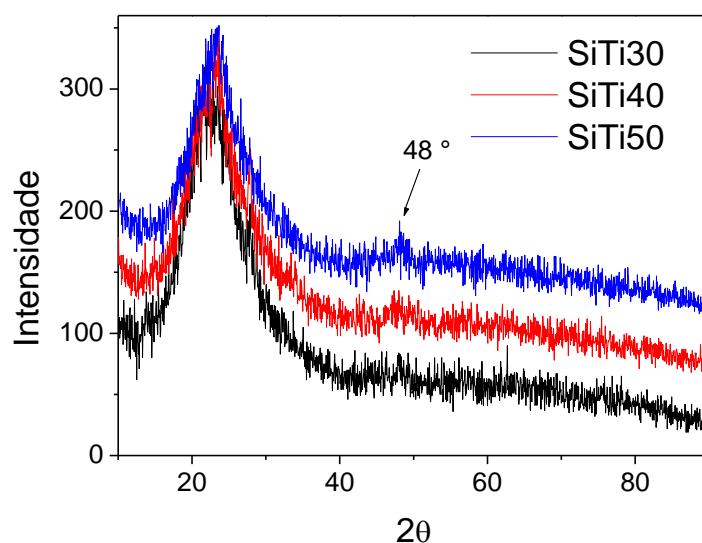


Figura 11. Difratoogramas de raios X dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50.

Através desse resultado, observou-se que o material SiTi50 contendo maior quantidade de titânia, apresenta um pico discreto em 48° que pode estar relacionado a formação da fase cristalina anatásio¹²⁰, concordando com os resultados de TGA apresentados anteriormente.

Apesar da observação desse pico, considera-se que os materiais sintetizados apresentaram-se predominantemente amorfos e o perfil semelhante dos difratogramas mostra que a organização estrutural dos diferentes suportes permaneceu semelhante.

5.1.4. Caracterização eletroquímica

A análise de voltametria cíclica (VC) foi utilizada na caracterização eletroquímica dos materiais SiTi30, SiTi40 e SiTi50, com varredura de potenciais na faixa correspondente de -0,5 a 1,0 V. As medidas foram realizadas na presença de uma solução redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ com concentração 1 mmol L^{-1} , que permitiu avaliar o processo envolvido na interface eletrodo/solução. As Figuras 12a, 12b e 12c apresentam o comportamento eletroquímico a diferentes velocidades de varredura na faixa de 5 mV s^{-1} a 150 mV s^{-1} para os eletrodos de pasta de carbono (EPC) construídos com as amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50, respectivamente.

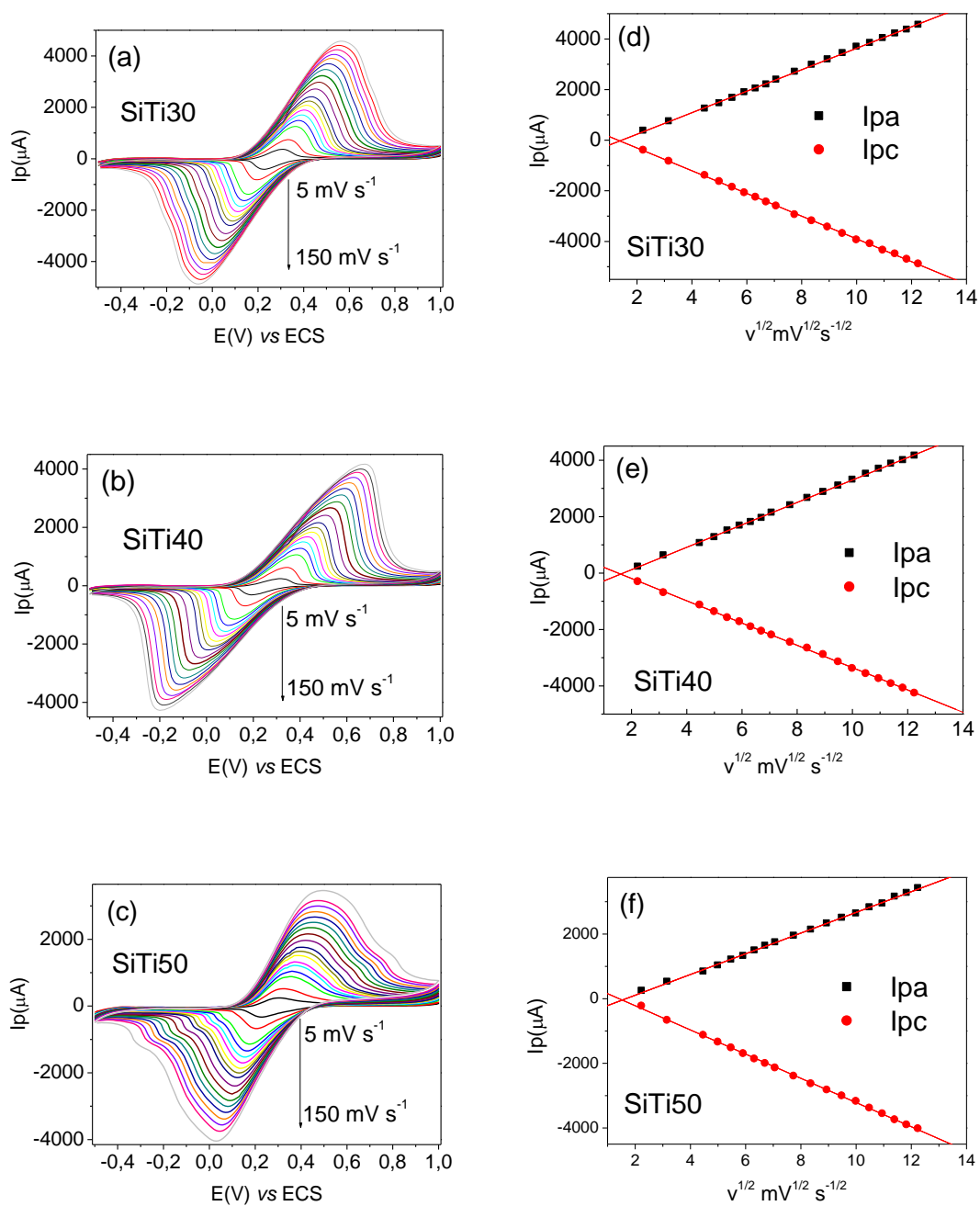


Figura 12. VCs dos EPCs das amostras a) SiTi30; b) SiTi40 c) SiTi50 variando as velocidades de varredura de 5 a 150 mV s^{-1} em solução $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Relações lineares entre $v^{1/2}$ e I_{pa} e I_{pc} para as amostras d) SiTi30; e) SiTi40 e f) SiTi50.

Todos os materiais apresentam definição do par de picos redox atribuído oxirredução do par Fe(II)/Fe(III). Além disso, observa-se o aumento linear entre a intensidade de corrente de pico anódico e catódico e a raiz quadrada da velocidade de

varredura (I_p vs $v^{1/2}$) apresentado nas Figuras 12d, 12e e 12f com coeficientes de correlação linear de pico anódico iguais a 0,9997, 0,9996 e 0,9994 e de pico catódico igual a 0,9997, 0,9995 e 0,9989 para as amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50, respectivamente. Esses resultados são característicos de um processo redox controlado predominantemente por difusão¹²¹.

A Figura 13, apresenta um comparativo das análises de voltametria cíclica obtidas na velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} para as amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50. Através da comparação, nota-se um comportamento redox similar dos três diferentes EPCs avaliados, com potenciais de oxidação e redução próximos. Através da medida ainda é possível avaliar um pequeno aumento na intensidade de corrente de picos anódico e catódico para a amostras SiTi30.

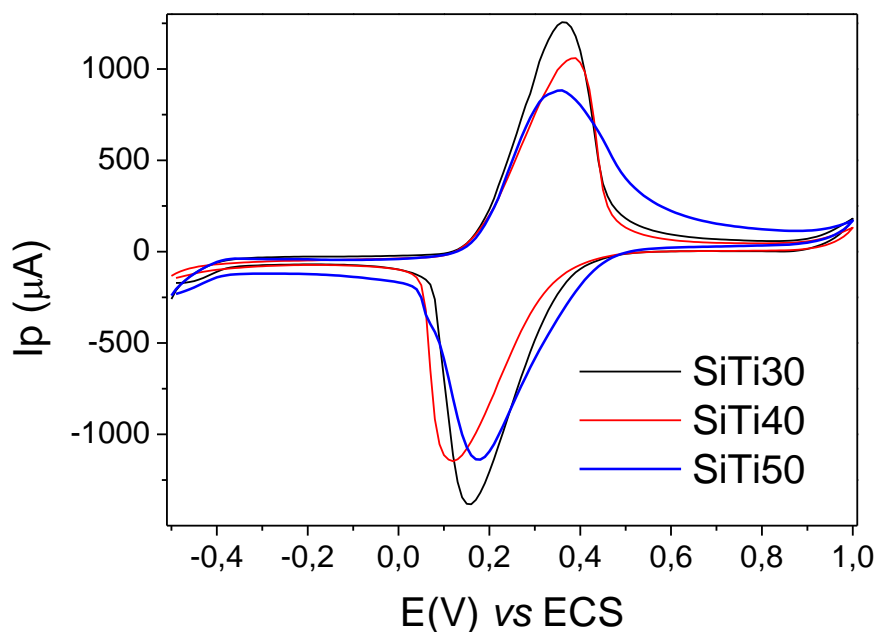


Figura 13. VC comparativa das amostras SiTi30, SiTi40 e SiTi50 na presença de solução $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1 mmol L^{-1} e velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

A Tabela 5, foi construída com base nos voltamogramas apresentados na Figura 13 e apresenta importantes parâmetros de estudo eletroquímico como, intensidade de pico anódico (I_{pa}), intensidade de pico catódico (I_{pc}), a relação I_{pa}/I_{pc} e a separação do pico anódico (E_{pa}) e pico catódico (E_{pc}) ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$). Todos esses parâmetros permitem avaliar comparativamente a resistência de transferência de elétrons e reversibilidade do processo redox envolvido na superfície dos eletrodos de pasta de carbono.

Tabela 5. Parâmetros eletroquímicos determinados por VC em velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹

EPC	ΔEp(mV)	Ipa(μA)	Ipc (μA)	Ipa/Ipc
SiTi30	203	1270	1385	0,92
SiTi40	285	1056	1124	0,94
SiTi50	195	883	1134	0,78

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram a maior separação entre picos (ΔE_p) para a amostra SiTi40 embora todos os EPCs modificados tenham apresentado valores acima do ideal 59 mV em um sistema Fe(II)/Fe (III), caracterizando que no processo existe resistência a transferência de elétrons na superfície dos eletrodos modificados. Os valores da razão I_{pa}/I_{pc} são utilizados para caracterizar a reversibilidade do processo Fe (III)/Fe(II), associando-se valores próximos a 1 a processos reversíveis ou quase reversíveis¹²⁰. Os eletrodos apresentaram comportamento quase reversível, pois a separação de pico ΔE_p aumenta com a velocidade de varredura conforme pode ser observado nas Figuras 12a, 12b e 12c. Os resultados indicam que as amostras SiTi30 e SiTi50 apresentam baixa resistência à transferência de carga, quando comparados a amostra SiTi40. Adicionalmente, maior intensidade de picos anódico e catódico, na velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, foi obtida para o EPC SiTi30.

Através dos parâmetros eletroquímicos estimados por VC, considerando o melhor comportamento eletroquímico do EPC SiTi30, optou-se por modificar sua superfície do mesmo com nanopartículas de ouro e avaliar o desempenho eletroquímico do EPC frente a determinação de compostos fenólicos.

5.2.Caracterização da amostra SiTi30 modificada com quitosana-nanopartículas de ouro, SiTi30-Au

Como a amostra SiTi30 apresentou melhor comportamento eletroquímico, essa amostra foi modificada com nanopartículas de ouro previamente estabilizadas em quitosana denominando-se SiTi30-Au, como demonstrado na seção experimental 4.2.2. A

amostra SiTi30-Au foi caracterizada por isotermas de adsorção e dessorção de N₂, análise termogravimétrica, espectroscopia na região do UV-visível, microscopia eletrônica de transmissão e voltametria cíclica. Os resultados discutidos a seguir mostram um comparativo das duas amostras antes e após a modificação com ouro.

5.2.1. Análise textural

A Figura 14a apresenta os resultados de isotermas de adsorção e dessorção de N₂ dos materiais SiTi30 e SiTi30-Au. Observa-se um perfil semelhante para as duas amostras, característico de materiais mesoporosos. Não ocorrem alterações significativas no perfil da isoterma após a modificação com ouro. Esse resultado também é observado através da curva de distribuição de tamanho de poros apresentada na Figura 14b através da sobreposição das curvas correspondentes aos materiais SiTi30 e SiTi30-Au. Além disso, observa-se uma faixa larga de distribuição de tamanho poros, com valores entre 20 e 35 nm, e máximos de aproximadamente 27 nm para a amostra SiTi30 e 29 nm para o material SiTi30-Au.

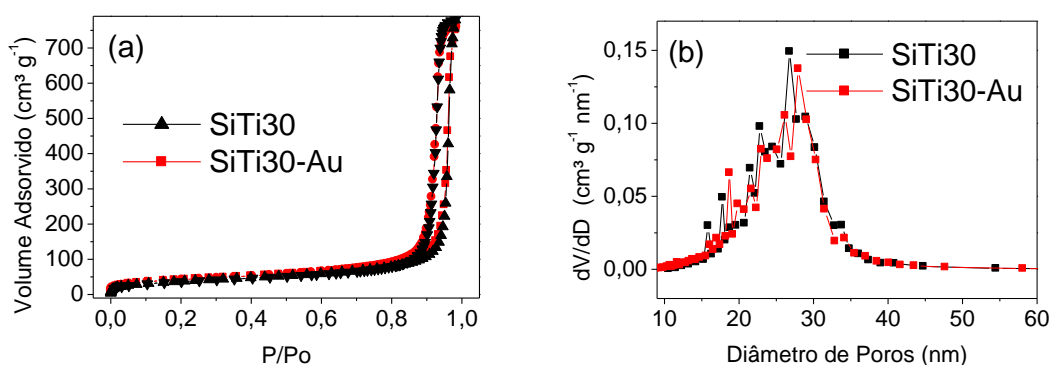


Figura 14. Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e b) Curvas de distribuição de tamanho de poros; das amostras SiTi30 e SiTi30-Au.

Os valores de área superficial obtidos por BET foram de 135 e 150 (± 10) $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ para os materiais SiTi30 e SiTi30-Au, respectivamente. Esse aumento no valor de área pode ser justificado pela incorporação das nanopartículas de ouro que possuem uma grande relação superfície/volume. O volume de poros foi de 1,20 ($\pm 0,01$) $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ para a amostra SiTi30 e 1,17 ($\pm 0,01$) $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ para a amostra SiTi30-Au. Essa pequena redução no volume de poro no volume de poros, e o fato que as amostras apresentam o mesmo perfil de distribuição de tamanho de poros observada pelo BJH, sugere que pode ter acontecido a formação de um filme de nanopartículas de ouro imobilizadas na superfície da amostra SiTi30.

5.2.2. Análise termogravimétrica

Considerando que a estabilização e imobilização de nanopartículas de ouro no suporte foi mediada pela quitosana, as amostras SiTi30 e SiTi30-Au também foram caracterizados por análise termogravimétrica visando determinar a quantidade de componente orgânico incorporado, a fim de comprovar a efetividade da modificação realizada no material SiTi30. As curvas termogravimétricas correspondentes a cada amostra estão apresentadas na Figura 15.

As perdas correspondentes a água adsorvida podem ser identificadas na faixa de 0° a 150°C. A dehidroxilação de silanóis pode ser atribuída as perdas entre 150° a 650°C, faixa também de provável decomposição de componentes orgânicos como a quitosana.

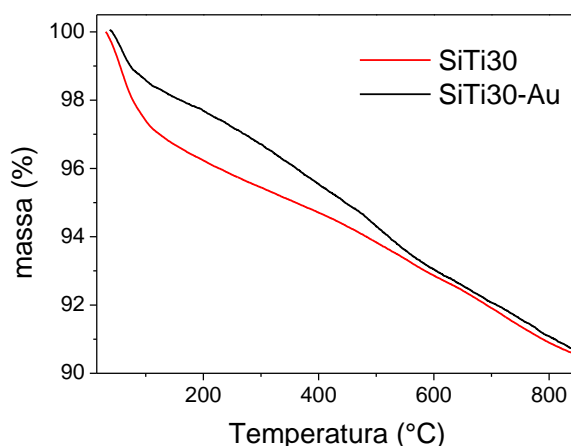


Figura 15. Curvas termogravimétricas dos materiais SiTi30 e SiTi30-Au obtidas entre 50 a 850 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} .

Através dos resultados de perda de massa mostrados na Tabela 6, é possível notar que o material SiTi30 apresenta maior quantidade de água adsorvida. Além disso, o material SiTiAu apresentou uma perda maior na faixa de 150° a 650°C que pode ser atribuída a decomposição da quitosana. O acréscimo na perda de massa em aproximadamente 1% em massa, é um resultado adicional que evidencia a incorporação de pouca quantidade de quitosana no material SiTi30.

Tabela 6. Perda de massa (%) para os materiais SiTi30 e SiTi30-Au estimados com base nas curvas de TGA.

Material	Perda de massa (%)		
	0-150 °C	150-650 °C	650-850 °C
SiTi30	3,288	4,269	1,880
SiTi30-Au	1,799	5,508	1,911

5.2.3. Espectroscopia na região do Uv-Vis

A análise de espectroscopia na região do UV-Vis das dispersões de nanopartículas de ouro (NPs-Au) estabilizadas com quitosana foi utilizada para caracterizar as dispersões de nanopartículas de Au oferecida (a), sobrenadante (b) e lavagens (c e d) de modo a identificar a efetividade de modificação do material SiTi30-Au, por diferença na banda de ressonância das NPs-Au para as diferentes soluções. Os resultados correspondentes são apresentados na Figura 16.

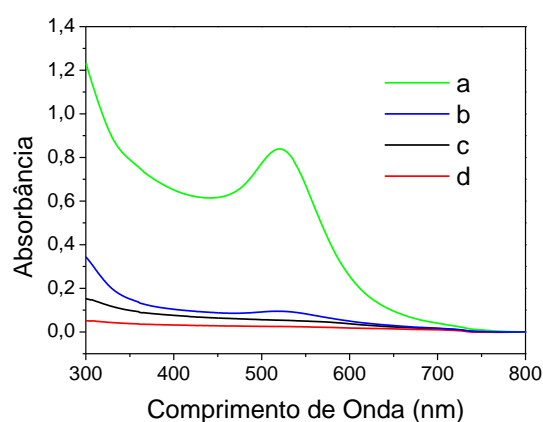


Figura 16. Espectro de Uv-Vís da a) dispersão de ouro oferecida b) da solução residual sobrenadante c) primeira lavagem e d) segunda lavagem.

O espectro (a), corresponde a dispersão de NPs-Au oferecida. A partir do mesmo é possível identificar uma banda em aproximadamente 530 nm, correspondente a banda de ressonância plasmônica das nanopartículas de ouro com diâmetro menores que 20 nm. O espectro (b), corresponde a solução sobrenadante, a partir do qual observa-se uma diminuição substancial na banda de ressonância das nanopartículas, indicando que a maior quantidade NPs-Au oferecida foi imobilizada no suporte. Também foram realizados espectroscopia de Uv-Vis das soluções resultantes da primeira e segunda lavagem do material SiTiAu com etanol. Os espectros (d) e (e), não apresentam alteração de sinal relevante na região da banda características do ouro. Esse resultado indica a imobilização efetiva de NPs-Au na amostra SiTi30.

5.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Após verificar resultados indicativos da imobilização de NPs-Au na amostra SiTi30, através da diferença de resposta entre as soluções oferecida e residual nos espectros de UV-Vis, buscou-se confirmar a presença das nanopartículas no sólido SiTi30-Au através da análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as imagens obtidas estão apresentadas na Figura 17a e 17b.

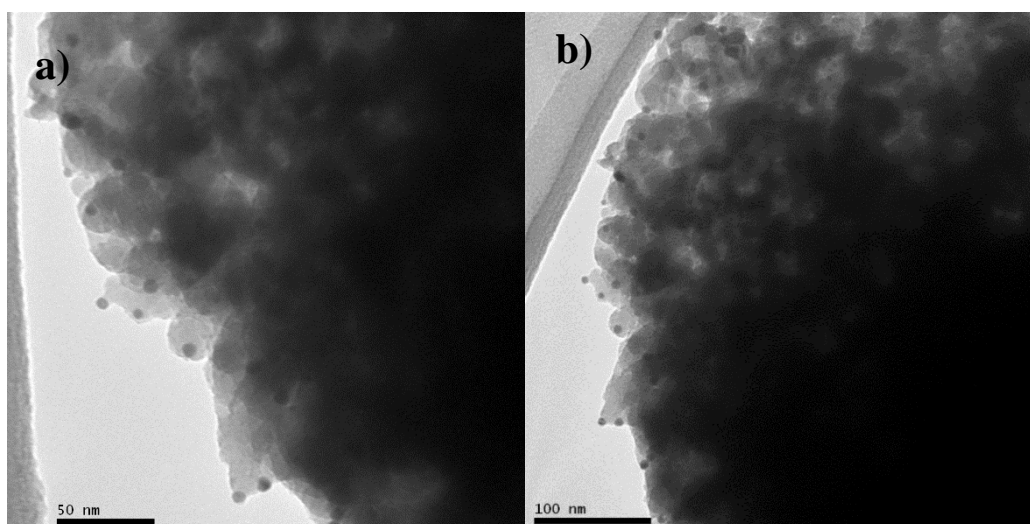


Figura 17. Microscopia eletrônica de transmissão da amostra SiTi30-Au a) barra de 50 nm e b) barra de 100 nm.

Na Figura 17, verificam-se regiões com pequenos pontos densos e escuros, que atribuídos as nanopartículas de ouro. Através da imagem também é possível observar que

não há aglomeração dessas partículas, as quais encontram-se dispersas na superfície, apresentando diâmetro abaixo de 15 nm.

5.2.5. Caracterização eletroquímica

Para avaliar o comportamento redox das amostras SiTi30 e SiTi30-Au foram preparados eletrodos de pasta de carbono e realizadas medidas de voltametria cíclica em uma solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ com concentração 1 mmol L^{-1} , conforme é apresentado na Figura 18. Observa-se através da medida, picos redox definidos para as duas amostras com um pequeno aumento da intensidade de corrente de picos anódicos e catódicos após a imobilização de NPs-Au na matriz SiTi30.

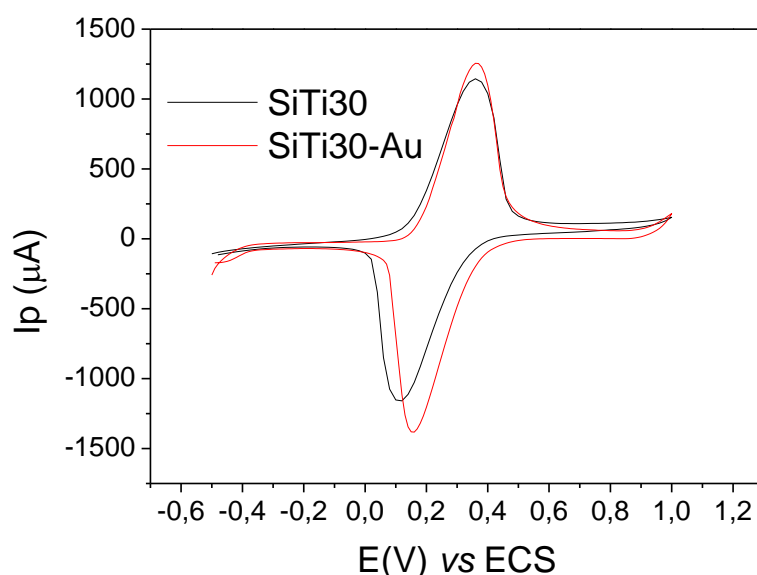


Figura 18. VC das amostras SiTi30 e SiTi30-Au na presença de solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

Utilizando a equação de Randles–Sevcik¹²³ foi possível calcular os valores de área eletroativa dos eletrodos conforme é representado na equação 1, considerando n como o número de elétrons envolvidos no processo redox; A a área eletroativa (cm^2); i_p a corrente máxima de pico; F a constante de Faraday (C mol^{-1}); D o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$); C a concentração em mol L^{-1} e ν a velocidade em V s^{-1} .

$$i_p = 2,69 \cdot 10^{-5} n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \text{ (equação 1)}$$

Os valores correspondentes de área eletroativa foram determinados como 11,8 cm² para SiTi30 e 14,1 cm² para SiTi30Au. Esse aumento na área eletroativa do material indica que embora tenha sido imobilizada pequena quantidade de nanopartículas de ouro, ainda sim as mesmas são responsáveis por catalisar as reações redox que acontecem na interface eletrodo/solução, indicando que a modificação do suporte sílica/titânia com ouro aumenta a potencialidade de aplicação eletroanalítica do material. As relações I_{pa}/I_{pc} obtidas foram 0,97 e 0,91 e os valores de ΔE_p 262 e 210 mV para os materiais SiTi30 e SiTi30-Au, respectivamente. Os valores I_{pa}/I_{pc} mostram uma ligeira diminuição na reversibilidade do processo redox para a amostra SiTi30-Au que pode estar relacionado a incorporação de quitosana na superfície dos EPC¹²⁴. Apesar disso, observa-se menor separação entre picos para a amostra com as NPs-Au, caracterizando menor resistência à transferência de elétrons que a amostra SiTi30

Após o estudo comparativo, também buscou-se avaliar o comportamento eletroquímico do material SiTi30-Au a diferentes velocidades de varredura na faixa entre 20 mV s⁻¹ a 150 mV s⁻¹, conforme apresentado na Figura 19a, é possível observar que a separação de picos (ΔE_p) aumenta com aumento da velocidade de varredura indicando que o processo é quase-reversível¹²⁵. A Figura 19 b apresenta a relação linear entre intensidade de corrente de pico anódico e catódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, resultado que indica um processo controlado predominantemente por difusão. Os coeficientes de correlação linear encontrados foram de 0,9997 e 0,9998 para o I_{pa} e I_{pc} , respectivamente.

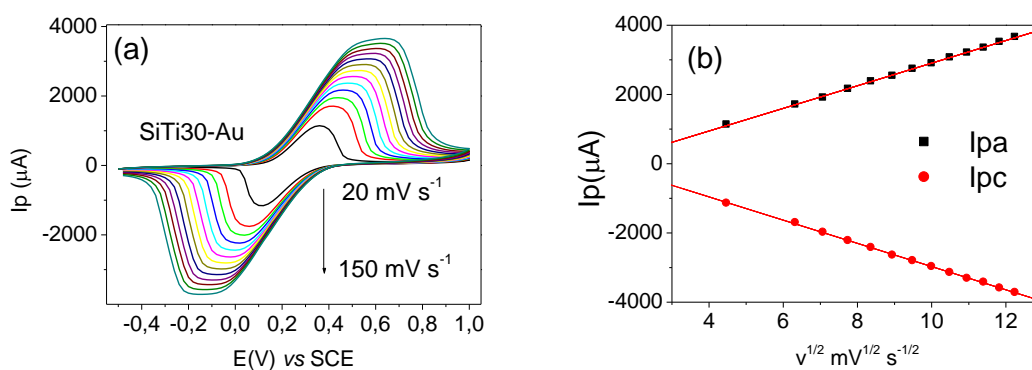


Figura 19. a) VC da amostra SiTi30-Au na presença de solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L⁻¹ a diferentes velocidade de varredura de 20 a 150 mV s⁻¹ b) Relação linear entre $v^{1/2}$ e I_{pa} e I_{pc} .

Comparando ainda os resultados de VC do EPC SiTi30, apresentados anteriormente, com os resultados obtidos para o EPC SiTi30-Au, pode-se notar que não houve alteração no processo redox ocorrido na interface do eletrodo após a imobilização de ouro, sendo o mesmo analogamente controlado por difusão.

5.3. Aplicação do EPC SiTi30-Au como sensor eletroquímico para norepinefrina e dopamina

5.3.1. Voltametria cíclica na presença de norepinefrina

Após as caracterizações do EPCs modificados com os materiais SiTi30 e SiTi30-Au, avaliou-se o desempenho eletroquímico dos mesmos na presença $458 \mu\text{mol L}^{-1}$ de norepinefrina utilizando a análise de VC, os resultados estão apresentados na Figura 20a. Pode-se observar um aumento da corrente de pico anódico e o aparecimento de um pico catódico intenso e definido após a imobilização NPs-Au na superfície do material sílica/titânia, mostrando a melhora na eficiência catalítica desse eletrodo na reação de oxirredução da norepinefrina.

A Figura 20b, apresenta as análises de VC do eletrodo SiTiAu na presença de diferentes concentrações de norepinefrina. Os voltamogramas mostram a relação entre o aumento da corrente de picos anódicos e catódico ao aumento da concentração de norepinefrina no meio na faixa estudada, que corresponde de 119 a $458 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, observa-se a presença de dois picos de oxidação definidos para a norepinefrina em -0.12 e 0.11 V e um pico de redução em -0.19 V. O aparecimento de mais de um pico redox pode ser justificado pelas reações de ciclização que podem acontecer com catecolaminas como relatado na literatura¹²⁶ evidenciadas em pH 7 ou acima deste pH onde existem grupos aminos não protonados. Outra explicação para a ocorrência de múltiplos picos pode estar associada a diferença de interação do analito com os diferentes componentes presentes na superfície do material, já que não foram apresentadas evidências de total recobrimento da superfície, áreas de titânia expostas podem também interagir por adsorção com os compostos fenólicos analisados.

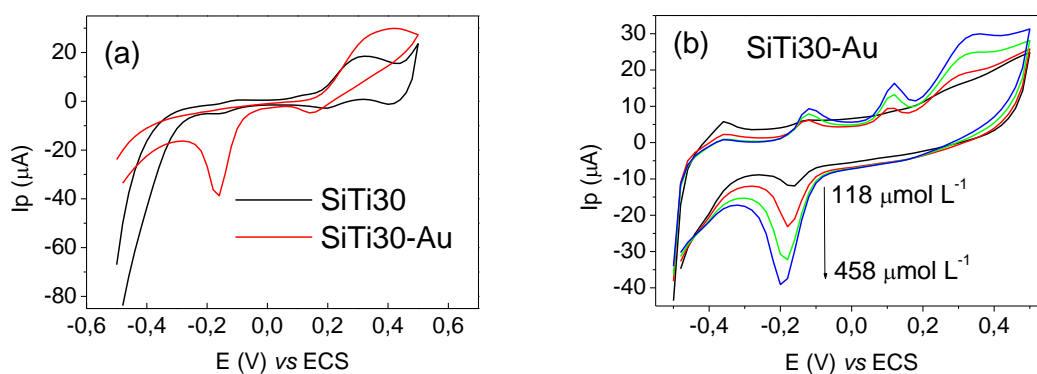


Figura 20. a) VC dos EPCs SiTi30 e SiTi30-Au na presença de solução 5 μmol de norepinefrina b) VC do EPC SiTi30-Au na presença de diferentes concentrações de norepinefrina.

5.3.2. Estudo de pH

Após verificar a resposta do eletrodo EPC SiTi30-Au frente a diferentes concentrações do analito, buscou-se estudar o comportamento da oxirredução em faixas de pH compreendidas entre 4 e 8 na presença de 5 μmol de norepinefrina. Os resultados estão apresentados na Figura 21a. Nos pHs correspondentes a faixa ácida, 4, 5 e 6, observa-se o aparecimento de dois picos de redução bem definidos para a norepinefrina. Tal resultado não pode ser evidenciado nos pHs 7 e 8, os quais apresentam apenas um pico de redução definido em potenciais próximos a -0.2 V.

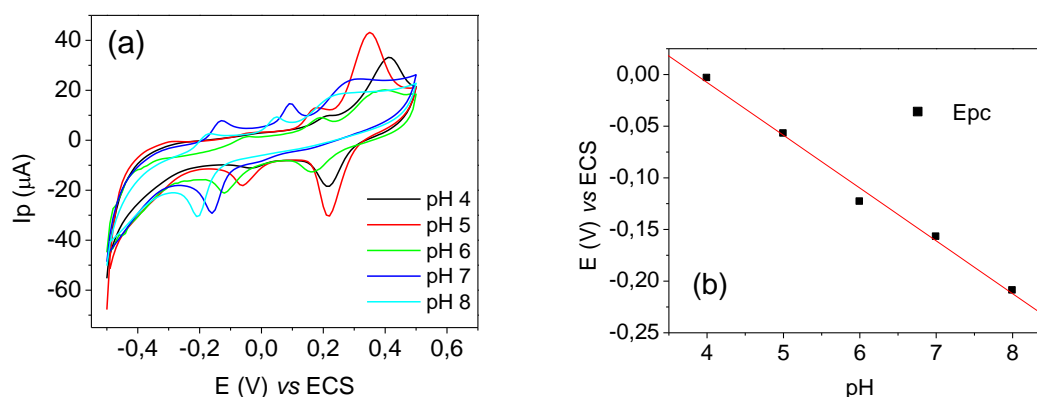


Figura 21. a) Voltamogramas do EPC SiTi30-Au na presença de 5 μmol de norepinefrina em diferentes pHs b) Relação Epc e pH de estudo.

Relacionando os potenciais de pico catódicos correspondentes a cada pH, como apresentado na Figura 21b, observa-se um comportamento linear com $R_c = -0,996$. A equação da reta obtida foi $E_{pc} \text{ (V)} = 0,20 (\pm 0,02) - 0,051 (\pm 0,003) \text{ pH}$. O coeficiente angular obtido na reta está próximo ao valor teórico da equação de Nernst que corresponde a $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ a 25°C confirmando o mecanismo definido na literatura de dois prótons e dois elétrons ¹²⁷.

Apesar de um aparecimento de pico redox mais intenso e definido em pH 5, optou-se por realizar a análise em pH 7 devido maior semelhança com meios biológicos. Para a escolha do pH também foi considerada a sobreposição dos picos correspondentes a oxirredução da dopamina e norepinefrina em aproximadamente $0,22 \text{ V}$ e $0,33 \text{ V}$ apresentados na voltametria cíclica da Figura 22, que impossibilitariam futuras quantificações simultâneas desses analitos em pH 5.

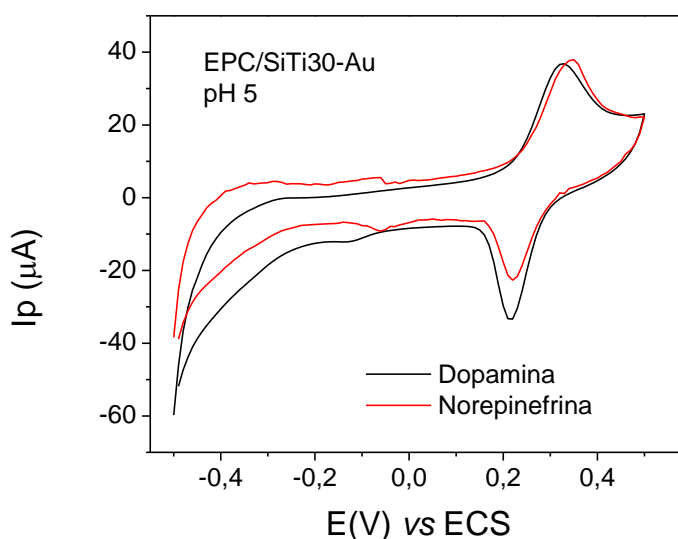


Figura 22. Comportamento eletroquímico do EPC SiTi30-Au na presença de $5 \mu\text{mol}$ de norepinefrina e $5 \mu\text{mol}$ de dopamina em tampão fosfato pH 5.

5.3.3. Análise norepinefrina e dopamina por voltametria de onda quadrada

Buscou-se verificar o comportamento eletroquímico da amostra SiTi30-Au na presença de norepinefrina e dopamina através da análise de voltametria de onda quadrada (VOQ). Inicialmente foi otimizada a frequência de pulso, para qual avaliou-se a

intensidade de resposta da corrente de pico anódico a diferentes frequências de 3 até 10 Hz na presença de 5 μmol de Norepinefrina. Esses resultados estão apresentados na Figura 23. Pouca variação nas intensidades foi observada, porém a relação sinal/ruído obtida experimentalmente para a frequência de 3Hz além de pequena melhora na intensidade de corrente, fizeram da mesma a frequência escolhida para a análise, sendo essa frequência anteriormente utilizada com sucesso por outros trabalhos relatados na literatura¹²⁸.

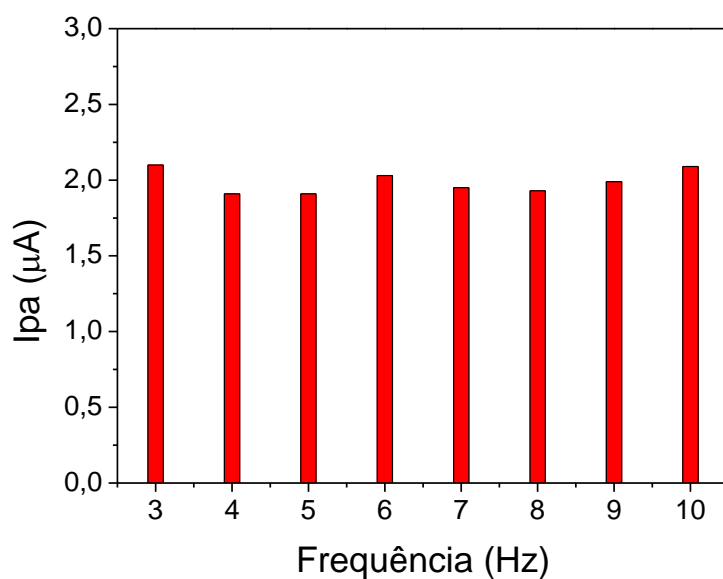


Figura 23. Otimização da frequência de pulso em VOQ avaliando a faixa de 3 até 10 Hz na presença de 5 μmol de norepinefrina.

Após a otimização da frequência, a resposta do eletrodo SiTi30-Au foi avaliada na presença de diferentes concentrações de norepinefrina e dopamina. A Figura 24a mostra os resultados de VOQ na presença de norepinefrina, na faixa de estudo de 50 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na faixa de potencial de 0,0 a -0,4V.

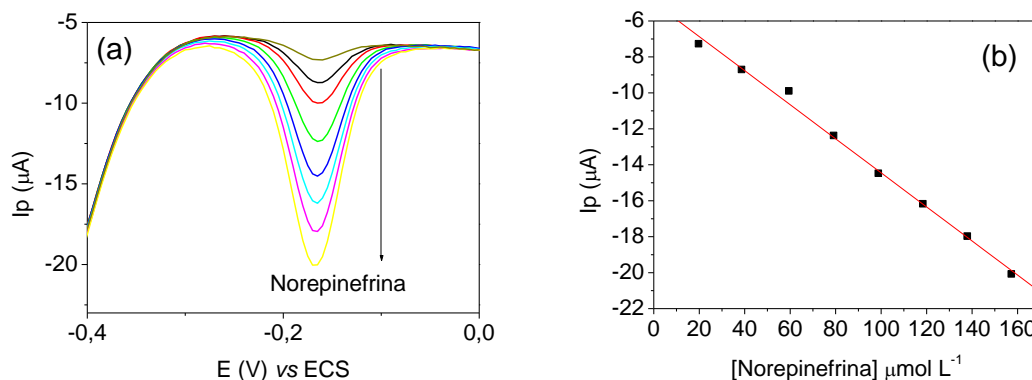


Figura 24. a) VOQ do EPC SiTi30-Au a diferentes concentrações de norepinefrina; b) Curva de calibração analítica para determinação de norepinefrina; tampão fosfato pH 7.

Observa-se um pico catódico bem definido em aproximadamente -0,16V correspondente a redução da norepinefrina no sistema e este pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração da norepinefrina. A relação linear entre intensidade de corrente de pico catódico e a concentração de norepinefrina representada na Figura 24b pode ser descrita pela equação:

$$I_{pc} \text{ (A)} = - 4,9 \times 10^{-6} (\pm 0,3 \times 10^{-6}) - 0,095 (\pm 0,003) [\text{Norepinefrina}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$$

A equação descrita apresenta coeficiente de correlação linear igual a 0,9948. O valor de sensibilidade é expresso pelo coeficiente angular da curva analítica correspondente a 0,095 A/mol L⁻¹. O limite de detecção foi determinado por 3*SD S⁻¹ (onde SD é o desvio padrão do branco e S a sensibilidade) como igual a 0,48 μmol L⁻¹ e o limite de quantificação foi determinado por 10*SD S⁻¹ como 1,6 μmol L⁻¹.

Avaliou-se também o comportamento eletroquímico do EPC SiTi30-Au na presença de diferentes concentrações de dopamina na faixa de 50 a 450 μmol L⁻¹, os resultados estão apresentados na Figura 25.

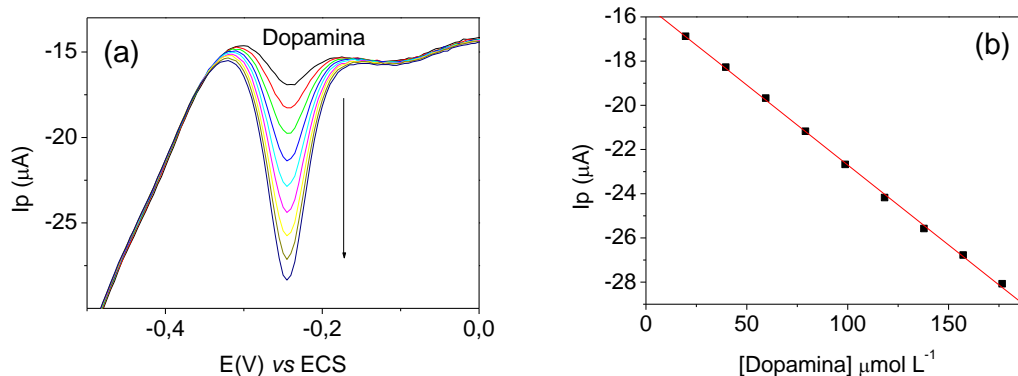


Figura 25. a) VOQ do EPC SiTi30-Au a diferentes concentrações de dopamina; b) curva de calibração analítica para determinação de dopamina, tampão fosfato pH 7.

Na Figura 25a, pode-se observar um pico catódico definido em aproximadamente -0,23V, que corresponde a redução da dopamina, a intensidade deste pico se incrementa com o aumento da concentração da dopamina no sistema. Analogamente, o eletrodo EPC SiTi30- Au apresenta relação linear entre I_{pa} e a concentração de dopamina na faixa estudada (Figura 25b), descrita pela equação a seguir:

$$I_{pc} \text{ (A)} = - 1,547 \times 10^{-5} (\pm 0,008 \times 10^{-5}) - 0,0723 (\pm 0,0007) [\text{Dopamina}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$$

A equação descrita apresenta coeficiente de correlação linear igual a 0,9992. A sensibilidade encontrada foi de $0,0723 \text{ A/mol L}^{-1}$, o limite de detecção de $0,94 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação $3,13 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

5.3.4. Análise simultânea de norepinefrina e dopamina por voltametria de onda quadrada

Considerando a boa definição de picos catódicos, obtida por voltametria de onda quadrada e a separação entre os potenciais de picos de redução da norepinefrina e dopamina em aproximadamente 70 mV, realizou-se o estudo comportamento do EPC SiTi30-Au frente a determinação simultânea desses analitos. Primeiramente, buscou-se avaliar a interferência de resposta dos mesmos, através da concentração constante de um dos analitos no sistema e posteriormente na presença de diferentes concentrações do outro analito (Figura 26).

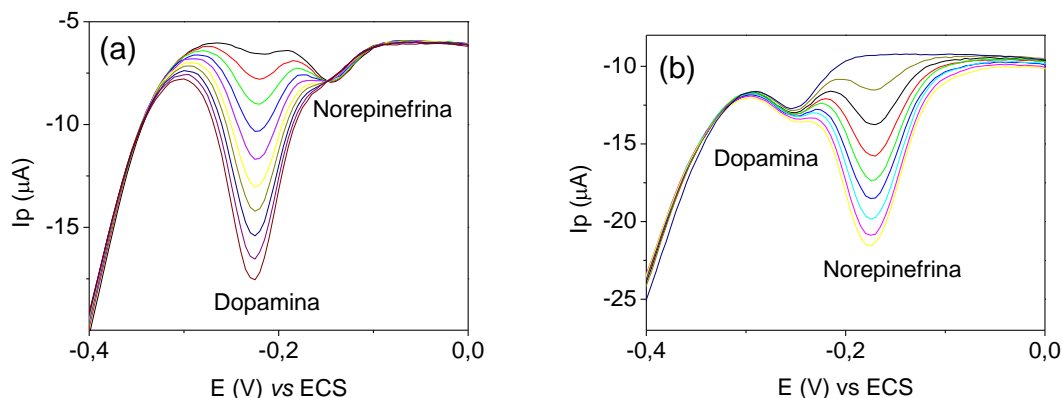


Figura 26. VOQs do EPC SiTi30-Au na presença a) de concentração fixa de norepinefrina e diferentes concentrações de dopamina; b) de concentração fixa de dopamina e diferentes concentrações de norepinefrina, tampão fosfato pH 7.

Na Figura 26a, é apresentada a VOQ na presença de 2,5 μmol de norepinefrina com diferentes concentrações e dopamina na faixa de 50 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Observa-se o aumento linear da I_{pc} com a concentração de dopamina, apresentando coeficiente de correlação linear igual a 0,9990, enquanto a intensidade de pico catódico correspondente a norepinefrina permaneceu constante.

Também foi realizado o estudo mantendo-se a concentração de dopamina constante em 2,5 μmol e variando a concentração de norepinefrina de 50 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 26b). Igualmente, observou-se o comportamento linear do eletrodo frente as adições de norepinefrina ($R^2= 0,9870$) a medida em que a intensidade de pico catódico da dopamina permaneceu inalterada. A partir desses resultados, observa-se que não há interferência de um analito em relação ao outro na faixa de concentração estudada, indicando potencialidade de aplicação do mesmo em análise simultânea de norepinefrina e dopamina.

A análise simultânea foi realizada por VOQ através de sucessivas e concomitantes adições de norepinefrina e dopamina no sistema eletroquímico, no intervalo de concentração 50 a 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 27a). O comportamento linear da concentração dos analitos relacionados as respectivas intensidades de pico catódico está apresentado na Figura 27b, sendo descritas pelas equações a seguir:

$$I_{pc} \text{ (A)} = -7,2 \times 10^{-7} (\pm 0,1 \times 10^{-7}) - 0,079 (\pm 0,001) [\text{Dopamina}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$$

$$I_{pc} (A) = -7,0 \times 10^{-7} (\pm 0,2 \times 10^{-7}) - 0,130 (\pm 0,001) [Norepinefrina] (\text{mol L}^{-1})$$

Os parâmetros eletroanalíticos estimados a partir da análise simultânea desses analitos estão apresentados na Tabela 7.

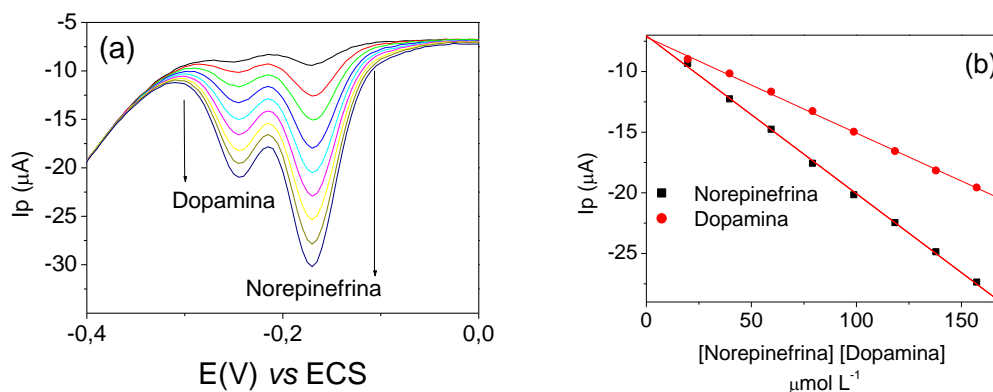


Figura 27. a) Análise simultânea de dopamina e norepinefrina por VOQ; b) Curvas de calibração analítica para dopamina e norepinefrina, tampão fosfato pH 7.

Tabela 7. Parâmetros eletroanalíticos obtidos por VOQ para análise simultânea.

Analito	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidade A/mol L^{-1}	LQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	R^2
Dopamina	0,57	0,079	1,90	0,9984
Norepinefrina	0,35	0,130	1,16	0,9992

O eletrodo EPC SiTi30-Au mostrou-se mais sensível e conseqüentemente apresentou menor Limite de Detecção para a determinação de Norepinefrina. Comparando os resultados obtidos nesse trabalho com eletrodos semelhantes relatados na literatura, observa-se que alguns trabalhos anteriores já reportaram menores limites de detecção obtidos por técnicas eletroanalíticas para os analitos avaliados¹²⁸. Por outro lado, na atualidade ainda encontram-se poucos sensores eletroquímicos que conseguem distinguir e quantificar catecolaminas simultaneamente, devido a semelhança entre as suas estruturas, fator esse que justifica a relevância do trabalho realizado.

5.3.5. Análise de interferentes

A análise de VOQ do EPC SiTi30-Au foi realizada também na presença de potenciais interferentes na quantificação de norepinefrina em meios biológicos como a glicose, o ácido úrico e o ácido ascórbico. Tais analitos podem oxidar ou reduzir em potenciais que coincidem com os potenciais de oxirredução da norepinefrina ocasionando interferência em sua determinação, inviabilizando a aplicação do eletrodo diretamente em amostras reais complexas. Os resultados da análise de interferentes estão apresentados na Figura 28.

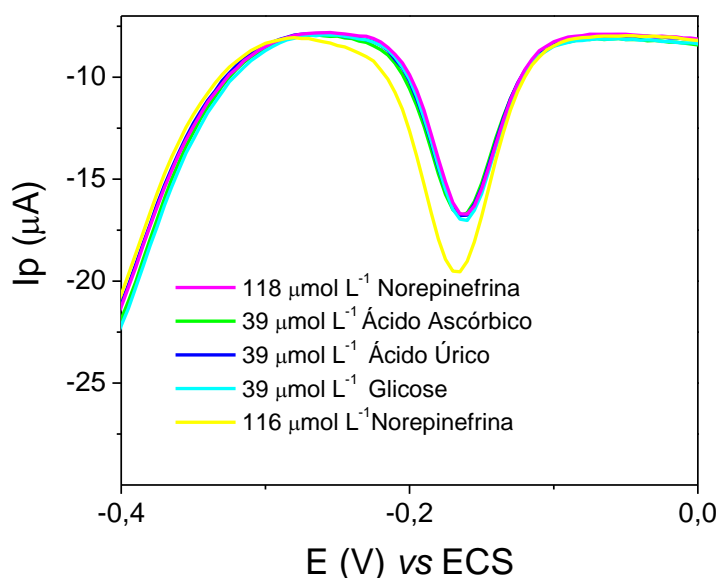


Figura 28. VOQ do EPC SiTi30-Au na presença de norepinefrina e interferentes ácido ascórbico, ácido úrico e glicose.

Através da adição 1 μmol de cada um dos interferentes ao sistema contendo previamente 3 μmol de norepinefrina, observaram-se desvios relativos ao sinal de I_{pc} correspondentes a 1,77% para o Ácido Úrico, 2,48% para o Ácido Ascórbico e 8,51% para a glicose. Na literatura, consideram-se aceitáveis valores abaixo de 10% para determinações analíticas, dessa maneira configura-se que o EPC SiTi30-Au não apresenta interferência de sinal na detecção de norepinefrina em presença dos analitos apresentados, mostrando promissora resposta para futuras determinações em matrizes complexas.

5.3.6. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do eletrodo foi avaliada também por VOQ através da confecção de 4 diferentes eletrodos colocados em contato com uma solução contendo 2,5 μmol de norepinefrina. O desvio padrão relativo entre as alturas de pico obtidas para os diferentes eletrodos (Figura 29) foi calculado como 5,86%, indicando a ótima reprodutibilidade do eletrodo.

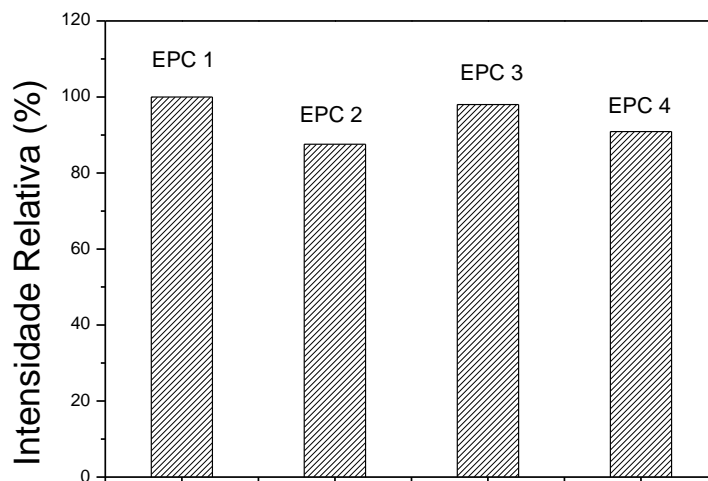


Figura 29. Reprodutibilidade de resposta de 4 diferentes eletrodos EPC SiTi30-Au na presença de 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de norepinefrina.

PARTE II

Xerogel magnético de sílica/titânia modificado com tirosinase e sua aplicação como biossensor eletroquímico

Após estudar a aplicação de diferentes materiais de sílica/titânia como dispositivos eletroquímicos, buscou-se desenvolver um novo material mesoporoso magnético de sílica/titânia contendo 30% de titânia em volume, denominado como SiTiMPs. Esse material foi posteriormente modificado com a enzima tirosinase (SiTiMPs-Ty) e aplicado como sensor eletroquímico na detecção de catecol, epinefrina e dopamina. Os materiais foram caracterizados por isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio, análise termogravimétrica, magnetização, microscopia eletrônica de varredura e voltametria cíclica a fim de realizar um estudo comparativo das propriedades dos materiais bem como a efetividade da imobilização da enzima no material SiTiMPs.

5.4. Caracterização dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty

5.4.1. Análise textural

As propriedades texturais do xerogel magnético SiTiMPs antes e após a imobilização da enzima foram investigadas por isotermas de adsorção e dessorção de N_2 , como pode ser visto na Figura 30a. As isotermas obtidas para os dois materiais foram do tipo IV segundo a classificação da IUPAC, típicas de materiais mesoporosos¹²². Observa-se um aumento significativo na adsorção de N_2 para valores de pressão acima de 0,8, indicando presença de poros na região de mesoporos. Esse resultado pode ser confirmado pela curva de distribuição de tamanho de poros mostrada na Figura 30b, que apresenta máximos localizados em aproximadamente 17 e 14 nm para SiTiMPs e SiTiMPs-Ty, respectivamente.

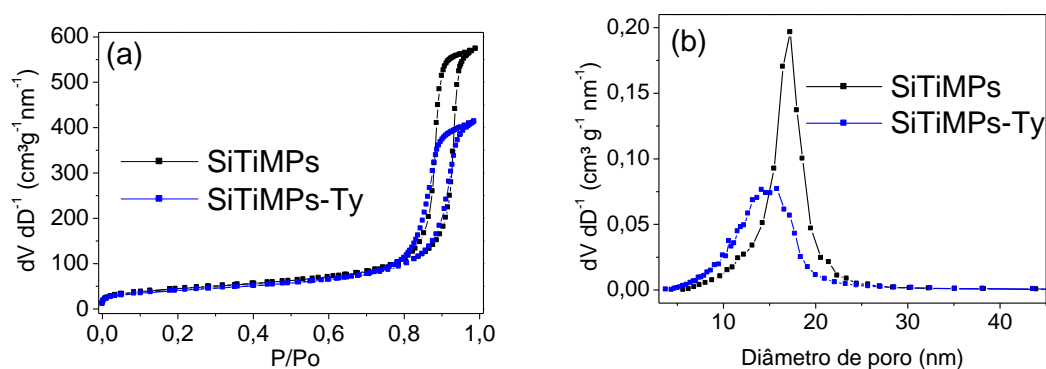


Figura 30. a) Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 b) Curvas de distribuição de tamanho de poros; dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty.

Os valores de área superficial, obtidos por BET, foram $158 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para SiTiMPs e $144 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para SiTiMP-Ty. Foi possível observar também uma diminuição no volume de poros após a imobilização da enzima de $0,88 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (SiTiMPs) para $0,63 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (SiTiMPs-Ty). Comparando as propriedades texturais dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty, observa-se uma clara evidência da imobilização direta da tirosinase na superfície do material SiTiMPs devido ao substancial decréscimo no volume adsorvido para o material SiTiMPs-Ty e também o deslocamento da curva de distribuição para menores valores de diâmetro de poros, ambos observados por BJH. Esse resultado também é indicativo de uma imobilização efetiva da enzima dentro dos poros do material SiTiMPs.

Considerando essas características apresentadas, os dois materiais apresentam propriedades adequadas para aplicação suporte de eletrodos eletroquímicos, apresentando alta área superficial e considerável volume de poros, e diâmetro médio de poros na região de mesoporos, que facilita a imobilização de macromoléculas e pode favorecer o processo de difusão na superfície do eletrodo⁴⁶.

5.4.2. Análise termogravimétrica

Os materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty foram submetidos a análise termogravimétrica e as curvas obtidas estão apresentadas na Figura 31, assim como dados de perda de massa em diferentes faixas de temperatura mostrados na Tabela 8. As perdas de massa abaixo de 150°C podem ser atribuídas a adsorção de água. Na faixa de 150°C a 650°C , podem ser observadas perdas correspondentes a reações de dehidroxilação dos óxidos e também a decomposição de componentes orgânicos.

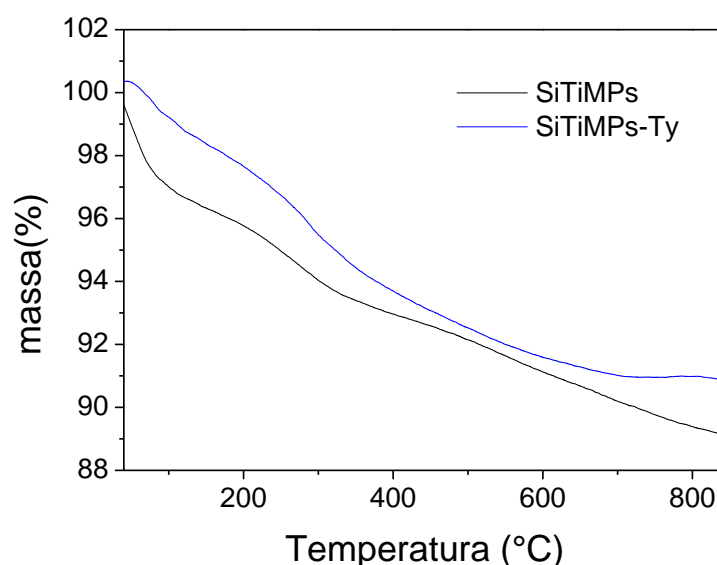


Figura 31. Curvas termogravimétricas dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty na faixa de 50 a 850 °C.

Como pode ser observado na Figura 31, há um aumento na inclinação da reta tangente a curva em aproximadamente 200 °C para o material SiTiMPs-Ty. Esses valores podem ser melhores observados na Tabela 8, que indica um aumento na perda de massa, na faixa de 150 a 650 °C, de aproximadamente 1,4% após a imobilização da enzima. Esse valor pode ser atribuído à decomposição da tirosinase imobilizada na superfície do material SiTiMPs, confirmando os resultados de análise textural que indicam a efetiva modificação do material SiTiMPs.

Tabela 8. Perda de massa (%) obtidas através das curvas de TGA.

Material	Perda de massa (%)		
	0-150 °C	150-650 °C	650-850 °C
SiTiMPs	3,644	5,632	1,633
SiTiMPs-Ty	1,612	7,041	0,457

5.4.3. Análise estrutural e morfológica

A análise de difratometria de raios X das amostras Fe₃O₄, MPs e SiTiMPs está apresentada na Figura 32. Como pode ser observado, são identificados nos três materiais os picos do padrão de difração de raios X correspondentes aos ângulos de Bragg da

estrutura cúbica de face centrada da magnetita (arquivo JCPDS, nº 19-0629). A partir dos dados de difração de Fe_3O_4 e MPs, calculou-se através da equação de Scherrer o tamanho do cristalito das partículas de magnetita com dimensões nanométricas, abaixo de 40 nm. O material SiTiMPs apresenta também o halo típico da sílica/titânia amorfa, com 2θ em aproximadamente 22° ¹²⁹. Estes resultados são indicativos que partículas de magnetita foram incorporadas com sucesso na matriz de sílica/titânia.

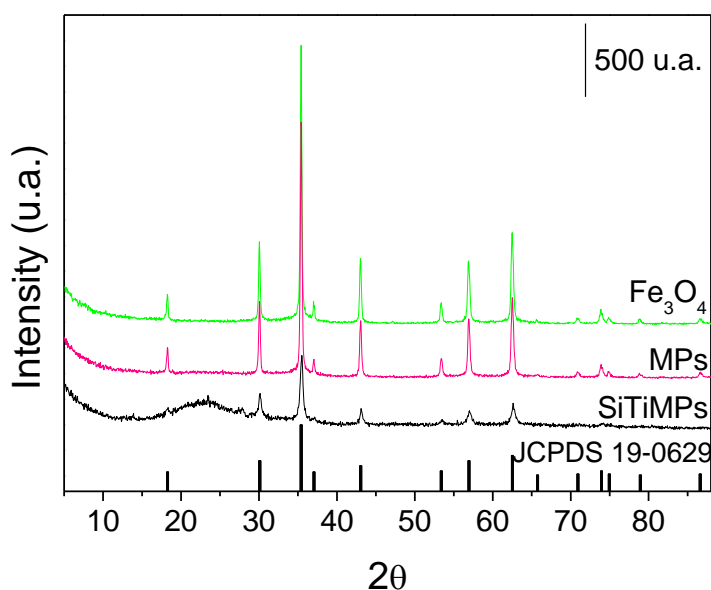


Figura 32. Difratomogramas de raios X das Fe_3O_4 , das partículas magnéticas MPs e do xerogel magnético SiTiMPs.

Para observar a dispersão das partículas magnéticas na matriz de sílica /titânia, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura através da técnica de elétrons retro espalhados (*Backscattering*) apresentada na Figura 33. Ao usar elétrons retro espalhados, a imagem de SiTiMPs obtida por MEV permite discriminar por brilho as áreas com diferentes composições químicas, onde as áreas brilhantes correspondem a uma região composta por elementos mais pesados¹³⁰. Dessa maneira, uma vez que o silício e o titânio são elementos com baixo número atômico (mais leves) quando comparados com o ferro encontrado nas partículas de magnetita, existe um contraste adequado entre a sílica/titânia opaca e as partes brilhantes compostas por magnetita.

A imagem também revela claramente partículas esféricas de magnetita com um tamanho inferior a 1 μm dispersas sobre a sílica/titânia, que também podem encontrar-se

inseridas no material SiTiMPs. Além disso, considerando o tamanho do cristalito nanométrico obtido pelos dados de raios X, pode-se concluir que as partículas de magnetita são policristalinas.

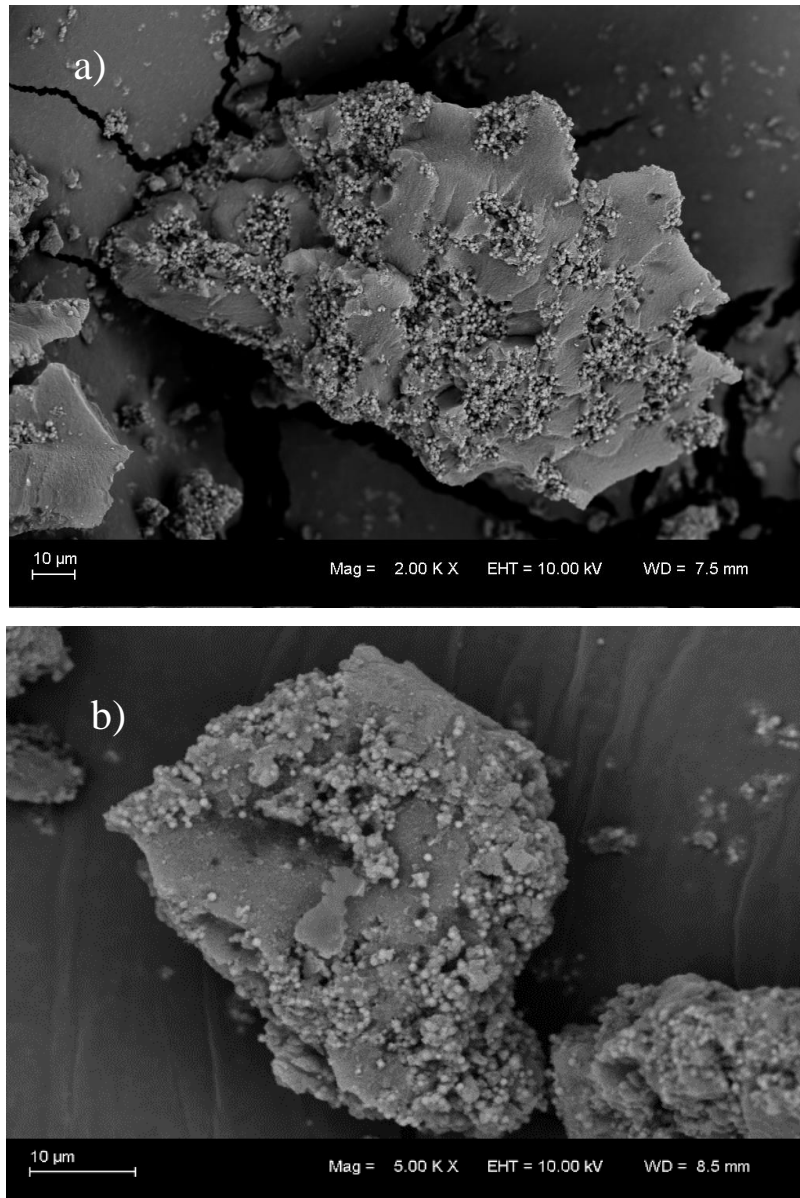


Figura 33. MEV do material SiTiMPs com aproximação de a) 2.0 kx e b) 5.0 kx.

5.4.4. Magnetização

A Figura 34 apresenta as curvas de magnetização. O perfil semelhante das curvas indica uma resposta magnética comparável das diferentes partículas, sugerindo que a cobertura de Fe_3O_4 para preparar MPs e subsequentemente o material SiTiMPs não modifica substancialmente as propriedades magnéticas intrínsecas das partículas iniciais.

Observam-se histereses em todos os materiais, características do seu comportamento magnético. A redução na saturação de magnetização após a o recobrimento com sílica (MPs) e também no material SiTiMPs deve-se principalmente à incorporação de material não magnético na massa total da amostra.

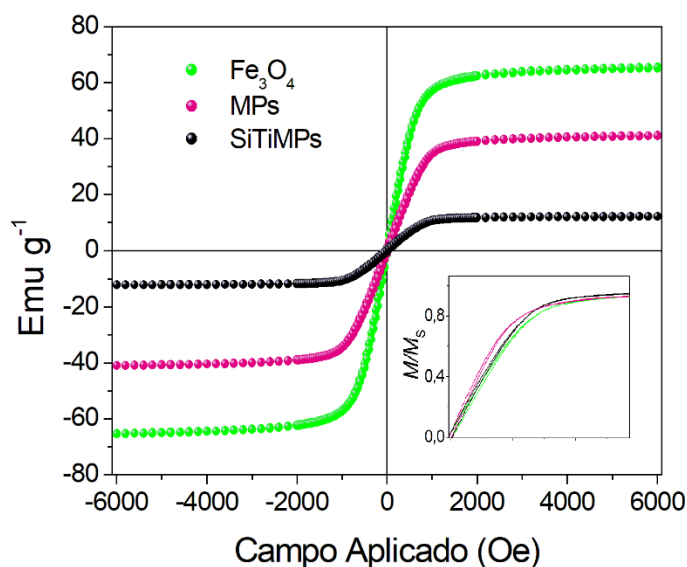


Figura 34. Curvas de magnetização das amostras Fe_3O_4 , MPs e SiTiMPs. Figura inserida: Curvas de magnetização normalizadas

5.4.5. Caracterização eletroquímica

O comportamento eletroquímico da tirosinase imobilizada no xerogel magnético foi investigado modificando um EPC com os materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty para fins comparativos. Na Figura 35, os voltammogramas cíclicos apresentam o comportamento dos EPCs modificados com SiTiMPs e SiTiMPs-Ty usando como solução sonda o par redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Os dois materiais apresentaram um par de picos redox definidos e foi observado um aumento substancial na corrente de pico anódico e catódico após a imobilização da tirosinase. Este resultado pode ser indicativo que a tirosinase imobilizada forneça um aumento na área eletroativa, a qual foi determinada pela equação de Randles-Sevcik como $3,96 \text{ cm}^2$ e $6,31 \text{ cm}^2$, para SiTiMPs e SiTiMPs-Ty, respectivamente¹²³. Esta elevada área eletroativa é uma característica desejada ao desenvolver sensores eletroquímicos¹¹⁹. A Tabela 9 foi formulada de acordo com os voltamogramas da Figura 35, apresentando parâmetros eletroquímicos como intensidades de corrente de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc}), potencial de pico anódico e catódico

(E_{pa} e E_{pc}), relação I_{pa}/I_{pc} e separação entre os potenciais de pico de oxidação e redução (ΔE_p).

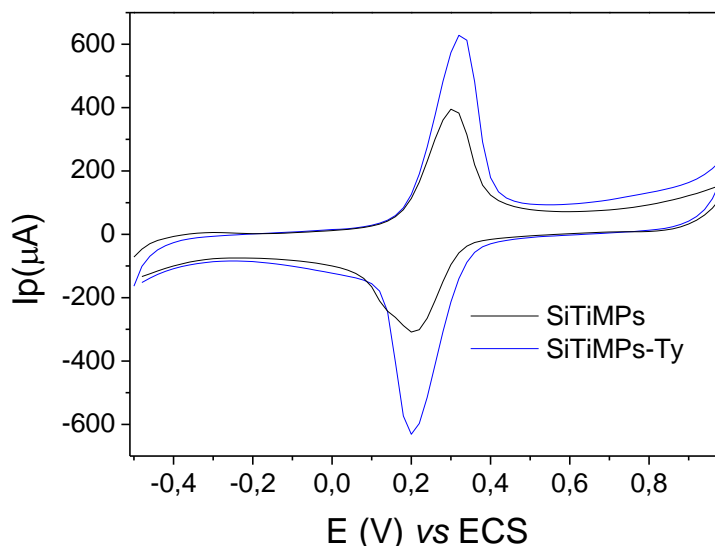


Figura 35. VC dos EPCs modificados com SiTiMPs e SiTiMPs-Ty na presença de solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L⁻¹ e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

Tabela 9. Tabela de parâmetros eletroquímicos dos materiais SiTiMPs e SiTiMPs-Ty obtidos por VC.

Eletrodo	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	I_{pa}/I_{pc}	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (mV)
SiTiMPs	391,5	316,4	1,240	0,30	0,20	100
SiTiMPs-Ty	625,7	626,9	0,998	0,33	0,20	130

Ao comparar os materiais com e sem a tirosinase imobilizada, além da maior corrente de pico, o EPC modificado com SiTiMPs-Ty é também aquele com a melhor relação I_{pa}/I_{pc} , mais próxima de 1,0 indicando que neste eletrodo existe uma maior reversibilidade. Quanto aos valores de ΔE_p , o EPC SiTiMPs apresenta a menor separação de picos (100 mV) do que o EPC/SiTiMPs-Ty (130 mV). Embora haja um aumento na resistência a transferência de carga para o eletrodo modificado com a enzima SiTiMPs-Ty, este resultado não é expressivo quando comparado ao incremento na corrente de pico fornecido pela tirosinase imobilizada. Além disso, esse comportamento é esperado

considerando que, quanto maior o conteúdo orgânico incorporado, maior é a resistência à transferência de carga, conforme relatado em trabalhos anteriores ¹²⁴.

Também foi avaliado o comportamento eletroquímico do EPC SiTiMPs-Ty a diferentes velocidades de varredura nas faixas de 10 a 150 mV s⁻¹ os resultados estão apresentados na Figura 36a. É possível observar um incremento na separação de pico com aumento da velocidade de varredura sugerindo que o processo envolvido na interface eletrodo solução é quase reversível ¹²². Adicionalmente, os voltamogramas mostram a relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a intensidade dos picos anódico e catódico conforme mostrado na Figura 36b, as equações das retas obtidas são descritos por:

$$I_{pa} \text{ (A)} = -3,5 \times 10^{-4} (\pm 0,3 \times 10^{-4}) + 1,45 \times 10^{-4} (\pm 0,03 \times 10^{-4}) v^{1/2} \text{ (mV s}^{-1}\text{)}$$

$$I_{pc} \text{ (A)} = 3,8 \times 10^{-4} (\pm 0,3 \times 10^{-4}) - 1,49 \times 10^{-4} (\pm 0,04 \times 10^{-4}) v^{1/2} \text{ (mV s}^{-1}\text{)}$$

Os coeficientes de correlação linear determinados a partir das retas apresentadas foram $R^2_{I_{pa}} = 0,993$ e $R^2_{I_{pc}} = 0,992$. Esse resultado indica um processo eletroquímico controlado na interface eletrodo solução tipicamente por difusão.

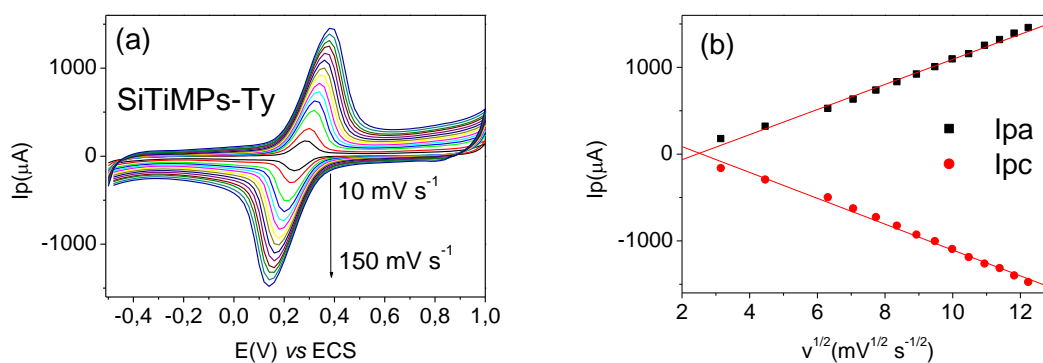


Figura 36. a) Voltamogramas do EPC SiTiMPs-Ty na presença de solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L⁻¹ a diferentes velocidades de varredura na faixa de 10 a 150 mV s⁻¹ b) relação linear entre $v^{1/2}$ e I_{pa} e I_{pc}.

5.5. Aplicação do EPC SiTiMPs-Ty como biossensor eletroquímico para catecol e catecolaminas

5.5.1. Resposta eletroquímica para catecol e catecolaminas

A resposta dos EPCs SiTiMPs e SiTiMPs-Ty também foi avaliada no processo redox do catecol através da análise de VC na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ do analito, conforme apresentado na Figura 37. O par de picos correspondentes ao processo redox do catecol é identificado para os dois eletrodos indicando um processo reversível. A análise de VC, mostra ainda correntes de pico anódico e catódico mais definidas e intensas para o EPC SiTiMPs-Ty. Esse resultado sugere que a presença da enzima tirosinase, imobilizada na superfície do eletrodo, fornece o aumento da atividade electrocatalítica no processo redox do catecol.

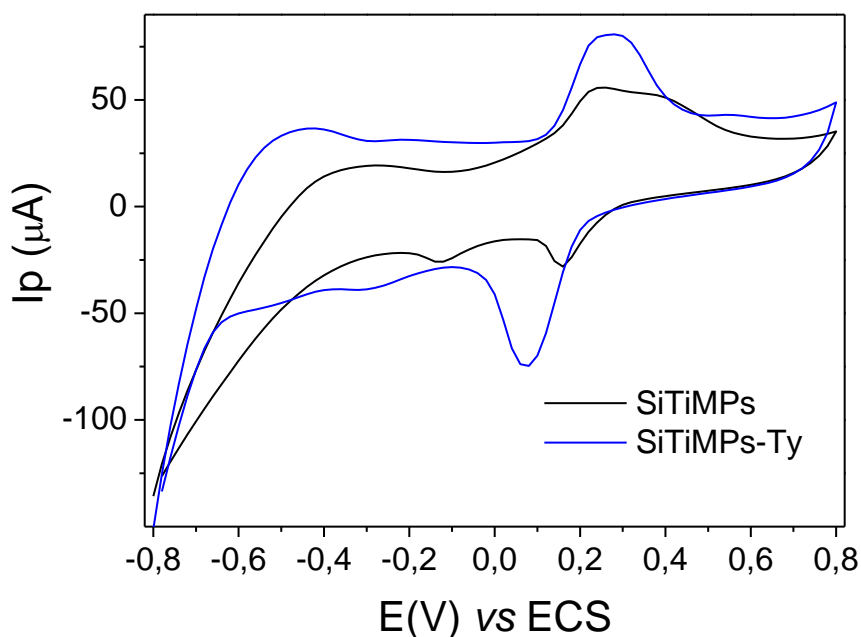


Figura 37. Voltamogramas do EPC SiTiMPs e EPC SiTiMPs-Ty na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

A influência da velocidade de varredura no comportamento eletroquímico do catecol também foi examinada por VC e os resultados são mostrados na Figura 38. As correntes de pico anódico e catódico aumentam linearmente com a velocidade de varredura na faixa de 10 a 150 mV s^{-1} (Figura Inserida), indicando um processo

controlado por adsorção. As equações que descrevem o comportamento linear são apresentadas abaixo:

$$I_{pa} \text{ (A)} = 4,7 \times 10^{-5} (\pm 0,3 \times 10^{-5}) + 1,79 \times 10^{-6} (\pm 0,03 \times 10^{-6}) v \text{ (mV s}^{-1}\text{)}$$

$$I_{pc} \text{ (A)} = 4,8 \times 10^{-7} (\pm 0,2 \times 10^{-7}) - 1,61 \times 10^{-6} (\pm 0,02 \times 10^{-6}) v \text{ (mV s}^{-1}\text{)}$$

Através das equações, foram determinados os coeficientes lineares como $R^2_{I_{pa}} = 0,992$, $R^2_{I_{pc}} = 0,998$.

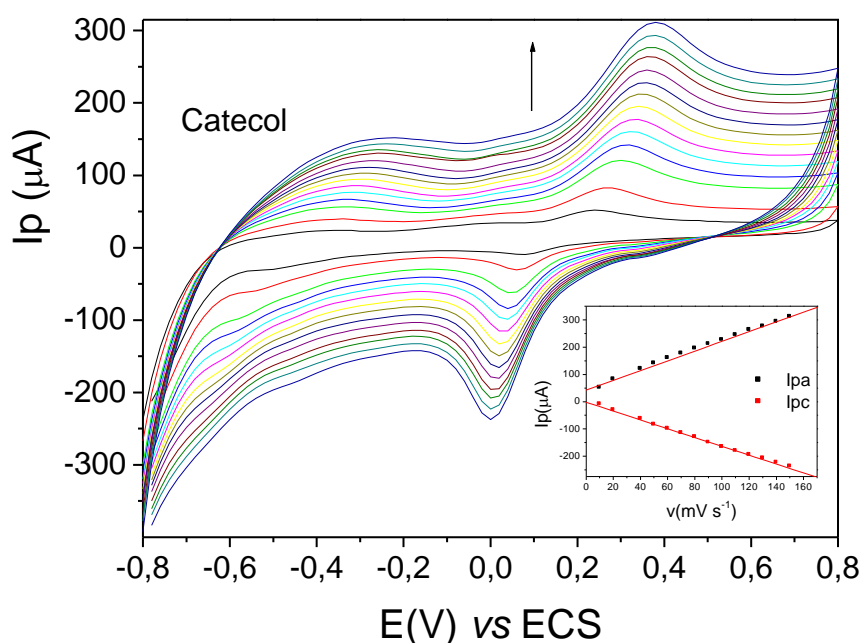


Figura 38. Voltamogramas do EPC SiTiMPs-Ty a diferentes velocidades de varredura de 10 a 150 mV s^{-1} na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol.

A resposta eletroquímica do EPC/SiTiMPs-Ty foi investigada em diferentes pH (6,0, 6,5, 7,0, 7,5) na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol. De acordo com a Figura 39a, observam-se correntes de pico anódico e catódico mais intensas e definidas em pH 7,5. Este pH é próximo ao pH de meios biológicos. Considerando a melhor resposta e as possíveis futuras aplicações do eletrodo, essa condição foi determinada como ideal para a quantificação dos analitos estudados.

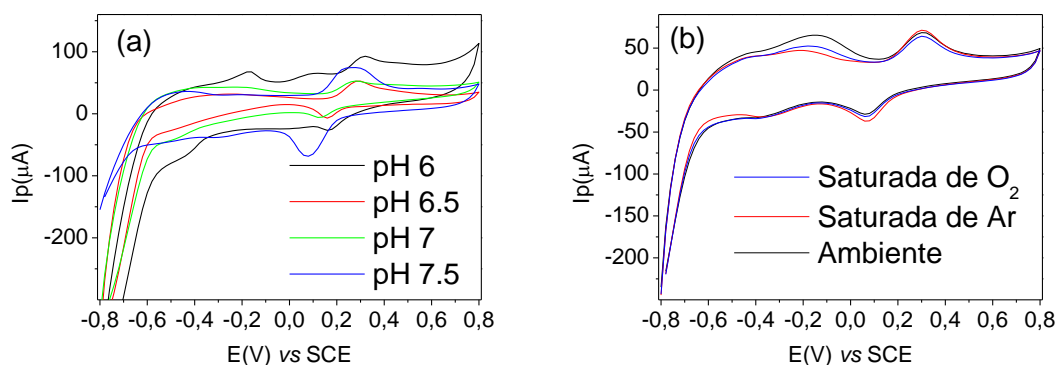


Figura 39. VCs do EPC SiTiMPs-Ty na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol a diferentes pHs e b) na presença de diferentes atmosferas, na velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

A atmosfera ideal para medidas eletroquímicas também foi avaliada na presença na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol em diferentes atmosferas como apresentado na Figura 39b. As medidas mostram resposta eletroquímica semelhante para as atmosferas testadas e, por isso foi determinada como adequada a atmosfera ambiente considerando-se a simplicidade e economia de análise.

Considerando que o eletrodo EPC SiTiMPs-Ty apresentou boa resposta para o catecol este eletrodo também foi testado para outros analitos como dopamina e epinefrina. A Figura 40 mostra as voltametrias cíclicas a diferentes velocidades de varredura na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina (Figura 40a) e $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de epinefrina (Figura 40b). Nas Figuras pode ser observada a presença de picos anódicos e catódicos que correspondem a processos de oxidação e redução na superfície do eletrodo das espécies analisadas. Também é observado nas Figuras Inseridas que as correntes de pico anódico e catódico aumentam linearmente com a velocidade de varredura na faixa de 10 a 150 mV s^{-1} , sugerindo que o processo na interface eletrodo solução é controlado por adsorção. As equações que das retas obtidas são apresentadas a seguir.

- Para a dopamina:

$$I_{pa} (\text{A}) = 1,2 \times 10^{-5} (\pm 0,5 \times 10^{-5}) + 1,51 \times 10^{-6} (\pm 0,05 \times 10^{-6}) v (\text{mV s}^{-1})$$

$$I_{pc} (\text{A}) = 3,2 \times 10^{-6} (\pm 0,7 \times 10^{-6}) - 1,82 \times 10^{-6} (\pm 0,07 \times 10^{-6}) v (\text{mV s}^{-1})$$

Os valores de correlação linear $R^2_{I_{pa}} = 0,995$ e $R^2_{I_{pc}} = 0,992$;

-Para a epinefrina:

$$I_{pa} (\text{A}) = 3,5 \times 10^{-5} (\pm 0,2 \times 10^{-5}) + 1,10 \times 10^{-6} (\pm 0,02 \times 10^{-6}) v (\text{mV s}^{-1})$$

$$I_{pc} (\text{A}) = -2,1 \times 10^{-5} (\pm 0,2 \times 10^{-5}) - 1,81 \times 10^{-6} (\pm 0,02 \times 10^{-6}) v (\text{mV s}^{-1})$$

Os valores de correlação linear como $R^2_{Ipa} = 0.998$ e $R^2_{Ipc} = 0.999$;

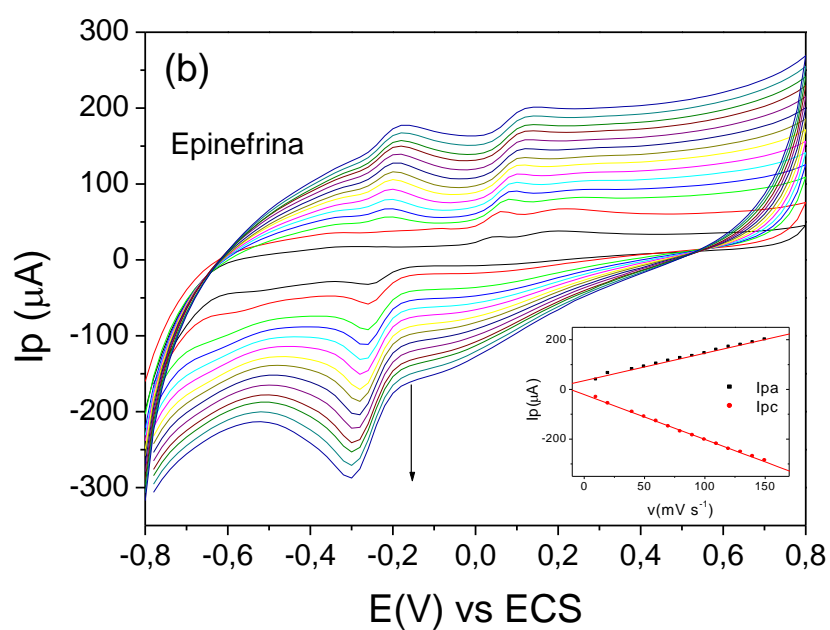
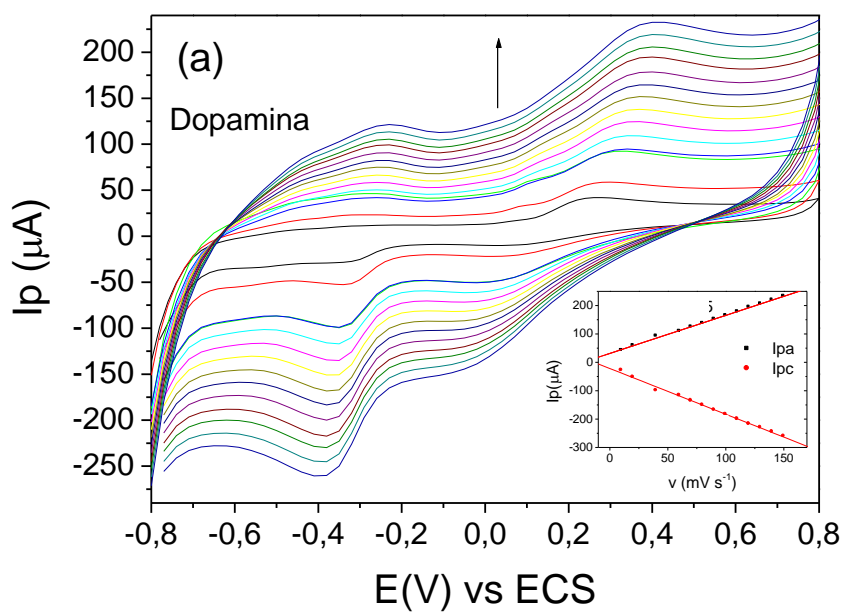


Figura 40. Voltamogramas do EPC SiTiMPs-Ty a diferentes velocidades de varredura de 10 a $150 mV s^{-1}$ na presença de $38 \mu mol L^{-1}$ em pH 7,5 de a) dopamina b) epinefrina. Figuras inseridas: Retas de velocidade de varredura ($mV s^{-1}$) versus I_{pa} e I_{pc} (μA).

5.5.2. Análise de catecol, epinefrina e dopamina por voltametria de pulso diferencial

A análise de voltametria de pulso diferencial (VPD) do EPC SiTiMPs-Ty visou avaliar o comportamento eletroquímico do eletrodo na presença de catecol, dopamina e epinefrina. Comparando os VDPs na faixa de -0,8 até 0,8V apresentados na Figura 41, observa-se apenas um pico de redução para o catecol e epinefrina definidos em potenciais de 0,07 V e -0,23 V, respectivamente. Por outro lado, a análise na presença de dopamina mostra dois picos definidos e intensos de redução com os máximos de corrente localizados nos potenciais de -0,25 V e 0,15 V.

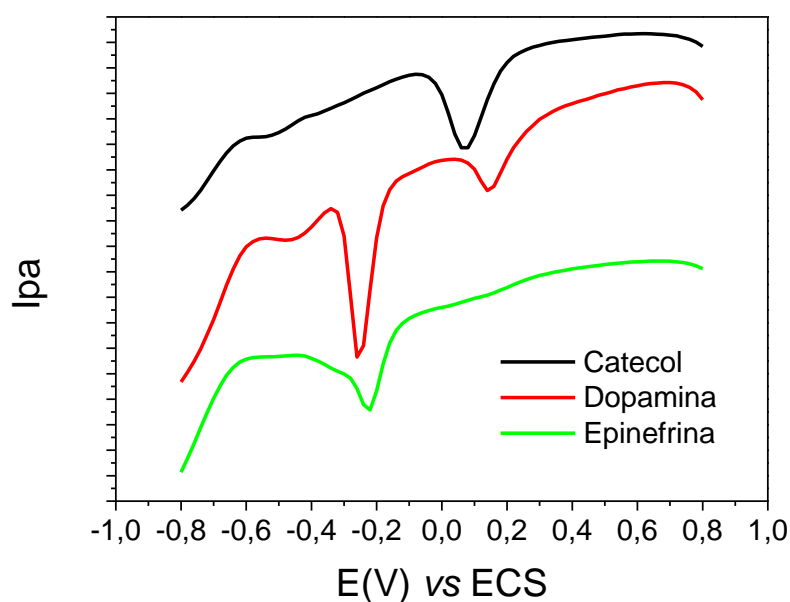


Figura 41. VPD comparativo do EPC SiTiMPs-Ty na presença de $38 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol, dopamina e epinefrina em pH 7,5.

Esse resultado indica que o mecanismo envolvido no processo redox da dopamina ocorre em duas etapas de reação, conforme já relatado na literatura e apresentado na Figura 42 ¹³¹.

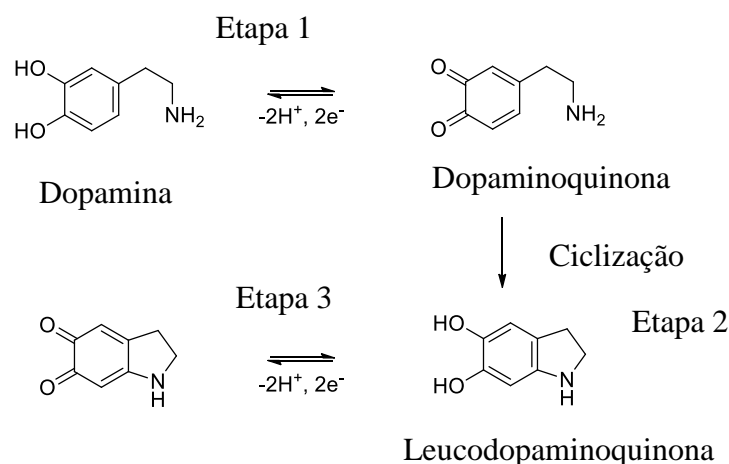


Figura 42. Mecanismo de ciclização da dopamina

No primeiro passo, a dopamina é oxidada a hidroquinona em uma reação envolvendo dois elétrons. O produto obtido (dopaminoquinona) apresenta um grupo amina doador de elétrons e um anel deficiente em elétrons que pode realizar facilmente uma reação de ciclização quando as medições são conduzidas em pH acima de 7. Este efeito é muito fraco em pH abaixo de 7 devido à presença de grupos amina protonados que impedem a ciclização. A mesma reação poderia ocorrer com epinefrina, mas o resultado de VPD mostra apenas um pico de redução e, neste caso, a presença de um grupo metila pode ter induzido a um efeito estérico, dificultando a ciclização ¹³².

Apesar de todos os compostos testados apresentarem resposta de redução em potenciais catódicos próximos, identifica-se uma separação de picos comparando os potenciais de catecol e epinefrina de aproximadamente 300 mV, resposta promissora para utilização do EPC SiTiMPs-Ty em análises simultâneas de catecol e epinefrina.

Avaliando o comportamento de redução por VPD, o EPC SiTiMPs-Ty foi aplicado como biossensor eletroquímico para determinação de catecol, dopamina e epinefrina sob as condições de detecção otimizadas e os resultados são mostrados nas Figuras 43a, 43b e 43c. Para todas as espécies estudadas, os voltamogramas mostram um aumento de pico de corrente proporcional ao aumento da concentração de analito. Considerando a resposta linear, as curvas de calibração construídas para cada analito estão apresentadas na Figura 43d, 43e e 43f.

A resposta linear foi observada entre uma faixa de 40 a 530 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para catecol e epinefrina e, 40 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a dopamina. As regressões lineares obtidas para a

determinação individual de catecol, epinefrina e dopamina foram expressas pelas seguintes equações:

$$I_{pc} (A) = -8,65 \times 10^{-5} (\pm 0,09 \times 10^{-5}) - 0,198 (\pm 0,03) [\text{Catecol}] (\text{mol L}^{-1})$$

$$I_{pc} (A) = -1,34 \times 10^{-4} (\pm 0,02 \times 10^{-4}) - 0,366 (\pm 0,008) [\text{Dopamina}] (\text{mol L}^{-1})$$

$$I_{pc} (A) = -1,10 \times 10^{-4} (\pm 0,02 \times 10^{-4}) - 0,221 (\pm 0,008) [\text{Epinefrina}] (\text{mol L}^{-1})$$

Os coeficientes lineares determinados a partir das retas foram 0,999, 0,990 e 0,997 para catecol, dopamina e epinefrina, respectivamente. As sensibilidades (S) foram determinadas como a inclinação das curvas de calibração e os limites de detecção foram calculados pela relação $3 \times \text{SDB } S^{-1}$, onde SDB foi o desvio padrão das medidas em branco (n = 7).

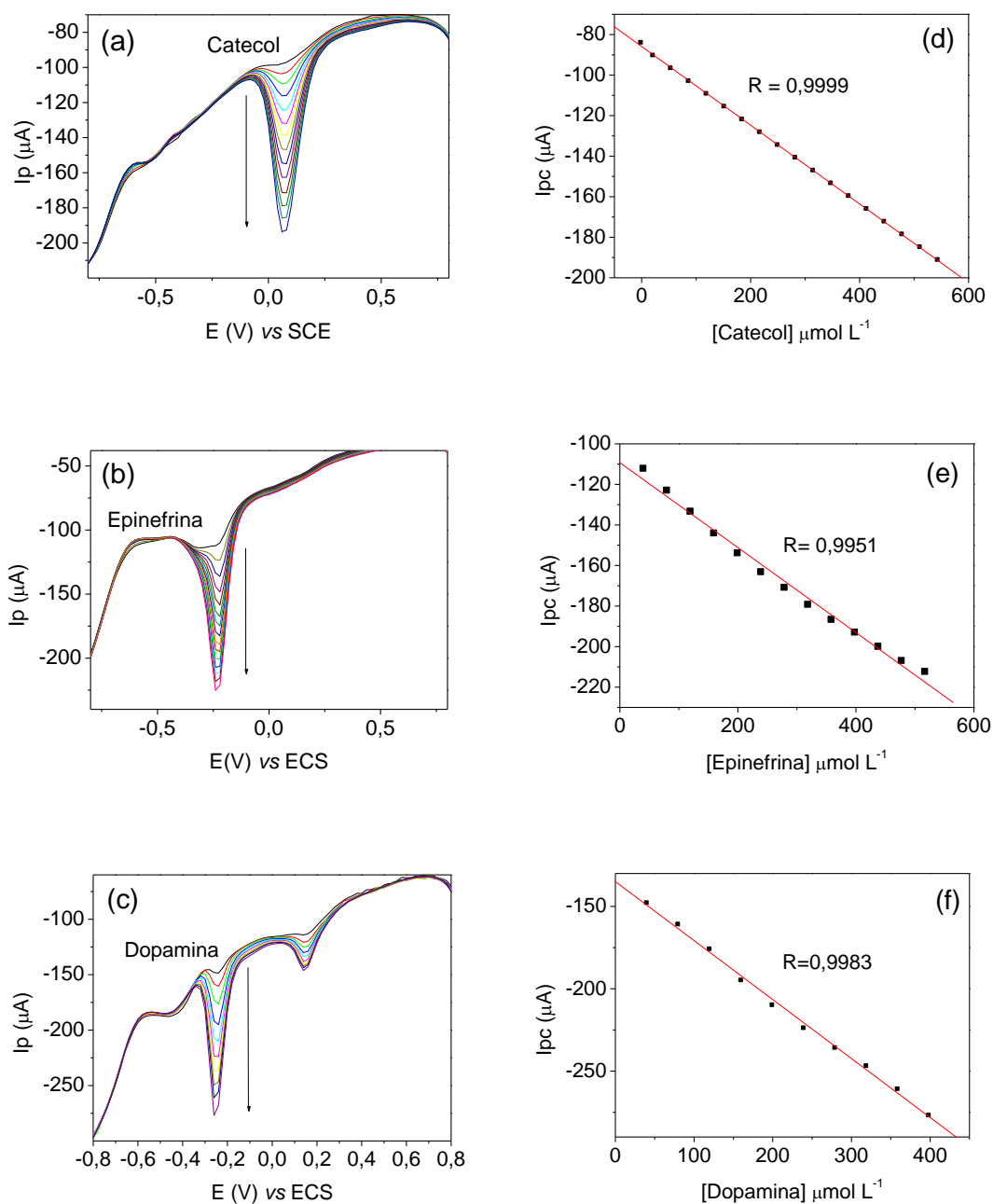


Figura 43. VPDs na presença de diferentes concentrações de a) catecol b) epinefrina e c) dopamina; curvas de calibração I_{pc} versus concentração d) catecol e) epinefrina e f) dopamina.

Os valores de limites de detecção e sensibilidades para cada analito são apresentados na Tabela 10. O sistema proposto apresentou alta sensibilidade para todos os analitos em uma ampla faixa linear e também baixos limites de detecção quando comparados a outros biossensores eletroquímicos usando tirosinase.

Tabela 10. Comparação do EPC SiTiMPs-Ty com diferentes eletrodos modificados com tirosinase aplicados na determinação eletroanalítica de catecol e catecolaminas.

Eletrodo Modificado	Analito	Sensibilidade ($\mu\text{A}/\mu\text{M}$)	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de Detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
Tyr-AuNPs-DHP/GCE ^a	CC	0,115	2,5-95	0,17	133
Ty-CoPc-CNTP ^b	CC	0,064	10-120	1,66	134
Tyrosinase-modified BDND ^c	CC	0,096	5-120	3,28	135
SiTiMPs-Ty	CC	0,198	40-530	0,23	Presente trabalho
Au-MEA/PEDOT-Tyr ^d	DP	0,002	20-300	0,24	136
Tyrosinase/NiO/ITO ^e	DP	0,06	2–100	1,04	137
PEDOT-Ty ^f	DP	-----	10-150	0,99	138
SiTiMPs-Ty	DP	0,366	40-400	0,72	Presente trabalho
Tyrosinase/SWCNT-GCE ^g	EP	-----	10-110	2,54	134
SiTiMPs-Ty	EP	0,221	40-530	2,94	Presente trabalho

^a Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e tirosinase em filme de dodecil sulfato

^b Eletrodo de pasta de carbono contendo nanotubos de carbono e Ftalocianina de Cobalto (II) modificado com tirosinase

^c Biossensor amperométrico baseado em filme de nanocristais de diamante dopados com Boro e modificado com tirosinase

^d Microeletrodo de Ouro modificado com biopolímero condutor poli(3,4-etilenodioxithiofenol) e tirosinase

^e Biossensor modificado com nanopartículas de níquel e tirosinase em superfície do óxido de índio

^f Micro eletrodo preparado pela deposição eletroquímica de poli(3,4- etilenodioxithiofenol) e tirosinase

^g Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo tirosinase imobilizada

De acordo com a Tabela 10, os limites de detecção obtidos para catecol e dopamina no presente trabalho foram menores que a maioria dos outros eletrodos modificados com tirosinase. Para dopamina e epinefrina, os intervalos lineares foram semelhantes aos relatados anteriormente e, para catecol, a faixa linear relatada foi maior do que a encontrada em outros trabalhos. No presente trabalho, também se observaram resultados de alta sensibilidade que poderiam ser atribuídos à incorporação de partículas magnéticas no material modificado¹³⁹ e também às propriedades texturais da sílica/titânia como a alta área superficial. O tamanho dos poros de aproximadamente 20 nm pode ter permitido a imobilização da enzima, mantendo a disponibilidade dos sítios ativos. Além disso, o EPC SiTiMPs-Ty pode ser considerado um sistema simples comparado a outros eletrodos relatados na literatura^{133,140}.

5.5.3. Análise Simultânea de catecol e dopamina

Considerando a diferença de potenciais obtidos para o catecol e a dopamina, observa-se a possibilidade de realizar análises simultâneas para ambos os analitos. Para isso analisou-se primeiro a interferência de resposta de cada analito mantendo-se um deles constante e variando a concentração do outro.

A Figura 44a apresenta os voltamogramas contendo diferentes concentrações de catecol na faixa de 40 a 380 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na presença de 4 μmol de epinefrina. Observa-se que a intensidade do pico relacionada ao catecol aumentou linearmente com o aumento da concentração do mesmo através de um comportamento descrito pela equação $I_{pc} \text{ (A)} = -6,8 \times 10^{-5} (\pm 0,1 \times 10^{-5}) - 0,261 (\pm 0,005) [\text{Catecol}] \text{ (mol L}^{-1})$ com $R^2 = 0,997$, ao mesmo tempo em que o pico relacionado a epinefrina não mostra variações significativas na intensidade de corrente.

Do mesmo modo, esta medida foi realizada na presença de 4 μmol de catecol alterando a concentração de epinefrina no sistema na faixa de 40 a 380 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 44b). Também é observada uma resposta linear para a epinefrina na presença de catecol expressa pela equação $I_{pc} \text{ (A)} = -9,5 \times 10^{-5} (\pm 0,4 \times 10^{-5}) - 0,42 (\pm 0,02) [\text{Epinefrina}] \text{ (mol L}^{-1})$ com $R^2 = 0,987$ ao mesmo tempo em que não se observam alterações substanciais na intensidade de corrente do catecol.

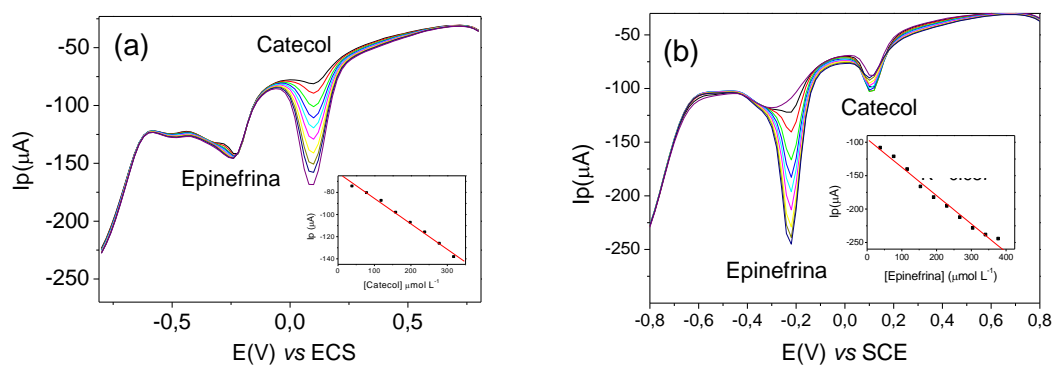


Figura 44. VPD do EPC SiTiMPs-Ty em pH 7,5 na presença de diferentes concentrações de a) catecol mantendo a concentração de epinefrina constante
b) epinefrina mantendo a concentração de catecol constante.

Esses resultados mostraram que, na faixa de concentração estudada, a presença simultânea de catecol não interfere na análise de epinefrina e vice-versa. Portanto, uma vez que não houve interferência, o EPC SiTiMPs-Ty foi aplicado na determinação simultânea de catecol e epinefrina.

A determinação das duas espécies usando o EPC SiTiMPs-Ty foi realizada na faixa potencial de -0,8 a 0,8 V por VPD. A resposta eletroquímica aumentou linearmente com o aumento da concentração em uma faixa de 50 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ conforme é mostrado na Figura 45.

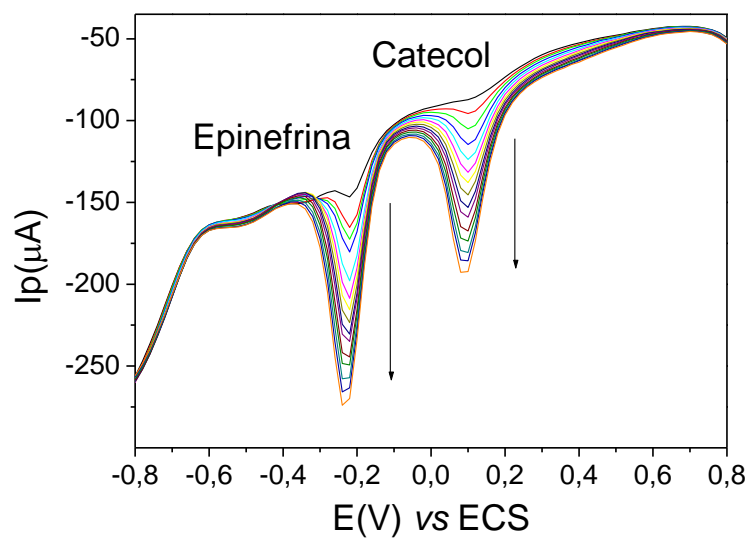


Figura 45. Análise simultânea por VPD do EPC SiTiMPs-Ty na presença de diferentes concentrações de catecol e epinefrina em pH 7,5.

As equações lineares correspondentes obtidas estão apresentadas na Figura 46 e podem ser descritas como:

$I_{pc} \text{ (A)} = -8,12 \times 10^{-5} (\pm 0,09 \times 10^{-5}) - 0,211 (\pm 0,003) [\text{Catecol}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$ com $R^2 = 0,997$ para o catecol;

$I_{pc} \text{ (A)} = -1,47 \times 10^{-4} (\pm 0,03 \times 10^{-4}) - 0,237 (\pm 0,008) [\text{Epinefrina}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$ com $R^2 = 0,985$, para a epinefrina;

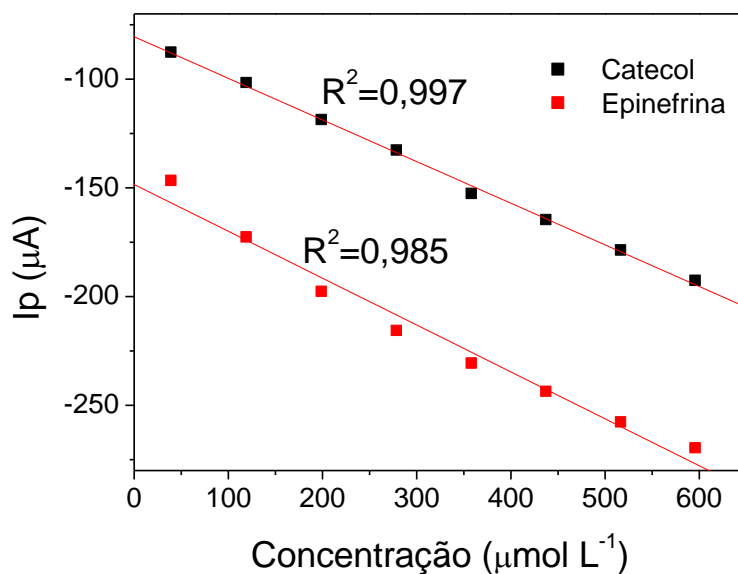


Figura 46. Curvas eletroanalíticas obtida por VPD do EPC SiTiMPs-Ty em análise simultânea de catecol e epinefrina.

Usando as curvas de calibração apresentadas na Figura 46, os limites de detecção foram de $3,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ com sensibilidades de $0,211 \mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,237 \mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$ para catecol e epinefrina, respectivamente. Os limites de quantificação foram determinados como $11,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o catecol e $5,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a epinefrina. Estes resultados revelam a possibilidade de quantificação para tais analitos por análise simultânea de VPD, com boas sensibilidades e baixos limites de detecção.

5.5.4. Reprodutibilidade

Este EPC modificado com o material SiTiMPs-Ty também apresentou boa reprodutibilidade (Figura 47) para determinações de catecol. O desvio padrão relativo da intensidade de corrente de pico catódico por VPD para a resposta de 5 diferentes eletrodos colocados em contato a um sistema eletroquímico contendo $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol foi de 6,87%.

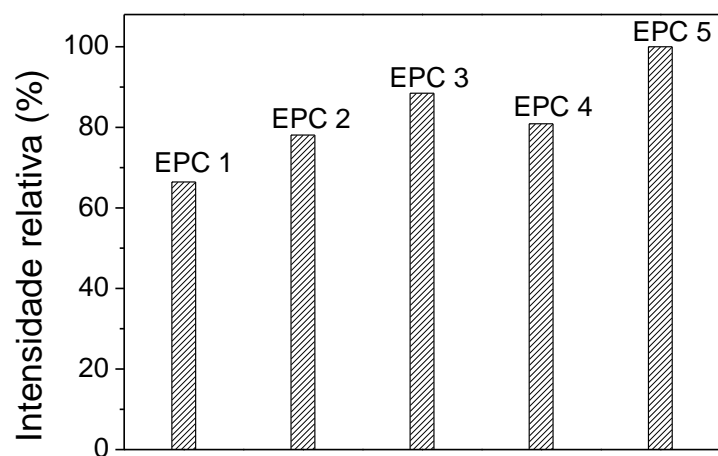


Figura 47. Resposta de intensidade relativa de pico para 5 diferentes EPC SiTiMPs-Ty em um sistema contendo $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo foram sintetizados materiais de sílica/titânia amorfos pelo método sol-gel com elevada área superficial e porosidade na faixa de mesoporos. Determinou-se através do comportamento eletroquímico e da facilidade da metodologia de síntese a proporção ideal para aplicações eletroquímicas como 30% de titânia no material (SiTi30). Após o estudo eletroquímico, foram incorporadas as nanopartículas de ouro previamente estabilizadas em quitosana na amostra SiTi30 utilizando o *método de grafting* e o novo material modificado SiTi30-Au foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão que permitiu confirmar a efetiva incorporação das nanopartículas de ouro no Suporte.

Também foi sintetizado um xerogel magnético de sílica/titânia contendo partículas magnéticas (SiTiMPs) o que permitiu o desenvolvimento de um novo suporte magnético com área superficial de $158 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e poros na região de aproximadamente 20 nm. Resultados por difração de raios X e curvas de magnetização mostraram que as partículas magnéticas apresentaram cristallitos menores que 40 nm e o comportamento magnético das partículas foi mantido no xerogel. Além disso, observou-se por microscopia eletrônica de transmissão a incorporação de partículas magnéticas na superfície da sílica/titânia com tamanho aproximado de 1 μm .

Foi imobilizada a enzima tirosinase na superfície do material SiTiMPs, este resultado foi investigado por curvas termogravimétricas que permitiram observar um aumento na perda de massa na região de decomposição de componentes orgânicos. Além disso, as análises texturais mostraram uma diminuição no diâmetro de poros do material em aproximadamente 4 nm que pode ser atribuído a incorporação da tirosinase na superfície e nos poros do material SiTiMPs.

O EPC modificado com o material SiTi30-Au mostrou promissora resposta para a determinação simultânea de norepinefrina e dopamina, apresentando altas sensibilidades e baixos limites de detecção e considerável reprodutibilidade. Além disso, o EPC modificado com SiTiAu-30 não apresenta interferência de sinal na determinação de norepinefrina em presença de componentes presentes em meios biológicos como glicose, ácido úrico e ácido ascórbico, mostrando potencialidade de aplicação do eletrodo na presença de matrizes complexas.

O EPC modificado com o material SiTiMPs-Ty também apresentou baixos limites de detecção e altas sensibilidades na detecção simultânea epinefrina e catecol, mostrando bons resultados de reprodutibilidade. Além disso, foi possível observar que a presença da

enzima aumentou a definição e a intensidade dos picos redox na presença de catecol, mostrando eficiência eletrocatalítica da tirosinase frente a esse analito.

Por fim, de modo geral os EPCs modificados desenvolvidos nesse trabalho foram obtidos através de uma metodologia sintética simples e de fácil reprodução que permitiu determinar seletivamente através de técnicas eletroquímicas compostos fenólicos com estruturas bastante semelhantes o que indica o avanço das técnicas eletroquímicas para determinação em determinações eletroanalíticas através de eletrodos modificados com nanoestruturas e espécies eletroativas, responsáveis por catalisar as reações redox na interface eletrodo/solução.

7. REFERÊNCIAS

- (1) Nantaphol, S.; Watanabe, T.; Nomura, N.; Siangproh, W.; Chailapakul, O.; Einaga, Y. *Biosens. Bioelectron.* 2017, 98, 76–82.
- (2) Ng, K. L.; Tan, G. H.; Khor, S. M.; *Food Chem.* 2017, 237, 912–920.
- (3) Liu, X.; Liu, X.; Wei, H.; Song, G.; Guo, H.; Lu, X.; *Sensor Actuat. B-Chem.* 2017, 252, 503–510.
- (4) Ferreira, U. C.; Gushiken, Y.; Kubota, L. T.; *J Solid Stat Electrochem* 2000, 4, 298-303.
- (5) Kadib, A. E.; Bousmina, M.; *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 8264 – 8277
- (6) Etienne, M.; Zhang, L.; Vilà, N.; Walcarius, A.; *Electroanalysis* 2015, 27, 2028 – 2054
- (7) Morosanova, E. I.; *Talanta* 2012, 102, 114–122
- (8) Benvenuti, E. V.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; *Quim. Nova* 2009, 32, 1926-1933
- (9) Cheraghi, S.; Taher, M. A.; Karimi-Maleh, H.; *Appl. Surf. Sci.* 2017, 420, 882–885.
- (10) Amani-Beni, Z.; Nezamzadeh-Ejehieh, N.; *J. Colloid Interface Sci.* 2017, 504, 186–196.
- (11) Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; de la Guardia, M.; *Trends Analyt Chem.* 2015, 72, 1–9
- (12) Kang, C.; Kang, J.; Lee, N.; Yoon, Y. H.; Yang, H.; *Anal. Chem.* 2017, 89, 7974–7980.
- (13) Rocha-Santos, T. A. P.; *Trends Analyt Chem.* 2014, 62, 28–36
- (14) Baghayeri, M.; Veisi, H.; Ghanei-Motlagh, M.; *Sensor Actuat. B-Chem.* 2017, 249, 321–330.
- (15) Yuan, Y.; Wu, H.; Chi, B.; Wen, S.; Liang, R.; Qiu, J.; *Biosens. Bioelectron.* 2017, 97, 325–331.
- (16) Patra, S.; Roy, E.; Parui, R.; Madhuri, R.; Sharma, P. K.; *Biosens. Bioelectron.* 2017, 97, 208–217
- (17) Asadpour-Zeynali, K.; Mollarasouli, F.; *Biosens. Bioelectron.* 2017, 92, 509–516.
- (18) Bai, L.; Yuan, R.; Chai, Y.; Yuan, Y.; Zhuo, Y.; Mao, L.; *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 4331–4336.
- (19) Li, G.; Li, Z.; You, X.; Chen, J.; Tang, S.; *Talanta* 2016, 161, 138–142.

- (20) Li, X.; Li, J.; Liu, Y.; Zhang, X.; Chen, J.; *Sensor Actuat. B-Chem.* 2017, 250, 1–7.
- (21) Zucca, P.; Sanjust, E.; *Molecules* 2014, 19, 14139–14194.
- (22) Florescu, M.; David, M.; *Sensors* 2017, 17, 1314
- (23) Goncalves, D.; Alves, G.; Soares-da-Silva, P.; Falcão, A.; *Anal Chim Acta* 2012, 710, 17–32.
- (24) Ribeiro, J. A.; Fernandes, P. M. V.; Pereira, C. M.; Silva, F.; *Talanta* 2016, 160, 653–679.
- (25) Jain, S.; Goldstein, D. S.; *Neurobiol. Dis.* 2012, 46, 572–580.
- (26) Seeber, R.; Pigani, L.; Terzi, F.; Zanardi, C.; *Electrochim Acta* 2015, 179, 350–363.
- (27) Arvanda, M.; Pourhabibb, A.; Giahic, M.; *J Pharm Biomed Anal* 2017, 7, 110–117.
- (28) Song, H.; Xue, G.; Zhang, J.; Wang, G.; Ye, B.; Sun, S.; Tian, L.; Li, Y.; *Microchim Acta* 2017, 184, 843–853.
- (29) Morosanova, E. I.; *Talanta* 2012, 102, 114–122.
- (30) Gao, X.; Wachs, I. E.; *Catalysis Today* 1999, 51, 233–254.
- (31) Matsuda, A.; Higashi, Y.; Tadanaga, K.; Tatsumisago, M.; *J Mater Sci* 2006, 41, 8101–8108.
- (32) Lukowiak, A.; Dylewicz, R.; Lis, S.; Baszczuk, A.; Patela, S.; Maruszewski, K.; *Optical Mater.* 2005, 27, 1501.
- (33) Khalil, T.; Abou, F.; El-Nour, B.; El-Gammal, A.; Boccaccini, R.; *Powder Technol.* 2001, 114, 106–111.
- (34) Li, X.; He, G.; Han, Y.; Xue, Q.; Wu, X.; Yang, S.; *J. Colloid Interface Sci.* 2012, 382, 39–46.
- (35) Choi, H. N.; Kim, M. A.; Lee, W.; *Anal. Chim. Acta.* 2005, 537, 179–187.
- (36) Ferreira, C.U.; Gushikem, Y.; Kubota, L.T.; *J Solid State Electrochem.* 2000, 4, 298–303.
- (37) Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* 2002, 25, 835–841.
- (38) Parka, S.; Kima, C.; Leea, W.; Sunga, S.; Yoona, M.; *Mater. Sci. Eng. C.* 2017, 114, 1–22.
- (39) Pudukudya, M.; Yaakoba, Z.; Zulhamizan, M.; Takriff, M. S.; Jahayac, S. S.; *Appl Catal B: Environ* 2017, 218, 298–316.

- (40) Liu, J.; Zhou, Y.; Han, F.; Chen, D.; Chen, L.; *Mater Lett.* 2017, 207, 109–112.
- (41) Taromi, A. A.; Kaliaguine, S.; *Micropor Mesopor Mater.* 2017, 248, 179–191.
- (42) Xu, L.; Ke, C.; Huang, Y.; Yan, Y.; *Catalysts* 2016, 6, 149.
- (43) Kayili, H. M.; Salih, B.; *Talanta* 2016, 155, 78–86.
- (44) Maroneze, C. M.; Luz, R. C. S.; Landers, R.; Gushikem, Y; *J Solid State Electrochem*, 2010, 14,115–121.
- (45) Angelome, P. C.; Marzan, L. M. L; *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2014, 70, 180–190.
- (46) Walcarius, A.; *Electroanalysis* 2015, 27, 1 – 39.
- (47) Caldas, E. M.; Novatzky, D.; Deon, M.; de Menezes, E. W.; Hertz, P. F.; Costa, T. M. H.; Arenas, L. T.; Benvenutti, E. V.; *Micropor. Mesopor. Mater.* 2017, 247, 95-102.
- (48) Walcarius, A.; *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 4098.
- (49) Innocenzi, P.; Malfatti, L.; *Chem. Soc. Rev.* 2012, 42, 4198-4216.
- (50) Ehea, C. V.; Weber, C.; Gottschaldt, M.; Schubert, U. S.; *Prog Colloid Polym. Sci.* 2016, 57, 64–102.
- (51) Aziz, M. A.; Mahfoz, W.; Shaikh, M. N.; Zahir, M. H.; AlBetar, A.; Oyama, M.; Theleritis, D.; Yamani, Z. H.; *Electroanalysis* 2017, 29, 1 –9
- (52) Ramos, J. V. H.; Morawski, F. M.; Costa, T. M. H.; Dias, S. L. P.; Benvenutti, E. V.; de Menezes, E. W.; Arenas, L. T.; *Micropor Mesopor Mat.* 2015, 217, 109-118.
- (53) Yusoff, N.; Rameshkumar, P.; Shahid, M. M.; Huang, S.; Huang, N. M.; *Microchim Acta* 2017, 184,3291–3299.
- (54) Goyal, R. R.; Shim, Y.; *RSC Adv.* 2015, 5, 69356–69364.
- (55) Jia, D.; Liua, L.; Lia, S.; Chena, C.; Lua, Y.; Wua, J.; Liu, Q.; *Biosens. Bioelectron.* 2017, 98, 449–456.
- (56) Baghayeri, M.; Veisi, H.; Ghanei-Motlaghc, M.; *Sensor Actuat. B-Chem.* 2017, 249, 321–330.
- (57) Zhu, C.; Yang, G.; Li, H.; Du, D.; Lin, Y.; *Anal. Chem.* 2015, 87, 230–249.
- (58) Windmiller, J. R.; Wang, J.; *Electroanalysis* 2012, 24, 1 – 18.
- (59) Teng, J.; Ye, Y.; Yao, L.; Yan, C.; Cheng, K.; Xue, F.; Pan, D.; Li, B.; Chen, W.; *Microchim Acta* 2017, 184, 3477–3485.

- (60) Tepelia, Y.; Barlasb, F. B.; Timurb, S.; Anika, U.; *Electrochim. Acta* 2016, 211, 71–76.
- (61) Chena, J.; Liuc, Z.; Penga, H.; Zhenga, Y.; Lina, Z.; Liua, A.; Chena, W.; Lin, X.; *Biosens. Bioelectron.* 2017, 98, 345–349.
- (62) Donga, X.; Yanga, J.; Luo, L.; Zhanga, Y.; Mao, C.; Suna, Y.; Leia, H.; Shena, Y.; Beierd, R. C.; Xu, Z.; *Biosens. Bioelectron.* 2017, 98, 305–309.
- (63) Mondal, D.; Paul, D.; Mukherji, S.; *IEEE Sensors J.* 2017, 17, 5021-5029.
- (64) Husua,I.; Rodioa, G.; Touloupakis, E.; Lambrevaa, M. D.; Buonaseraa, K.; Litescuc, S. C.; *Sensor Actuat. B-Chem.* 2013, 185, 321–330.
- (65) Chillawar, R. R.; Tadi, K. K.; Motghare, R. V.; 8, *Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 70, 400-418.
- (66) Cheraghi, S.; Taher, M. A.; Karimi-Maleh, H.; *Applied Surface Science*, 2017, 420, 882–885.
- (67) Jia, D.; Liua, L.; Lia,S.; Chen, C.; Lu, Y.; Wu, J.; Liu, Q.; *Biosensors and Bioelectronics* 2017, 98, 449–456.
- (68) Shamsipur, M.; Karimi, Z.; Tabrizi, M. A.; *Microchem. J* 2017, 133, 485–489.
- (69) Lu, X.; Liu, X.; Shen, T.; Qin, Y.; Zhang, P.; Luo, H.; Guo, Z.; *Mater. Lett.* 2017, 207, 49–52.
- (70) Zamora-Gálveza, A.; Mayorga-Matinez, C. C.; Paroloa, C.; Ponsb, J.; Merkočia, A.; *Electrochem Commun.* 2017, 82, 6–11.
- (71) Fartas, F. M.; Abdullah, J.; Yusof, N. A.; Sulaiman, Y.; Saiman, M. I.; *Sensors* 2017, 17, 2-14.
- (72) Yiwei, X.; Wen, Z.; Jiyong, X.; Xiaobo, C.; Yanxiao, L.; Tahir, H. E.; Xiaowei, H.; Zhihua, L.; Xiaodong, Z.; Xuetao, H.; *Food Chem.* 2017, 237, 423–430.
- (73) Yu, J.; Liu, S.; Ju, H.; *Biosens. Bioelectron.* 2003, 19, 509-514.
- (74) Adamski, J.; Kochana, J.; Nowak, P.; Parczewski, A.; *J Food Compost Anal.* 2016, 46, 1–6.
- (75) Durán, N.; Rosa, M. A.; D’Annibale, A.; Gianfreda, L.; *Enzyme Microb Technol.* 2002, 31, 907–931.
- (76) Santos, J. C. S.; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R.; *ChemCatChem* 2015, 7, 2413 – 2432.

- (77) Hasanzadeh, M.; Shadjou, M.; Eskandani, M.; de la Guardia, M.; Trends Analyt. Chem., 2012, 40, 107-118.
- (78) Soussou, A.; Gammoudi, I.; Moroté, F.; Kalboussi, A.; Cohen-Bouhacina, T.; Grauby-Heywang, C.; Baccar, Z. M.; IEEE Sensors J., 2017, 17, 4340-4348.
- (79) Peniche, H.; Osorio, A.; Acosta, N.; de la Campa, A.; Peniche, C.; J Appl Polym Sci 2005, 98, 651-657.
- (80) Sroysee, W.; Ponlakhet, K.; Chairam, S.; Jarujamrus, P.; Amatatongchai, M.; Talanta, 2016, 157, 154–162.
- (81) Gerent, G. G.; Spinelli, A.; J Hazard. Mater. 2017, 330, 105–115.
- (82) Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; la Guardia, M.; Trends Analyt. Chem. 2015, 72, 1–9.
- (83) Xiao; D.; Lu; D.; Zeng; R.; Bi; Y.; Microchim Acta 2016, 183, 2655–2675.
- (84) Jaime, J.; Rangel, G.; Munoz-Bonilla, A.; Mayoral, A.; Herrasti, P.; Sensor Actuat. B-Chem. 2017, 238, 693–701.
- (85) Gasser, C. A.; Ammann, E. M.; Schäffer, A.; Shahgaldian, P.; Corvini, P. F. X.; Appl Microbiol Biotechnol 2016, 100, 7281–7296.
- (86) Chen, D.; Deng, J.; Liang, J.; Xie, J.; Hue, C.; Huang, K.; Sensor. Actuat. B-Chem. 2013, 183, 594–600.
- (87) Arvand, M.; Hassannezhad, M.; Mater. Sci. Eng. C 2014, 36, 160–167.
- (88) Chen, A.; Chatterjee, S.; Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 5425-5438.
- (89) Chen, J.; He, P.; Bai, H.; He, S.; Zhang, T.; Zhang, T.; Dong, F.; Sensor Actuat. B-Chem. 2017, 2017, 9–16.
- (90) Heydari-Bafrooeil, E.; Askari, S.; Microchim Acta 2017, 184, 3405–3413.
- (91) He, H.; Guo, C.; Song, Y.; Zhang, S.; Wang, M.; Peng, D.; Fang, S.; Zhang, Z.; Liu, C.; Microchim Acta 2017, 184, 2919–2924.
- (92) Simon, I. A.; Vacaro, B. B.; Nunes, M. R.; Benvenuti, E. V.; Dias, S. L. P.; Gushikem, Y.; Arguello, J.; Electroanalysis 2013, 11, 2501 – 2506.
- (93) Švancara, I.; Walcarius, A.; Kalcher, K.; Vytřas, K.; Cent. Eur. J. Chem. 2009, 7, 598–656.
- (94) Amatatongchai, M.; Sroysee, W.; Chairam, S.; Nacapricha, D.; Talanta 2017, 166, 420–427.
- (95) Afkhami, A.; Gomar, F.; Madrakian, T.; Sensor Actuat. B-Chem. 2016, 233, 263–271.

- (96) Mustafa, H. N. A.; Isa, M. D.; Alil, N. M.; Hashim, N.; Musa, M.; Ghani, S. A.; *Int. J. Electrochem. Sci.* 2015, 10, 9232 – 9245.
- (97) Zaidi, S. A.; *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013, 8, 11337 – 11355.
- (98) Movlaee, K.; Beitollahi, H.; Ganjali, M. R.; Norouzi, P.; *Microchim Acta* 2017, 184, 3281–3289.
- (99) Batchelor-McAuley, C.; Katelhon, E.; Barnes, E. O.; Compton, R. G.; Laborda, E.; Molina, A.; *ChemistryOpen* 2015, 4, 224 – 260.
- (100) Farghaly, O. A.; Hameed, R. S. A.; Abu-Nawwas, A. H.; *Int. J. Electrochem. Sci.* 2014, 9, 3287-3318.
- (101) Kimmel, D. W.; LeBlanc, G.; Meschievitz, M. E.; Cliffel, D. E.; *Anal Chem.* 2012, 84, 685–707.
- (102) Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; 1996, 220-245.
- (103) Chen, A.; Shah, B.; *Anal. Methods*, 2013, 5, 2158-2173.
- (104) Mirceski, V.; Gulaboski, R.; Lovric, M.; Bogeski, I.; Kappl, R.; Hothd, M.; *Electroanalysis* 2013, 25, 2411 – 2422.
- (105) Alu'datt, M. H.; Rababah, T.; Alhamad, T. M.; Al-Mahasneh, M. A.; Almajwal, A.; Ereifej, S. G. K.; Johargy, A.; Alli, I.; *Food Chem.* 2017, 218, 99–106.
- (106) Ahmed, S.; Rasul, M. G.; Brownb, R.; Hashib, M. A.; *J Environ Manage.* 2011, 92, 311-330.
- (107) Gharras, H. E.; *Int J Food Sci Tech.* 2009, 44, 2512–2518.
- (108) Ribeiro, J. A.; Fernandes, P. M. V.; Pereira, C. M.; Silva, F.; *Talanta* 2016, 160, 653–679.
- (109) Granato, D.; Santos, J. S.; Maciel, L. G.; Nunes, D. S.; *Trac-trend Anal. Chem.* 2016, 80, 266–279.
- (110) Palanisamy, S.; Chen, K. T. S.; Thirumalraja, B.; Liu, X.; *Sensor Actuat. B-Chem*, 233, 298–306.
- (111) Vicentini, F. C.; Garcia, L. L. C.; Figueiredo-Filho, L. C. S.; Janegitza, B. C.; Fatibello-Filho, O.; *Enzyme Microb Technol* 2016, 84, 17–23.
- (112) Apetreia, I. M.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Apetreic, C.; de Saja, J. A.; *Sensor Actuat. B-Chem* 2013, 177, 138– 144.
- (113) Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M.; *Analyst*, 2016, 141, 2568-2573.
- (114) Jackowska, K.; Kryszinski, P.; *Anal Bioanal Chem* 2013, 405, 3753–3771.

- (115) Narayana, P. V.; Reddy, T. M.; Gopal, P.; Reddy, M. M.; Naidu, R.; Mater. Sci. Eng. C 2015, 56, 57–65.
- (116) Lastovina, T. A.; Budnyk, A. P.; Kudryavtsev, E. A.; Nikolsky, A. V.; Kozakov, A. T.; Chumakov, N. K.; Emelyanov, A. V.; Soldatov, A. V. Mater. Sci. Eng. C 2017, 80, 110-116.
- (117) Stober, W. 1968. 1, 69, 62–69.
- (118) Gregg, S. J.; Sing, K. S. W. Adsorption Surface Area and Porosity; Academic London, 1982.
- (119) Mueller, R.; Kammler, H. K.; Wegner, K.; Pratsinis, S. E. Langmuir 2003, 19, 160-165.
- (120) Yang, Z.; Shen, G.; He, Y.; Liu, X.; Yang, S. J Porous Mater 2016, 23, 589–599.
- (121) Brett, A. M. O.; Brett, C. M. A.; Eletroquímica Princípios, Métodos e Aplicações. Almeida: Coimbra, 1996, 92-95.
- (122) Greef, R., Peat, R., Peter, L. M., Robinson, J. 1985. England: Ellis Horwood.
- (123) Baio, J. A. F.; Ramos, L. F.; Cavalheiro, E. T. G.; Quim. Nova 2014, 37, 1078-1084.
- (124) de Menezes, E. W., Nunes, M. R., Arenas, L. T., Dias, S. L. P., Garcia, I. T. S., Gushiken, Y., Costa, T. M. H., Benvenuti, E. V. J. Solid. State Electr. 2012, 16, 3703–3713.
- (125) Bard, J.; Faulkner, L.; Electrochemical Methods: Fundamental and Applications. 2000, Wiley: New York.
- (126) Mao, H.; Zhang, H.; Jiang, W.; Liang, J.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Wu, Q.; Zhang, G.; Song, X. Mater. Sci. Eng. C 2017, 75, 495–502.
- (127) Zhou, Y.; Tang, W.; Wang, J.; Zhang, G.; Chai, S.; Zhang, L.; Liu, T. Anal Methods 2014, 6, 3474-3481.
- (128) Mukdasai, S.; Langsi, V.; Pravda, M.; Srijaranai, S.; Glennon, J. D.; Sensor Actuat. B-Chem. 2016, 236, 126–135.
- (129) Cullity, B. D. Elements of XRD.1956, Addison-Wesley.
- (130) Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Roming Jr, A. D., Lyman, C. E., Fiori, C., Lifshin, E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis (3rd edition). 2003, New York: Springer.
- (131) Ejaz, A., Joo, Y., Jeon, S. Sensor Actuat. B-Chem. 2017, 240, 297–307.

- (132) Mao, H., Zhang, H., Jiang, W., Liang, J., Sun, Y., Zhang, Y., Wu, K., Zhang, G., Song, X. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.* 2017, 75, 495–502.
- (133) Vicentini, F. C., Garcia, L. L. C., Figueiredo, L. C. S., Janegitz, B. C., Fatibello, O. *Enzyme Microb. Tech.* 2016, 84, 17–23.
- (134) Apetrei, I. M., Rodriguez-Mendez, M. L., Apetrei, C., de Saja, J. A. *Sensor Actuat. B-Chem.* 2013, 177, 138–144.
- (135) Zou, Y. S., Lou, D., Dou, K., He, L. L., Dong, Y. H., & Wang, S. L. J. *Solid. State Electr.* 2016, 20, 47–54.
- (136) Lete, C., Lakard, B., Hihn, J. Y., del Campo, F. J., Lupu, S. *Sensor Actuat. B-Chem.* 2017, 240, 801–809.
- (137) Roychoudhury, A., Basu, S., Jha, S. K. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 84, 72–81.
- (138) Lupu, S., Lete, C., Balaure, P. C., del Campo, F. J., Muñoz, F. X., Lakard, B., Hihn, J. Y. *Sensor Actuat. B-Chem.* 2013, 181, 136–143.
- (139) Hasanzadeh, M., Shadjou, N., de la Guadia, M. *Trac-trend Anal. Chem.* 2015, 72, 1–9.
- (140) Sotomayor, M. D., Tanaka, A. A., Kubota, L. T. *Electrochim. Acta.* 2003, 48, 855–865.