UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

UNICAMP

TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS À BASE DE FILMES COM TCNX (TETRACIANOQUINODIMETANO E TETRACIANOETILENO) PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Rita de Cássia Silva Luz

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Campinas - SP
Março/2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

L978d

Luz, Rita de Cássia Silva.
Desenvolvimento de sensores eletroquímicos à base de filmes com TCNX (tetracianoquinodimetano e tetracianoetileno) para a determinação de compostos fenólicos / Rita de Cássia Silva Luz. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Sensores eletroquímicos. 2. TCNX. 3.Compostos fenólicos. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development of electrochemical sensors based on films containing TCNX (tetracyanoquinodimethane and tetracyanoethylene) for phenolics compound determination

Palavras-chaves em inglês: Eletrochemical sensors, TCNX, Phenolic compounds

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Prof. Dr. Auro Atsuhi Tanaka (DQ-UFMA), Prof. Dr. Edvaldo Sabadini (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Claudia Longo (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (DQ-UFSCAR)

Data de defesa: 19/03/2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a minha família pelo incentivo, força, carinho e amizade depositados a mim. Em especial ao Flavio Damos pelo amor e segurança transmitidos ao longo desses anos e ao pequeno Flavio Gabriel que nos trouxe enorme felicidade.

Agradecimentos

À Deus, que nos fortalece nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela segura orientação e incentivo, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Adriano Bof de Oliveira pelos materiais enviados durante o doutorado.

Ao Prof. Auro Tanaka e à Profa. Sônia Tanaka, pelo constante incentivo ao longo destes anos.

Aos ex. e atuais colegas, companheiros e amigos do LEEDS com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado, em especial a Wilney e Phabyanno pelo carinho e amizade.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial a Bel e Rodrigo (CPG) e Mário (mecânica fina) pela atenciosa e amigável forma com que sempre se dirigem aos alunos.

Aos funcionários da biblioteca do IQ, cuja eficiência só nos faz enriquecer.

À FAPESP pela bolsa e auxílio concedidos.

CURRICULUM VITAE

Rita de Cássia Silva Luz

I. Formação Acadêmica
I.1. Graduação
I.1. Química Industrial
Universidade Federal do Maranhão, São Luís–MA. Inicio: fevereiro de 1996/Conclusão: março de 2000. Local: São Luís – MA

I.2. Mestrado em Química Analítica
Universidade Federal do Maranhão – UFMA
Título da Dissertação: *Determinação de Vanádio em óleo diesel utilizando a Espectrometria de Absorção Atômica com forno de grafite*
Orientador: Prof. Dr. Edmar Pereira Marques
Início: agosto de 2001/Conclusão: julho de 2003. Local: São Luís – MA

II. Produção Científica
II.1. Artigos Publicados

II.1.1. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Electrocatalytical determination of reduced glutathione in human erythrocytes, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, 2007, 1891-1897.

II.1.2. Duarte, J. C. Luz, R.C.S., Damos, F.S., Oliveira, A.B., Lauro Tatsuo Kubota, Tetracyanoquinodimethanide adsorbed on a silica gel modified with titanium oxide for electrocatalytic oxidation of hydrazine, Journal of Solid State Electrochemistry, 11, 2007, 631-638.

II.1.3. Damos, F.S.; Luz, R.C.S; Sabino, A.A.; Eberlin, M.N.; Pilli, R.A.; Kubota, L.T, Self-Assembled Monolayer of Mono(6-deoxy-6-mercapto)-β-Cyclodextrin onto Gold Surface: Adsorption Kinetic and Film Properties, Journal of Electroanalytical Chemistry, 601, 2007, 181-193.

II.1.4. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Dissolved oxygen sensor based on cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized in poly-L-lysine film onto glassy carbon electrode, Sensors and Actuators B, 114, 2006, 1019-1027.

II.1.5. Luz, R. C. S.; Moreira, A. B.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A. and Kubota, L. T., Cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on poly-l-lysine film onto glassy carbon electrode as amperometric sensor for cysteine, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 42, 2006, 184-191.

II.1.6. Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Investigation of nanometric films of doped polyaniline by using electrochemical surface plasmon resonance

and electrochemical quartz crystal microbalance, Journal of Electroanalytical Chemistry, 589, 2006, 70-81.

II.1.7. Santos, W. J. R.; Sousa, A. L.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Kubota, L. T.; Tanaka A. A. e Tanaka, S. M. C. N., Amperometric Sensor for nitrite using glassy carbon electrode modified with alternating layers of iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)- porphyrin and cobalt tetrasulphonated phthalocyanine, Talanta, 70, 2006, 588-594.

II.1.8. Costa, C. O.; Miranda, P. R. B.; Hazra, B.; Sarma, M.; Luz, R. C. S.; Kubota, L. T.; Goulart, M. O. F., Development of a voltammetric sensor for diospyrin determination in nanomolar concentrations. Talanta, 68, 2006, 1378-1383.

II.1.9. Damos, F. S.; Luz, R. C. S. e Kubota, L. T., Investigations of ultrathin polypyrrole films: Formation and effects of doping/dedoping processes on its optical properties by electrochemical surface plasmon resonance, Electrochimica Acta, 51, 2006, 1304-1312.

II.1.10. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; de Oliveira, A. B.; Beck, J. e Lauro Tatsuo Kubota, Development of a voltammetric sensor for catechol in nanomolar levels using a modified electrode with $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ and PLL, Sensors and Actuators, B, 117, 2006, 274-281.

II.1.11. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; de Oliveira, A. B.; Beck, J. e Kubota, L. T., Development of a sensor based on tetracyanoethylenide (LiTCNE)/poly-L-lysine (PLL) for dopamine determination, Electrochimica Acta, 50, 2005, 2675-2683.

II.1.12. Damos F. S., Luz R. C. S. e Kubota, L. T., Determination of Thickness, Dielectric Constant of Thiol Films, and Kinetics of Adsorption Using Surface Plasmon Resonance, Langmuir, 21, 2005, 602-609.

II.1.13. Damos, F. S.; Luz R. C. S. e Kubota, L. T., Study of poly(methylene blue) ultrathin films and its properties by electrochemical surface plasmon resonance, Journal of Electroanalytical Chemistry, 581, 2005, 231-240.

II.1.14. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; de Oliveira, A. B.; Beck, J. e Lauro Tatsuo Kubota, Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a lithium tetracyanoethylenide (LiTCNE) modified glassy carbon electrode, Talanta, 64, 2004, 935-942.

II.1.15. Luz, R. C. S.; Silva, L. M. S.; Marques, A. L. B.; Lopes, G. S.; Marques, E. P. Determinação de Vanádio em Óleo Diesel por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite. Revista Analytica, Brasil, 7, 2003, 48-56.

II. 2. Participação em Eventos Técnico-Científicos

II.2.1. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Oliveira, A. B.; Beck, J. e Kubota, L. T., Estudo Eletroanalítico da Oxidação de catecol sobre eletodo de carbono Vítreo Modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e PLL. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 29ª SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo.

II.2.2. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Estudo eletroanalítico da redução de oxigênio empregando um eletrodo de carbono vítreo modificado com CoTSPc e PLL. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 29ª SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo.

II.2.3. Damos, F. S., Luz, R. C. S.; Kubota, L. T., Estudos das propriedades de monocamadas auto-organizadas de mono(6-deoxi-6-mercapto)-β-Ciclodextrina. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 29ª SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo.

II.2.4. Luz, R. C. S.; Damos, F. S. e Kubota, L. T., Investigações da formação e propriedades de filmes ultrafinos de polipirrol usando ressonância de plásmon de superfície e eletroquímica. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 28ª SBQ. Poços de Caldas, Minas Gerais.

II.2.5. Luz, R. C. S.; Damos, F. S. e Kubota, L. T., Estudos das propriedades de filmes nanométricos de azul de metileno usando eletroquímica com ressonância de plásmon de superfície. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 28ª SBQ. Poços de Caldas, Minas Gerais.

II.2.6. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Sensor voltamétrico para oxigênio a base de carbono vítreo modificado com ftalocianina tetrasulfonada de cobalto (CoTsPc) e poli-L-lisina (PLL). 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 28ª SBQ. Poços de Caldas, Minas Gerais.

II.2.7. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Oliveira, A. B.; Beck, J. e Kubota, L. T., Desenvolvimento de um sensor voltamétrico para catecol usando um eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e PLL. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 28ª SBQ. Local de Realização do evento: Poços de Caldas, Minas Gerais.

II.2.8. Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Investigação de filmes ultrafinos de polipirrol dopado com ftalocianina tetrasulfonada de cobalto por SPR e MCQ. 13º Encontro Anual de Química Analítica – 13º ENQA. Local de Realização do evento: Niterói, Rio de Janeiro.

II.2.9. Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Oliveira, A. B.; Beck, J. e Kubota, L. T., Estudos eletroanalítico e eletroquímico da oxidação de dopamina sobre eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de LiTCNE e PLL. 13º Encontro Anual de Química Analítica – 13º ENQA. Niterói, Rio de Janeiro.

II.2.10. Damos, F. S.; Luz, R. C. S. e Kubota, L. T., Investigação de propriedades ópticas e elétricas de filmes de polipirrol usando ressonância de plásmon de superfície modulado eletroquimicamente. XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XIV SIBEE, Teresópolis, Rio de Janeiro.

II.2.11. Damos, F. S.; Luz, R. C. S. e Kubota, L. T., Medidas de ressonância de plásmon de superfície tempo-diferencial aplicadas à analise eletroquímica. XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XIV SIBEE. Teresópolis, Rio de Janeiro.

II.2.12. Luz, R. C. S.; Damos, F. S. e Kubota, L. T., Desenvolvimento de um sensor voltamétrico a base de LiTCNE-PLL para determinação de *p*-nitrofenol em amostras ambientais. XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XIV SIBEE. Teresópolis, Rio de Janeiro.

II.2.13. Luz, R. C. S.; Damos, F. S. e Kubota, L. T., Desenvolvimento de um sensor para determinação de dopamina (DA) usando um eletrodo modificado com tetracianoetileneto de lítio (LiTCNE). XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XIV SIBEE. Teresópolis, Rio de Janeiro.

II.2.14. Damos, F. S.; Luz, R. C. S. e Kubota, L. K., Estudo in situ das propriedades de filmes nanométricos de poli(pirrol)-poli(b-ciclodextrina) por RPS e MCQ. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XV SIBEE. Londrina, Paraná.

II.2.15. Damos, F. S.; Luz, R. C. S.; Tanaka, A. A. e Kubota, L. T., Investigações de filmes nanométricos de polianilina empregando RPS e MCQ. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XV SIBEE. Londrina, Paraná.

II.2.16. Moreira, A. B.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S.; Reis, A. P.; Tanaka, T. T. e Kubota, L. T., Desenvolvimento de um sensor amperométrico para cisteína. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XV SIBEE Londrina, Paraná.

II.2.17. Duarte, J. C.; Luz, R. C. S.; Damos, F. S. e Kubota, L. T., Sensor para hidrazina utilizando pasta de carbono modificada com SiO_2/TiO_2/LiTCNQ. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XV SIBEE. Londrina, Paraná.

II. 3. Prêmios resultantes de Atividade Científica.

II.3.1. Comunicação Premiada apresentada na 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (divisão Eletroquímica e Eletroanalítica) – ano: 2005. Título da comunicação: Estudos das propriedades de filmes nanométricos de azul de metileno usando eletroquímica com ressonância de plásmon de superfície.

RESUMO

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos á base de filmes com TCNX (tetracianoquinodimetano e tetracianoetileno) para a determinação de compostos fenólicos. Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de sensores eletroquímicos à base de compostos com TCNX (tetracianoetileno e tetracianoquinodimetano) para a determinação de compostos fenólicos. Para este propósito foram preparados eletrodos de carbono vítreo modificados com tetracianoetileneto de lítio (LiTCNE) e bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenantrolina) de cobre (II) [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$], ambos imobilizados em filmes de poli-l-lisina (PLL). Após esta etapa, o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL foi testado para verificar a capacidade de eletrocatálise da reação de redução de *p*-nitrofenol enquanto que o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL foi utilizado para a oxidação de catecol. As técnicas utilizadas para a realização deste trabalho foram a voltametria cíclica, voltametria de varredura linear, amperometria, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, as quais foram utilizadas para estudar o comportamento dos eletrodos modificados, para a otimização dos parâmetros experimentais, obtenção dos parâmetros cinéticos e caracterização analítica dos sensores. Os hidrodinâmicos foram realizados com o objetivo de obter maiores informações sobre os processos de redução e oxidação de *p*-nitrofenol e catecol, respectivamente, sobre os eletrodos modificados. Através do gráfico de Koutech-Levich foi possível obter os valores para o coeficiente de difusão e constante de velocidade da reação (k) para os analitos em estudo. Os valores do coeficiente de difusão e de k, determinados para o *p*-nitrofenol, foram de 9,03 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} e 1,65 x 10^5 mol^{-1} L s^{-1}, enquanto que para o catecol, os valores do coeficiente de difusão e de k, foram de 4,6 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} e 1,3 x 10^3 mol^{-1} L s^{-1}, respectivamente. O aumento na velocidade de reação, tanto para o *p*-nitrofenol como para o catecol, foi atribuído à eficiente transferência eletrônica entre as espécies estudadas e os compostos eletroativos imobilizados nas superfícies dos eletrodos de carbono vítreo. O eletrodo modificado com filme de LiTCNE/PLL apresentou uma ampla faixa de resposta linear, sensibilidade, limite de detecção e quantificação de 0,001 a 5 μmol L^{-1}, 42,90 μA cm^{-2} L $μmol^{-1}$, 0,3 e 1,0 nmol L^{-1} (n=10), respectivamente, para o de *p*-nitrofenol, enquanto que o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL apresentou uma faixa de resposta linear, sensibilidade, limite de detecção e quantificação de 0,005 a 5 μmol L^{-1} (n=8), 16,10 μA cm^{-2}, 1,5 e 5,0 nmol L^{-1}, para o catecol. Após a aplicação destes sensores em amostras de interesse, estudos de adição e recuperação dos analitos foram realizados para avaliar a exatidão dos métodos e verificou-se

que em ambos os casos foi possível uma percentagem de recuperação entre 98,87 e 104,5% para o *p*-nitrofenol e 99,1 e 100,1% para o catecol.

ABSTRACT

Development of electrochemical sensors based on films containig TCNX (tetracyanoquinodimethane and tetracyanoethylene) for phenolics compound determination. In this work is describing the development of electrochemical sensors based on TCNX (tetracyanoquinodimethane and tetracyanoethylene) for phenolics compound determination. For this purpose glass carbon electrodes were modified with lithium tetracyanoethylenide (LiTCNE) and bis (tetracyanoquinodimethanide) of bis (phenantroline) of copper (II) [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$], both immobilized at films of poly-l-lysine (PLL). After this step, the modified electrode with LiTCNE/PLL was tested to verify the electrocatalysis capacity of the reduction of *p*-nitrofenol and the electrode modified with Cu $(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL for the catechol oxidation. The techniques used for the accomplishment of this work were the cyclic voltametry, linear sweep voltametry, amperometry, differential pulse voltametry, and square wave voltametry, which were used to study the behavior of the modified electrodes, for the experimental parameters optimization, for the attainment of the kinetic parameters and analytical characterization of the sensors. Hydrodynamic studies were carried out with the aim to get information on the reduction processes and oxidation of *p*-nitrofenol and catechol, respectively, on the modified electrodes. Through the Koutech-Levich plot it was possible to obtain the values for the diffusion coefficient (D_o) and kinetic constant of the reaction (k) for the analyte in study. The values of the diffusion coefficient and k, determined for *p*-nitrofenol, were 9,03 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} and 1,65 10^5 x mol^{-1} L s^{-1}, whereas for catechol, the values of D_o and k were 4,6 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} e 1,3 x 10^3 mol^{-1} L s^{-1}, respectively. The increase of the reaction rate for *p*-nitrofenol and catechol was attributed to the efficient electron transfer between the studied species and immobilized electroactives species on superface the glassy carbon electrodes surface. The electrode modified with LiTCNE/PLL presented a wide linear response range, as well as sensitivity, detection and quantification limit of 0,001 up to 5 μmol L^{-1}, 42,90 μA cm^{-2} L μmol^{-1}, 0,3 and 1,0 nmol L^{-1} (n=10) for the *p*-nitrophenol, whereas the electrode modified with [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$], presented a linear range, sensitivity, detection and quantification limit of 0,005 a 5 μmol L^{-1} (n=8), 16,10 μA cm^{-2}, 1,5 e 5,0 nmol L^{-1}, respectively, for catechol. After the application of these sensors in samples of interest, studies of addition and recovery of the analytes were carried out to evaluate the error of the methods and was verified that in both the cases a recovery percentages between 98,8 and 104,5% for *p*-nitrofenol and, 99,1 e 100,1% for catechol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

***p*-NF**	**para-nitrofenol**
CA	**Catecol**
FIA	**Análise por Injeção de Fluxo**
TCNX	**Tetracianoetileno ou tetracianoquinodimetano**
TCNE	**Tetracianoetileno**
TCNQ	**Tetracianoquinodimetano**
LiTCNE	**Tetracianoetileno de lítio**
$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$	**bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenantrolina) de cobre**
TTF	**Tetratiofulvaleno**
NADH	**Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)**
TTF	**Tetratiofulvaleno**
PLL	**Poli-l-lisina**
TRIS	**Tris [(hidroximetil)aminometano**
HEPES	**[N-(2-hidroxietil(piperazina)-N,N'-bis(2-ácido etanosulfônico)]**
PIPES	**Piperazina-N,N'-bis-(2-ácido etanossulfônico)**
KH_2PO_4	**Dihidrogeno fosfato de potássio**
Na_2HPO_4	**Hidrogeno fosfato de sódio**
ECS	**Eletrodo de calomelano saturado**
CV	**Carbono vítreo**
n_p	**Número de prótons**
n_e	**Número de elétrons**
n	**Número de elétrons total**
F	**Constante de Faraday**
C_o	**Concentração do analito**
D_o	**Coeficiente de difusão**
v	**Velocidade de varredura**
R	**Constante dos gases**
T	**Temperatura**
υ	**Viscosidade cinemática**
E_p	**Potencial de pico**
ΔE_p	**Variação de potencial de pico**
j	**Densidade de corrente ($\mu A\ cm^{-2}$)**
α	**Coeficiente de transferência eletrônica**
n_a	**Número de elétrons da etapa determinante**
$E_{p/2}$	**Potencial de corrente de pico a meia altura**

LOD	**Limite de detecção**
LOQ	**Limite de quantificação**
DP	**Desvio padrão**
DPR	**Desvio padrão relativo**
b	**Coeficiente angular**
ΔE_i	**Incremento de potencial**
r	**Coeficiente de correlação**
k	**Constante da velocidade da reação**
f	**Freqüência**
ω	**Velocidade de rotação**

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS **XXIII**
LISTA DE FIGURAS **XXVII**

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL **1**

I. Introdução Geral **3**
I.1. Importância da determinação de compostos fenólicos em amostras ambientais **5**
I.2. Importância da determinação de compostos fenólicos em amostras alimentícias **7**
I.3. Determinação de compostos fenólicos **9**
I.3.1. Principais métodos utilizados para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol **9**
I.4. Compostos TCNX: Tetracianoetileno (TCNE) e Tetracianoquinodimetano (TCNQ) imobilizados em filme de PLL no desenvolvimento de sensores químicos **15**

CAPÍTULO II. OBJETIVOS **23**

II. Objetivos Gerais e Específicos **25**

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL **27**

III. Parte Experimental **29**
III.1. Reagentes utilizados e soluções **29**
II.2. Instrumentação **29**
III.3. Preparo dos eletrodos modificados **32**
III.4. Estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo de carbono vítreo modificado com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL **33**
III.5. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais para o catecol empregando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL **33**
III.5.1. Parâmetros experimentais **33**
III.5.2. Parâmetros operacionais **34**
III.6. Preparo das amostras para análise dos compostos fenólicos **35**
III.6.1. Determinação de *p*-nitrofenol em amostras de águas naturais **35**
III.6.2. Coleta e preparo das amostras de águas e guaraná em pó **35**

para análises
III.7. Determinação de *p*-nitrofenol empregando um ECV modificado com LiTCNE/PLL e testes de adição de padrão **36**
III.8. Determinação de catecol empregando um ECV modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL e testes de adição de padrão **37**
III.9. Determinação espectrofotométrica de catecol **37**
III.10. Avaliação da estabilidade e tempo de vida dos eletrodos modificado com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL **38**
III.11. Avaliação da repetibilidade dos sensores **38**
III.12. Estudo de interferentes **39**

CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO **41**

IV. Resultados e Discussão **43**

IV.1. SENSOR PARA P-NITROFENOL À BASE DE LITCNE/PLL **43**
IV.1.1. Comportamento voltamétrico de *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL **43**
IV.1.2. Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação de *p*-nitrofenol **45**
IV.1.2.1. Influência das concentrações de LiTCNE e PLL sobre a densidade de corrente do *p*-nitrofenol **45**
IV.1.2.2. Influência do pH, solução tampão e concentração da solução tampão sobre a densidade de corrente do *p*-nitrofenol **48**
IV.1.3. Estudos sobre o mecanismo de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL **52**
IV.1.4. Escolha da técnica eletroanalítica a ser empregada para a determinação de *p*-nitrofenol **59**
IV.1.4.1. Otimização dos parâmetros operacionais para a determinação de *p*-nitrofenol empregando a amperometria, Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) **60**
IV.1.4.1.1. Amperometria **60**
IV.1.4.1.2.Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) **63**
IV.1.4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) **66**
IV.1.5. Caracterização analítica do sensor para o *p*-nitrofenol **70**
IV.1.6. Estabilidade e tempo de vida útil do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL **73**
IV.1.7. Repetibilidade das medidas e do preparo do sensor á **74**

base de LiTCNE/PLL
IV.1.8. Estudo de interferentes para o *p*-nitrofenol 76
IV.1.9. Considerações finais e figuras de mérito do sensor desenvolvido á base de LiTCNE/PLL 79
IV.1.10. Aplicação do sensor à base de LiTCNE/PLL para análises de *p*-nitrofenol em águas naturais e testes de adição e recuperação 80
IV.2. SENSOR PARA CATECOL À BASE DE $Cu(PHEN)_2(TCNQ)_2$/PLL 83
IV.2.1. Comportamento voltamétrico do catecol (CA) sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL 83
IV.2.2. Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação de catecol 85
IV.2.2.1. Influência da concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e PLL na resposta do sensor 85
IV.2.2.2. Influência do pH, solução tampão e concentração da solução tampão sobre a densidade de corrente do catecol 88
IV.2.2.3 Estudos sobre o mecanismo de redução de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL 91
IV.2.2.4. Otimização dos parâmetros operacionais para a determinação de catecol empregando a amperometria, Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) 97
IV.2.2.4.1 Amperometria 97
IV.2.2.4.2. Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) 100
IV.2.2.4.3. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) 103
IV.2.5. Caracterização analítica do sensor para catecol 106
IV.2.6. Estabilidade e tempo de vida útil do eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL 109
IV.2.7. Repetibilidade das medidas e do preparo do sensor á base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL 110
IV.2.8. Estudo de interferentes para o catecol 112
IV.2.9. Considerações finais e figuras de mérito do sensor desenvolvido á base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL 113
IV.2.10. Aplicação do sensor à base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL para análises de catecol em guaraná em pó e testes de adição e recuperação 115

CAPÍTULO V. CONCLUSÕES 121

V. Conclusões Gerais **123**

CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **125**

VI. Referências Bibliográficas **127**

CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS **135**

VII. Perspectivas **137**

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1	*Efeito da concentração de LiTCNE na resposta do sensor usando-se uma concentração de PLL de 24,5 μmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0). Velocidade de varredura=0,05 V s^{-1}.*	**46**
Tabela IV.2	*Efeito da concentração de PLL na resposta do sensor usando-se uma concentração de LiTCNE 1,95 mmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas nas mesmas condições da Tabela IV.1.*	**47**
Tabela IV.3	*Influência da solução tampão (0,1 mol L^{-1}) sobre a densidade de corrente referente a eletro-redução do p-NF obtida em concentrações de 5 μmol L^{-1}. v= 0,05 V s^{-1}.*	**51**
Tabela IV.4	*Influência da concentração da solução tampão acetato na densidade de corrente elétrica de pico para 5 μmol L^{-1} de p-NF,v=0,05 V s^{-1}.*	**52**
Tabela IV.5	*Influência do potencial aplicado sobre a resposta do sensor para 0,7 μmol L^{-1} de p-nitrofenol, obtida em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão acetato, pH 4,0.*	**61**
Tabela IV.6a	*Influência da velocidade de varredura sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de p-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão acetato, pH 4,0, com amplitude de 0,050 V.*	**63**
Tabela IV.6b	*Influência da amplitude sobre a densidade de corrente de pico do p-nitrofenol com uma velocidade de varredura de 0,035 V s^{-1}. Experimento realizado nas mesmas condições da Tabela IV.6a.*	**64**
Tabela IV.7a	*Efeito da freqüência sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de p-NF sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão acetato, pH 4,0, com a=0,05 V.*	**66**

Tabela IV.7b	*Efeito da amplitude sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de p-NF com f=80 s^{-1}. Experimento realizado em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0.*	**67**
Tabela IV.8	*Sensibilidades obtidas através da curva analítica para o p-NF empregando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL.*	**69**
Tabela IV.9	*Estudo da repetibilidade do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL para 50 nmol L^{-1} de p-NF. Eletrólito: solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0). Freqüência= 80 s^{-1}; Amplitude= 0,03 V, ΔE=0,004 V.*	**76**
Tabela IV.10	*Valores de recuperação obtidos com o sensor desenvolvido, para soluções de p-NF contendo espécies orgânica e inorgânicas na concentração de 50 nmol L^{-1}, em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0. f=80 s^{-1} e amplitude=0,05 V.*	**78**
Tabela IV.11	*Figuras de mérito para o sensor à base de LiTCNE/PLL.*	**80**
Tabela IV.12	*Determinação de p-nitrofenol em amostras de águas naturais (n = 3).*	**81**
Tabela IV.13	*Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método proposto.*	**82**
Tabela IV.14	*Efeito da concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ na resposta do sensor usando-se uma concentração de PLL de 10 μmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de catecol. Medidas conduzidas em solução tampão 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Velocidade de varredura=0,05 V s^{-1}.*	**86**
Tabela IV.15	*Efeito da concentração de PLL na resposta do sensor usando-se uma concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ de 0,15 mmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de catecol. Medidas conduzidas nas mesmas condições da Tabela VI.15.*	**87**

Tabela IV.16	*Influência da solução tampão 0,1 mol L^{-1} sobre a densidade de corrente obtida para 5 μmol L^{-1} de catecol. v= 0,05 V s^{-1}.*	**90**
Tabela IV.17	*Influência da concentração da solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, sobre a densidade de corrente de pico obtida VC com o sensor para 5 μmol L^{-1} de catecol. v= 0,05 V s^{-1}.*	**91**
Tabela IV.18	*Influência do potencial aplicado sobre a resposta do sensor para 0,7 μmol L^{-1} de catecol, obtida em solução tampão fosfato, 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0.*	**98**
Tabela IV.19a	*Influência da velocidade de varredura sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato, pH 7,0, com amplitude de 0,050 V.*	**100**
Tabela IV.19b	*Influência da amplitude de pulso sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol. Experimento realizado nas mesmas condições da Tabela VI.19a.*	**100**
Tabela IV.20a	*Efeito da frequência sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato, pH 7,0, com a=0,05 V.*	**103**
Tabela IV.20b	*Efeito da amplitude sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol com f=60 s^{-1}. Experimento conduzido nas mesmas condições da Tabela VI.20a.*	**103**
Tabela IV.21	*Sensibilidades obtidas através da curva analítica para o catecol empregando o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$./PLL*	**106**

Tabela IV.22	*Estudo da repetibilidade do eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL para 50 nmol L^{-1} de catecol. Eletrólito: solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Freqüência= 60 s^{-1}; Amplitude= 0,04 V, ΔE_i=0,004 V.*	**111**
Tabela IV.23	*Valores de recuperação obtidos com o sensor desenvolvido, para soluções de catecol contendo possíveis interferentes na concentração de 50 nmol L^{-1}, em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0.*	**113**
Tabela IV.24	*Figuras de mérito para o sensor à base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL.*	**114**
Tabela IV.25	*Determinação de catecol em amostras de guaraná em pó (n = 3).*	**116**
Tabela IV.26a	*Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método proposto.*	**118**
Tabela IV.26b	*Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método espectrofotométrico.*	**119**

LISTA DE FIGURAS

I NTRODUÇÃO

Figura I.1	*Estruturas químicas do p-nitrofenol (a) e catecol (b).*	**9**
Figura I.2	*Estruturas químicas de: (a) TCNE, (b) TCNQ, onde x=0, -1 e –2. (c) bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenantrolina) de cobre II e (d) tetracianoetileneto de lítio.*	**16**
Figura I.3	*Estrutura química da PLL.*	**20**
Figura I.4	*Modelo esquemático da PLL imobilizada na superfície do eletrodo.*	**21**

III PARTE EXPERIMENTAL

Figura III.1	*Potenciostato utilizado para as medidas eletroquímicas.*	**30**
Figura III.2	*Célula com entrada para três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas. ER= eletrodo de referência – ECS; EW = eletrodo de trabalho, CE= eletrodo auxiliar – espiral de platina. Logo acima um sistema EDR - Eletrodo com Disco Rotativo.*	**31**

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura IV.1	*Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo não modificado (a) e modificado com LiTCNE/PLL (b) na ausência de p-NF. Para comparação os eletrodos não modificado (c), modificado apenas com a PLL (d) e eletrodo modificado com LiTCNE/PLL (e) na presença de 10 μmol L^{-1} de p-NF. Experimentos conduzidos em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão Macllvaine pH 4,0. v= 0,05 V s^{-1}.*	**44**
Figura IV.2	*Influência do pH sobre a resposta do sensor para 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine 0,1 mol L^{-1}; v= 0,05 V s^{-1}.*	**49**

Figura IV.3 ***Influência do pH sobre o potencial de pico para 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão Macllvaine; v= 0,05 V s^{-1}.*** **50**

Figura IV.4 ***(a) (a) Gráfico da densidade de corrente de pico versus raiz quadrada da velocidade de varredura para o p-NP em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão MacIlvaine pH 4,0. (b) Gráfico de $j_p/v^{1/2}$ vs V s^{-1}.*** **54**

Figura IV.5 ***(a) Gráfico de Levich e (b) Koutecky-Levich para a redução de p-NF sobre o eletrode modificado com LiTCNE/PLL.*** **57**

Figura IV.6 ***(a) Amperograma para o p-NF nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Medidas conduzida usando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0). $E_{apl.}$= -0,7 V vs ECS.*** **62**

Figura IV.7 ***(a) Voltamogramas de pulso diferencial para o p-nitrofenol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (5) 0,5, (6) 0,6 e (7) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Medidas conduzidas empregando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0, velocidade de 0,035 V s^{-1} e amplitude de 0,050 V.*** **65**

Figura IV.8 ***(a) Voltamogramas de onda quadrada para o p-nitrofenol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Experimento realizado em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0, f=80 s^{-1}, amplitude=0,03 V, ΔE_i=0,004 V.*** **68**

Figura IV.9	*(a) VOQ para a eletro-redução de p-NF obtidos nas condições otimizadas para as concentrações de: (1) 0,001; (2)0,050; (3) 0,080; (4) 0,120; (5) 0,270; (6) 0,780; (7) 1,700; (8) 2,720;(9) 3,920 e (10) 5,000 μmol L^{-1}. (b) Gráfico da curva analítica.*	**71**
Figura IV.10	*Estabilidade operacional do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de p-NF em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0).*	**73**
Figura IV.11	*Tempo de vida útil do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de p-NF em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0).*	**74**
Figura IV.12	*Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo não modificado (a) e o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ na ausência(b) e presença (e) de 5 μmol L^{-1} de catecol. Para comparação os voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo não modificado (c) e modificado apenas com PLL (d) na presença de 5 μmol L^{-1} de catecol. Experimentos conduzidos em solução tampão Macllvaine, 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0. v= 0,05 V s^{-1}.*	**84**
Figura IV.13	*Influência do pH sobre a resposta do sensor. Medidas conduzidas em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão Macllvaine; v= 0,05 V s^{-1}.*	**88**
F igura IV.14	*Influência do pH sobre a resposta do sensor. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine; 0,1 mol L^{-1}, v= 0,05 V s^{-1}.*	**89**
Figura IV.15	*(a) Gráfico da densidade de corrente de pico versus raiz quadrada da velocidade de varredura para o catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0. (b) Gráfico de $j_p/v^{1/2}$ vs V s^{-1}.*	**93**

Figura IV.16	*(a) Gráfico de Levich e (b) Koutecky-Levich para a oxidação de CA sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).v=0,005 V s^{-1}.*	**96**
Figura IV.17	*(a) Amperograma para catecol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).*	**99**
Figura IV.18	*(a) Voltamogramas de pulso diferencial para o catecol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica.*	**102**
Figura IV.19	*(a) Voltamogramas de onda quadrada para o catecol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4)0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica.*	**105**
Figura IV.20	*(a) VOQ para a eletro-oxidação de catecol obtidos nas condições otimizadas para as concentrações de: (1) 0,005; (2) 0,025; (3) 0,216; (4) 0,820; (5) 1,620; (6) 2,800; (7) 4,020 e (8) 5,000 μmol L^{-1} . (b) Gráfico da curva analítica. f=60 s^{-1} e A=0,04 V.*	**107**
Figura IV.21	*Estabilidade operacional do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).*	**109**
Figura IV.22	*Tempo de vida útil do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).*	**110**
Figura IV.23	*Correlação entre as medidas obtidas com o método espectrofotométrico e o método proposto.*	**117**

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I. Introdução Geral

O desenvolvimento de novos eletrodos é um dos campos de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse clínico, ambiental, alimentício, farmacêutico, entre outros, que têm levado a uma crescente busca por métodos que conduzam a resultados mais rápidos, exatos e reprodutíveis com o objetivo de substituir ou melhorar os já existentes.

Em química analítica, a eletroanalítica tem recebido grande atenção nos mais diversos campos aplicativos. Isto se deve ao baixo custo de operação, á enorme possibilidade de aplicações analíticas e também à sua utilização como ferramenta de estudo de inúmeros fenômenos envolvendo transferência de elétrons que podem fornecer informações complementares a determinação analítica.

Apesar da grande versatilidade e perspectivas positivas apresentadas pelos sistemas eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a uma passivação gradual de sua superfície, que é conseqüência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de oxidação ou redução utilizada na detecção, ou ainda, dos sub-produtos destas reações que podem se polimerizar e depositar sobre a superfície dos eletrodos [1].

Além disso, a sensibilidade das técnicas a muitos analitos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos ser excessivamente lenta [1]. Uma outra limitação é a dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuam características redox similares [2]. Por isso, uma área que oferece grande potencial para minimizar os problemas acima descritos, e

conseqüentemente, aumentar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos, é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados [2,3].

A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizada por Murray e colaboradores [4], na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. O principal objetivo desta modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de dispositivos com uma variedade de efeitos atrativos, levando a superfícies com características que podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sistemas eletroquímicos tradicionais.

Neste contexto, os sensores eletroquímicos ganharam novos espaços nas diversas áreas de pesquisas [5,6]. Dentre as espécies que vêm sendo determinadas empregando estes dispositivos estão os compostos fenólicos, devido, principalmente, o aumento na produção e utilização destes em produtos químicos.

Nas últimas décadas, alguns compostos fenólicos vêm causando problemas de poluição ambiental de maneira generalizada, praticamente em todas as partes do mundo, como é o caso dos clorofenóis e nitrofenóis. Já na área biológica e farmacológica os compostos fenólicos que mais têm sido pesquisados são os neurotransmissores. Estes são mensageiros químicos que transmitem uma mensagem de um neurônio a outro. Esta transmissão ocorre pela secreção de um neurotransmissor a partir de um neurônio que se ligam por um receptor específico localizado na membrana da célula mãe [7]. Esta interação entre o neurônio e o neurotransmissor é o maior caminho de

comunicação entre os neurônios, por isso, os neurotransmissores possuem um importante papel no sistema nervoso central [7,8]. Dentre estes neurotransmissores, a dopamina tem sido intensamente pesquisada por neurocientistas. Sua deficiência no organismos pode implicar em doenças graves como esquizofrenia e doença de Parkinson [9], daí a necessidade de algumas pessoas em utilizar formulações farmacêuticas contendo dopamina, como forma de suprir ou minimizar tal deficiência.

Uma outra área que merece bastante destaque é a área de alimentos já que alguns compostos fenólicos podem ser encontrados em plantas, frutas, sucos, vinhos, cervejas etc [10], daí a importância em se determinar compostos fenólicos em amostras de alimentos principalmente pelo fato das suas propriedades antioxidantes.

I.1. Importância da determinação de compostos fenólicos em amostras ambientais

Um número considerável de poluentes orgânicos, que encontram-se largamente distribuídos no meio ambiente, possuem estrutura fenólica [11]. Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, oriundos das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, desinfetantes e, principalmente de papel e celulose [11-18].

Vários fenóis substituídos, como cloro e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos [15,16,18,19]. Estes dois

grupos de fenóis substituídos, são os principais produtos de degradação de pesticidas organofosforados e fenoxi-ácidos clorados [11,12].

Mesmo em pequenas concentrações (<1 ppm), os compostos fenólicos afetam o gosto e o odor de águas potáveis e peixes [15]. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepato-tóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese [15,16].

Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da EC (Comissão Européia) [20] e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana), como é o caso do *p*-nitrofenol [12,21,22]. A diretiva (80/778 EEC) [23] da Comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de 0,5 mg L^{-1} e 0,1 mg L^{-1} para fenóis individuais.

Deste modo, atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos [24,25].

O tempo e o custo envolvidos com a detecção de poluentes ambientais (por exemplo, aquisição da amostra, preparação da amostra, análise de laboratório) tem imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental [25].

O aumento na quantidade de dados analíticos tende a aumentar a confiabilidade nas decisões de gerenciamento ambiental, por aumentar a eficiência na caracterização dos compostos poluentes "*in situ*" e caracterizar melhor os riscos ou ainda a eficiência dos procedimentos de descontaminação [24,26].

A limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas que possam permitir um aumento no número destas análises num menor tempo e com custos acessíveis [11,12,24,27].

I.2. Importância da determinação de compostos fenólicos em amostras alimentícias

Os compostos fenólicos (ex. polifenóis) estão largamente distribuídos no reino vegetal, principalmente na forma de bioprodutos gerados a partir do metabolismo de plantas sendo encontrados em alimentos de origem vegetal, constituindo uma parte integral de nossa dieta [28].

Recentemente, eles têm atraído muito atenção devido seus benefícios a saúde, pois são responsáveis em grande parte pela capacidade antioxidante em muitos produtos derivados de plantas. Os antioxidantes agem como eliminadores dos radicais livres (moléculas instáveis e altamente reativas pelo fato de seus átomos possuírem um número ímpar de elétrons) [29], agentes quelantes metálicos [30], inibição de oxidação lipoprotêica [31] e também exibem propriedades relacionadas a prevenção à oxidação [32], inflamação [33] alergias [34] e câncer [35].

Os polifenóis são também usados como marcadores em estudos taxonômicos em fitoquímica [36] e são responsáveis pelas propriedades organolépticas e cores de muitas frutas e flores [18]. Assim, a qualidade dos

alimentos pode estar relacionada com a presença destas substâncias fenólicas em sua composição, principalmente em bebidas como o vinho, sucos, café e chá.

Dentre os polifenóis mais estudados em vegetais, com a finalidade de se determinar a sua capacidade antioxidante, estão o ácido clorogênico, o ácido cafêico, ácido gálico, ácido tânico, (-)-Epicatequina, (+)-Catequina, catecol, entre outros. Entre estes compostos, o catecol é atualmente, um composto fenólico que tem despertado grande interesse dos pesquisadores devido sua ação antioxidante e, conseqüentemente, seu efeito fisiológico benéfico à saúde [37] podendo também ser encontrado em alguns produtos naturais como o guaraná em pó, planta característica da região amazônica [38].

Pesquisas recentes [39] relatam que esta planta apresenta grande atividade antioxidante devido a presença de polifenóis na sua composição. Neste sentido, os pesquisadores quantificaram os principais componentes responsáveis por essa atividade no guaraná e correlacionaram a atividade antioxidante com a quantidade de polifenóis presentes. Os mesmos verificaram que o catecol pode ser o principal responsável pela atividade antioxidante desta planta, uma vez que o mesmo apresenta-se numa quantidade muito superior a todos os demais compostos fenólicos juntos.

Neste contexto, pode-se verificar que os compostos fenólicos não apresentam apenas riscos à saúde, mas também podem apresentar-se como substâncias benéficas sendo responsáveis pelo odor e cores de muitos vegetais e também por apresentar importantes funções fisiológicas como é o caso dos polifenóis.

I.3. Determinação de compostos fenólicos

Como são vários os compostos fenólicos de interesse, seja ambiental, farmacêutico ou alimentício, serão descritos os principais métodos para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol (**Figura I.1**), os quais serão utilizados como substâncias representantes dos compostos nitroaromáticos e polifenóis, respectivamente.

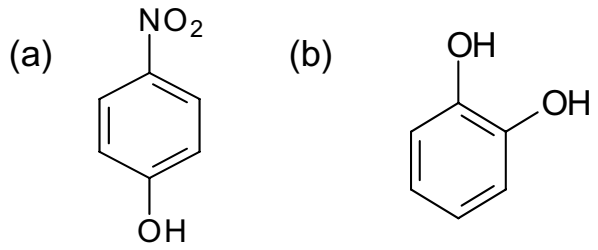

Figura I.1: *Estruturas químicas do p-nitrofenol (a) e catecol (b).*

I.3.1. Principais métodos utilizados para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol

Diferentes métodos para determinação de nitrofenóis como o *p*-nitrofenol em amostras ambientais tem sido propostos [23,40-47]. A Agência de Proteção Ambiental tem aceitado técnicas baseadas na extração líquido–líquido (ELL) acoplada a cromatografia gasosa (CG) com a captura eletrônica (CE) ou a espectrometrica de massa (EM) [21,48]. Numerosas técnicas como a cromatografia líquida [40,49,50], bem como métodos eletroforéticos capilares [44,45] também tem sido propostos para a detecção de nitrofenóis, usando detecção eletroquímica [40,41], espectrofotometria [43,50] ou espectrometria de massas [42,49]. Apesar dessas técnicas serem sensíveis,

permitindo a quantificação dos nitrofenóis abaixo do limite requerido pela legislação ambiental internacional, elas muitas vezes são lentas, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda da amostra, às vezes são caras e também necessitam de operadores hábeis. [12,26]

Os ensaios baseados em componentes biológicos, tais como a enzima e os imunoensaios, também têm sido extensivamente usados no monitoramento ambiental [18,26,51-55]. O número de enzimas que pode converter seletivamente pesticidas e/ou fenóis é muito limitado, entretanto, estes compostos podem muitas vezes agir como inibidores para uma grande variedade de componentes e micro-organismos biológicos [53,56-58], por isso o desenvolvimento de imunoensaios para a determinação de derivados fenólicos cresceu bastante nas últimas décadas [59-62].

Particularmente, imunoensaios usados para a determinação de *p*-nitrofenol e *p*-nitrofenol substituído foram desenvolvidos de forma simples [46,47], ou acoplados com a extração de fluido supercrítico [63] ou cromatografia líquida [64], permitindo limites de deteção (LOD) tão baixos quanto 0,2 μg L^{-1} [47]. No entanto a principal desvantagem desse tipo de metodologia é com relação a estabilidade do sistema já que se trata do uso de espécies biológicas.

Para a determinação de catecol também geralmente são utilizados os métodos espectrofotométricos [50,65-67] e cromatográficos [68-70], mas como citado anteriormente esses métodos não são sensíveis o bastante (com exceção do trabalho desenvolvido por Fatibello-Filho e colaboradores [50]), requerem instrumentos complicados e caros, consomem muito tempo, usam reagentes tóxicos, ou fornecem altos limites de detecção.

Então, o desenvolvimento de novos métodos que possibilitem o uso mínimo de reagentes e um menor tempo de análise é muito importante. Neste sentido, os métodos eletroquímicos envolvendo o desenvolvimento de sensores químicos têm sido muito utilizados [71-73] e a motivação para a modificação da superfície do eletrodo são: (i) a eletrocatálise, (ii) não passivação da superfície do eletrodo (iii) e prevenção de reações indesejáveis que competem cineticamente com o processo desejado do eletrodo [74,75].

Neste contexto, para a determinação de diversos compostos fenólicos, métodos eletroanalíticos utilizando eletrodos quimicamente modificados tem possibilitado a realização de análises com maior versatilidade, baixo custo e simplicidade. No entanto, os principais materiais utilizados para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol são materiais biológicos como enzimas, DNA, microorganismos entre outros, os quais formam os denominados biossensores. O principal problema na determinação desses compostos empregando espécies biológicas em superfícies transdutoras é que essas espécies respondem para vários outros compostos com estruturas fenólicas. Outro fator que limita bastante o emprego de materiais biológicos é o cuidado com o acondicionamento do eletrodo, pois muitos deles perdem a atividade quando acondicionados em temperatura ambiente.

Neste contexto, para termos uma idéia do que foi e está sendo feito no campo de sensores eletroquímicos para a determinação de compostos fenólicos, mais especificamente para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol, a seguir serão descritos alguns trabalhos envolvendo o emprego de biossensores, bem como também são descritos outros trabalhos envolvendo o emprego de outros materiais mediadores eletrônicos para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol.

Mulchandani e colaboradores [75] desenvolveram um biossensor para a determinação amperométrica de *p*-nitrofenol empregando um eletrodo de pasta de carbono à base de microorganismos (*Moraxella* sp) em solução tampão fosfato, pH 7,5. A faixa de resposta linear de 1 a 20 μmol L^{-1} (r=0,994) com uma sensibilidade 1,92 nA μmol L^{-1} e limite de detecção de 20 nmol L^{-1}. O biossensor manteve-se estável por três semanas, se o mesmo for mantido em em solução tampão fosfato pH 7,5. Os autores afirmaram que é possível aplicar o biossensor em amostras de águas naturais, no entanto nenhuma determinação foi mencionada no trabalho para garantir tal afirmação.

Lei e colaboradores [76] desenvolveram um biossensor amperométrico para *p*-nitrofenol à base de outro microorganismo (bacteria Arthrobacter sp.). Uma solução tampão fosfato em pH 7,5 foi usado como eletrólito suporte após a otimização dos parâmetros experimentais. O biossensor apresentou um limite de detecção cerca de 0,2 μmol L^{-1} de *p*-nitrofenol e um tempo de vida útil de 5 dias quando estocado nas condições de trabalho a 4 ^{o}C. A sensibilidade foi 0,78 % de oxigênio consumido por μmol L^{-1} de *p*-nitrofenol. De acordo com os pesquisadores a aplicabilidade em águas de lagos também foi demonstrada, no entanto nenhum resultado foi mostrado.

Cordero-Rando e colaboradores [77] empregaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com zeólita para determinação de *p*-nitrofenol em solução tampão Britton Robinson, pH 3,5 usando a VPD. O eletrodo modificado apresentou uma faixa de resposta linear variando entre 1,4 a 72 μmol L^{-1} (r=0,999) com uma sensibilidade de 10 nA L μmol^{-1} e limite de detecção de 29 nmol L^{-1}. O método para a determinação de *p*-nitrofenol foi aplicado em amostras de água do mar e nenhum sinal foi observado quando as

amostras foram analisadas, então as amostras foram contaminadas com *p*-nitrofenol dando concentrações na faixa de 1,7 a 7,2 μmol L^{-1}. Os resultados mostraram recuperações entre 98% e 98,2%. Apesar deste biossensor ter apresentado uma boa recuperação, observa-se que o sensor não foi sensível o suficiente para determinar baixas concentrações de *p*-nitrofenol nas amostras ou a amostra não contém nenhuma quantidade de *p*-nitrofenol em sua matriz. A estabilidade do sensor desenvolvido não foi estudada pelos pesquisadores.

Hu e colaboradores [78] modificaram um eletrodo de carbono vítreo com montmorilonita e antraquinona para a determinação de *p*-nitrofenol em solução tampão fosfato pH 3,4. A técnica empregada foi a voltametria de pulso diferencial com uma velocidade de rotação de 3000 rpm para melhorar a sensibilidade e a forma dos picos quando comparados com o eletrodo estacionário. Sob as condições otimizadas, uma faixa de resposta linear de 2 a 324 μmol L^{-1} (r= 0,997) foi obtida com uma sensibilidade de 16 nA L μmol^{-1} e limite de detecção de 0,1 μmol L^{-1}. Este método foi aplicado para a detecção de *p*-nitrofenol em águas de lago e nenhum sinal para o analito foi observado. Então, este método foi aplicado para a determinação de *p*-nitrofenol em amostras contaminadas com *p*-nitrofenol em determinadas concentrações e os resultados mostraram uma boa recuperação para a espécie analisada (entre 99,2 e 102,2 %). Nenhum estudo de estabilidade foi realizado com o sensor desenvolvido.

Wang e colaboradores [79] desenvolveram um sensor amperométrico à base da enzima tirosinase para a determinação de compostos fenólicos, incluindo o catecol, em solução tampão fosfato pH 7,0. Um copolímero foi introduzido na solução sol-gel (álcool polivinílico e polivinil piridina) e a composição do material compósito resultante foi otimizada. A faixa de resposta linear para o sensor proposto, sensibilidade e limite de detecção

foram respectivamente 0,1 a 100 μmol L^{-1} (r=0,994), 59,6 nA L μmol^{-1} e 0,04 μmol L^{-1}. O biossensor manteve 73 % de sua atividade original após seu uso por três semanas quando estocado a seco numa temperatura de 4 ^{o}C.

Campuzano e colaboradores [80] desenvolveram um outro biossensor amperométrico (com FIA – Análise por Injeção em Fluxo) para determinação de compostos fenólicos (incluindo o catecol) a base de tirosinase construído pela imobilização da enzima com uma monocamada auto-organizada do ácido 3-mercaptopropiônico sobre um eletrodo de ouro. O eletrólito utilizado foi uma solução tampão fosfato pH 7,0. A faixa linear variou entre 0,2 e 100 μmol L^{-1} (r=0,999) com uma sensibilidade de 34,2 nA L μmol^{-1} e limite de detecção de 0,1 μmol L^{-1}. O tempo de vida útil do biossensor foi de 5 dias.

Quan e Shin [81] imobilizaram lacase em um eletrodo de platina para a detecção amperométrica de catecol e catecolaminas em solução tampão fosfato pH 5,5. A faixa de resposta linear variou entre 0,5 e 58 μmol L^{-1} (r=0,999), com uma sensibilidade para o catecol de 210 nA L μmol^{-1} e limite de detecção de 0,07 μmol L^{-1}. O biossensor mostrou-se estável por um período entre 40 e 50 dias mantendo 80 % de sua atividade inicial.

Yang e colaboradores [82] construiram um biosensor amperométrico para o catecol em solução barbitúrica e HCl, pH 8,0, baseado na formação de camadas alternadas da enzima horseradish peroxidase, polialilamina e o ácido mercaptopropiônico. Sob as condições otimizadas, o biossensor apresentou uma resposta linear para o catecol de 6 a 120 μmol L^{-1} (r=0,999), com uma sensibilidade de 48,91 nA L μmol^{-1} e um limite de detecção de 0,7 μmol L^{-1}. A resposta do eletrodo modificado foi estável por apenas 1 semana estocado a uma temperatura de 4 ^{o}C. Entre a segunda e a quarta semana a resposta do eletrodo foi reduzida em cerca de 35 %.

Pelo exposto, observa-se que muitos dos sistemas desenvolvidos não permitem a detecção de espécies fenólicas com alta sensibilidade, estabilidade, baixos limites de detecção e ampla faixa de resposta linear, sendo este último muito importante para a determinação de substâncias em baixas concentrações, sendo assim, a utilização de novas moléculas se faz necessário com o intuito de atingir tais características. Para isso, é necessário que estas substâncias apresentem propriedades que justifiquem sua utilização no desenvolvimento de sensores químicos para então serem aplicados em amostras de interesse. Neste sentido, os compostos TCNX (tetracianoetileno - TCNE ou tetracianoquinodimetano - TCNQ) destacam-se por apresentar propriedades físico-químicas interessantes as quais podem possibilitar suas aplicações na área de desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

I.4. Compostos TCNX: Tetracianoetileno (TCNE) e Tetracianoquinodimetano (TCNQ) imobilizados em filme de PLL no desenvolvimento de sensores químicos

Os compostos TCNE e TCNQ são fortes aceptores de elétrons devido a presença de quatro grupos ciano na molécula e seus sistemas de conjugação π relativamente grande [83]. Suas estruturas químicas bem como alguns dos seus derivados são mostradas a seguir:

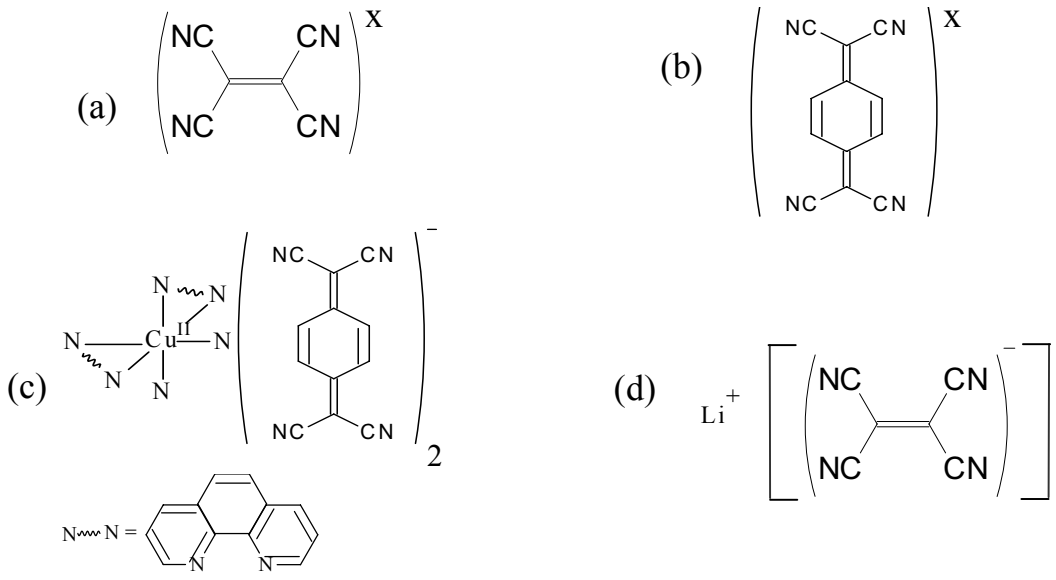

Figura I.2*: Estruturas químicas de: (a) TCNE, (b) TCNQ onde x=0, -1 e –2. (c) bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenantrolina) de cobre II e (d) tetracianoetileneto de lítio.*

Uma importante características destes compostos é que eles formam reservatórios eletrônicos estáveis devido pequenas mudanças estruturais durante as transições redox do sistema extensivamente ressonante, favorescendo uma rápida transferência eletrônica [83].

Dentre esses dois compostos, o TCNE foi o único que ainda não foi explorado por outros pesquisadores na área de desenvolvimento de sensores químicos. Este fato talvez possa ser justificado pela dificuldade de imobilização deste composto na superfície de eletrodos. Já os compostos TCNQ foram bastante explorados na área de desenvolvimento de sensores, principalmente como como mediadores enzimáticos [84-86]. Entretanto, sua utilização em muitos casos não possibilitou o desenvolvimento de sistemas com alta estabilidade, bem como sistemas com grande detectabilidade [84-86].

Desta forma, serão descritos alguns exemplos onde compostos a base de TCNQ utilizados no desenvolvimento de sensores químicos.

Kulys e D'Costa [87] prepararam um sensor eletroquímico descartável a base de TCNQ, usando a técnica "screenprinting" para a determinação de ácido ascórbico. O sensor desenvolvido apresentou um baixo potencial de oxidação para o ácido ascórbico (0,05 V *vs* Ag/AgCl, pH 7,0) quando comparado com eletrodos não modificados como eletrodos de platina ou carbono vítreo onde o potencial de oxidação para o ácido ascórbico ocorre em aproximadamente em 0,5V *vs* ECS. O sensor apresentou uma faixa linear de 30 - 100 μmol L^{-1} (r=0,998), com uma sensibilidade de 3,5 nA L μmol^{-1} e limite de detecção de 22 μmol L^{-1}.

Um outro trabalho utilizando o composto TCNQ foi proposto por Murphy e Grupta [88] para a determinação de NADH. Neste trabalho, o TCNQ previamente dissolvido em acetonitrila foi imobilizado eletroquimicamente sobre o eletrodo de grafite pirolítico de plano edge (plano perpendicular ao plano basal), aplicando-se um potencial de 1,0 V *vs* Ag/AgCl por 25 min. O eletrodo modificado mostrou resposta catalítica para a oxidação de NADH em solução tampão fosfato pH 7,0, com um aumento significativo na corrente de pico em um potencial de oxidação de 0,38 V *vs* ECS, sendo este potencial menor quando comparado com eletrodos metálicos (não modificados) onde o potencial de oxidação é de 1,1 V. Já em eletrodos de grafite pirolítico de plano edge não modificado a oxidação de NADH ocorre em 0,38 V mas o pico de oxidação é pouco definido.

A desvantagem de usar somente compostos $TCNX^0$ no eletrodo é a falta de estabilidade e reprodutibilidade, por apresentarem certa solubilidade em solução aquosa. Outra desvantagem está na baixa condutividade que estes compostos apresentam. Neste sentido uma alternativa é de usá-los na forma de

um sal. Por essa razão, complexos como TTF-TCNQ (tetratiofulvaleno-tetracianoquinodimetano) ou outros complexos têm sido utilizados na construção de eletrodos.

O complexo TTF-TCNQ faz parte de uma classe de materiais utilizados como mediadores, são os chamados complexos de transferência de carga. Esses complexos são preparados pela combinação de um doador (ex. TTF) e um receptor (ex. TCNQ) de elétrons e já foram muito utilizados para a detecção de compostos de interesse biológico [89].

Recentemente, Kubota e colaboradores [90], construiram um eletrodo de pasta de carbono à base de TTF-TCNQ para determinação de glutationa em eritrócito hemolisado num potencial de oxidação de 0,2 V *vs* ECS. O sensor exibiu uma faixa de resposta linear de 5 a 340 μmol L^{-1}, com sensibilidade e limite de detecção de 90,1 nA L μmol^{-1} e 0,3 μmol L^{-1}. Quando o sensor foi aplicado em amostras de eritrócitos hemolisados para a determinação de glutationa, concentrações de glutationa entre 1,1 e 2,02 mmol L^{-1} foram obtidas com uma percentagem de recuperação de glutationa em torno de 100 % nas amostras analisadas.

Devido o grande interesse no estudo da reatividade de transferência de elétrons [83], têm sido dada uma grande atenção à interação de moléculas como os compostos TCNQ e TCNE com íons e complexos metálicos, formando diferentes tipos de sais, por este motivo a formação de várias espécies de complexos entre os ligantes (TCNQ e TCNE) e compostos metálicos foram investigadas [83].

Do exposto observa-se que o desenvolvimento de novos materiais com caracterísiticas melhoradas é necessário em eletroanálise para a detecção de espécies de interesse, por isso este trabalho propõe o uso do tetracianoetileno e tetracianoquinodimetano na forma de seus sais tetracianoetileneto de lítio

(LiTCNE) e bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenantrolina) de cobre (II) [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$] como forma de aproveitar suas propriedades no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a detecção de *p*-nitrofenol e catecol, respectivamente. Entretanto, estes dispositivos só podem apresentar excelentes características analíticas por meio de uma eficiente imobilização do reagente levando em consideração suas características mecânicas (fácil manuseio) e químicas (estabilidade ao ambiente e durabilidade) após a imobilização.

É importante ressaltar que a técnica de imobilização do material na construção de um sensor dependerá do tipo de aplicação que será realizada e do tipo de transdutor que será utilizado, portanto, o bom funcionamento dos sensores depende da realização de uma imobilização efetiva do reagente num transdutor adequado.

Dentre os métodos utilizados para imobilizar substâncias catalisadoras em superfícies eletródicas pode-se destacar a adsorção física [91] e camadas alternadas (layer by layer) [92]. No entanto, estes métodos de preparação são geralmente pouco estáveis, demorados ou não apresentam boa sensibilidade para análise em amostras reais. Assim, polieletrólitos tem recebido particular atenção como uma alternativa para fixação de substâncias na superfície de eletrodos, sendo um procedimento extremamente simples, rápido e eficiente [93-95]. Como exemplo de polieletrólito bastante utilizado para imobilizar substâncias na superfície de eletrodos pode-se destacar a poli-l-lisina (PLL), entretanto, pouco tem sido explorada na área de sensores eletroquímicos. Sua estrutura é apresentada na **Figura I.2**.

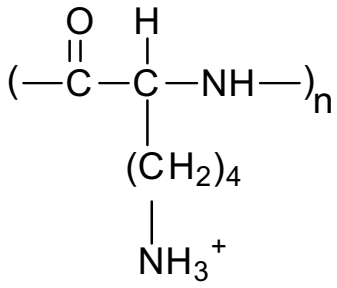

Figura I.3*: Estrutura química da PLL*

A PLL é um polímero pré-formado que tem sido utilizado devido a sua habilidade em formar filmes contendo moléculas ligadas eletrostaticamente [96], podendo interagir com uma infinidade de compostos. Este polímero possui duas regiões: a primeira denominada "Domínio Donnan", região onde os contra-íons ficam confinados por interação eletrostática e a segunda região compreende o volume remanescente do filme, que assume ser ocupado pela solução eletrolítica. Como resultado dessas duas fases haverá uma maior propagação de cargas no filme sendo favorável ao rápido movimento dos contra-íons [97], favorecendo assim a transferência eletrônica entre a superfície do eletrodo e as espécies carregadas em solução.

A figura a seguir apresenta um modelo esquemático da PLL imobilizada na superfície do eletrodo:

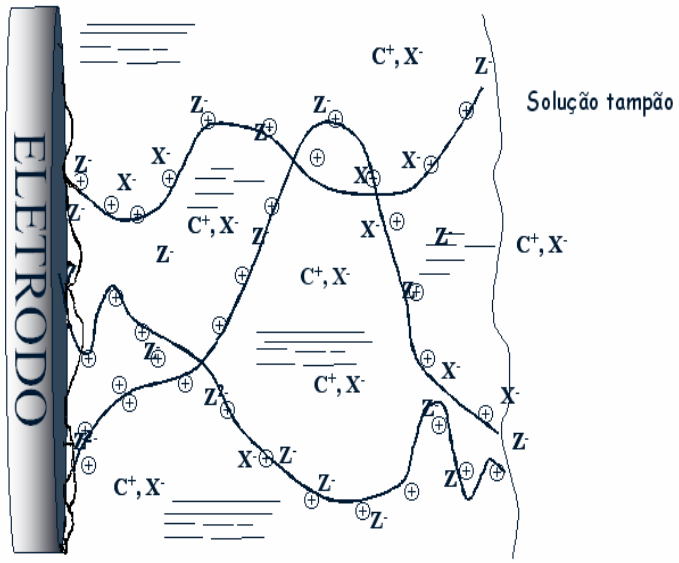

Figura I.4: *Modelo esquemático da PLL imobilizada na superfície do eletrodo [95].*

As linhas cheias com o símbolo ⊕ representam as cadeias do polieletrólito com as cargas positivas dos grupos NH_3 da poli-l-lisina, enquanto que as linhas tracejadas representam a região onde os contra-íons, representados por z^-, estão confinados por interação eletrostática com os cátions NH_3^+ (“Domínio Donnan”). C^+, X- representam a solução tampão (eletroinativa) que ocupa o volume remanescente do filme.

É importante ressaltar que a técnica de imobilização do material na construção de um sensor dependerá do tipo de aplicação que será realizada e do tipo de transdutor que será utilizado, portanto, o bom funcionamento dos sensores vai depender da imobilização efetiva do reagente num transdutor adequado. Sendo assim para uma melhor fixação dos compostos nas superfícies dos eletrodos, os mesmos serão imobilizados na poli-l-lisina através da simples evaporação do solvente.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II. Objetivos Gerais e Específicos

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de sensores eletroquímicos com alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear e estabilidade para a determinação de compostos fenólicos empregando eletrodos de carbono vítreo modificados com tetracianoetileneto de lítio (LiTCNE) e bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenabrolina) de cobre [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$] em filmes de poli-l-lisina (PLL).

Para atingir o objetivo proposto os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos

i) Estudar o comportamento do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL na presença e ausência de *p*-nitrofenol, bem como investigar o comportamento do eletrodo modificado com [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$]/PLL na presença e ausência de catecol;

ii) Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas dos analitos em estudo, usando as voltametrias cíclica e de varredura linear;

iii) Otimizar os parâmetros experimentais para determinação dos compostos fenólicos, tais como, pH, tipo de solução tampão e concentração da solução tampão sobre o sinal analítico dos analitos;

iv) Escolher a melhor técnica eletroquímica (amperometria, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada) a ser utilizada para a

determinação da espécie de interesse após a otimização dos parâmetros operacionais;

v) Construir as curvas analíticas referentes às espécies de interesse;

vi) Aplicar o sensor em amostras reais e realizar estudos de adição e recuperação do analito na amostra;

v) Realizar estudos de possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade, tempo de vida útil e repetibilidade das medidas e no preparo do sensor;

vi) Comparar os resultados obtidos com outro método descrito na literatura quando possível.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Reagentes utilizados e soluções

Os compostos tetracianoetileneto de lítio (LiTCNE) e bis(tetracianoquinodimetaneto) de bis(fenatrolina de cobre) [$Cu(phen)_2(TCNQ)_2$] foram sintetizados de acordo com a literatura [98-100].

Poli-l-lisina (PLL), catecol, ácido cítrico, tampão Tris [(hidroximetil)aminometano, HEPES [N-(2-hidroxietil(piperazina)-N,N'-bis(2-ácido etanosulfônico)] e PIPES (Piperazina-N,N'-bis-(2-ácido etanossulfônico) foram adquiridos da Sigma, St. Louis, EUA. *p*-nitrofenol foi adquirido da Merck, Darmstadt-Alemanha. Dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) e hidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4) foram adquiridos da Synth, São Paulo, Brasil. Acetonitrila foi adquirido da Nuclear, São Paulo, Brasil. O acetato de sódio e ácido acético, foram adquiridos da Nuclear, São Paulo, Brasil.

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e preparados em água deionizada pelo sistema Mili-Q da Milipore.

A eliminação de oxigênio (O_2) dissolvido foi feita pelo borbulhamento de nitrogênio nas soluções durante 10 minutos antes das análises.

III.2. Intrumentação

As medidas voltamétricas e amperométicas foram realizadas com um potenciostato da *Echo Chemie* (Autolab® modelo PGSTAT-30) (Utrecht, The Netherlands) (**Figura III.1**) controlado por um microcomputador com

Software GPES 4.9 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

Figura III.1: *Potenciostato utilizado para as medidas eletroquímicas.*

O sistema utilizado foi constituído de uma célula eletroquímica com capacidade para 5,0 mL com entrada para os eletrodos de referência (Eletrodo de Calomelano Saturado – ECS), eletrodo auxiliar (um fio de platina em espiral) e eletrodo de trabalho (eletrodo de carbono vítreo modificado) (Figura III.2). Para os estudos hidrodinâmicos utilizou-se um sistema com Eletrodo de Disco Rotativo da AUTOLAB (**Figura III.2**) e para as medidas de pH empregou-se um pH/Analisador de íons da Corning, modelo 350, com eletrodo combinado de vidro também da Corning, modelo 476530.

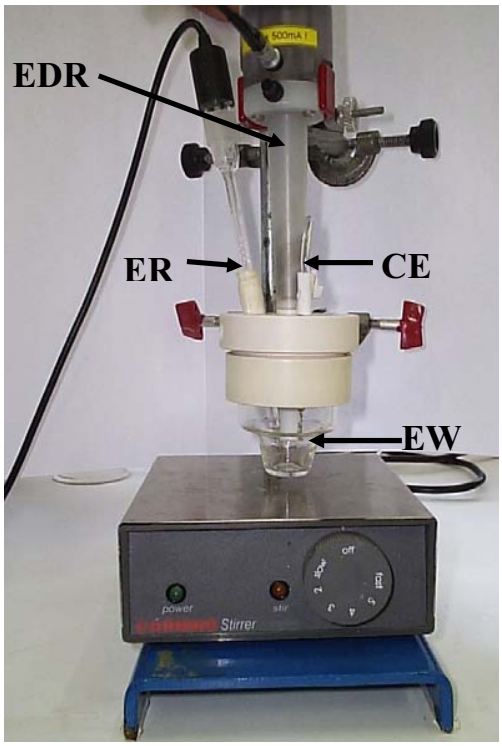

Figura III.2: *(a) Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas. ER= eletrodo de referência – ECS; EW = eletrodo de trabalho, CE= eletrodo auxiliar – espiral de platina. Logo acima um sistema EDR - Eletrodo com Disco Rotativo.*

As medidas espectrofotométricas foram efetuadas em um espectrofotômetro UV/Visível da Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, usando-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e 4,5 mL de capacidade total.

III.3. Preparo dos eletrodos modificados

Eletrodos de carbono vítreo (CV) adquirido da Metrohm - Suíça, com área geométrica de 0,071 cm^2 (3 mm de diâmetro) foram utilizados para a construção dos sensores. Antes da modificação do eletrodo, a superfície do mesmo foi polida usando uma politriz Fortel, modelo PLF, empregando alumina (Al_2O_3) como abrasivo, sendo a superfície do eletrodo lavada exaustivamente após esta etapa e sonicada por 2 minutos. Em seguida, o primeiro eletrodo foi preparado através da adição de 20 μL de uma solução de LiTCNE em diferentes concentrações (1,20; 1,95; 2,90; 3,86 e 4,85 mmol L^{-1}) sobre a superfície do eletrodo e deixado em temperatura ambiente para evaporação do solvente. Após aproximadamente 30 minutos acrescentou-se mais 20 μL de solução de PLL (20,4; 24,5, 28,6; 34,7; 40,8 e 51,0 μmol L^{-1}) deixando-a por 3 a 4 horas à temperatura ambiente. O segundo eletrodo foi preparado nas mesmas condições do LiTCNE usando-se concentrações de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mmol L^{-1} e de PLL de 5; 10; 15; 20 e 25 μmol L^{-1}.

Através deste procedimento foi possível a obtenção de filmes com boa adesão à superfície do eletrodo. Entretanto, a não utilização da PLL implicou numa instabilidade e redução significativa na resposta dos sensores, o que provavelmente está associado a lixiviação dos compostos da superfície do eletrodo.

III.4. Estudo do comportamento eletroquímico do eletrodo de carbono vítreo modificado com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL foi avaliado por voltametria cíclica na presença e ausência de *p*-nitrofenol e de catecol, respectivamente. Para ambos os eletrodos utilizou-se uma solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}. Para comparação dos voltamogramas realizou-se os voltamogramas do eletrodo não modificado e modificado apenas com a PLL na presença do analito.

III.5. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais para o *p*-nitrofenol e catecol empregando os eletrodos modificados com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

Para melhor desempenho dos sensores os parâmetros experimentais que influenciam na sensibilidade, estabilidade e resposta dos eletrodos modificados foram investigados, bem como os parâmetros operacionais também foram otimizados.

III.5.1. Parâmetros experimentais

Inicialmente, como descrito no item III.3, fixou-se a concentração de PLL e variou-se a concentração de LiTCNE e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$. Em seguida a concentração do complexo que apresentrou melhor sinal analítico foi fixada

e variada a concentração de PLL. Após a obtenção das melhores respostas tanto para as substâncias modificadoras (LiTCNE e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ como para a PLL variou-se o pH da solução tampão Macllvaine entre 3 e 5,4 para o nitrofenol e entre 3 e 9 para o catecol. Sendo assim, as maiores densidades de correntes de pico para ambos os analitos foram escolhidas para o estudo das soluções tampão.

Para o nitrofenol foram estudados os tampões succinato, acetato, citrato e Macllvaine enquanto que para o catecol estudou-se os tampões Macllvaine, fosfato, Pipes e Hepes. Logo após estes estudos, verificou-se qual dessas soluções apresentaram melhores sinais analíticos para então variar a concentração dos tampões escolhidos entre 0,0025 e 0,2 mol L^{-1} para verificar em qual dessas concentrações a densidade de pico alcança um máximo.

III.5.2. Parâmetros operacionais

Para a escolha da melhor técnica a ser escolhida para a obtenção da curva analítica otimizou-se os parâmetros operacionais da amperometria, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. Na amperometria, otimizou-se o potencial aplicado para a redução de *p*-nitrofenol e oxidação de catecol e na voltametria de pulso diferencial e onda quadrada otimizou-se, respectivamente, a velocidade de varredura e amplitude e a freqüência e amplitude. Após a otimização dos parâmetros operacionais construiu-se uma curva analítica usando cada técnica e comparou-se a sensibilidade entre elas. A técnica que apresentou melhor coeficiente angular foi utilizada para a construção da curva analítica final para os estudos posteriores.

III.6. Preparo das amostras para análise dos compostos fenólicos

III.6.1. Determinação de *p*-nitrofenol em amostras de águas naturais

Para a determinação de *p*-nitrofenol, uma alíquota de 1 mL de amostra foi adicionada à célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

III.6.2. Coleta e preparo das amostras de águas e guaraná em pó para análises

As amostras de águas foram coletadas em rios que passam por Barão Geraldo – Campinas sendo acondicionadas em frascos de polietileno e conservadas em geladeira. Para a determinação de *p*-nitrofenol nessas amostras uma alíquota de 1 mL da amostra foi adicionada à célula eletroquímica contendo o eletrólito de suporte sem nenhum prévio tratamento.

As amostras de guaraná em pó foram adquiridas nos supermercados da região de Campinas - SP e foram tratadas de acordo com o procedimento descrito na literatura [38] onde uma massa de 1,0 g de cada amostra foi extraída com 100 mL de etanol em temperatura ambiente (cerca de 25 ^{o}C) por 12 horas. Em seguida esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo e uma alíquota de 1 mL da solução filtrada foi adicionada à célula eletroquímica contendo o eletrólito em uma proporção 1:4 para então ser analisada.

Para as análises espectrofotométricas das amostras de guaraná foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima seguido pela adição do reagente *p*-aminofenol para complexar com o catecol. A absorbância foi medida num comprimento de onda de 586 nm, um minuto após a adição de

catecol. A reação de *p*-aminofenol com catecol resultou na forma indofenólica de coloração azul.

III.7. Determinação de *p*-nitrofenol empregando um ECV modificado com LiTCNE/PLL e testes de adição de padrão

A concentração de *p*-nitrofenol nas amostras de águas naturais foram determinadas pelo método de adição de padrão utilizando-se 4 mL de uma solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0, onde 1 mL da amostra foi adicionada à célula eletroquímica seguida por adições sucessivas do analito (0,0; 20,0; 40,0; 60,0 e 80 μL) a partir de uma solução estoque 1 μmol L^{-1}.

Os testes de adição e recuperação do analito foram realizados da seguinte maneira: em uma célula eletroquímica contendo 5 mL de uma solução eletrolítica (nas condições otimizadas), foi adicionada uma concentração conhecida do analito na amostra, e em seguida a concentração total obtida (concentração da amostra + concentração adicionada na amostra) pela concentração esperada vezes 100. Neste estudo foram utilizadas três diferentes concentrações de *p*-nitrofenol nas amostras (10; 100 e 1000 nmol L^{-1}), sendo que cada amostra foi analisada em triplicata para maior confiabilidade da análise.

III.8. Determinação de catecol empregando um ECV modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL e testes de adição de padrão

A concentração de catecol nas amostras de guaraná em pó também foram determinadas pelo método de adição de padrão utilizando-se 4 mL de uma solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0, onde 1 mL da amostra (já

tratada) foi adicionada à célula eletroquímica seguida por adições sucessivas do analito (0,0; 20,0; 40,0; 60,0 e 80 μL) a partir de uma solução estoque 100 μmol L^{-1}.

Os testes de adição e recuperação para o catecol foram realizados da mesma maneira que para o nitrofenol.

III.9. Determinação espectrofotométrica de catecol

O método espectrofotométrico foi utilizado como método de comparação para a determinação de catecol em amostras de guaraná em pó. A determinação espectrofotométrica do analito foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Magna e colaboradores [38] com adaptações.

Neste sentido, uma solução de 1 mmol L^{-1} de p-aminofenol foi preparada usando-se uma solução aquosa de 0,1 HCl e uma solução padrão de catecol (1 mmol L^{-1}) foi preparada em etanol 95% *v/v*.

Para a obtenção da curva de calibração foram adicionados em seis balões volumétricos (10 mL), 3 mL de uma solução de NaOH 2% (m/v); 3 mL de solução de *p*-aminofenol e em seguida foram adicionados em cada balão 1 mL da amostra já tratada e soluções padrão de catecol de 0,0; 10,0; 20,0; 40 e 60 e 80 μL. O volume final foi completado com etanol e a absorbância foi medida em 586 nm, um minuto após a adição de catecol. A reação de *p*-aminofenol com catecol resultou na forma indofenólica de coloração azul.

III.10. Avaliação da estabilidade e tempo de vida dos eletrodos modificado com LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

Para avaliar a estabilidade do sensor, várias medidas consecutivas foram realizadas com o mesmo eletrodo modificado comparando-se as respostas ao longo das medidas. Os valores de resposta obtidos inicialmente foram considerados como 100%. Já para o tempo de vida do eletrodo foram realizadas medidas com o eletrodo modificado por mais de sessenta dias. Durante o período de avaliação do tempo de vida do sensor este foi armazenado em temperatura ambiente.

III.11. Avaliação da repetibilidade dos sensores

A repetibilidade das medidas obtidas com os sensores foram avaliadas através de 10 medidas voltamétricas sucessivas para o *p*-nitrofenol e catecol, respectivamente, e logo após, foi calculado o desvio padrão para cada corrente de pico obtida. Essas medidas foram realizadas nas condições experimentais otimizadas para o eletrodo modificado com o LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$. A repetibilidade para 10 sensores preparados em dias diferentes também foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão para as medidas obtidas para cada sensor.

III.12. Estudo de interferentes

A interferência de espécies que podem ser encontradas nas amostras a serem analisadas (águas naturais e guaraná em pó) foi verificada através estudos de recuperação dos interferentes nas condições experimentais otimizadas contendo determinadas concentrações dos analitos estudados (*p*-nitrofenol e catecol).

Em águas naturais é possível de se encontrar algumas espécies iônicas como Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{+} etc, bem como algumas substâncias fenólicas como *o*-nitrofenol, hidroquinona, catecol, entre outros compostos. Enquanto que em guaraná em pó pode-se encontrar o ácido cafêico, *o*-clorofenol, ácido clorogênico, dentre outros antioxidantes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. SENSOR PARA P-NITROFENOL À BASE DE LITCNE/PLL

IV.1.1. Comportamento voltamétrico de *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL

Conforme descrito na literatura, o composto TCNE pode se apresentar em três estados de oxidação: forma neutra ($TCNE^{0}$), aniônica ($TCNE^{1-}$) e dianiônica ($TCNE^{2-}$) [101] e, em solução aquosa pode apresentar até dois pares redox, dependendo do intervalo de potencial estudado [101]. Neste trabalho estudou-se o comportamento do LiTCNE utilizando intervalos de potenciais de –1,0 a 0 V *vs* ECS para estudar a redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com o propósito de explorar as propriedades eletrocatalíticas do composto imobilizado para a determinação deste composto fenólico.

A **Figura IV.1** apresenta os voltamogramas do eletrodo não modificado (a), do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL na ausência de *p*-nitrofenol (b) e os voltamogramas dos eletrodos não modificado (c), modificado apenas com PLL (d) e modificado com LiTCNE/PLL (e), na presença de *p*-nitrofenol.

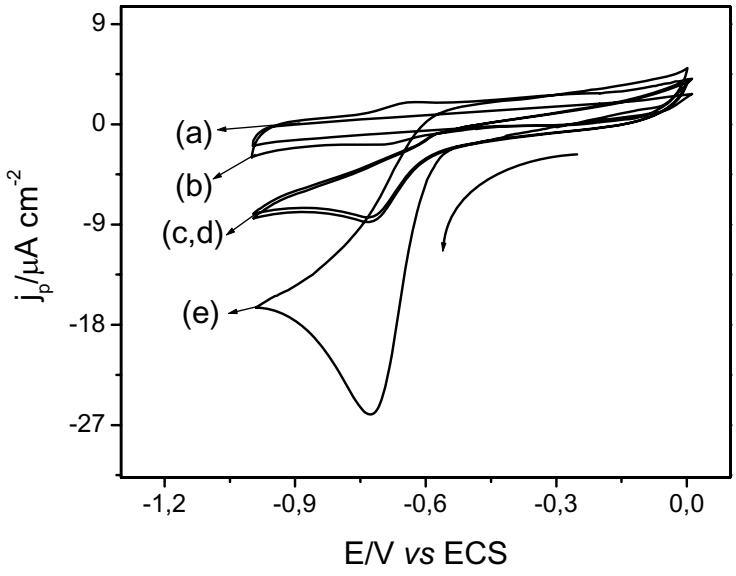

Figura IV.1: *Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo não modificado (a) e modificado com LiTCNE/PLL (b) na ausência de p-NF. Para comparação os eletrodos não modificado (c), modificado apenas com a PLL (d) e eletrodo modificado com LiTCNE/PLL (e) na presença de 10 μmol* L^{-1} *de p-NF. Experimentos conduzidos em 0,1 mol* L^{-1} *de solução tampão Macllvaine pH 4.* v*= 0,05 V* s^{-1}.

O voltamograma da **Figura IV.1(a)** não apresenta nenhum processo faradaico, pois é referente apenas a formação da dupla camada elétrica entre a superfície do eletrodo e a solução eletrolítica, consistindo num acúmulo de cargas positivas e negativas. Já na **Figura IV.1(b)**, quando o eletrodo foi modificado com LiTCNE/PLL, observou-se um par redox em cerca de –0,7 V. Este par redox é referente ao processo de oxidação e redução do TCNE na superfície do eletrodo, ou seja, o processo redox do par $TCNE^{-}/TCNE^{2-}$[101] quando o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho. Adicionalmente, quando são comparados os voltamogramas (c) e (d) da **Figura IV.1**, observa-

se que os mesmos apresentaram comportamento voltamétrico similar, o que significa que a PLL, além de não prejudicar a interação entre o analito e a superfície do eletrodo, não catalisa a reação de redução do *p*-nitrofenol, bem como não apresenta efeitos pré-concentrativos sobre o analito.

Conforme também pode ser observado na **Figura IV.1**, quando este eletrodo foi modificado com LiTCNE/PLL e colocado na presença de *p*-nitrofenol (**Figura IV.1e**) um significante aumento na corrente de pico catódica foi observado na mesma região de potencial onde ocorre a redução do TCNE (cerca de -0,7 V). Esta corrente de pico do *p*-nitrofenol foi muito superior a corrente observada no voltamograma do eletrodo não modificado (**Figura IV.1c**). Este aumento sugere que o eletrodo modificado pode estar promovendo um aumento na transferência eletrônica entre o *p*-nitrofenol e a superfície do eletrodo bem como indica que o LiTCNE age como catalisador da reação do *p*-nitrofenol, aumentando assim a sensibilidade do sistema.

IV.1.2. Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação de *p*-nitrofenol

IV.1.2.1. Influência das concentrações de LiTCNE e PLL sobre a densidade de corrente do p-nitrofenol

A influência da concentração de LiTCNE e PLL na preparação do filme é um fator de grande importância, uma vez que estes compostos devem ser utilizados na superfície do eletrodo em concentração na qual o analito apresente as melhores densidades de corrente para um melhor desempenho do sensor. Neste sentido, a influência das concentrações de LiTCNE e PLL

usadas na preparação do filme foram verificadas usando 5 μmol L^{-1} de *p*-nitrofenol em 5 mL de solução tampão Macllvaine, 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0.

Inicialmente, variou-se a quantidade de LiTCNE nas concentrações 1,20; 1,95; 2,90; 3,86 e 4,85 mmol L^{-1} fixando-se a concentração de PLL em 24,5 μmol L^{-1}. Os resultados são apresentados na **Tabela IV.1.**

Tabela IV.1: *Efeito da concentração de LiTCNE na resposta do sensor usando-se uma concentração de PLL de 24,5 μmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine 0,1mol L^{-1} (pH 4,0). Velocidade de varredura=0,05 V s^{-1}.*

[LiTCNE]/ mmol L^{-1}	j_p/μA cm^{-2}
0,95	15,54 (±0,03)
1,20	17,75 (±0,05)
1,95	18,50 (±0,05)
2,90	17,20 (±0,02)
3,86	17,12 (±0,01)
4,85	16,05 (±0,03)

A maior densidade de corrente para o *p*-nitrofenol foi obtida usando a solução de concentração 1,95 mmol L^{-1} de LiTCNE. Concentrações menores que 1,95 mmol L^{-1} forneceram respostas menores devido estas concentrações serem insuficientes para garantir uma densidade máxima de sítios catalíticos para a redução de *p*-nitrofenol na superfície do eletrodo. Concentrações maiores que 1,95 mmol L^{-1} proporcionaram uma diminuição crescente na densidade de corrente o que pode ser justificado pela quantidade de grupos

NH_3^+ da PLL terem sido insuficientes para imbolizar todos os íons $TCNE^-$ na superfície de carbono vítreo. Neste caso as membranas obtidas não foram uniformes e as respostas não foram estáveis. Com base nessas informações, a membrana preparada com concentração 1,95 μmol L^{-1} foi escolhida por proporcionar um melhor desempenho para o sensor.

Na etapa seguinte estudou-se a influência da concentração de PLL na densidade de corrente do *p*-nitrofenol. Assim sendo, foram estudadas as concentrações de PLL de 20,4; 24,5, 28,6; 34,7; 40,8 e 51,0 μmol L^{-1} e fixada a concentração de LiTCNE em 1,95 mmol L^{-1} **(Tabela IV.2)**.

Tabela IV.2: *Efeito da concentração de PLL na resposta do sensor usando-se uma concentração de LiTCNE 1,95 mmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas nas mesmas condições da* ***Tabela IV.1***.

[PLL]/μmol L^{-1}	j_p/μA cm^{-2}
20,4	16,22 (±0,08)
24,5	18,32 (±0,05)
28,6	20,00 (±0,01)
34,7	19,78 (±0,04)
40,8	14,55 (±0,09)
51,0	13,98 (±0,07)

Os resultados mostraram que as maiores densidades de corrente foram obtidas com as soluções de concentrações 28,6 e 34,7 μmol L^{-1} de PLL. Soluções de PLL de concentrações abaixo de 28,6 μmol L^{-1} apresentaram valores de densidade de corrente menores devido, provavelmente, estas

concentrações usadas serem insuficientes para a imobilização total do LiTCNE. Entretanto, o uso de concentrações maiores que 34,7 μmol L^{-1} resultaram em menores respostas, devido provavelmente ao aumento da barreira ao transporte de carga e/ou massa (resistência) gerada pelo polímero ou a razão PLL/LiTCNE promover uma diminuição do número de sítios de TCNE acessíveis para catálise. Neste sentido, devido as concentrações 28,6 e 34,7 μmol L^{-1} apresentarem melhores resultados, optou-se pelo uso da concentração 28,6 μmol L^{-1} para os demais estudos.

IV.1.2.2. Influência do pH, solução tampão e concentração da solução tampão sobre a densidade de corrente do *p*-nitrofenol

O estudo do pH foi conduzido em solução tampão Macllvaine 0,1 mol L^{-1} contendo 5 μmol L^{-1} de *p*-nitrofenol, utilizando-se uma faixa de pH entre 3,5 e 5,4 e as densidades de correntes obtidas apresentaram desvios padrão menores que 0,17.

Os resultados deixam evidente que a densidade de corrente de pico aumenta com o aumento do pH na faixa de 3,5 a 4,0 e diminui em valores de pH maiores que 4,0 (**Figura IV.2**). Dois aspectos relacionados ao sistema investigado que se apresentam como prováveis fatores responsáveis pelo comportamento verificado na **Figura IV.2**, são a dependência do avanço da reação com a concentração de prótons no meio reacional [102] bem como a mudança no mecanismo reacional de redução de p-nitrofenol quando meios de maior acidez são usados (pH < 4) [102]. Desde os trabalhos pioneiros de Smyth e Osteryoung [102] até os recentes trabalhos de Ni e colaboradores [103] se verifica que a corrente de pico referente à redução do *p*-nitrofenol

aumenta à medida que o pH alcança valores menores. Por outro lado, a mudança no mecanismo de redução do *p*-nitrofenol de um processo que envolve 4 elétrons para um processo via 6 eletrons envolve a formação de p-aminofenol na sua forma protonada ($pk_a \sim 5$) [102]. Tendo em vista a natureza da estrutura da PLL em meios ácidos (forma randômica), a presença das moleculas de p-aminofenol como resultado da redução do *p*-nitrofenol deve promover um aumento na concentração de cargas positivas, o que pode promover um aumento na concentração de contra-ions no filme e, consequentemente, uma redução na velocidade com que o analito difunde através deste resultando numa redução na corrente de pico em pH < 4. Conforme pode ser observado, a maior densidade de corrente obtida foi em pH 4, portanto, este foi utilizado para os demais estudos.

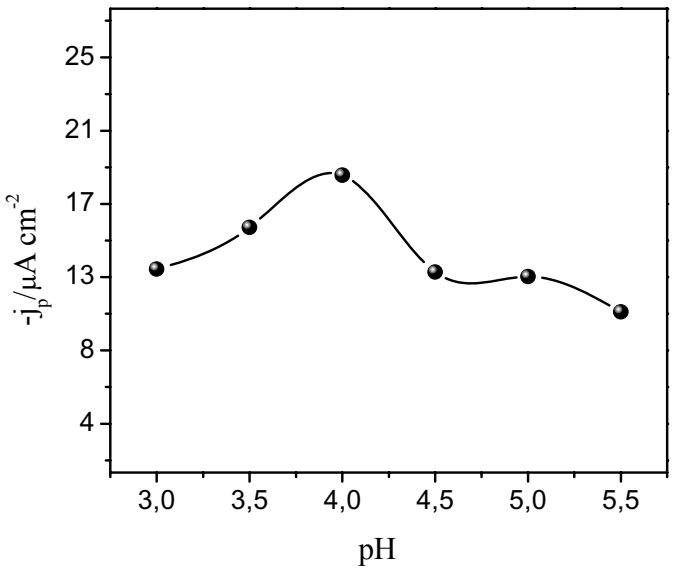

Figura IV.2: *Influência do pH sobre a resposta do sensor para 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine 0,1 mol L^{-1}; v= 0,05 V s^{-1}.*

A influência do pH sobre o potencial de pico referente a redução do *p*-nitrofenol também foi verificada **(Figura IV.3)** e observou-se que houve uma relação linear entre o potencial de pico do analito e o pH na faixa de pH de 3,5 a 5,5. O coeficiente angular deste gráfico correspondeu a 0,054 V/pH, sendo muito próximo ao valor obtido para um sistema nernstiano (0,0592 (n_p/n_e) V/pH, onde o número de prótons (n_p) é igual ao número de elétrons (n_e) [104]. Este resultado sugere que, no processo de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE, o número de prótons é igual ao número de elétrons.

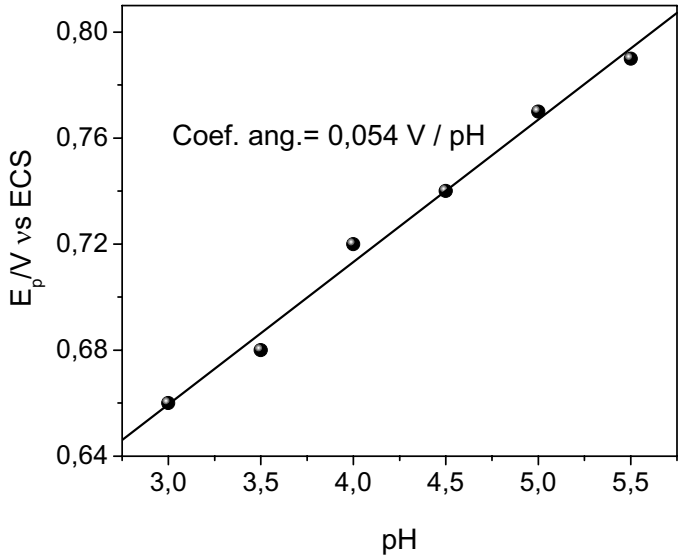

Figura IV.3: *Influência do pH sobre o potencial de pico para 5 μmol L^{-1} de p-NF. Medidas conduzidas em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão Macllvaine, pH 4; v= 0,05 V s^{-1}.*

Para a realização do estudo da solução tampão utilizou-se os tampões MacIlvaine, acetato, citrato e succinato e os resultados mostraram que a melhor densidade de corrente de pico foi obtida quando a solução tampão acetato foi utilizada (**Tabela IV.3**). Este comportamento pode estar associado à maior facilidade dos íons acetato difundirem através da superfície do filme de LiTCNE/PLL em comparação com os íons dos outros tampões investigados.

Tabela IV.3: *Influência da solução tampão (0,1 mol* L^{-1}*), pH 4, sobre a densidade de corrente referente a eletro-redução do p-NF obtida em concentrações de 5* μ*mol* L^{-1}*.* $v = 0{,}05\ V\ s^{-1}$*.*

Solução tampão	j_p / $\mu A\ cm^{-2}$
Succinato	15,15 (±0,06)
Acetato	20,89 (±0,07)
Citrato	16,79 (±0,04)
Macllvaine	18,82 (±0,05)

A influência da concentração da solução tampão acetato também foi estudada **(Tabela IV.4)**, mostrando que em concentrações acima de 0,1 mol L^{-1} não se observa nenhuma alteração significativa na eficiência do processo de redução do *p*-nitrofenol. Abaixo deste valor, começa haver um comprometimento da transferência eletrônica do sistema podendo ser atribuída à carência de transportadores de carga para manter a eletroneutralidade do eletrodo, sendo assim, optou-se pelo uso da concentração 0,1 mol L^{-1}.

Tabela IV.4: *Influência da concentração da solução tampão acetato (pH 4) na densidade de corrente elétrica de pico para 5 μmol L^{-1} de p-NF. v=0,05 V s^{-1}.*

[Solução tampão] / mol L^{-1}	j_p / μA cm^{-2}
0,025	11,11 (±0,03)
0,05	17,03 (±0,02)
0,10	20,84 (±0,01)
0,15	20,89 (±0,01)
0,20	20,85 (±0,07)

IV.1.3. Estudos sobre o mecanismo de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL

Informações adicionais sobre a redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL foram obtidas nas condições otimizadas pela análise das densidades de correntes dos voltamogramas cíclicos. De acordo com o modelo teórico de Andrieux and Sevéant [105], a densidade de corrente catalítica de pico, é dependente da velocidade de varredura conforme a equação abaixo:

$$j_p = 0{,}496 nFC_o D_o^{1/2} (Fv/RT)^{1/2} \quad (1)$$

onde, n é o número de elétrons, C_o é a concentração do analito, D_o representa o seu coeficiente de difusão na solução, F é a constante de Faraday, R e T são as constantes dos gases e temperatura, respectivamente. Uma outra informação importante é que um sistema se comporta como um processo

totalmente irreversível, controlado por difusão, para grandes valores de parâmetros cinéticos (ex. grandes valores de k, que representa a constante da velocidade da reação) [105,106]. Com base nessas informações, um gráfico da densidade de corrente de pico catalítica, j_p, vs a raiz quadrada da velocidade de varredura, $v^{1/2}$, foi construído e resultou em uma reta (**Figura IV.4a**), sugerindo que o processo de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado, é controlado por difusão, ou seja, o transporte de massa é o fator limitante deste processo.

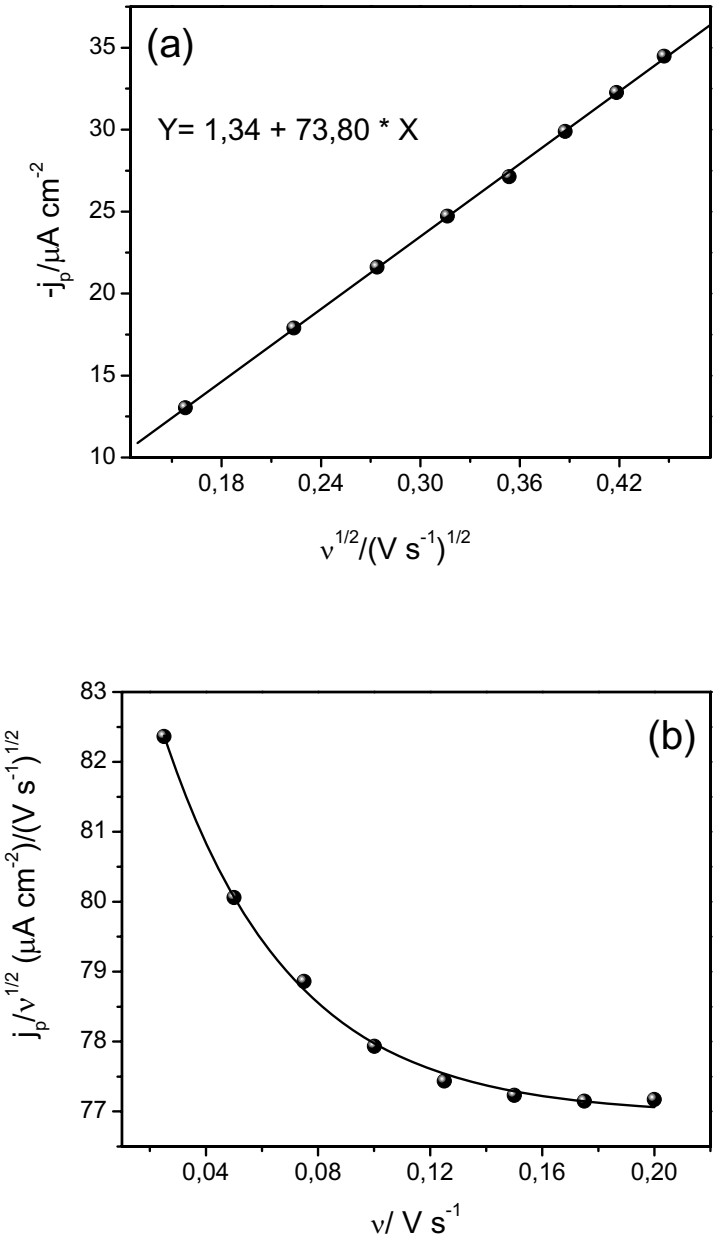

Figura IV.4: *(a) Gráfico da densidade de corrente de pico versus raiz quadrada da velocidade de varredura para o p-NF em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão MacIlvaine pH 4,0. (b) Gráfico de $j_p/v^{1/2}$ vs V s^{-1}.*

O gráfico da razão entre a densidade de corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($j_p/v^{1/2}$) vs a velocidade de varredura (v) (**Figura IV.4b**) exibe um comportamento característico de um processo EC_{cat} (eletroquímico-químico catalítico) sugerindo a existência de uma reação química acoplada [107] no mecanismo de redução do *p*-nitrofenol.

Como a densidade de corrente de pico o *p*-nitrofenol é dependente da velocidade de varredura, como esperado para um sistema irreversível, então, o número de elétrons, n, envolvido na reação global pode ser obtido a partir do coeficiente angular do gráfico de j_p *vs* $v^{1/2}$ de acordo com a equação utilizada para um sistema totalmente irreversível controlado por difusão [106]:

$$j_p = (2{,}99 \times 10^5)\, n(\alpha n_a)^{1/2}\, C_o\, D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (2)$$

onde n é o número total de elétrons envolvidos na reação, α é o coeficiente de transferência eletrônico, n_a, o número de elétrons envolvidos na etapa determinante do sitema, "D_o" ($cm^2\ s^{-1}$) é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa em solução, C_o* (mol cm^{-3}) é a concentração dessas espécies e ν é a velocidade de varredura (V s^{-1}). Neste estudo, o valor do coeficiente de difusão utilizado foi de 9,19 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} [108]. Adicionalmente, para a obtenção do número total de elétrons foi necessário calcular o valor de αn_a, o qual foi obtido pela diferença entre o potencial de pico (E_p) e o potencial da metade da corrente de pico ($E_{p/2}$) de acordo com a equação [106]:

$$\alpha n_a = 47{,}7\ \text{mV} / (E_p - E_{p/2}) \quad (3)$$

Assim, o valor para αn_a foi igual a 0,68. Substituindo-se este valor na Equação 2 foi possível obter um valor para *n* igual a 3,93, o qual sugere que o mecanismo de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com

LiTCNE/PLL envolve 4 elétrons. Este valor está de acordo com os determinados por outros pesquisadores mediante o emprego de outros materiais de eletrodo [109-111]. Com base nestas informações e, considerando que este sistema se comporta como um sitema nernestiano onde o número de prótons é igual ao de elétrons é possível sugerir que o processo de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado ocorre de acordo com a seguinte reação [111]:

$$\underset{\text{p-nitrofenol}}{\text{R-NO}_2} + 4e^- + 4H^+ \rightarrow \underset{\text{hidroxilamina}}{\text{R-NHOH}} + H_2O \qquad (4)$$

onde R representa o anel aromático ligado ao grupo hidroxila (OH).

Na etapa seguinte, experimentos utilizando um eletrodo com disco rotativo foram conduzidos com o objetivo de fornecer mais informações sobre os processos de redução do *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado. Tal sistema funciona num regime de convecção forçada, cuja vantagem é o aumento do transporte das espécies eletroativas para o eletrodo, conduzindo a maiores correntes bem como reduzindo os efeitos do transporte de massa à superficie do eletrodo. O eletrodo modificado também foi utilizado para investigar a cinética das reações eletroquímicas.

Após a obtenção da curvas de polarização realizadas em diferentes velocidades de rotação (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 rpm) bem como diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (11, 17, 26, 37, 52 e 62 μmol L^{-1}) em solução de tampão acetato (pH 4,0) a uma velocidade de varredura de 0,005 V s^{-1}, foi possível a obtenção dos gráficos de Levich e Koutecky-Levich (**Figuras IV.5a e IV.5b**).

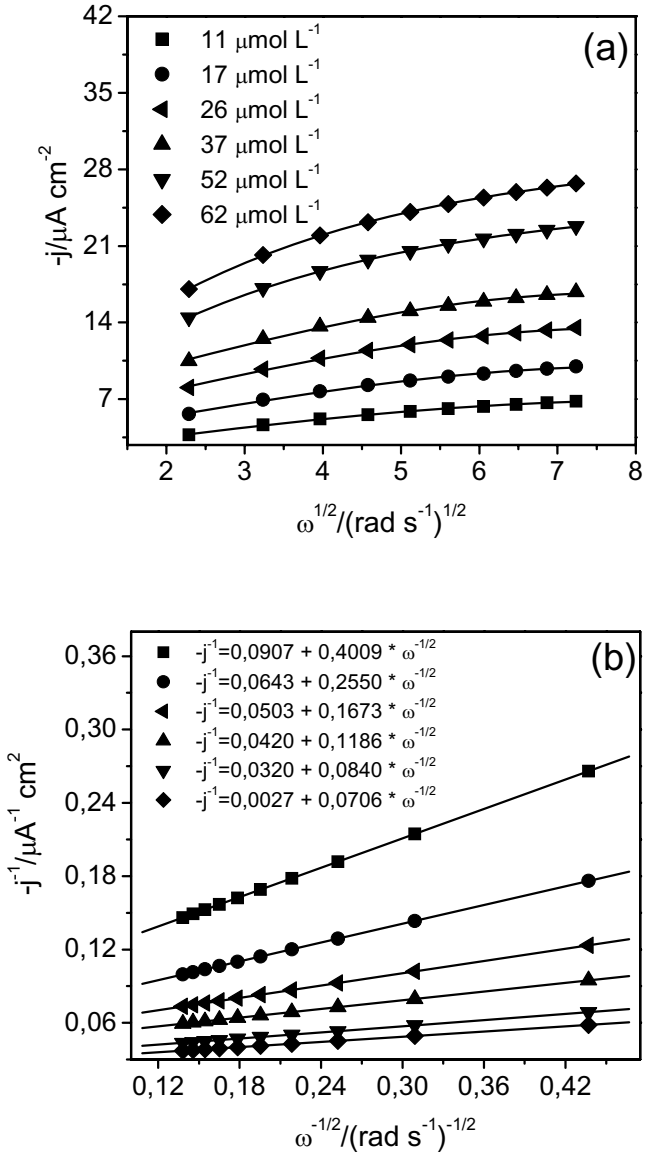

Figura IV.5: *(a) Gráfico de Levich e (b) Koutecky-Levich para a redução de p-NF sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL.*

De acordo com a **Figura IV.5a**, as densidades de correntes limites obtidas sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL aumentam com a velocidade de rotação e o desvio da linearidade deste gráfico indica que além da densidade de corrente difusional existe a predominância da corrente cinética, ou seja, a transferência eletrônica (reação química) também limita os processos de redução do *p*-nitrofenol. Neste caso, as densidades de correntes limites j_{lim} resultantes, obtidas para as reações mediadas, são o somatório entre as densidades de correntes cinéticas (j_k) e as densidades de correntes Levich (j_{Lev}), conforme a equação seguinte [106]:

$$\frac{1}{j_{\lim}} = \frac{1}{\mathrm{nFCok}\Gamma} + \frac{1}{0{,}62\mathrm{nFD}^{2/3}\nu^{1/6}C_o\omega} \quad (5)$$

onde *n* é o número de elétrons total transferidos para o eletrodo durante a redução do analito sobre o eletrodos modificados, D_o ($cm^2\ s^{-1}$), υ (0,01 $cm^2\ s^{-1}$), ω (rad s^{-1}) e C_o (mol cm^{-3}) são os coeficientes de difusão, a viscosidade cinemática, a velocidade de rotação e a concentração das espécies eletroativas em solução, *k* é a constante da velocidade da reação (mol^{-1} L s^{-1}ou mol^{-1} cm^3 s^{-1}) que governa a reação do modificador com o analito e Γ a quantidade de material ativo (catalisador) sobre a superfície do eletrodo (mol cm^{-2}). Um valor de Γ=1,2 x 10^{-11} mol cm^{-2} foi obtido pela equação Q/nFA, onde Q é a carga do eletrodo modificado, na ausência do analito, e todos os outros parâmetros possuem seus significados usuais.

De acordo com a equação de Kouteky-Levich o gráfico de j^{-1} *vs* $\omega^{-1/2}$ fornece uma reta para todas as concentrações utilizadas (**Figura IV.5b**) e pelos interceptos e coeficientes angulares deste gráfico foi possível determinar os valores de *k* e D_o, respectivamente. Os valores de *k e* D_o foram 1,62 x 10^8

mol^{-1} cm^3 s^{-1} e 9,0 x 10^{-6} (± 0,1) cm^2 s^{-1}, respectivamente. Este alto valor para a constante da velocidade de reação se deve à boa atividade catalítica do LiTCNE para a redução de *p*-nitrofenol, promovendo assim um aumento na velocidade de transferência eletrônica sobre o eletrodo modificado. A média dos coeficientes de difusão das espécies em solução determinados pelos coeficientes angulares do gráfico de Koutecky-Levich foi similar ao valor encontrado na literatura [108].

IV.1.4. Escolha da técnica eletroanalítica a ser empregada para a determinação de *p*-nitrofenol

A Química Analítica vem aperfeiçoando cada vez mais os métodos e técnicas que possam determinar concentrações menores de analitos em soluções aquosas. As técnicas eletroanalíticas, principalmente aquelas em que a varredura de potenciais gera sinais analíticos na forma de correntes, têm sido empregadas na determinação de diversos analitos [112]. Dentre as várias técnicas, algumas se destacam por apresentar grande sensibilidade e reprodutibilidade dos sinais analíticos. Como exemplos, têm-se a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada, sendo que essa última vem ganhando a atenção da comunidade científica devido a sua versatilidade na caracterização das espécies eletroativas [113].

A escolha da técnica a ser utilizada para a determinação de um analito é de fundamental importância em uma análise quantitativa, pois dela dependem todos os resultados analíticos. Neste sentido, para a escolha da melhor técnica eletroquímica a ser utilizada para a determinação de *p*-nitrofenol os parâmetros operacionais foram otimizados por três das mais utilizadas

técnicas eletroanalíticas: a amperometria, a voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Assim, uma breve abordagem sobre cada técnica foi feita, bem como seus parâmetros operacionais em relação ao *p*-nitrofenol foram estudados. Após otimização dos parâmetros operacionais para cada técnica construiu-se as curvas analíticas para o analito a fim de verificar qual destas técnicas forneceriam uma maior sensibilidade para o sistema.

IV.1.4.1. Otimização dos parâmetros operacionais para a determinação de *p*-nitrofenol empregando a amperometria, Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

IV.1.4.1.1. Amperometria

A amperometria consiste no monitoramento da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado potencial ao sistema investigado. Para as medidas amperométricas o potencial aplicado tem uma importante influência sobre a resposta do sensor, devido o mesmo contribuir para a sensibilidade do sistema, por isso, este estudo foi realizado dentro de uma ampla faixa de potencial aplicado (antes, durante e após a oxidação do analito).

A dependência do potencial sobre a resposta do sensor foi investigada utilizando-se até 0,7 μmol L^{-1} de *p*-nitrofenol, obtida em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão acetato, pH 4,0 conforme mostrado na **Tabela IV.5** e pode ser claramente observado que o sensor alcança um patamar máximo de resposta a

-0,70 V e mantêm-se constante até -0,85 V. Deste modo -0,70 V vs ECS foi escolhido como potencial ótimo de trabalho uma vez que não são observados aumentos significativos no sinal elétrico, o que está associado com o controle da corrente elétrica pelo transporte de massa por meio de difusão das espécies, conforme pode ser observado na **Figura IV.6**.

Tabela IV.5: *Influência do potencial aplicado sobre a resposta do sensor para até 0,7 μmol L^{-1} de p-nitrofenol, obtida em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão acetato, pH 4,0.*

$-E_{aplicado}$ / V vs SCE	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85
$-\Delta j$ / μA cm^{-2}	1,37	2,49	3,57	3,58	3,60	3,59

Após a otimização do potencial aplicado construiu-se a curva analítica realizando sucessivas adições de *p*-nitrofenol na célula eletrolítica contendo a solução tampão. A primeira adição correspondeu a 0,2 μmol L^{-1}, e as demais adições corresponderam ao incremento de 0,1 μmol L^{-1} à adição anterior, por isso o primeiro delta de densidade de corrente foi maior que os deltas posteriores (**Figura IV.6a)**. Conforme pode ser observado nesta figura as adições do analito e polarização do eletrodo em -0,7 V vs ECS são suficientes para gerar correntes elétricas proporcionais (linearmente) à concentração do analito adicionadas. Assim sendo, o gráfico da variação da densidade de corrente (Δj) versus a concentração do analito adicionada resultou numa sensibilidade de 9,75 μA cm^{-2} L μmol^{-1}.

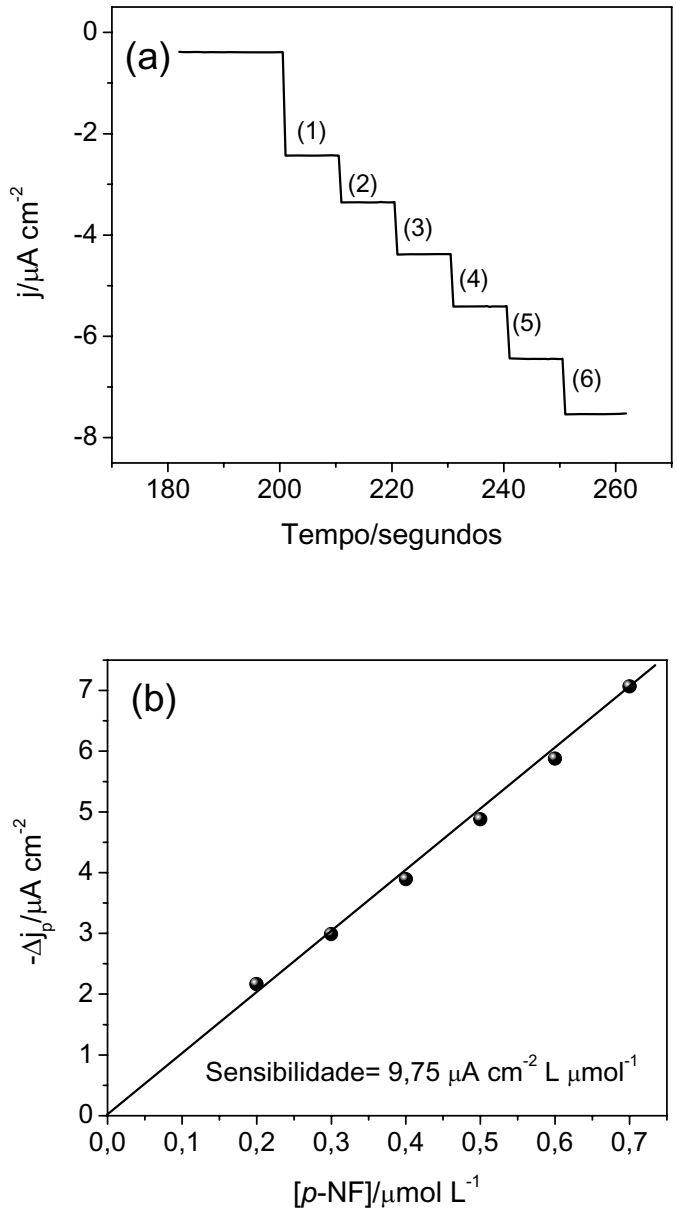

Figura IV.6: *(a) Amperograma para o p-NF nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Medidas conduzida usando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0). $E_{apl.}$= -0,7 V vs ECS.*

IV.1.4.1.2.Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, onde a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira apresenta a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é, fundamentalmente, a contribuição da corrente faradaica e, então, plotadas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana [113]. Esta técnica é mais sensível que a de pulso normal, isto porque ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido.

Na voltametria de pulso diferencial o efeito da velocidade de varredura e amplitude de pulso são parâmetros muito importantes, pois eles podem influenciar diretamente na sensibilidade do sistema. Sendo assim, inicialmente, variou-se a velocidade de varredura de 0,005 a 0,07 V s^{-1} utilizando uma amplitude de 0,05 V para uma solução de *p*-nitrofenol contida em uma solução tampão acetato, pH 4,0 (**Tabela IV.6a**).

Tabela IV.6a: *Influência da velocidade de varredura sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de p-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão acetato, pH 4,0, com amplitude de 0,050 V.*

Veloc./V s^{-1}	0,005	0,025	0,03	0,035	0,04	0,05	0,07
$-j_p$/μA cm^{-2}	1,91	6,92	8,31	9,69	9,67	9,68	9,66

Conforme pode ser observado nesta tabela a densidade de corrente de pico do *p*-nitrofenol alcançou um patamar máximo em 0,035 V s^{-1} mantendo-se até 0,07 V s^{-1}. Adicionalmente, observou-se que após a velocidade de 0,035 V s^{-1} os voltamogramas foram acompanhados por distorção e alargamento dos picos, portanto a velocidade de 0,035 V s^{-1} foi escolhida para os demais estudos. Em seguida variou-se a amplitude de potencial de 0,01 a 0,08 V (**Tabela IV.6b**). Neste estudo verificou-se que a maior densidade de corrente para o *p*-nitrofenol foi obtida a partir de 0,05 V, por outro lado, amplitudes maiores 0,050 V também apresentaram alterações nos perfis voltamétricos. Por este motivo uma velocidade de 0,035 V s^{-1} e uma amplitude de 0,05 V foram utilizadas para a construção da curva analítica nas condições experimentais otimizadas.

Tabela IV.6b: *Influência da amplitude sobre a densidade de corrente de pico do p-nitrofenol com uma velocidade de varredura de 0,035 V* s^{-1}*. Experimento realizado nas mesmas condições da* ***Tabela IV.6a****.*

Amplitude/V	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08
j_p/μA cm^{-2}	1,94	3,88	5,82	7,76	9,70	9,69	9,71

Os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos através de adições seqüenciais de, inicialmente 0,2 μmol L^{-1} e, seqüencialmente 0,1 μmol L^{-1} (**Figura IV.7a)**. A partir dos voltamogramas obtidos mediu-se a densidade de corrente para cada adição considerando apenas o voltamograma do eletrodo modificado na ausência do analito. A curva analítica referente aos voltamogramas obtidos também é apresentada na **Figura IV.7b.** Conforme

pode ser observado as densidades de correntes de pico são linearmente proporcionais às concentrações adicionadas do analito tendo sido verificado uma sensibilidade de 24,76 μA cm^{-2} L μmol^{-1}.

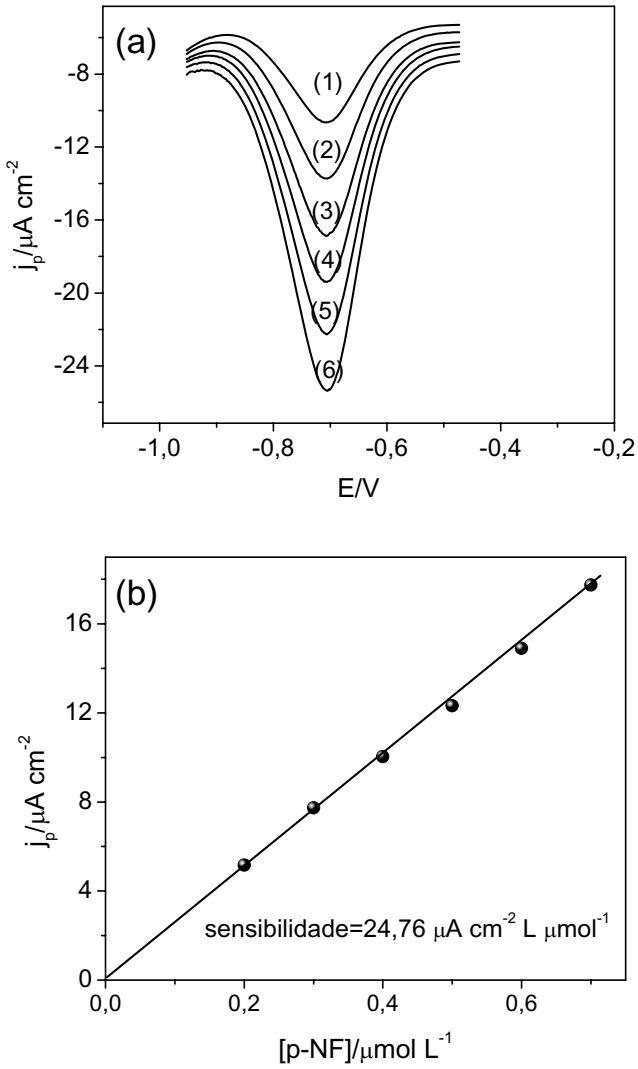

Figura IV.7: *(a) Voltamogramas de pulso diferencial para o p-nitrofenol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (5) 0,5, (6) 0,6 e (7) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Medidas conduzidas empregando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0, velocidade de 0,035 V s^{-1} e amplitude de 0,050 V.*

IV.1.4.1.3. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas que apresenta excelente sensibilidade [113]. Na VOQ a forma de onda consiste numa onda quadrada sobreposta numa rampa de potencial elétrico na forma de escada (degrais de potencial elétrico). Do ponto de vista prático, a maior vantagem da VOQ é a possibilidade de se obter correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, melhorando assim, a sensibilidade da técnica. Além disso, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente faradaica pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente capacitiva seja minimizada. Nesta técnica as correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante de forma diferencial apresentando assim excelente sensibilidade.

A frequência (*f*) e a amplitude são parâmetros muito importantes em VOQ, principalmente a freqüência, já que a mesma determina a intensidade dos sinais e com isso, a sensibilidade da técnica. A **Tabela IV.7a** mostra as densidades de correntes para diferentes valores de freqüência utilizando-se as condições experimentais otimizadas.

Tabela IV.7a: *Efeito da freqüência sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de p-NF sobre o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão acetato, pH 4,0, com a=0,05 V.*

Freqüência/s^{-1}	20	30	40	60	80	100	120
$-j_p$/μA cm^{-2}	17,03	24,25	28,42	33,99	43,94	43,93	34,40

De acordo com a **Tabela IV.7a**, entre as freqüências 80 e 100 s^{-1} a densidade de corrente de pico do *p*-nitrofenol apresentou maiores sinais a 80 s^{-1} bem como resultou em menores sinais para freqüências maiores que 100 s^{-1} e os voltamogramas foram acompanhados por alargamento dos picos. Sendo assim utilizou-se uma freqüência de 80 s^{-1} para o estudo da amplitude.

A amplitude de pulso (a) também é um importante parâmetro envolvido em VOQ. A **Tabela IV.7b** mostra as respostas para os valores das amplitudes estudadas. Estes experimentos foram conduzidos utilizando um incremento de potencial (ΔE_i) de 0,004 V.

Tabela IV.7b: *Efeito da amplitude sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de p-NF com f=80 s^{-1}. Experimento realizado em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0.*

Amplitude/V	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
$-j_p/\mu A\ cm^{-2}$	18,4	31,39	43,97	43,95	43,96

Na **Tabela IV.7b** observa-se que uma maior densidade de corrente de pico foi obtida a partir de 0,03 V, mantendo um patamar máximo até 0,05 V. Deste modo uma amplitude de 0,03 V foi escolhida para a construção da curva analítica. Os voltamogramas referentes a esta curva são apresentados na **Figura IV.8a.** Os mesmos também foram obtidos através de sucessivas adições de *p*-nitrofenol na célula contendo a solução tampão. A curva analítica referente a esses voltamogramas também é apresentada a seguir (**Figura IV.8b**).

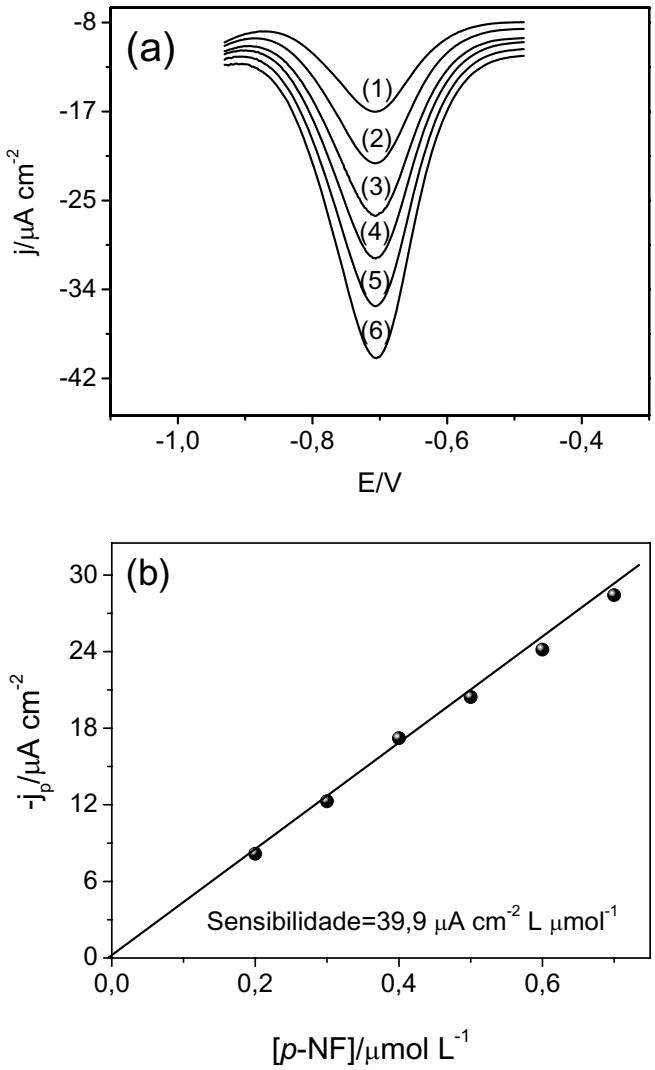

Figura IV.8: *(a) Voltamogramas de onda quadrada para o p-nitrofenol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Experimento realizado em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0, f=80 s^{-1}, amplitude=0,03 V, ΔE_i=0,004 V.*

Após obtenção das curvas analíticas do *p*-nitrofenol para cada técnica foi possível fazer uma comparação entre as sensibilidades obtidas a partir das curvas analíticas construídas para o *p*-nitrofenol e cujos valores são apresentados na **Tabela IV.8**.

Tabela IV.8: *Sensibilidades obtidas através da curva analítica para o p-NF empregando o eletrodo modificado com LiTCNE/PLL.*

Técnica	Sensibilidade/μA cm^{-2} L μmol^{-1}
Amperometria	9,75
VPD	24,76
VOQ	39,90

A amperometria foi a técnica que apresentou menor sensibilidade conforme pode ser observado na **Tabela IV.8**. Esta técnica possui algumas limitações, tais como limitações devido a convecção natural e limitações imposta pela não compensação da resistência do eletrólito e da capacitância da dupla camada elétrica (C_d) [106].

A convecção natural pode ser originada por duas forças: o peso do próprio fluido (campo gravitacional) e as forças devido ao gradiente de densidade de massa no fluido resultando numa desordem da camada de difusão, então a corrente que deveria ser medida será muito maior que a prevista pela equação de Cottrel [106]. A limitação imposta pela capacitância da dupla camada elétrica também é muito importante, pois mesmo a corrente não faradaica flui durante a etapa de potencial, ou seja, existe uma apreciável contribuição da corrente de carga à corrente total medida, e este sinal superimposto pode dificultar a identificação precisa da corrente faradaica. Já nas técnicas de pulso essas desvantagens não existem e isto faz com que as mesmas apresentem maior sensibilidade que a técnica amperométrica [106].

As freqüências usadas em voltametria de onda quadrada permitem que experimentos possam ser realizados com velocidades cem vezes maiores ou

mais que nas técnicas de pulso, permitindo também uma maior sensibilidade que as demais técnicas [113].

Neste caso para a VOQ foi utilizada uma velocidade de 0,32 V s^{-1} e uma amplitude de pulso de 0,03 V, enquanto para a VPD foi utilizada uma velocidade de 0,035 V s^{-1} e uma amplitude de 0,05 V. De acordo com esses dados pode-se observar que na VOQ a velocidade de varredura foi muito superior a voltametria de pulso diferencial e que mesmo usando uma amplitude maior na VPD, como é o caso, a sensibilidade da VOQ foi superior.

Pelo exposto, os resultados apresentados na **Tabela IV.8** comprovam que dentre as três técnicas utilizadas a voltametria de onda quadrada foi a que apresentou melhor desempenho para fins quantitativos, sendo assim, uma nova curva analítica foi obtida para o *p*-nitrofenol iniciando-se de concentrações mais baixas do analito para posterior aplicação do sensor.

IV.1.5. Caracterização analítica do sensor para o *p*-nitrofenol

Com o objetivo de obter a curva analítica para o sensor desenvolvido, voltamogramas de onda quadrada foram realizados em diferentes concentrações de *p*-nitrofenol em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão acetato (**Figura IV.9a**). O gráfico da densidade de corrente *versus* concentração do analito é apresentado a seguir (**Figura IV.9b**).

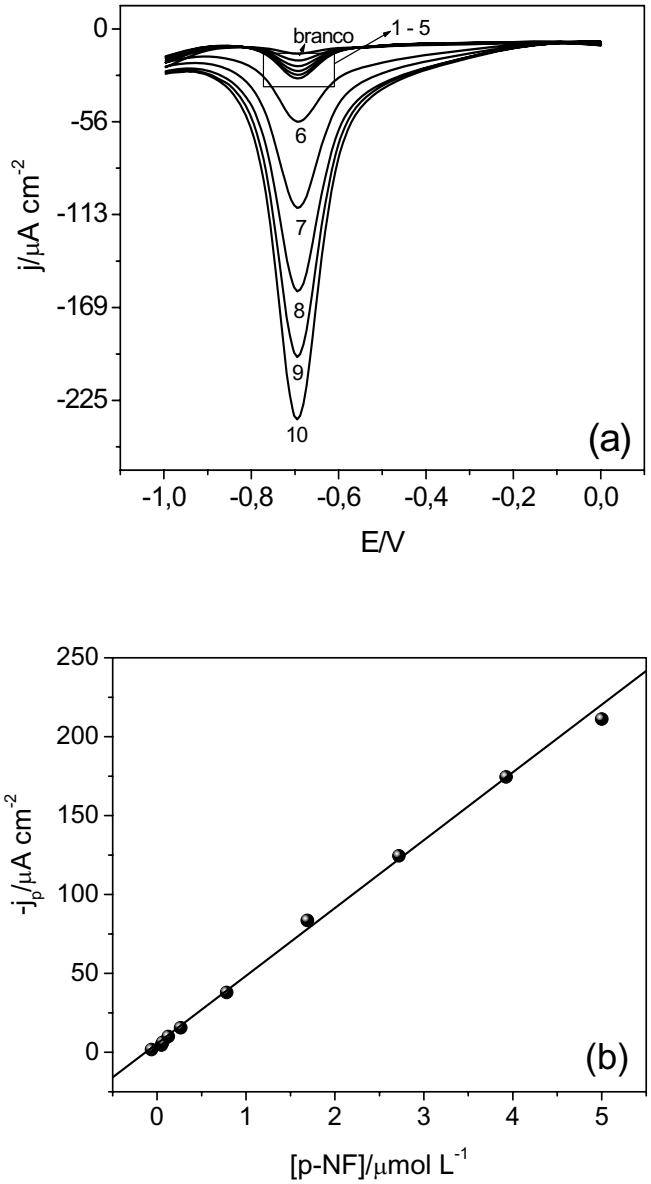

Figura IV.9: *(a) VOQ para a eletro-redução de p-NF obtidos nas condições otimizadas para as concentrações de: (1) 0,001; (2) 0,050; (3) 0,080; (4) 0,120; (5) 0,270; (6) 0,780; (7) 1,700; (8) 2,720;(9) 3,920 e (10) 5,000 μmol* L^{-1}*. (b) Gráfico da curva analítica.*

Nessas condições o sensor apresentou uma ampla faixa linear de resposta de 0,001 a 5 μmol L^{-1} (1,0 a 5000 nmol L^{-1}) (para n = 10) com coeficiente de 0,999, que pode ser expressa de acordo com a equação a seguir:

$$j_p / \mu A\ cm^{-2} = 6\ (\pm 2) + 43\ (\pm 1)\ [p\text{-NF}] / (\mu mol\ L^{-1}) \quad (6)$$

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados usando 3 x DP/*b* e 10 x DP/*b*, onde DP representa o desvio padrão para dez voltamogramas do branco e *b* o coeficiente angular da curva analítica, conforme as recomendações da IUPAC [114]. O desvio padrão para dez medidas do branco foi de 3,76 x 10^{-3} μA cm^{-3}, permitindo assim a obtenção de um LOD e LOQ de 0,3 e 1,0 nmol L^{-1}, respectivamente. Neste sentido, verificou-se que o sensor desenvolvido apresentou uma ampla faixa de resposta linear, uma alta sensibilidade e um baixo limite de detecção, os quais não são comumente observados para a determinação de *p*-nitrofenol empregando por exemplo, eletrodo modificado com *Moraxella* sp, *Arthrobacter* sp., zeólita, montmorilonita e antraquinona, eletrodo diamante dopado com boro [75-78,115] entre outros. Tal sensibilidade pode ser atribuída à eficiente transferência eletrônica entre o LiTCNE/PLL e o *p*-nitrofenol.

IV.1.6. Estabilidade e tempo de vida útil do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL

A estabilidade do sensor desenvolvido foi verificada na presença de 50 nmol L^{-1} de *p*-nitrofenol realizando-se sucessivos voltamogramas cíclicos. Após 200 medidas voltamétricas (**Figura IV.10**) nenhuma mudança foi observada no comportamento voltamétrico do eletrodo modificado. Além disto, quando o eletrodo foi armazenado em temperatura ambiente nenhuma mudança significativa na resposta do sensor foi observada por mais de sessenta dias (**Figura IV.11**).

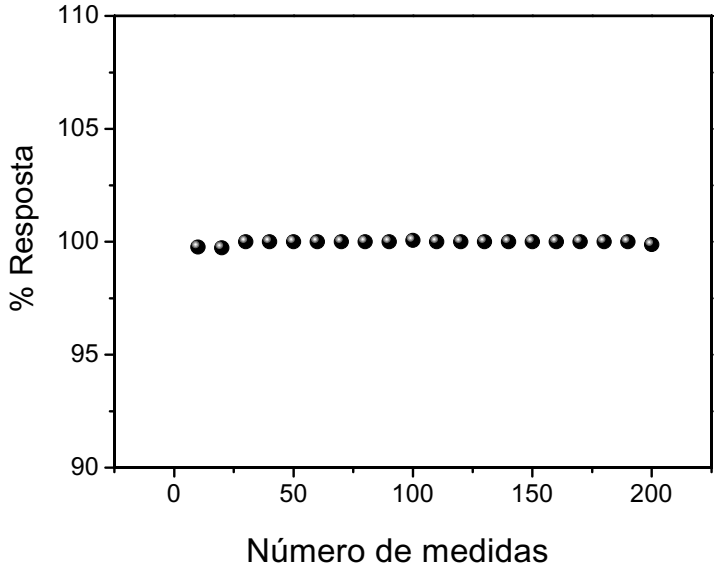

Figura IV.10: *Estabilidade operacional do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de p-NF em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0).*

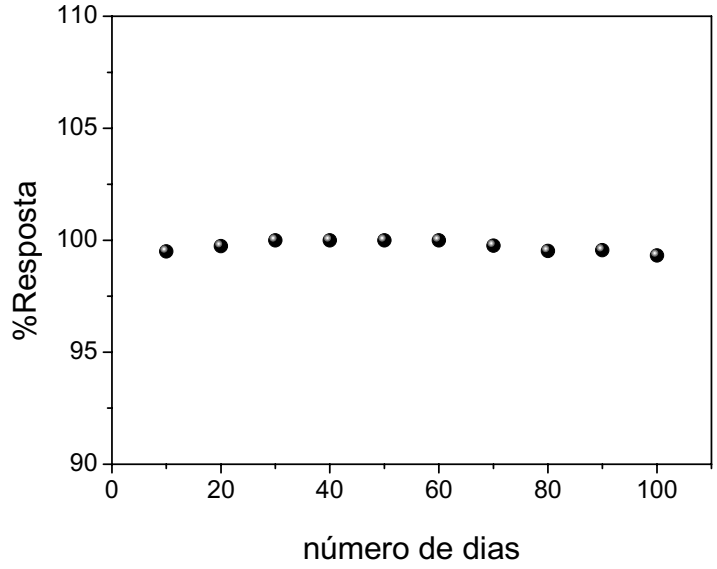

Figura IV.11: *Tempo de vida útil do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de p-NF em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0).*

IV.1.7. Repetibilidade das medidas e do preparo do sensor á base de LiTCNE/PLL

A repetibilidade das medidas foi verificada através das densidades de correntes de pico obtidas para 10 determinações de 50 nmol L^{-1} de *p*-nitrofenol em solução tampão acetato pH 4,0. O desvio padrão relativo da densidade de corrente de pico para as 10 determinações foi de 1,3% (**Tabela VI.9a**) o que mostra que o eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para a determinação de *p*-nitrofenol observado através do baixo desvio padrão.

Adicionalmente, uma série de 10 sensores foram preparados em dias diferentes, partindo-se do preparo de todas as soluções necessárias para a modificação do eletrodo, e testados em solução tampão acetato (pH 4,0) contendo 50 nmol L^{-1} de *p*-nitrofenol dando respostas com um desvio padrão relativo de 4,5% (**Tabela VI.9b**). Esses experimentos indicaram que os eletrodos modificados com o filme de LiTCNE/PLL apresentaram boa estabilidade e repetibilidade das medidas e do preparo dos sensores, provavelmente devido a simplicidade de modificação da superfície do eletrodo bem como habilidade da PLL em fixar o TCNE sobre a superfície do eletrodo em um caminho reprodutivo.

Tabela VI.9: *Estudo da repetibilidade do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL para 50 nmol L^{-1} de p-NF. Eletrólito: solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0). Freqüência= 80 s^{-1}; Amplitude= 0,03 V, ΔE=0,004 V.*

a) Medidas obtidas com o mesmo sensor num mesmo dia

Medidas	j_p/μA cm^{-2}
1	10,12
2	10,10
3	10,08
4	10,12
5	10,11
6	10,12
7	10,12
8	10,11
9	10,10
10	10,12
Média e DPR	10,1 (±1,3 %)

b) Medidas obtidas com o mesmo sensor preparado em dias diferentes

Medidas	j_p/μA cm^{-2}
1	10,11
2	10,05
3	10,12
4	10,07
5	10,00
6	9,99
7	10,07
8	10,03
9	10,08
10	10,11
Média e DPR	10,0 (4,5%)

IV.1.8. Estudo de interferentes para o *p*-nitrofenol

Tendo como objetivo a utilização do eletrodo modificado com LiTCNE para a determinação de *p*-nitrofenol em amostras de águas naturais a interferência de possíveis interferentes foi investigada. Para isto soluções de espécies interferentes foram preparadas no mesmo dia e nas mesmas condições usadas para a determinação de *p*-nitrofenol (solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 4,0). Para as medidas de interferência no sinal analítico foi

registrada a resposta do sensor para uma concentração de 50 nmol L^{-1} de *p*-nitrofenol e este sinal foi comparado com o sinal obtido para uma mistura de *p*-nitrofenol:interferente numa proporção 1:1 (**Tabela IV.10**).

Os valores apresentados na **Tabela IV.10** mostram que a recuperação para as espécies estudadas na solução contendo o *p*-nitrofenol variou entre 99,6 e 102%. Este estudo mostrou que os cátions Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{+}, Cu^{2+} e Fe^{3+} e os compostos fenólicos não apresentaram nenhuma interferência na determinação de *p*-nitrofenol nestas condições, o que pode ser atribuído à redução dessas espécies em potenciais mais ou menos negativos que o potencial de redução de *p*-nitrofenol sobre o eletrodo modificado com o complexo LiTCNE/PLL.

Tabela IV.10:. *Valores de recuperação obtidos com o sensor desenvolvido, para soluções de p-NF contendo espécies orgânica e inorgânicas na concentração de 50 nmol L^{-1}, em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1}, pH 4,0. f=80 s^{-1} e amplitude=0,05 V.*

Espécies interferentes	[*p*-NF] adicionado (nmol L^{-1})	[*p*-NF] encontrado (nmol L^{-1})	Recuperação %
Mn^{2+}	50	50,1 ±0,1	100,2 ±1,0
Zn^{2+}	50	49,9 ±0,3	99,8 ±0,9
Ni^{2+}	50	50,0 ±0,2	100,0 ±1,0
Cu^{2+}	50	50,3 ±0,1	100,6 ±1,0
Fe^{3+}	50	50,1 ±0,1	100,2 ±0,8
o-nitrofenol	50	51,8 ±0,2	103,6 ±1,0
Hidroquinona	50	50,5 ±0,1	101,0 ±1,2
p-cloro-*m*-metil-fenol	50	51,7 ±0,2	103,4 ±0,9
Catecol	50	49,8 ±0,3	99,6 ±1,1
p-aminofenol	50	50,4±0,1	100,8 ±0,8

IV.1.9. Considerações finais e figuras de mérito do sensor desenvolvido á base de LiTCNE/PLL

A faixa linear de resposta linear, a sensibilidade, os limites de detecção e quantificação do eletrodo modificado com LiTCNE/PLL para o nitrofenol merecem grande destaque pois são superiores aos demais sensores e/ou biossensores descritos na literatura [75-78,115]. Vale ressaltar que o emprego da poli-l-lisina para imobilização do catalisador foi uma simples e eficiente alternativa para o desenvolvimento do sensor.

Outro aspecto importante que merece destaque é a estabilidade do sensor, pois o mesmo pode ser reutilizado sem perda de resposta por pelo menos 200 determinações ou por mais de 60 dias mantendo-o em temperatura ambiente. Os demais sensores apresentaram baixa estabilidade verificada por um menor período de tempo de vida útil, principalmente os biossensores [75-79].

A repetibilidade das medidas e no preparo do sensor também são importantes para a obtenção de parâmetros confiáveis. Neste sentido o sensor á base de LiTCNE/PLL proporcionou repetibilidades inferiores a 5%, o que favorece sua aplicação em amostras reais. Neste contexto, para melhor visualização dos parâmetros analíticos construiu-se a **Tabela IV.11** para apresentação resumida das figuras de mérito do sensor desenvolvido**.**

Tabela IV.11: *Figuras de mérito para o sensor à base de LiTCNE/PLL.*

Parâmetros	Resultados
Faixa linear	1 nmol – 5 μmol L^{-1}
Sensibilidade	42,9 μA cm^{-2} L $μmol^{-1}$
Limite de detecção	0,3 nmol L^{-1}
Limite de quantificação	1,0 nmol L^{-1}
Estabilidade	mais de 200 medidas ou mais 2 meses
Repetibilidade das medidas	1,3%
Repetibilidade no preparo dos sensores	4,5%

IV.1.10. Aplicação do sensor à base de LiTCNE/PLL para análises de *p*-nitrofenol em águas naturais e testes de adição e recuperação

A maior fonte de contaminação por compostos fenólicos em águas naturais é através do despejo de efluentes industriais ou através do uso de pesticidas na agricultura. Dentre estes compostos o *p*-nitrofenol é um dos mais perigosos e tóxicos que pode causar danos significativos à saúde e ao meio ambiente. Por essa razão o sensor desenvolvido à base de LiTCNE/PLL foi aplicado para a determinação de *p*-nitrofenol em águas naturais.

As concentrações do analito nas amostras foram determinadas usando o método da adição de padrão para eliminar o efeito da matriz. A quantidade de *p*-nitrofenol determinada nas amostras são apresentados na **Tabela IV.12.**

Tabela IV.12: *Determinação de p-nitrofenol em amostras de águas naturais (n = 3).*

Amostras	Método proposto/nmol L^{-1}
A	12 (± 1)
B	11 (± 2)
C	20 (± 1)

*Valores obtidos considerando a diluição das amostras

De acordo com os valores apresentados na **Tabela IV.12** observa-se que o sensor conseguiu detectar uma concentração muito baixa de *p*-nitrofenol (cerca de 10^{-9} mol L^{-1}) as amostras analisadas apresentaram um baixo desvio padrão para as medidas, o que pode estar associado a uma boa reprodutibilidade e sensibilidade do método proposto. É importante ressaltar que a diretiva (80/778 EEC) [23] da Comunidade Econômica Européia determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de 0,5 mg L^{-1} (ou 3,6 μmol L^{-1}) e 0,1 mg L^{-1} (0,72 μmol L^{-1}) para fenóis individuais. Neste trabalho, os teores de *p*-nitrofenol encontrados nas amostras de águas foram inferiores a esse valor.

Adicionalmente, para checar a exatidão do método desenvolvido, experimentos de recuperação com base na adição de três quantidades conhecidas do analito às amostras: 10, 100 e 1000 nmol L^{-1}, com a finalidade de verificar a eficiência do sensor em diferentes faixas de concentração. (**Tabela VI.13**).

Tabela IV.13: *Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método proposto.*

Amostras	[*p*-NF] adicionado (nmol L^{-1})	[*p*-NF] esperada (nmol L^{-1})	[*p*-NF] encontrada (nmol L^{-1})	Recup. (%)
A*	10	22	23 (± 1)	104,5 (± 0,1)
	100	112	114 (± 5)	101,8 (± 0,1)
	1000	1012	1013 (± 3)	100,0 (± 0,3)
B*	10	21	21 (± 1)	100,0 (± 0,2)
	100	111	111 (± 3)	100,0 (± 0,1)
	1000	1011	999 (± 2)	98,8 (± 0,2)
C*	10	29	30 (± 1)	103,4 (± 0,3)
	100	120	119 (± 2)	99,2 (± 0,3)
	1000	1020	1030 (± 4)	100,9 (± 0,1)

A percentagem de recuperação foi calculada com base na seguinte equação:

%Recuperação=(concentração encontrada/ concentração esperada) x 100 (7)

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela IV.13** pode-se observar que para o sensor à base de LiTCNE/PLL consegue detectar uma ampla faixa de concentração partindo desde concentrações mais baixas (10 nmol L^{-1}) até concentrações maiores (1000 nmol L^{-1}).

O sensor permitiu também uma boa recuperação para a espécie estudada apresentando uma percentagem de recuperação entre 100 e 104,5 % para a

amostra A; 98,8 e 100,0% para a amostra B e, 99,2 e 103,4% para a amostra C, mostrando que o método desenvolvido apresenta uma boa exatidão para as amostras analisadas.

Adicionalmente, pode-se verificar que todas as amostras analisadas apresentaram baixos desvios padrão para as medidas (entre 1 e 2) mostrando a boa reprodutibilidade do método proposto para as replicatas.

IV.2. SENSOR PARA CATECOL À BASE DE $Cu(PHEN)_2(TCNQ)_2$/PLL

IV.2.1. Comportamento voltamétrico do catecol (CA) sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

A **Figura IV.12** mostra os voltamogramas cíclicos para o eletrodo não modificado (a) e o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)$/PLL na ausência (b) e presença (e) de 5 μmol L^{-1} de catecol empregando-se uma solução tampão Macllvaine, pH 7,0. Para comparação, os voltamogramas para o eletrodo não modificado (c) e modificado apenas com a PLL (d) na presença de catecol.

A **Figura IV.12a** apresenta o voltamograma referente à formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo solução. Quando o eletrodo foi modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)$/PLL (**Figura IV.12b**) foi observada um aumento na densidade de corrente na mesma região dos processos redox do catecol. Adicionalmente, o uso do complexo apresentou picos redox em uma faixa de potencial onde o TCNQ geralmente apresenta uma zona inerte [116]

indicando que o complexo apresenta um comportamento diferente daqueles observados para o TCNQ.

Os voltamogramas **12c** e **12d** mostram que as densidades de correntes de pico para o catecol foram similares, o que sugere que a PLL também não catalisa a reação de oxidação de catecol, bem como não dificulta a interação entre o analito e a superfície do eletrodo e não apresenta efeitos pré-concentrativos do analito na superfície do eletrodo.

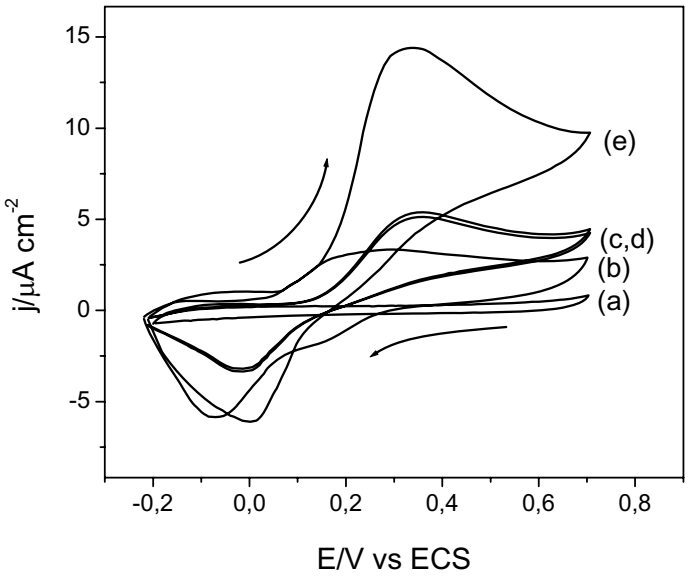

Figura IV.12: *Voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo não modificado (a) e o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ na ausência (b) e presença (e) de 5 μmol L^{-1} de catecol. Para comparação os voltamogramas cíclicos referentes ao eletrodo não modificado (c) e modificado apenas com PLL (d) na presença de 5 μmol L^{-1} de catecol. Experimentos conduzidos em solução tampão Macllvaine, 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0. v= 0,05 V s^{-1}.*

Já na presença de catecol (**Figura IV.12e**) um significativo aumento é observado na corrente de pico do analito em um potencial de 0,3 V onde é verificada alta densidade de carga para oxidação do complexo $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$. O aumento na corrente de pico anódica foi muito superior a corrente de pico observada no eletrodo de carbono vítreo não modificado na presença de catecol (**Figura IV.12c**), o que pode estar associado com o efeito da mediação do complexo $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ sobre a reação de oxidação do catecol.

IV.2.2. Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação de catecol

IV.2.2.1. Influência da concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e PLL na resposta do sensor

Com o objetivo de verificar a influência do complexo $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e da PLL na densidade de corrente do catecol, suas concentrações também foram estudadas. Inicialmente foram preparadas soluções contendo diferentes quantidades do complexo (0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 e 0,30 mmol L^{-1}) fixando-se uma concentração de 10 μmol L^{-1} de PLL **(Tabela IV.14)**.

Tabela VI.14: *Efeito da concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ na resposta do sensor usando-se uma concentração de PLL de 10 μmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de catecol. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine[1] (pH 7,0). Velocidade de varredura=0,05 V s^{-1}.*

$[Cu(phen)_2(TCNQ)_2]$/ mmol L^{-1}	j_p/μA cm^{-2}
0,05	9,75 (± 0,08)
0,10	10,12 (± 0,06)
0,15	14,20 (± 0,08)
0,20	10,12 (± 0,07)
0,25	9,05 (± 0,05)
0,30	8,54 (± 0,08)

A melhor resposta foi obtida usando-se uma solução de concentração de 0,15 mmol L^{-1} de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$. As membranas contendo concentrações de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ menores que 0,15 mmol L^{-1} apresentaram uma menor densidade de corrente, supostamente devido a uma menor concentração do complexo na superfície do eletrodo, ou seja, a concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ não foi suficiente para promover a total oxidação do catecol no eletrodo. Por outro lado, concentrações maiores que 0,15 mmol L^{-1} de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ apresentaram menores densidades de corrente, presumidamente devido a lixiviação deste uma vez que a concentração do polímero não foi suficiente para fixar totalmente o complexo. Então, a membrana preparada com uma solução de concentração 0,15 mmol L^{-1} de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ foi escolhida para o estudo da concentração de PLL.

Na etapa seguinte a influência da concentração de PLL foi investigada conforme pode ser observado na **Tabela VI.15**. , a melhor resposta para o sensor foi obtida com uma concentração de 15,0 μmol L^{-1} de PLL.

Tabela VI.15: *Efeito da concentração de PLL na resposta do sensor usando-se uma concentração de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ de 0,15 mmol L^{-1} e 5 μmol L^{-1} de catecol. Medidas conduzidas nas mesmas condições da* ***Tabela VI.14***.

[PLL]/μmol L^{-1}	j_p/μA cm^{-2}
5	12,57 (± 0,10)
10	14,32 (± 0,08)
15	16,00 (± 0,07)
20	15,60 (± 0,06)
25	14,55 (± 0,08)
30	13,98 (± 0,09)

Quando concentrações de PLL inferiores a 15 μmol L^{-1} foram usadas verificou-se uma diminuição sucessiva nas correntes de pico durante os ciclos de potencial e uma menor resposta elétrica foi observada. Tal comportamento sugere que o complexo $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ lixivia da superfície do eletrodo devido a insuficiente concentração de PLL usada. Entretanto, o uso de concentrações maiores que 15 μmol L^{-1} resultou em menores respostas, devido provavelmente a barreira gerada pelo filme polimérico à molécula eletroativa em solução. Então, o sensor preparado usando soluções de PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ nas concentrações 15 μmol L^{-1} e 0,15 mol L^{-1}, respectivamente, foram usadas para um melhor desempenho do sensor.

IV.2.2.2. Influência do pH, solução tampão e concentração da solução tampão sobre a densidade de corrente do catecol

Para o estudo do pH utilizou-se uma solução de 5 μmol L^{-1} de catecol em uma solução tampão Macllvaine 0,1 mol L^{-1}. A **Figura IV.13** mostra a influência do pH sobre a densidade de corrente de pico do catecol e do seu potencial de pico de oxidação, respectivamente. Os valores de pH utilizados foram de 3,0 a 9,0.

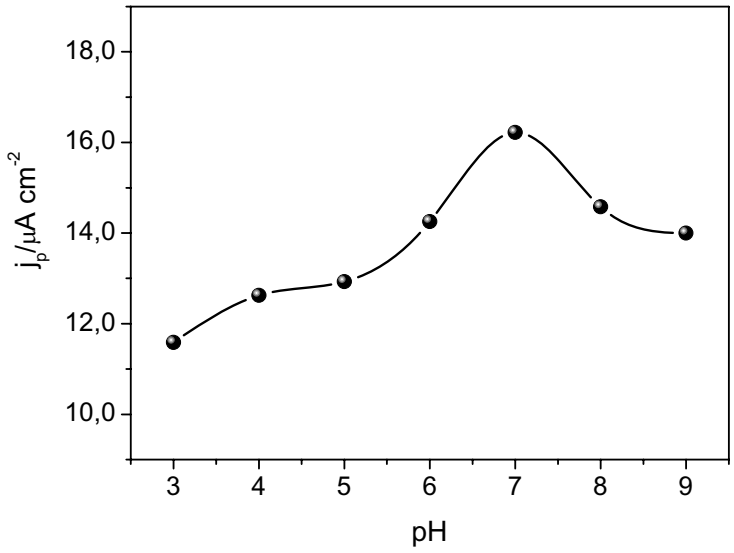

Figura IV.13: *Influência do pH sobre a resposta do sensor. Medidas conduzidas em 0,1 mol L^{-1} de solução tampão Macllvaine; v= 0,05 V s^{-1}.*

De acordo com a **Figura IV.13** observa-se que quanto menos ácido o meio, maior vai ser a resposta do eletrodo até que o pH 7 seja alcançado. Por outro lado, para valores de pH maiores que 7 observa-se que a densidade de corrente de pico é reduzida. O pK_a da PLL é em torno de 10 quando a mesma encontra-se livre em solução e a sua forma randômica (forma predominante) pode sofrer uma mudança na estrutura conformacional a qual pode ser sentida

ou observada a partir do pH 8,5. No entanto, quando o polímero encontra-se imobilizado essa mudança na sua estrutura pode ser observada a partir do pH 7, ou seja, o polímero passa da conformação randômica para as conformações α e β [117] dificultando assim a chegada do analito à superfície do eletrodo. Baseado nestas considerações escolheu-se o pH 7,0 para os demais estudos.

Figura IV.14 mostra a relação entre o potencial de pico anódico do catecol e o pH. Nesta figura verifica-se uma relação linear entre o potencial de pico do catecol e o pH (de 3 a 9). O coeficiente angular do gráfico foi 0,06 V/pH, sendo muito próximo ao valor obtido para um sistema nersntiano [0,0592 (n_p/n_e)] V/pH, onde $n_p=n_e$ (n_p= número de prótons; n_e número de elétrons). [104] o que sugere que o número de prótons é igual ao número de elétrons para o processo de oxidação do catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL.

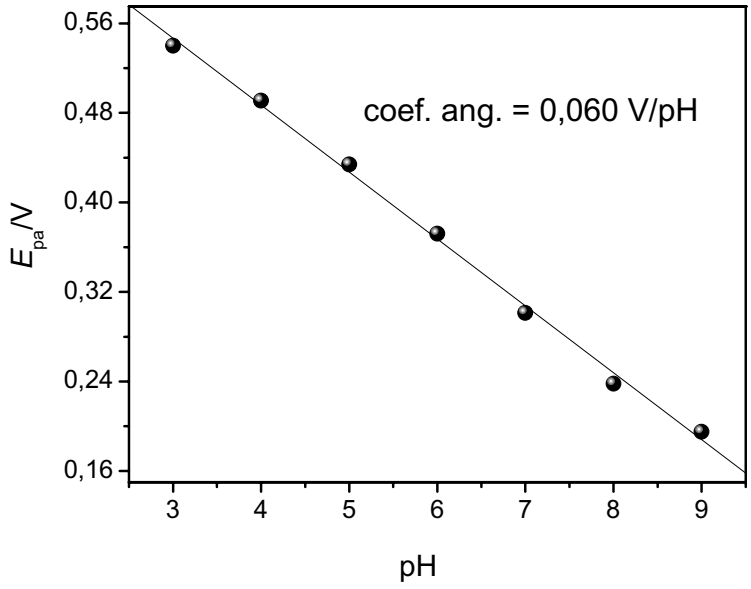

Figura IV.14: *Influência do pH sobre a resposta do sensor. Medidas conduzidas em solução tampão Macllvaine; 0,1 mol* L^{-1}*, v= 0,05 V* s^{-1}.

Para a realização do estudo da solução tampão foram testados as soluções tampões MacIlvaine, fosfato, Tris and Hepes numa concentração de 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0, conforme mostrado na **Tabela IV.16.**

Tabela VI.16: *Influência da solução tampão 0,1 mol L^{-1}, (pH 7) sobre a densidade de corrente obtida para 5 μmol L^{-1} de catecol. v= 0,05 V s^{-1}.*

Solução tampão	j_p/μA cm^{-2}
Macllvaine	16,00 (± 0,10)
Fosfato	17,80 (± 0,06)
Pipes	11,23 (± 0,08)
Hepes	9,92 (± 0,08)

Os resultados inidicam que a solução tampão fosfato apresenta melhor densidade de corrente de pico, enquanto que os demais tampões apresentaram menores respostas. Conforme pode ser observado, os tampões Pipes e Hepes foram as soluções que apresentaram menores resultados o que pode estar associado à maior estrutura dos ânions que fazem parte das estruturas destes tampões de forma que tenham dificultado a chegada do analito à superfície do eletrodo sendo atraídos pelo grupo -NH_3^+ da PLL, o que não foi observado para as solução fosfato e Macllvaine. Sendo assim, como a solução tampão fosfato apresentou uma resposta um pouco melhor que a solução Macllvaine, esta então foi escolhida para o estudo da concentração da solução tampão.

Finalmente, a **Tabela VI.17** apresenta os resultados obtidos para as medidas conduzidas em diferentes concentrações de solução tampão fosfato. De acordo com esta tabela as melhores respostas foram obtidas entre 0,1 e 0,2

mol L^{-1} e, neste sentido, optou-se pelo uso da concentração 0,1 mol L^{-1} para os experimentos posteriores.

Tabela VI.17: *Influência da concentração da solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, sobre a densidade de corrente de pico obtida VC com o sensor para 5 μmol L^{-1} de catecol. v= 0,05 V s^{-1}.*

[Solução tampão] / mol L^{-1}	j_p / μA cm^{-2}
0,025	15,76 (± 0,10)
0,05	16,34 (± 0,09)
0,10	17,82 (± 0,10)
0,15	17,80 (± 0,07)
0,20	17,83 (± 0,09)

IV.2.2.3 Estudos sobre o mecanismo de redução de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

Informações adicionais sobre a oxidação de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL também foram obtidas nas condições otimizadas pela análise das densidades de correntes dos voltamogramas.

Neste contexto, como foi verificado por Andrieux e Sevéant [105] que num sistema catalítico a corrente catalítica é dependente da velocidade de varredura, inicialmente, um gráfico da densidade de corrente de pico j_p *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura $v^{1/2}$ foi construída resultando numa

reta (**Figura IV.15a**), sugerindo que o processo de oxidação de catecol sobre o eletrodo modificado é controlado pelo transporte de massa. Como pode ser observado nesta figura a corrente de pico foi dependente da velocidade de varredura, como esperado para um processo irreversível. O segundo gráfico plotado foi o gráfico da razão entre a densidade de corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura ($j_p/v^{1/2}$) *versus* a velocidade de varredura **(Figura IV.15b)** e verificou-se que o sistema exibe um comportamento característico de um processo EC_{cat} (eletroquímico-químico catalítico) sugerindo a existência de uma reação química acoplada [107] no mecanismo de oxidação do catecol.

Como a densidade de corrente de pico do catecol é dependente da velocidade de varredura, como esperado para um sistema irreversível, então, o número de elétrons, n, envolvido na reação global também pode ser obtido a partir do coeficiente angular do gráfico de j_p vs $v^{1/2}$ de acordo com a equação utilizada para um sistema totalmente irreversível controlado por difusão [106]:

$$j_p=(2{,}99 \times 10^5)\,(1-\alpha n_a)^{1/2} n A Co^* D_o^{1/2} v^{1/2} \qquad (8)$$

O coeficiente angular deste gráfico (55,42 $\mu A\ cm^{-2}/(V\ s^{-1})^{1/2}$) foi usado para determinar o número total de elétrons (*n*) envolvidos na reação de oxidação de catecol sobre o eletrodo modificado. O coeficiente de difusão usado foi de $7{,}0 \times 10^{-6}\ cm^2\ s^{-1}$ [118].

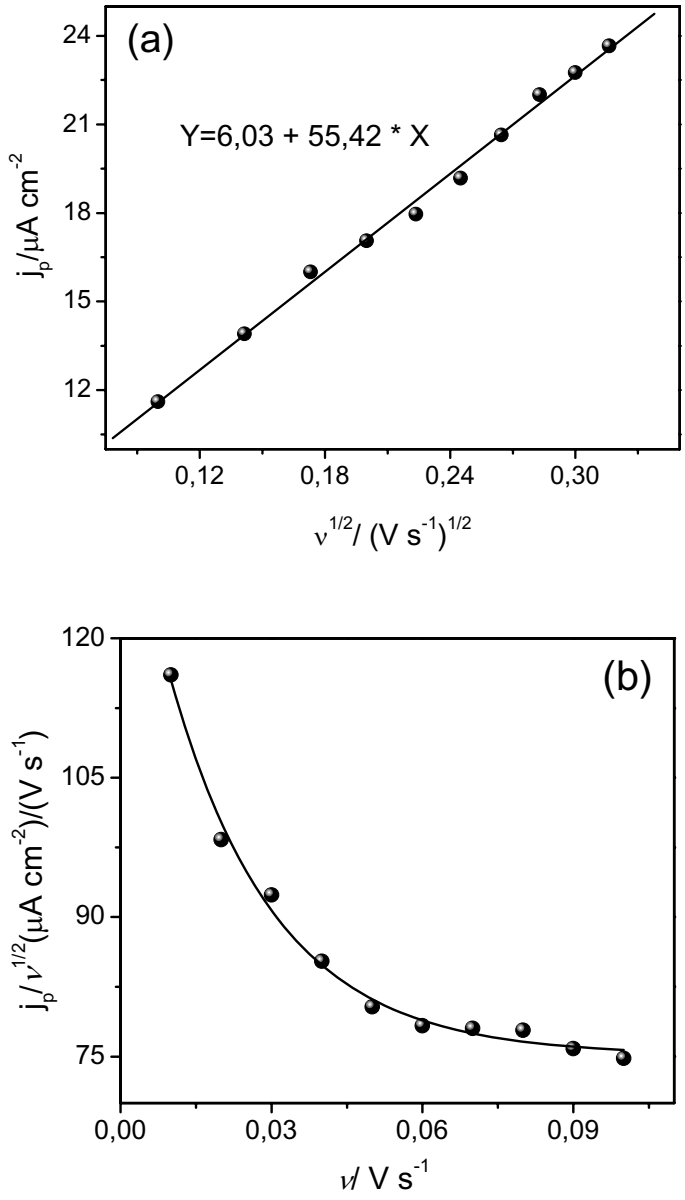

Figura IV.15: *(a) Gráfico da densidade de corrente de pico versus raiz quadrada da velocidade de varredura para o catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0. (b) Gráfico de $j_p/v^{1/2}$ vs V s^{-1}.*

O método usado para obter o valor de 1-αn_a para a oxidação de catecol foi baseado na forma do voltamograma e potencial de pico como uma função da velocidade de varredura de acordo com a equação [106]:

$$1\text{-}\alpha n_a = 47{,}7 \text{ mV} / (E_p - E_{p/2}) \quad (9)$$

onde E_p é potencial de pico (anódico) e $E_{p/2}$ é potencial da metade da corrente de meio pico. Usando o valor de αn_a obtido com esta equação (0,60) e o coeficiente angular do gráfico da **Figura IV.15a** na equação (2) foi possível calcular um valor para n igual a 1,97, sugerindo que o mecanismo de transferência eletrônica para a oxidação de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL envolve 2 elétrons de acordo com a seguinte reação global:

$$\underset{\text{catecol}}{C_6H_4(OH)_2} \longrightarrow \underset{\text{quinona}}{C_6H_4O_2} + 2H^+ + 2e^- \quad (10)$$

Na etapa seguinte, experimentos utilizando um eletrodo com disco rotativo foram conduzidos com o objetivo de fornecer mais informações sobre os processos de oxidação do catecol sobre o eletrodo modificado. Este eletrodo funciona num regime de convecção forçada, cuja vantagem é o aumento do transporte das espécies eletroativas para o eletrodo, conduzindo a maiores correntes. O eletrodo modificado em sistema rotativo foi utilizado para investigar a cinética da reação de catecol sobre o eletrodo.

Neste sentido, após a obtenção das curvas de polarização realizadas em diferentes velocidades de rotação (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 rpm), diferentes concentrações de catecol (100, 200, 300, 400, 500 e 600 μmol L^{-1}), em solução de tampão fosfato (pH 7,0) e uma velocidade de

varredura de 0,005 V s^{-1}, foi possível a obtenção do gráfico de Levich **(Figura IV.16a)** e Koutecky-Levich **(Figura IV.16b)**.

De acordo com a **Figura IV.16a**, as densidades de correntes limites obtidas sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL aumentam com a velocidade de rotação e o desvio da linearidade deste gráfico indica que além da densidade de corrente difusional existe a predominância da corrente cinética, ou seja, a transferência eletrônica (reação química) também limita os processos de redução do catecol. Neste caso, as densidades de corrente-limite j_{lim} resultantes, obtidas para as reações mediadas, são o somatório entre as densidades de correntes Levich (j_{Lev}) e as densidades de correntes cinéticas (j_k), conforme a equação (5) [106].

$$\frac{1}{j_{\text{lim}}} = \frac{1}{\text{nFCok}\Gamma} + \frac{1}{0{,}62\text{nFD}^{2/3}\nu^{1/6}C_o\omega} \quad (5)$$

Com base na equação Q/nFA um valor para Γ=1,19 x 10^{-9} (± 0,09) mol cm^{-2} foi obtido pela equação a partir da carga do voltamograma do eletrodo modificado na ausência do modificador.

De acordo com a equação de Kouteky-Levich o gráfico de j^{-1} *vs* $\omega^{-1/2}$ fornece uma reta para todas as concentrações utilizadas (**Figura VI.16b**) e pelos interceptos e coeficientes angulares deste gráfico foi possível determinar os valores de *k* e D_o, respectivamente. Assim, os valores de *k e* D_o para as diferentes concentrações de catecol foram 1,3 x 10^6 (± 0,1) mol^{-1} cm^{-3} s^{-1} e 7,6 x 10^{-6} (± 0,2) cm^2 s^{-1}, respectivamente. É importante ressaltar que o valor para o coeficiente de difusão encontrado para o catecol foi muito próximo ao valor usado na literatura (7,0 x 10^{-6} cm^2 s^{-1}) [118].

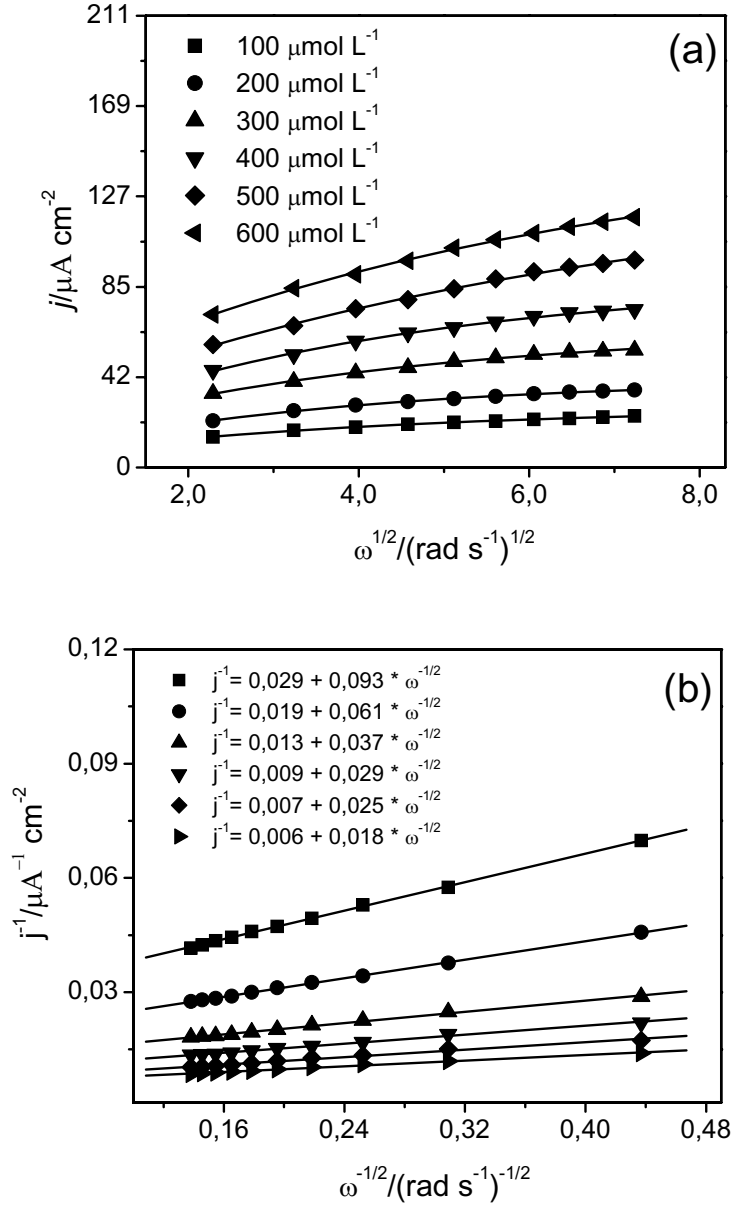

Figura VI.16: (*a) Gráfico de Levich e (b) Koutecky-Levich para a oxidação de CA sobre o eletrodo modificado com* $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$*/PLL. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol* L^{-1} *(pH 7,0).* $v=0{,}005\ V\ s^{-1}$.

As médias dos valores das constantes da velocidade da reação também foram superiores aos valores encontrados na literatura para catecolamina utilizando eletrodos modificados [119,120], uma vez que não foi encontrado nenhum trabalho na literatura onde os autores tenham calculado o valor de k para o catecol. Adicionalmente, a média dos coeficientes de difusão da espécie em solução determinado pelo coeficiente angular do gráfico de Koutecky-Levich está de acordo com o valor encontrado na literatura.

IV.2.2.4. Otimização dos parâmetros operacionais para a determinação de catecol empregando a amperometria, Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

IV.2.2.4.1 Amperometria

Para as medidas amperométricas estudou-se a dependência do potencial sobre a resposta do sensor de 0,10 a 0,80 V utilizando-se até 0,7 μmol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato, 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0.

Conforme mostrado na **Tabela VI.18,** pode ser observado que o sensor apresenta um maior variação de corrente elétrica em 0,3 V e mantêm-se constante até 0,80 V. Este comportamento pode estar associado com o controle da corrente elétrica pelo transporte de massa por meio de difusão das espécies. Deste modo 0,30 V foi escolhido como potencial ótimo de trabalho.

Tabela VI.18: *Influência do potencial aplicado sobre a resposta do sensor para até 0,7 μmol L^{-1} de catecol, obtida em solução tampão fosfato, 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0.*

$E_{aplicado}$ / V vs SCE	0,10	0,20	0,30	0,40	0,60	0,70	0,80
Δj / μA cm^{-2}	0,52	0,89	2,22	2,24	2,25	2,23	2,25

Após a otimização do potencial aplicado para a construção da curva analítica realizou-se adições sucessivas do analito na solução eletrolítica partindo-se da concentração 0,2 μmol L^{-1} e posteriormente adicionando-se adições seqüenciais de 0,1 μmol L^{-1} de catecol (**Figura VI.17a**).

Apartir dos deltas de densidades de corrente obtidos para cada adição e, considerando apenas o eletrodo modificado na ausência de analito (branco), foi possível obter uma relação linear entre as densidades de corrente e a concentração de catecol adicionada na célula eletroquímica conforme observado na **Figura VI.17b.**

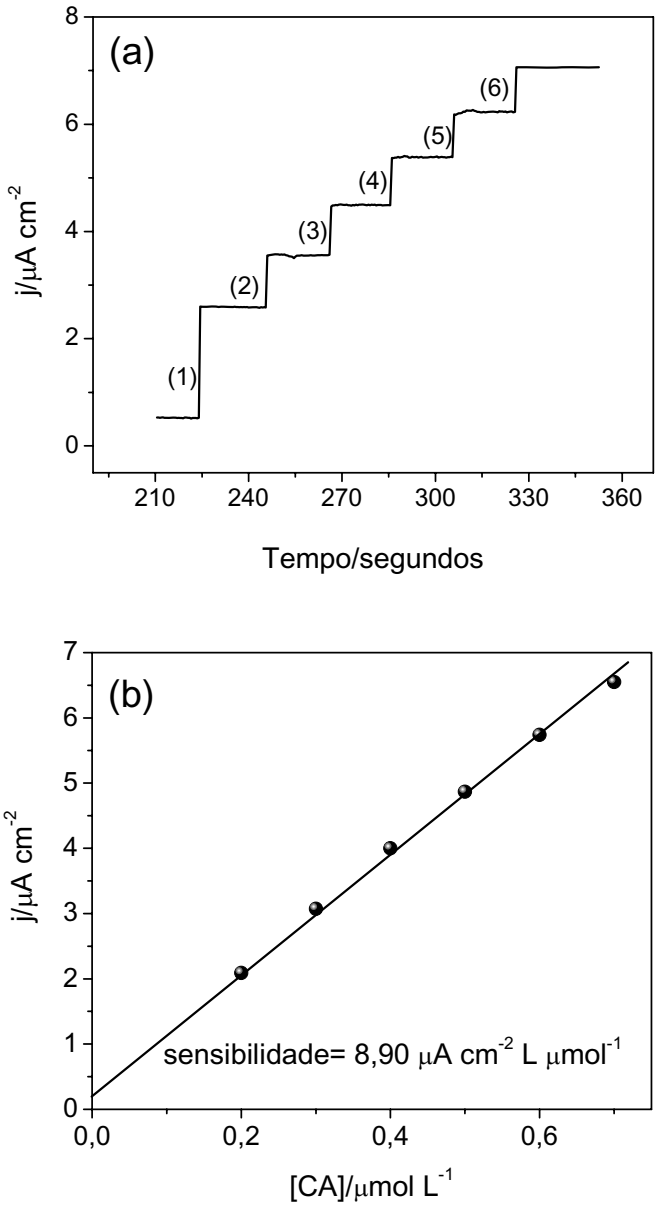

Figura VI.17: *(a) Amperograma para catecol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica. Experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).*

IV.2.2.4.2 Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Os experimentos de voltametria de pulso diferencial foram conduzidos em solução tampão fosfato, pH 7,0, contendo 0,7 μmol L^{-1} de catecol, ou seja, nas condições experimentais.

Nesta técnica variou-se a velocidade de varredura e amplitude de pulso (**Tabela IV.19a e IV.19b)** como descrito para o *p*-nitrofenol.

Tabela VI.19a: *Influência da velocidade de varredura sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato, pH 7,0, com amplitude de 0,050 V.*

Velocidade/V s^{-1}	0,005	0,020	0,030	0,040	0,050
j_p/μA cm^{-2}	0,80	1,51	2,03	3,52	3,53

Tabela VI.19b: *Influência da amplitude de pulso sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol. Experimento realizado nas mesmas condições da* ***Tabela VI.19a.***

Amplitude/V	0,030	0,040	0,05	0,06	0,08
j_p/μA cm^{-2}	3,22	3,75	4,23	3,69	3,60

De acordo com a **Tabela VI.19a**, a densidade de corrente de pico do catecol alcançou um máximo em 0,04 V s^{-1} mantendo-se constante até 0,05 V s^{-1}. Adicionalmente, observou-se que após a velocidade de 0,04 V s^{-1} os voltamogramas foram acompanhados por distorção e alargamento dos picos, por isso a velocidade de 0,04 V s^{-1} foi escolhida para os demais estudos. Em seguida variou-se a amplitude de potencial de 0,03 a 0,08 V (**Tabela VI.19b**). Neste estudo verificou-se que a maior densidade de corrente para o catecol foi obtida a partir de 0,05 V, por outro lado, amplitudes maiores 0,05 V também apresentaram alterações nos perfis voltamétricos. Por este motivo uma velocidade de 0,04 V s^{-1} e uma amplitude de 0,05 V foram utilizadas para a construção da curva analítica. Sendo assim, sob essas condições operacionais construiu-se a curva analítica através de sucessivas adições de catecol na solução eletrolítica conforme apresentado na **Figura VI.18.**

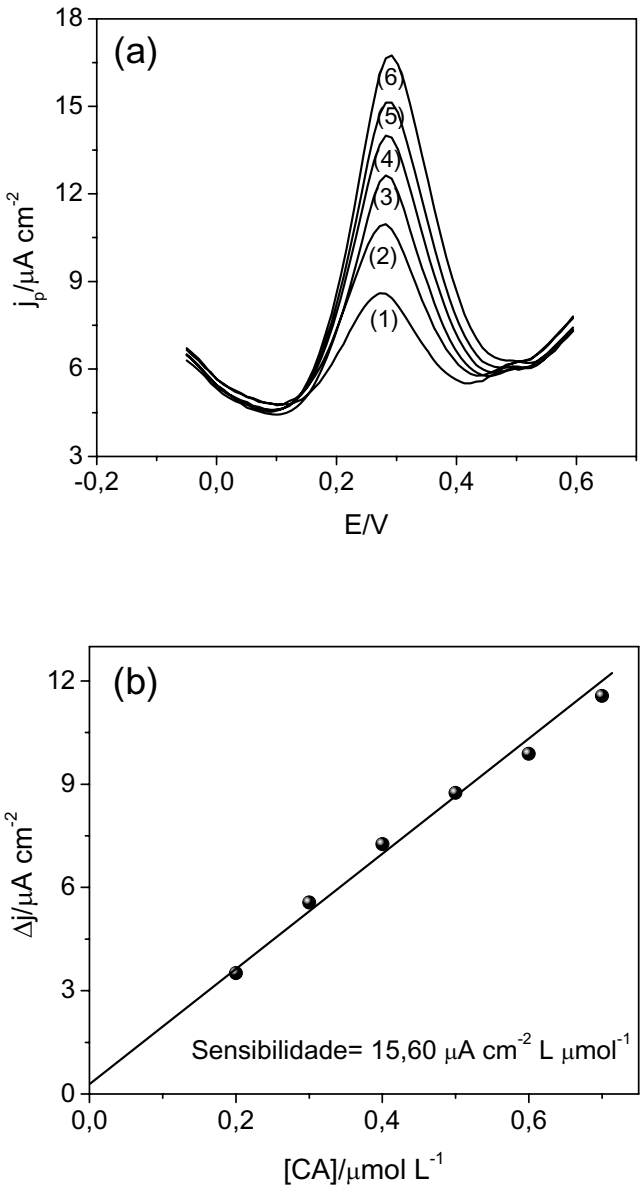

Figura VI.18: *(a) Voltamogramas de pulso diferencial para o catecol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica.*

IV.2.2.4.3 Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

Sob as condições experimentais otimizadas (tampão fosfato, pH 7,0) foram variadas a freqüência e a amplitude utilizando um incremento de potencial (ΔE_i) de 0,004 V.

As **Tabela VI.20a e VI.20b** mostram as densidades de correntes para diferentes valores de freqüência e amplitude respectivamente.

Tabela VI.20a: *Efeito da frequência sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol sobre o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL em 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato, pH 7,0, com a=0,05 V.*

Freqüência/s^{-1}	20	30	40	60	80	100	120
$-j_p$/μA cm^{-2}	12,03	14,25	16,42	18,03	18,02	18,05	15,40

Tabela VI.20b: *Efeito da amplitude sobre a densidade de corrente de pico para 0,7 μmol L^{-1} de catecol com f=60 s^{-1}. Experimento conduzido nas mesmas condições da* ***Tabela VI.20a.***

Amplitude/V	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
$-j_p$/μA cm^{-2}	15,4	16,39	17,00	18,05	18,04

De acordo com a **Talela VI.20a** verifica-se que entre as freqüências 60 e 100 s^{-1} as densidades de correntes de pico do catecol alçaram valores máximos e constantes, no entanto, em 120 s^{-1} houve uma diminuição significativa na resposta do sensor e os voltamogramas foram acompanhados por alargamento e distorção dos picos. Sendo assim optou-se em manter uma freqüência de 60 s^{-1}.

Na **Tabela VI.20b** observa-se que a densidade de corrente de pico alcançou um máximo e se manteve constante a partir de 0,04 V. Em amplitudes maiores que 0,04 V os voltamogramas também foram acompanhados por distorção e alargamentos dos picos, portanto a mesma foi utilizada para a construção da curva analítica apresentada a seguir:

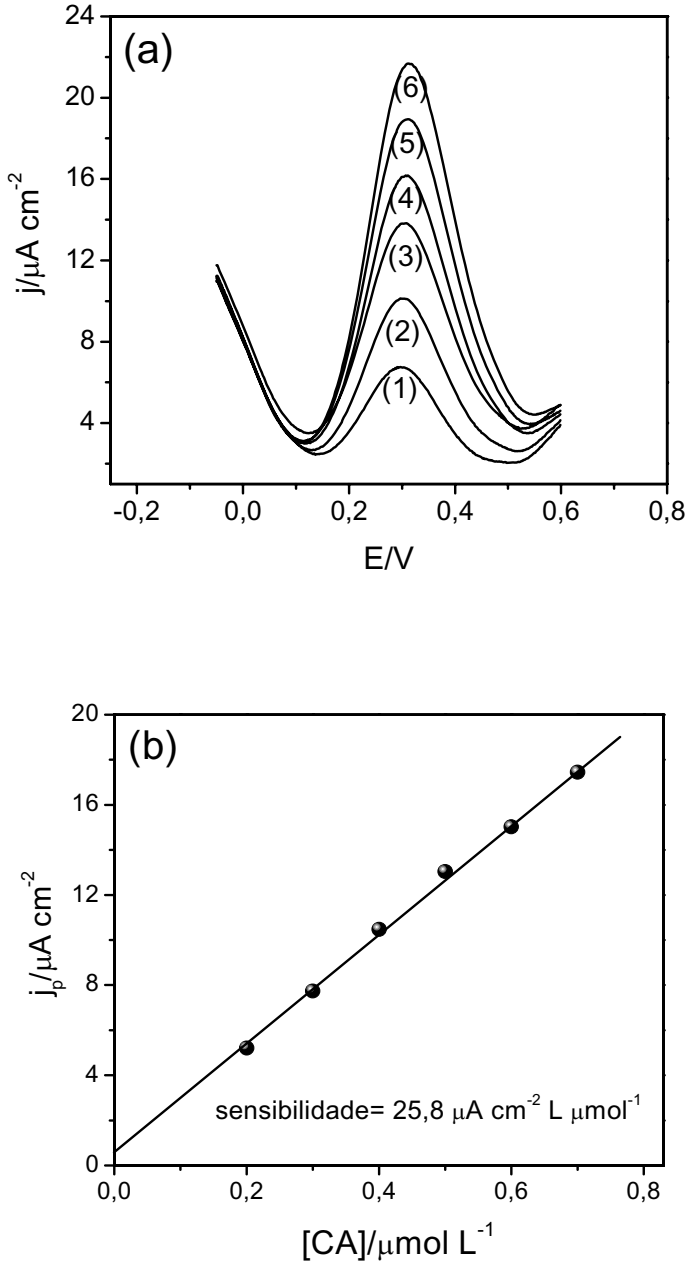

Figura VI.19: *(a) Voltamogramas de onda quadrada para o catecol nas concentrações: (1) 0,2, (2) 0,3, (3) 0,4, (4) 0,5, (5) 0,6 e (6) 0,7 μmol L^{-1} e (b) curva analítica.*

As sensibilidades obtidas através das curvas analíticas para o catecol são apresentadas na **Tabela VI.21**.

Tabela VI.21: *Sensibilidades obtidas através da curva analítica para o catecol empregando o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL.*

Técnica	Sensibilidade/μA cm^{-2} L μmol^{-1}
Amperometria	8,90
VPD	15,69
VOQ	25,60

A melhor sensibilidade também foi obtida empregando-se a voltametria de onda quadrada devido o uso de alta velocidade de varredura (0,24 V s^{-1}) aumentando assim a sensibilidade da técnica. Sendo assim, partiu-se para a caracterização analítica do sensor para sua posterior aplicação.

IV. 2.5. Caracterização analítica do sensor para catecol

Para a construção de uma nova curva analítica para o catecol, sob as condições experimentais e operacionais otimizadas, voltamogramas de onda quadrada foram obtidos após a adição de diferentes concentrações do analito à célula eletroquímica contendo o eletrólito (**Figura VI.12a**). O gráfico da densidade de corrente *versus* concentração do analito também é apresentado (**Figura VI.12b**):

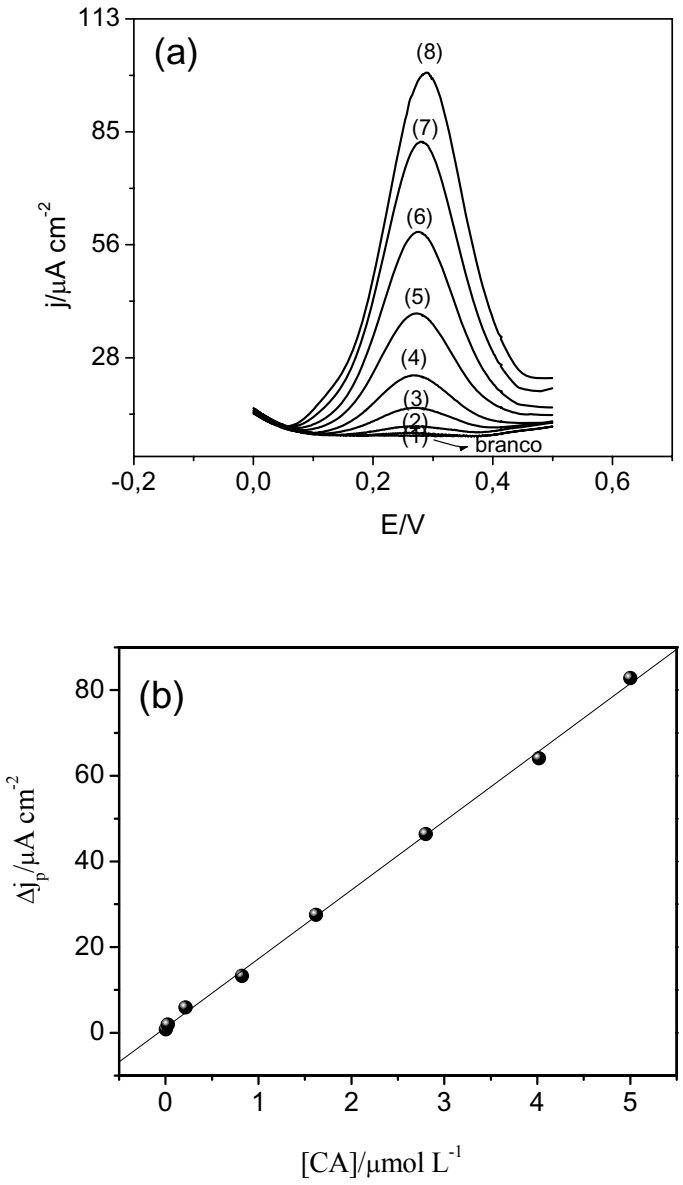

Figura VI.20: *(a) VOQ para a eletro-oxidação de catecol obtidos nas condições otimizadas para as concentrações de: (1) 0,005; (2) 0,025; (3) 0,216; (4) 0,820; (5) 1,620; (6) 2,800; (7) 4,020 e (8) 5,000 μmol* L^{-1} *. (b) Gráfico da curva analítica. f=60* s^{-1} *e A=0,04 V.*

Nessas condições foi possível obter um sensor com uma ampla faixa linear de resposta de 0,005 a 5 μmol L^{-1} (5 a 5000 nmol L^{-1}) (para n = 8) com coeficiente de 0,999, que pode ser expressa de acordo com a equação a seguir:

$$j_p / \mu A\ cm^{-2} = 1,0\ (\pm\ 0,6) + 16,1\ (\pm\ 0,2)\ [catecol] / (\mu mol\ L^{-1}) \quad (10)$$

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) também foram determinados conforme as recomendações da IUPAC [114]. O desvio padrão para dez medidas do branco foi de 8,05 10^{-3} μA cm^{-2}, sendo obtido os valores de 1,5 e 5,0 nmol L^{-1}, para o LOD e LOQ, respectivamente. Com estes resultados, verificou-se que o sensor desenvolvido também apresentou uma ampla faixa de resposta linear, alta sensibilidade e um baixo limite de detecção, os quais não são comumente obtidos para a determinação de catecol empregando, por exemplo, eletrodos modificados com a enzima tirosinase imobilizada em poli(anilina-co-aminofenol) [121], poli(tionina) [122], poli(pirrol) [123], monocamada auto-organizada do ácido 3-mercaptopropiônico [80], poli(dicarbazol) [124], mistura de tirosinase-DNA [125], lacase [126], poli(pirrol/β-ciclodextrina) [127], tetra-(N-metil-4-piridil) porfirina de ferro imobilizada em membrana de nafion [119] e a ftalocianina de cobre imobilizada em pasta de carbono [128]. A alta sensibilidade também foi atribuída à eficiente transferência eletrônica entre o complexo $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e o catecol.

IV.2.6. Estabilidade e tempo de vida útil para o eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

A estabilidade do sensor desenvolvido foi checada na presença de 50 nmol L^{-1} de catecol realizando-se sucessivos voltamogramas. Após 200 medidas voltamétricas (**Figura VI.21**) nenhuma mudança foi observada no comportamento voltamétrico do eletrodo modificado. Quando o eletrodo foi estocado em temperatura ambiente nenhuma mudança significativa na resposta do sensor foi observada por mais de sessenta dias (**Figura VI.22**).

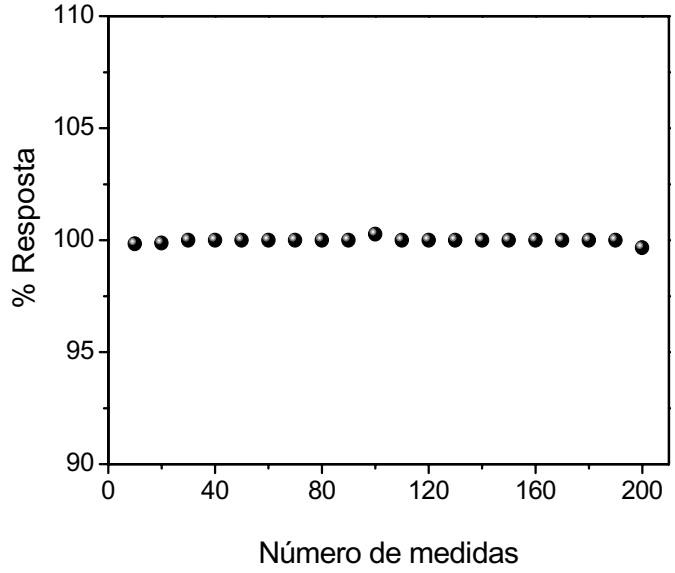

Figura VI.21: *Estabilidade operacional do eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).*

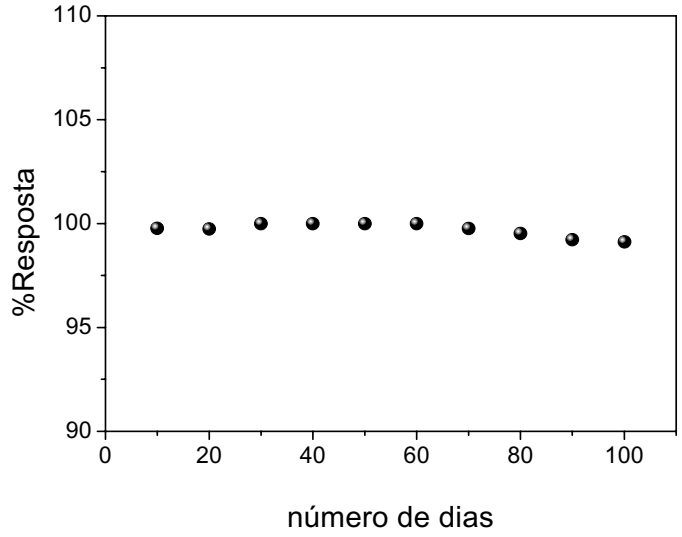

Figura VI.22: *Tempo de vida útil do eletrodo modificado Cu(phen)$_2$(TCNQ)$_2$/PLL. Resposta obtida em 50 nmol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0).*

IV.2.7. Repetibilidade das medidas e do preparo do sensor à base de Cu(phen)$_2$(TCNQ)$_2$/PLL

O eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para a determinação de catecol. O desvio padrão relativo da corrente de pico para 10 determinações de 50 nmol L^{-1} de catecol foi de 1,1% (**Tabela VI.22a**). Adicionalmente, uma série de 10 sensores foram preparados em dias diferentes e testados em solução tampão fosfato (pH 7,0) contendo 10 μmol L^{-1} de catecol dando respostas com um desvio padrão relativo de 2,4% (**Tabela VI.22b**). Esses experimentos indicaram que os eletrodos modificados com o filme de Cu(phen)$_2$(TCNQ)$_2$/PLL apresentaram boa estabilidade,

repetibilidade para as medidas e repetibilidade no preparo do sensor, provavelmente devido a forte adsorção de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ e PLL sobre a superfície do eletrodo em um caminho reprodutivo.

Tabela VI.22: *Estudo da repetibilidade do eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL para 50 nmol L^{-1} de catecol. Eletrólito: solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Freqüência= 60 s^{-1}; Amplitude= 0,04 V, ΔE=0,002 V.*

a) Medidas obtidas com o mesmo sensor num mesmo dia

Medidas	j_p/μA cm^{-2}
1	5,15
2	5,13
3	5,12
4	5,15
5	5,14
6	5,13
7	5,15
8	5,14
9	5,15
10	5,15
Média e DPR	5,1 (±1,1 %)

b) Medidas obtidas com o mesmo sensor preparado em dias diferentes

Medidas	j_p/μA cm^{-2}
1	5,17
2	5,10
3	5,15
4	5,16
5	5,12
6	5,15
7	5,14
8	5,11
9	5,15
10	5,17
Média e DPR	5,1 (±2,4%)

IV.2.8. Estudo de interferentes para o catecol

O estudo de interferência também foi realizado para o catecol com o objetivo de verificar quais as espécies que interferem na determinação de catecol mediante o emprego do eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$.

Para isto soluções de espécies interferentes comumente encontradas em plantas foram preparadas no mesmo dia, nas mesmas condições realizadas para a determinação de catecol (solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0). Para as medidas de interferência analítica, o sinal para uma concentração de 50 nmol L^{-1} de catecol foi registrado, e este sinal foi comparado com o sinal obtido para uma mistura de catecol: interferente numa proporção 1:1 (**Tabela VI.23**). Os valores apresentados na **Tabela VI.23** mostraram que nenhum dos compostos testados interferem na determinação de catecol.

Tabela VI.23: *Valores de recuperação obtidos com o sensor desenvolvido, para soluções de catecol contendo possíveis interferentes na concentração de 50 nmol L^{-1}, em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH 7,0.*

Espécies interferentes	[CA] adicionado (nmol L^{-1})	[CA] encontrado (nmol L^{-1})	Recuperação %
Fenol	50	50,1 ±0,3	100,2 ±1,0
Hidroquinona	50	51,5 ±0,2	103,0 ±1,0
o-aminofenol	50	50,2 ±0,1	100,4 ±0,6
Resorcinol	50	50,3 ±0,1	100,6 ±1,2
o-clorofenol	50	50,1 ±0,1	100,2 ±0,7
Cafeína	50	51,3 ±0,3	102,6 ±1,1
Ácido clorogênico	50	50,5 ±0,2	101,0 ±1,0

Dos compostos citados na **Tabela VI.23**, a hidroquinona foi a única espécie que na presença do eletrodo modificado apresentou um aumento na corrente de pico anódica, porém a mesma apresentou um potencial de oxidação menos positivo que o potencial de oxidação do catecol não interferindo na determinação deste.

IV.2.9. Considerações finais e figuras de mérito do sensor desenvolvido á base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL

A faixa linear de resposta linear, a sensibilidade, os limites de detecção e quantificação do eletrodo modificado com $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL para a determinação de catecol também merecem grande destaque pois são superiores aos demais sensores e/ou biossensores descritos na literatura [80,

119, 121-128]. O emprego do polímero para imobilização do complexo também forneceu uma boa estabilidade para o sensor, podendo ser reutilizado sem perda de resposta por pelo menos 200 determinações ou por mais de 60 dias mantendo-o em temperatura ambiente. Assim como para o nitrofenol, a maioria dos sensores/biossensores desenvolvidos para o catecol não apresentaram boa estabilidade.

O sensor á base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL também proporcionou repetibilidade nas medidas e no preparo do sensor com desvios padrão inferiores a 5%, o que favorece sua aplicação em amostras reais.

Para melhor visualização dos parâmetros analíticos obtidos também foi construída uma tabela (**Tabela IV.24)** para apresentação resumida das figuras de mérito do sensor desenvolvido**.**

Tabela IV.24: *Figuras de mérito para o sensor à base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL.*

Parâmetros	Resultados
Faixa linear	5 nmol – 5 μmol L^{-1}
Sensibilidade	16,10 μA cm^{-2} L μmol^{-1}
Limite de detecção	0,5 nmol L^{-1}
Limite de quantificação	5,0 nmol L^{-1}
Estabilidade	mais de 200 medidas ou mais 2 meses
Repetibilidade das medidas	1,1%
Repetibilidade no preparo dos sensores	2,4%

IV.2.10. Aplicação do sensor à base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL para análises de catecol em guaraná em pó e testes de adição e recuperação

Paulínia Cupana (o guaraná) é uma espécie nativa e perene da Região Amazônica. É conhecida por suas propriedades medicinais, mas é também conhecido popularmente na forma de uma refrescante e agradável bebida no Brasil [38]. Diversos produtos podem ser obtidos, industrialmente, a partir desta planta, podendo-se citar: guaraná descafeinado, cafeína, guaraná solúvel, extrato e xarope de guaraná e guaraná em pó.

Embora o guaraná seja há longo tempo utilizado por suas propriedades estimulantes, poucos são os dados disponíveis sobre sua composição química, facilitando assim falsificações. Alguns produtos encontrados no mercado são fraudados com a adição de casca de árvore, madeira, etc. Adicionalmente, a utilização de técnicas analíticas acessíveis para sua identificação e avaliação de componentes do produto, também é carente de opções [38]. O efeito estimulante do guaraná é função da presença dos alcalóides metilxantínicos, entretanto, estudos relatam que a presença de compostos fenólicos, como por exemplo, o catecol, pode apresentar atividade antioxidante maior que outros fenóis presentes nestes extratos [39]. Neste sentido aplicou-se o sensor a base de $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL para a determinação de catecol em amostras de guaraná em pó comercial usando o método da adição de padrão. Em seguida as mesmas amostras foram também analisadas pelo método espectrofotométrico (método descrito na literatura) [38]. A quantidade de catecol determinada nas amostras analisadas por ambos os métodos são apresentados na **Tabela VI.25.**

Tabela VI.25: *Determinação de catecol em amostras de guaraná em pó (n = 3).*

Amostras	Método Proposto*	Método Espectrofotométrico [38]*
	[CA]/nmol L^{-1}	
A	1250 (±16)	1240 (± 30)
B	1630 (± 20)	1600 (± 25)
C	2000 (± 17)	1980 (± 22)

Valores obtidos considerando o fator de diluição para cada método.

De acordo com os valores apresentados na **Tabela VI.25** observa-se que o método espectrofotométrico apresenta aparentemente um menor valor para a determinação de catecol nas amostras associado à necessidade de uma maior etapa de preparo da amostra para a leitura espectrofotométrica.

Para verificar se existe uma boa correlação linear entre o método proposto e o método comparativo, foi plotado um gráfico relacionando as concentrações obtidas em cada método conforme descreve o método de regressão linear [129]. No eixo x colocou-se os dados do método comparativo (espectrofotométrico) enquanto o eixo y colocou-se os dados do método eletroquímico (método proposto**)** conforme apresentado na **Figura VI.23.** Esta figura mostra que existe uma boa correlação linear entre os dois métodos a qual pode ser verificada através do valor de "r" (0,999) obtido no gráfico.

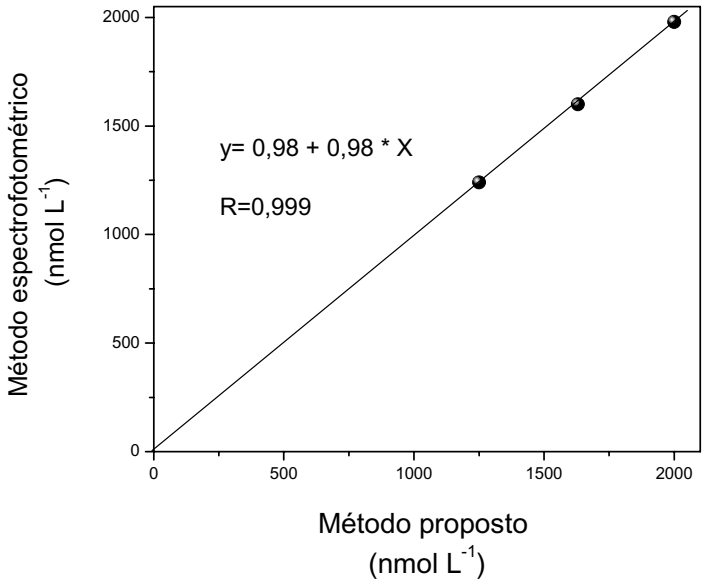

Figura IV.23*: Correlação entre as medidas obtidas com o método espectrofotométrico e o método proposto.*

Para verificar se existe diferença significativa entre os dois métodos foi realizado os teste estatístico *t* pareado e o teste *F* [129], dos quais concluiu-se, respectivamente, que não existe diferença significativa entre os métodos no nível de confiança de 95 % e que não há diferença significante entre as variância do método proposto e a variância do método comparativo em um nível de probabilidade de 5%, indicando que os dois método são precisos.

Adicionalmente, o teste de adição e recuperação do analito foi realizado tanto para o método proposto quanto para o método espectrofotométrico empregando três diferentes concentrações de catecol (17, 170 e 1700 nmol L^{-1}) e os resultados são apresentados nas **Tabelas VI.26a** e **VI.26b.**

Tabela VI.26a: *Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método proposto.*

Amostras	[CA] adicionada (nmol L^{-1})	[CA] esperada (nmol L^{-1})	[CA] encontrada (nmol L^{-1})	Recup. (%)
A	17	1267	1268 (±12)	100,0 (±0,3)
	170	1420	1419 (±10)	99,9 (±0,1)
	1700	2950	1940 (± 9)	99,4 (±0,5)
B	17	1647	1646 (±25)	99,8 (±0,2)
	170	1800	1799 (± 30)	99,9 (±0,5)
	1700	3330	3300 (± 1)	99,1 (±0,9)
C	17	2017	2020 (± 22)	100,1 (±0,3)
	170	2170	2161 (± 14)	99,5 (±0,4)
	1700	3700	3695 (± 7)	99,9 (±0,1)

Tabela 26b: *Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método espectrofotométrico.*

Amostra	[CA] adicionada (nmol L^{-1})	[CA] esperada (nmol L^{-1})	[CA] encontrada (nmol L^{-1})	Recup. (%)
A	17	1227	1188 (± 26)	96,8 (± 0,5)
	170	1380	1270 (± 30)	92,0 (± 0,4)
	1700	2910	2860 (± 12)	95,4 (±0,1)
B	17	1617	1520 (± 20)	94,0 (± 0,4)
	170	1770	1650 (± 12)	93,2 (± 0,7)
	1700	3300	2990 (± 10)	90,6 (±0,2)
C	17	1997	1935 (± 35)	92,6 (± 0,1)
	170	2150	2100 (± 17)	96,9 (± 0,1)
	1700	3680	3500 (± 11)	95,1 (±0,6)

De acordo com as **Tabelas IV.26a** e **Tabelas IV.26b** observa-se que a percentagem de recuperação encontrada para o analito em estudo com o método proposto (99,4-102,6 %) para todas as amostras foi melhor quando comparada com os resultados obtidos com o método espectrofotométrico (92,0-96,9 %). É importante ressaltar que mesmo usando três diferentes quantidades de catecol observou-se que a percentagem de recuperação no método proposto foi muito superior ao método comparativos. Consequentemente, esses resultados mostram uma melhor exatidão para o método proposto que para o método espectrofotométrico.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

V. Conclusões Gerais

Este trabalho demonstra que a poli-l-lisina apresenta-se como uma matriz eficaz para a imobilização de compostos em eletrodos de carbono vítreo. A modificação da superfície do eletrodo foi efetuada de forma simples e efetiva, proporcionando grande estabilidade aos sensores desenvolvidos á base de LiTCNE e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$. Esta estabilidade foi devido à boa interação eletrostática entre os contra-íons dos complexos utilizados e os grupos $-NH_3$ da poli-l-lisina;

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do *p*-nitrofenol e catecol empregando os sensores desenvolvidos comprovaram a grande eficiência dos mediadores LiTCNE e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$ na transferência de elétrons entre os analitos e o eletrodo. O eletrodo de carbono vítreo juntamente com os complexos e a poli-l-lisina constituem-se excelentes ambientes para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de *p*-nitrofenol e catecol mesmo empregando sistemas hidrodinâmicos com eletrodo de disco rotatório, usado nos estudos cinéticos. Estudos comprovaram que o polímero utilizado não dificulta a interação entre os analitos estudados e os complexos imobilizados, bem como não apresenta indícios de catálise ou pré-concentração dos analitos no eletrodo de carbono vítreo.

Os estudo cinéticos indicaram altos valores para a constante da velocidade da reação dos analitos estudados quando estes foram comparados com outros valores encontrados na literatura empregando outros modificadores, o que está diretamente associado à eficiente transferência de elétrons e afinidade entre os complexos imobilizados e as espécies eletroativas em solução.

Após a otimização dos parâmetros operacionais realizada para as três técnicas verificou-se que a melhor sensibilidade foi obtida empregando-se a voltametria de onda quadrada tanto para o *p*-nitrofenol como para o catecol. Esta diferença foi verificada, principalmente, pelo uso de elevadas velocidades de varredura (0,32 V s^{-1} para o *p*-nitrofenol e 0,24 V s^{-1} para o catecol) na voltametria de onda quadrada aliada à contribuição da onda reversa, o que possivelmente proporcionou um aumento considerável na sensibilidade da mesma.

A avaliação dos parâmetros analíticos dos sensores desenvolvidos mostrou que estes são ótimos dispositivos para a determinação de *p*-nitrofenol e catecol, com amplas faixas lineares de resposta, altas sensibilidades, baixos limites de detecção e grande estabilidade, os quais foram melhores que os resultados encontrados na literatura.

A aplicação dos sensores a base de LiTCNE/PLL e $Cu(phen)_2(TCNQ)_2$/PLL em amostras de águas naturais e guaraná em pó, respectivamente, apresentaram boa recuperação e baixos desvios padrão para as amostras analisadas indicando que estes sensores são muito promissores para a determinação desses compostos fenólicos.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] S.S Rosatto, R. S. Freire, N. Durán, L. T. Kubota, Quim. Nova 24 (2001) 77.

[2] J.Wang, Electroanalysis 3 (1991) 255.

[3] J.A. Cox, M.E. Tess, T.E. Cummings, Rev. Anal. Chem. 15 (1996) 173.

[4] P.R. Moses, P. Wier, R. W. Murray, Anal. Chem. 47 (1975) 1882.

[5] R.C.S. Luz, F. S. Damos, A. A. Tanaka, L.T. Kubota, Sens. Actuators. B, Chem. 114 (2005) 1019.

[6] R.C.S. Luz, A. B. Moreira, F. S. Damos, A. A. Tanaka, L. T. Kubota, J. Pharm. Biom. Anal. 42 (2006) 184.

[7] D.J. Michael, R. M. Wightman, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 33.

[8] P. Damier, E.C. Hirsch, Y. Agid, A. M. Graybiel, Brain 122 (1999) 1437.

[9] R.M. Wighman, L.J. May, A.C. Michael, Anal. Chem. 60 (1988) 769.

[10] H. Cui, C. He, G. Zhao, J. Chromatogr. *A* 855 (1999) 171.

[11] C. Nistor, J. Emnéus, L. Gorton, A. Ciucu, Anal. Chim. Acta 387 (1999) 309.

[12] J. Svitel, S. Miertus, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 828.

[13] R.S. Freire, R. Pelegrini, L. T. Kubota, P. Peralta-Zamora, N. Durán, Quim. Nova 23 (2000) 504.

[14] D. Barceló, Environmental Analysis-Techniques, Applications and Quality Assurence Elsevier, Amsterdam, 1993, p. 1.

[15] F. Ortega, E. Domínguez, E. Burestedt, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, J. Chromatogr. A 675 (1994) 65.

[16] I.M. Russell, S.G. Burton, Anal. Chim. Acta 389 (1999) 161.

[17] E.J. Calvo, C. Danilowicz, J. Braz. Chem. Soc. 8 (1997) 563.

[18] L. Campanella, T. Beone, M.P. Sammartino, M. Tomassetti, Analyst 118 (1993) 979.

[19] F. Zimmermann, R. Taylor-Mayer, Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control, John Wiley and Sons, New York, 1985, p 1.

[20] G. Vincent, In Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental; Angeletti, G.; Bjorseth, A. (Eds); Klumer Dordrecht, 1991, p.285.

[21] EPA Method 604, Phenol. Environmental Protection Agency, Part III, 40 CFT Part 136, Fed Regist, 1984, p 58.

[22] Ambient Water Quality Criteria for Phenol, U.S. EPA 440/5-80-066; U.S. EPA, Washington, DC, 1980.

[23] D. Puig, T. Ruzgas, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, D. Barceló, Electroanalysis 8 (1996) 885.

[24] J.L. Vilchez, M. del Olmo, C. Diez, A. Molina, I. Orbe, Anal. Chim. Acta 335 (1996) 23.

[25] I. Karube, Y. Nomura, Y. Arikama, Trends Anal. Chem. 14 (1995) 295.

[26] G. Marko-Varga, J. Emnéus; L. Gorton, T. Ruzgas, Trends Anal. Chem. 14 (1995) 319.

[27] M.J. Denninson, A. P.F. Turner, Biotechnol. Adv. 13 (1995) 1.

[28] K. Herrmann, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 28 (1989) 315.

[29] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger, O.I. Aruoma, Food Chem. Toxicol. 33 (1995) 601.

[30] E. Haslam, J. Nat. Prod. 59 (1996) 205.

[31] A. Salvi, C. Brihlmann, E. Migliavacca, P.A. Carrupt, K. Hostettmann, B. Testa, Helv. Chim. Acta 85 (2002) 867.

[32] C.A. Rice Evans, J. Miller, G. Paganga, Trends Plant Sci. 2 (1997) 152.

[33] M.A. Read, Am. J. Pathol. 147 (1995) 235.

[34] V. Cody, E. Middleton Jr., J.B. Harborne, A. Beretz, R. Alan, Plant Flavonoids in Biology and Medicine. II. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. Progress in Clinical and Biological Research, vol. 280, Liss, New York, 1988.

[35] M.T. Huang, T. Ferraro, ACS Symp. Ser. 1992, p.507.

[36] M. Friedman, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 1523.

[37] I. Martinez-Valverde; M.J. Periago, G. Ros, Archivos Latinoamericanos de Nutricion 50 (2000) 58.

[38] A. Magna, A.A. Salomão, M.M.D.C. Vila, M. Tubino, J. Braz. Chem. Soc. 14 (2003) 129.

[39] A. Basile, L. Ferrara, M.D. Pezzo, G. Mele, S. Sorbo, P. Bassi, D. Montesano, J. Ethnopharmacology 102 (2005) 32.

[40] H.B. Wan, H. Chi, M.K. Wong, C.Y. Mok, A.K. Hsieh, J. Liquid Chromatogr. 16 (1993) 4049.

[41] N. Cardellichio, S. Cavalli, V. Pingerelli, S. Giandomenico, P. Ragone, Fresenius J. Anal. Chem. 358 (1997) 749.

[42] O. Jauregui, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 787 (1997) 79.

[43] A. Tracqui, P. Kintz, P. Maugin, J. Forensic. Sci. 40 (1995) 254.

[44] D. Kaniansky, E. Krcmova, V. Madajova, M. Masar, J. Marek, F.J. Onuska, J. Chromatogr. A 772 (1997) 327.

[45] Y.C. Chao, C.W. Whang, J. Chromatogr. A 663 (1994) 229.

[46] A. Oubiña, B. Ballesteros, R. Galve, D. Barceló, M.-P. Marco, Anal. Chim. Acta 387 (1999) 255.

[47] Q.X. Li, M.S. Zhao, S.J. Gee, M.J. Kurth, J.N. Seiber, B.D. Hammock, J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 1685.

[48] EPA Method 625, Base/Neutrals and Acids, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40, CFR Part 136., Fed. Regist., 26 October, 1984, 153.

[49] D. Puig, I. Silgoner, M. Grasserbauer, D. Barcelo, Anal. Chem. 69 (1997) 2756.

[50] K. O. Lupetti, F.R.P. Rocha, O. Fatibello-Filho, Talanta 62 (2004) 463-467.

[51] P. Skládal, Collect. Czech. Chem. Commun. 56 (1991) 1427.

[52] H. Kotte, B. Gruendig, K.-D. Vorlop, Anal. Chem. 67 (1995) 65.

[53] J. L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbé, G. Reverdy, Anal. Chim. Acta 311 (1995) 255.

[54] M. Bernabei, S. Chiavarini, C. Cremisini, G. Palleschi, Biosens. Bioelectron. 8 (1993) 265.

[55] F. Mazzei, F. Botrè, G. Lorenti, G. Simonetti, F. Porcelli, G. Scibona, C. Botrè, Anal. Chim. Acta 316 (1995) 79.

[56] F. Mazzei, F. Botrè, C. Botrè, Anal. Chim. Acta 336 (1996) 67.

[57] J.D. Brewster, A. R. Lightfield, Anal. Chem. 65 (1993) 2415.

[58] M. Preuss, E.A.H. Hall, Anal. Chem. 67 (1995) 1940.

[59] C.G. Bauer, A.V. Ermenko, E. Ehrentreich-Förster, F.F. Bier, A. Makower, B.H. Halsall, W.R. Heineman, F.W. Scheller, Anal. Chem. 68 (1996) 2453.

[60] P.M. Krämer, M.P. Marco, B.D. Hammock, J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 934.

[61] M.P. Marco, S. Chiron, J. Gascón, B.D. Hammock, D. Barceló, Anal. Chim. Acta 311 (1995) 319.

[62] R.W. Gerlach, J.M. Van Emon, Chemosphere 11 (1997) 2727., IUPAC, Comission on Water Chemistry, Pure Appl. Chem. 67 (1995) 1533.

[63] J.M. Wong, Q.X. Li, B.D. Hammock, J.N. Seiber, J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 1802.

[64] P.M. Krämer, Q.X. Li, B.D. Hammock, J. AOAC Int. 77 (1994) 1275.

[65] D. Amin, S.T. Sulaiman, Analyst 109 (1984) 739.

[66] A.A. Schilt, M.R. Ditusa, Talanta 29 (1984) 18.

[67] F. Onur, N. Acar, Int. J. Pharm. 78 (1992) 89.

[68] F. Palmisano, A. Guerrieri, Zambonin, P.G., Ann. Chim. Rome, 76 (1986) 419.

[69] J.J. Liu, R.T. Chen, Fenxi. Huaxue 24 (1996) 1312.

[70] L. Chen, J.L. He, Fenxi. Shiyanshi 17 (1998) 48.

[71] M.D.P.T. Sotomayor, A.A. Tanaka, L.T. Kubota, Electrochim. Acta 48 (2003) 855.

[72] M. Carvalho, C. Mello, L.T. Kubota, Anal. Chim. Acta 420 (2000) 109.

[73] L.D. Mello, M.D.P.T. Stomayor, L.T. Kubota, Sens. Actuators B: Chem. 96 (2003) 636.

[74] W. Murray In: A.J. Bard, Editor, Electroanalytical Chemistry, Marcel Dekker, New York, 1984.

[75] P. Mulchandani, C.M. Hangarter, Y. Lei, W. Chen, A. Muclchandani, Biosen. Bioelectron. 21 (2005) 523-527.

[76] Y. Lei, P. Mulchandani, W. Chen, J. Wang, A. Mulchandani, Electroanalysis 15 (2003) 1160.

[77] M.M. Cordero-Rando, M. Barea-Zamora, J.M. Barberá-Salvador, I. Naranjo-Rodríguez, J.A. Munõz-Leyva, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, Mikrochimica Acta 132 (1999) 7.

[78] S. Hu, C. Xu, G. Wang, D. Cui, Talanta 54 (2001) 115.

[79] B. Wang, J. Zhang, S. Dong, Biosen. Bioelectron. 15 (2000) 397.

[80] S. Campuzano, B. Serra, M. Pedrero, F.J.M. Villena, J.M. Pingarrón, Anal. Chim. Acta 494 (2003) 187.

[81] D. Quan, W. Shin, Electroanalysis 16 (2004) 1576.

[82] S. Yang, Y. Li, X. Jiang, Z. Chen, X. Lin, Sens. Actuators B 114 (2006) 774.

[83] W. Kaim, M. Moscherosch, Coord. Chem. Rev. 129 (1994) 157.

[84] G.S. Nunes, G. Jeanty, J.L. Marty, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 107.

[85] R. Kataky, M. R. Bryce, L. Goldenberg, S. Hayes, A. Nowak, Talanta 56 (2002) 451.

[86] X. Lopis, A. Merkoçi, M. del Valle, S. Alegret, Sens. Actuators B: Chem. 107 (2005) 742.

[87] J. Kulys, E.J. D'Costa, Biosens. Bioelectron. 6 (1991) 109.

[88] A.S.N. Murthy, A.R.L. Grupta. Bioelectrochem. Bioenerg. 33 (1994) 71.

[89] S. Zhao, R. Lennox, J. Electroanal. Chem. 346 (1993) 161.

[90] P. Calvo-Marzal, K.Y. Chumbimuni-Torres, N.F. Höehr, L.T. Kubota, Clin. Chim. Acta 371 (2006) 152.

[91] F.A. Armstrong, Curr. Op. Chem. Bio. 9 (2005) 110.

[92] S. Yang, Y. Li, X. Jiang, Z. Chen, X. Lin, Sens. Actuators B: Chem., in press, 2005.

[93] N. Oyama; F.C. Anson, J. Am. Chem. Soc. 101 (1979) 3450.

[94] N. Oyama; F.C. Anson, Anal. Chem. 52 (1980) 1192.

[95] K. Shigehara; N. Oyama; F. C. Anson, Inorg. Chem. 20 (1981) 518.

[96] J.C. Moreira; R. Zhao; A.G. Fogg, Analyst 115 (1990) 1565.

[97] F.C. Anson; J.M. Saveant; K. Shig, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 1096.

[98] O.W. Webster; W. Mahler; R.E. Benson, J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 3678.

[99] L.R. Melby, R.J. Harder, W.R. Hertler, W. Mahler, R.E. Benson, W.E. Mochel, J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 3374.

[100] M. Schwartz, W.E. Hatfield, Inorg. Chem. 26 (1987) 2823.

[101] S.B. Khoo, J.K. Foley, S. Pons, J. Electroanal. Chem. 215 (1986) 273.

[102] M.R. Smith, J.G. Osteryung, Anal. Chim. Acta 96 (1978) 334.

[103] Y. Ni, L. Wang, S. Kokot, Anal. Chim. Acta 431 (2000) 101.

[104] L. Papouchado, R.W. Sandford, G. Petrie, R.N. Adams, J. Electroanal. Chem. 65 (1975) 275.

[105] C.P Andrieux, J.M. Savéant, J. Electroanal. Chem. 93 (1978) 163.

[106] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical methods, Fundamentals and applications, Wiley, New York, 1980.

[107] F. Pariente, E. Lorenzo, F. Tobalina, H.D. Abruna, Anal. Chem. 67 (1995) 3936.

[108] R. Niesner, A. Heintz. J. Chem. Eng. Data 45 (2000) 1121.

[109] J. Barek, H. Ebertova, V. Mejstrik, J. Zima. Collect. Czech. Chem. Commun. 59 (1994) 1761.

[110] M.R. Smyth, J.G. Osteryoung. Anal. Chim. Acta 96 (1978) 335.

[111] N. Yongian, L. Wang, K. Serge. Anal. Chim. Acta 431 (2001) 101.

[112] P.H. Rieger, Electrochemistry, 2nd ed., Chapman & Hall: New York, 1994.

[113] D. Souza, S.A. Machado, L. A. Avaca, Quim. Nova 26 (2003) 81.

[114] Analytical Methods Commitee, Recommendations for the definition, estimationand use of the detection limit, Analyst 112 (1987) 199.

[115] V.A. Pedrosa, L. Codognoto, L.A. Avaca, J. Braz. Chem. Soc. 14 (2003) 530.

[116] T.J. Wooster, A.M. Bond, Analyst 128 (2003) 1386.

[117] A. Mauerer, G. Lee, Europ.J. Pharm. Biopharm. 62 (2006) 131.

[118] A. Durgbanshi, W.T. Kok, J. Chromatogr. *A* 798 (1998) 289.

[119] H. Razmi, M. Agazadeh, B. Habibi-A, J. Electroanal. Chem. 547 (2003) 25.

[120] H. Razmi, A. Azadbakkht, Electrochim. Acta 50 (2005) 2193.

[121] S. Mu, Biosens. Bioelectron., 21 (206) 1235.

[122] E. Dempsey, D. Diamond, A. Collier, Biosens. Bioelectron. 20 (2004) 367.

[123] W. Rajesh, K. Kaneto, Reac. Func. Polymer 59 (2004) 163.

[124] S. Cosnier, S. Szunerits, R.S. Markks, J.P. Lellouche, K. Perie, J. Biochem. Biophys. Methods 50 (2001) 65.

[125] P. Dantoni, S.H.P. Serrano, A.M.O. Brett, I.G.R. Gutz, Anal. Chim. Acta 366 (1998) 137.

[126] B. Haghighi, L. Gordon, T. Ruzgas, L.J. Josson, Anal. Chim. Acta 487 (2003) 3.

[127] N. Izacumen, D. Bouchta, H. Zejli, M.E. Kaoutit, A.M. Stalcup, K.R. Temsamani, Talanta 66 (2005) 111.

[128] M.D.P.T. Sotomayor, A.A. Tanaka, L.T. Kubota, Anal. Chim. Acta 455 (2002) 215.

[129] J.C. Miller, J.N. Miller, Statistics for analytical chemistry, Ellis Horwood, New York, 1993.

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS

VII. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras propõe-se o emprego de novos compostos á base de TCNE e TCNQ, uma vez que os mesmos se apresentaram como excelentes compostos para a eletrocatálise de espécies de interesse, seja na área ambiental, farmacêutica ou biológica. Nesta última, dois compostos que têm despertado grande interesse dos pesquisadores são a glutationa e a cisteína. No entanto, a oxidação destes compostos em eletrodo não modificado é muito difícil devido a lenta reação de transferência de elétrons a qual permite a oxidação destas espécies em altos potenciais (acima de 1 V). Uma de nossas propostas seria tentar aplicar eletrodos modificados à base de compostos TCNX para a determinação desses compostos tiolados.