

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Fernando Sílvio de Souza

**SENSORES AMPEROMÉTRICOS NANOESTRUTURADOS
PARA DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM AMOSTRAS DE USO
COSMÉTICO E DE HIGIENE PESSOAL**

Florianópolis
2015

Fernando Sílvio de Souza

**SENSORES AMPEROMÉTRICOS NANOESTRUTURADOS
PARA DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM AMOSTRAS DE USO
COSMÉTICO E DE HIGIENE PESSOAL**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica.
Orientador: Professor Dr. Almir Spinelli

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Souza, Fernando Silvio
SENSORES AMPEROMÉTRICOS NANOESTRUTURADOS PARA
DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS DE USO
COSMÉTICO E DE HIGIENE PESSOAL / Fernando Silvio de Souza ;
orientador, Almir Spinelli - Florianópolis, SC, 2015.
152 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Sensores amperométricos. 3.
Nanopartículas. 4. Azul da Prússia. 5. Peróxido de
hidrogênio. I. Spinelli, Almir. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Fernando Sílvio de Souza

**SENSORES AMPEROMÉTRICOS NANOESTRUTURADOS
PARA DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM AMOSTRAS DE USO
COSMÉTICO E DE HIGIENE PESSOAL**

Florianópolis, 03 de março de 2015.

Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
Coordenador do curso

Banca Examinadora

Prof. Dr. Almir Spinelli,
Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof.^a Dr.^a Keliana Dantas Santos,
Relatora
Instituto Federal da Paraíba

Prof.^a Dr.^a Suellen Cadorin
Fernandes,
Universidade Comunitária da
Região de Chapecó

Prof.^a Dr.^a Daniela Brondani,
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke,
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Luciano Vitali,
Universidade Federal de Santa
Catarina

À memória do meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais Sílvio e Marli, e meu avô Reduzino por terem sempre me incentivado a estudar e por fazerem o possível para um dia me ver onde estou agora. Trago-os em meu coração. Muito obrigado!

À minha mulher Vilma e minha filha Maria Alice, fontes de minha inspiração e motivação.

A todas as amizades que construí durante minha vida. Não faço destaques individuais, pois todos foram importantes para os conhecimentos da vida por mim adquiridos.

A toda a equipe do GEPEEA. Meus companheiros de trabalho que já passaram pelo ambiente e aos que nele permanecerão. Ao professor Almir Spinelli pela orientação do trabalho e colaboração para o meu desenvolvimento profissional.

A todos os amigos da UFSC que conviveram comigo em situação semelhante e a todos aqueles com quem pude compartilhar conhecimentos diversos.

Ao Laboratório de Bioinorgânica e Estudos de Equilíbrio da UFSC por ceder parte do material utilizado no trabalho.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC pelas análises de microscopia, em especial ao funcionário Américo Cruz Jr.

Aos funcionários responsáveis pela limpeza e manutenção do nosso local de trabalho.

A todos os professores do Departamento de Química que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e à UFSC, ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado!

“É preciso lembrar que sempre há um futuro, um futuro que é inevitavelmente incerto. Com isso, eu não quero dar uma mensagem de pessimismo, uma vez que a incerteza pode terminar tanto positiva quanto negativamente, com a vantagem de que o ser humano tem o poder de inclinar a balança a seu favor.”

Roberto Gomes Bolaños

LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS DESDE IC ATÉ
DOUTORADO

- Artigos publicados em revistas científicas:

QUINT, M. L.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; DOMINGOS, J. B. Low-range detection of the phosphate group by a molecularly imprinted polymer-modified carbon paste electrode. **Sensors Journal**, v. 15, p. 1012-1019, 2015.

de SOUZA, F. S.; GONÇALVES, R. S.; SPINELLI, A. Assessment of caffeine adsorption onto mild steel surface as an eco-friendly corrosion inhibitor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 81-90, 2014.

de SOUZA, F. S.; GIACOMELLI, C.; GONÇALVES, R. S.; SPINELLI, A. Adsorption behavior of caffeine as a green corrosion inhibitor for copper. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 2436-2444, 2012.

ROMAN, D.; BERNARDI, J. C.; BOEIRA, C. D.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; FIGUEROA, C. A.; BASSO, R. L. O. Nanomechanical and electrochemical properties ZrN coated NiTi shape memory alloy. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, p. 4645-4650, 2012.

AGUZZOLI, C.; FIGUEROA, C. A.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; BAUMVOL, I. J. R. Corrosion and nanomechanical properties of vanadium carbide thin film coatings of tool steel. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, p. 2725-2731, 2012.

ROMAN, D.; BERNARDI, J. C.; AMORIM, C. L. G.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; GIACOMELLI, C.; FIGUEROA, C. A.; BAUMVOL, I. J. R.; BASSO, R. L. O. Effect of deposition temperature on microstructure and corrosion resistance of ZrN thin films deposited by DC reactive magnetron sputtering. **Materials Chemistry and Physics**, v. 130, p. 147-153, 2011.

BASSO, R. L. O.; PASTORE, H. O.; SCHMIDT, V.; BAUMVOL, I. J. R.; ABARCA, S. A. C.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; FIGUEROA,

C. A.; GIACOMELLI, C. Microstructure and corrosion behaviour of pulsed plasma-nitrided AISI H13 tool steel. **Corrosion Science**, v. 52, p. 3133-3139, 2010.

de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A. Caffeic acid as a green corrosion inhibitor. **Corrosion Science**, v. 51, p. 642-649, 2009.

- Resumos publicados em congressos:

de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A. Sensores não enzimáticos para H_2O_2 baseados em nanopartículas de complexos de melanina- Fe^{3+} , $-Cu^{2+}$ ou $-Ni^{2+}$. In: XXI Encontro de Química da Região Sul (SBQ Sul), Maringá – PR, 2014.

BRAGA, O. C.; SOUZA, F. S.; SPINELLI, A. Eletrodo de filme de bismuto obtido *in situ* para a detecção de nitrocompostos. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), Campos do Jordão – SP, 2013.

de SOUZA, F. S.; ROMAN, D.; BASSO, R. L. O.; FIGUEROA, C. A.; BAUMVOL, I. J. R.; SPINELLI, A. Zirconium nitride thin films for application in biomaterials. In: IX Brazilian Materials Research Society Meeting (SBPMat), Ouro Preto – MG, 2010.

de SOUZA, F. S.; BERNARDI, J.; BOEIRA, C. B.; AMORIM, C. L. G.; BASSO, R. L. O.; BAUMVOL, I. J. R.; SPINELLI, A. Formation of protective ZrN/TiN coatings on Nitinol by duplex treatment. In: X Brazilian Materials Research Society Meeting (SBPMat), Gramado – RS, 2011.

BOEIRA, C. B.; BERNARDI, J.; AMORIM, C. L. G.; BAUMVOL, I. J. R.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; BASSO, R. L. O. Plasma nitriding of nickel-titanium alloy and its corrosion resistance. In: X Brazilian Materials Research Society Meeting (SBPMat), Gramado – RS, 2011.

de SOUZA, F. S.; AGUZZOLI, C.; BASSO, R. L. O.; FIGUEROA, C. A.; GIACOMELLI, C.; BAUMVOL, I. J. R.; SPINELLI, A. Resistência

à corrosão do aço-ferramenta AISI H12 revestido com carbetto de vanádio. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, 2010.

SOUZA, F. S.; SPINELLI, A. Resistência à corrosão do aço carbono na presença de ácido cafeico. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, 2007.

RESUMO

Realizou-se neste trabalho a determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em amostras comerciais utilizando sensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de análogos de azul da Prússia (NPAP). As amostras comerciais analisadas foram: creme para clareamento dental de uso doméstico, enxaguante bucal, solução antisséptica e creme para descoloração de pelos e cabelos. Fez-se a modificação de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com as NPAP, que eram encapsuladas por diferentes complexos de melanina- M^{n+} ($\text{M}^{n+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}). Os sensores obtidos foram usados na detecção de H_2O_2 e aqueles que apresentaram os melhores resultados foram empregados na determinação de H_2O_2 nas amostras comerciais. As NPAP foram caracterizadas com uso de microscopia de transmissão eletrônica (TEM). A caracterização das modificações feitas no GCE ocorreu por voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Utilizou-se os eletrodos modificados para determinação de H_2O_2 e curvas de calibração foram obtidas na faixa de 0,1 a 13 mmol L^{-1} . Obtiveram-se os melhores resultados para modificações contendo complexos de melanina- Fe^{3+} com limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de respectivamente 0,14 e 0,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O LD é um dos mais baixos encontrados na literatura para sensores não-enzimáticos de H_2O_2 . Os parâmetros de validação analisados, além de LD e LQ, foram a seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão e robustez. O processo de validação do método analítico mostrou-se satisfatório quanto aos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Sensores amperométricos; Eletroanalítica; nanopartículas; azul da Prússia; peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

The detection of hydrogen peroxide (H_2O_2) in commercial samples was performed in this work, utilizing electrochemical sensors based on melanin-capped Prussian blue nanoparticles analogs (PBNP). The samples analyzed were tooth whitening gel, mouth rinse solution, antiseptic solution and hair bleaching cream. A glassy carbon electrode was modified with BPNP, capped with different melanin- $\text{M}^{\text{n}+}$ complexes ($\text{M}^{\text{n}+} = \text{Fe}^{3+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$ or Co^{2+}). The sensors were used on the detection of H_2O_2 and the determination of H_2O_2 in commercial samples was realized by those sensors which presented best results. PBNP were characterized using transmission electron microscopy (TEM). The modification made on GCE was characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Calibration curves were obtained on the linear range of 0.1 to 13.0 mmol L^{-1} . The best results were obtained for melanin- Fe^{3+} capped PBNP, and the detection (DL) and quantification limits (QL) were 0.14 and 0.42 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. This DL is among the lowest ever published for non-enzymatic H_2O_2 sensors. The validation parameters analyzed, besides DL and QL, were selectivity, linearity, sensibility, accuracy and robustness. The analytical method validation seemed to be satisfactory regarding the analyzed parameters.

Keywords: Amperometric sensors; eletroanalytical; nanoparticles; Prussian blue; hydrogen peroxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos componentes principais de um sensor químico.....	40
Figura 2. Ilustração de um eletrodo quimicamente modificado com NPAP encapsuladas por outro agente modificador.....	45
Figura 3. Modificação de um eletrodo com NPAP utilizando um modelo estrutural.....	48
Figura 4. Técnica de modificação <i>layer-by-layer</i>	49
Figura 5. Esquema representativo de um eletrodo de pasta de carbono modificado.....	52
Figura 6. Quantidade de trabalhos publicados envolvendo o complexo azul da Prússia.....	58
Figura 7. Estrutura química do complexo azul da Prússia.....	59
Figura 8. Reação de complexação da melanina com metais de transição ($M^{n+} = Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}$ ou Co^{2+}).....	69
Figura 9. Reação entre o complexo melanina- M^{n+} com ferrocianeto de potássio para obtenção de NPAP modificadas ($M^{n+} = Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}$ ou Co^{2+}).....	70
Figura 10. Ilustração do método <i>casting</i> para construção dos sensores eletroquímicos baseados em NPAP modificadas com complexos de melanina- M^{n+} ($M^{n+} = Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}$ ou Co^{2+}).....	70
Figura 11. Voltamogramas cíclicos de GCE em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (a) na ausência e (b) na presença de H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹ . $v = 100$ mV s ⁻¹	78
Figura 12. Cronoamperograma para GCE em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ para cinco adições sucessivas de H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹ . $E_{app} = +1,4$ V.	79
Figura 13. Cronoamperogramas para três adições sucessivas de H ₂ O ₂ em eletrólito suporte (a) KCl 0,1 mol L ⁻¹ e (b) tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ + KCl 0,1 mol L ⁻¹ . Eletrodo de trabalho GCE. $E_{app} = +1,4$ V.	80
Figura 14. Influência do potencial aplicado nas reações de oxidação/redução de solução de H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹ para GCE em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ + KCl 0,1 L ⁻¹	81
Figura 15. Efeito do pH da solução de eletrólito suporte na oxidação de H ₂ O ₂ sobre GCE.....	82

- Figura 16.** Voltamogramas cíclicos para H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre GCE. $v =$ (a) 10, (b) 50, (c) 100, (d) 300, (e) 500 e (f) 1000 mV s^{-1} 83
- Figura 17.** Variação de i_{pa} com $v^{1/2}$ (A) e $\log i$ com $\log v$ (B) para H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre GCE imerso em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 85
- Figura 18.** Imagens de TEM e distribuição de diâmetro para as NPAP modificadas com complexos de melanina com Fe^{3+} (A), Cu^{2+} (B), Ni^{2+} (C) e Co^{2+} (D). 87
- Figura 19.** Voltamogramas cíclicos em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para GCE (a) em sobreposição com NPAP encapsuladas por complexos de melanina (b) com Fe^{3+} (A), Cu^{2+} (B), Ni^{2+} (C) ou Co^{2+} (D)..... 90
- Figura 20.** Diagramas de Nyquist obtidos a $+1,5 \text{ V}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para GCE (a) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b), Cu^{2+} (c), Ni^{2+} (d) ou Co^{2+} (e). 94
- Figura 21.** Diagramas de Bode de impedância total (A) e ângulo de fase (B) obtidos a $+1,5 \text{ V}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para GCE (a) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b), Cu^{2+} (c), Ni^{2+} (d) ou Co^{2+} (e)..... 95
- Figura 22.** Cronoamperogramas obtidos para GCE (a) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b), Cu^{2+} (c), Ni^{2+} (d) ou Co^{2+} (e) após cinco adições consecutivas de $100 \mu\text{L}$ de solução de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ 98
- Figura 23.** Influência do potencial aplicado nas reações de oxidação/redução de solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 para GCE (a - ■) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b - ●), Cu^{2+} (c - ○), Ni^{2+} (d - ▲) ou Co^{2+} (e - △). 99
- Figura 24.** Efeito do pH da solução tampão BR na corrente de oxidação de $100 \mu\text{L}$ de solução de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para GCE (a - ■) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina- Fe^{3+} (b - ●), Cu^{2+} (c - ○), Ni^{2+} (d - ▲) ou Co^{2+} (e - △). 101

Figura 25. Cronoamperogramas obtidos a +1,5 V em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ para adições sucessivas de H₂O₂ em concentrações entre 0,1 e 13,0 mmol L⁻¹ para GCE (A) e sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe³⁺ (B), Cu²⁺ (C) ou Ni²⁺ (D). Inserção: Curvas de calibração externa.

..... 103

Figura 26. Curvas de calibração externa e de adição de padrão para determinação de H₂O₂ em creme para clareamento dental e curva de calibração para GCE (A) e sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe³⁺ (B), Cu²⁺ (C) ou Ni²⁺ (D)..... 113

Figura 27. Curvas de adição de padrão para determinação de H₂O₂ em solução antisséptica e curva de calibração para GCE (A) e sensor composto por NPAP-Fe³⁺ (B). 117

Figura 28. Curvas de calibração externa e de adição de padrão para determinação de H₂O₂ em enxaguante bucal e curva de calibração para GCE (A) e sensor composto por NPAP-Fe³⁺ (B)..... 120

Figura 29. Curvas de calibração externa e de adição de padrão para determinação de H₂O₂ em creme descolorante de pelos e curva de calibração para GCE (A) e sensor composto por NPAP-Fe³⁺ (B)..... 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potenciais padrão de semirreações do H_2O_2 e outros agentes oxidantes.	37
Tabela 2. Instrumentos usados no trabalho.	67
Tabela 3. Procedência dos reagentes de grau analítico usados no trabalho.....	68
Tabela 4. Dados de impedância para os sensores eletroquímicos de NPAP encapsuladas com melanina- M^{n+} ($\text{M}^{n+} = \text{Fe}^{3+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$ ou Co^{2+}) sobre GCE.....	96
Tabela 5. Incrementos de corrente para os eletrodos de trabalho na oxidação do H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com E_{app} de $+1,5 \text{ V}$	101
Tabela 6. Equações de reta para os sensores eletroquímicos.....	106
Tabela 7. Parâmetros analíticos avaliados para a detecção de H_2O_2 usando os sensores desenvolvidos. $E_{\text{app}} = +1,5 \text{ V}$. Faixa linear de $0,1$ a $13,0 \text{ mmol L}^{-1}$	107
Tabela 8. Determinação de H_2O_2 em creme para clareamento dental com eletrodos modificados em substrato de carbono vítreo.....	111
Tabela 9. Inclinações das equações de reta para cada um dos sensores eletroquímicos obtidas através de curva de calibração externa e de adição de padrão.....	112
Tabela 10. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP- Fe^{3+} na quantificação de H_2O_2 em creme para clareamento dental.	115
Tabela 11. Determinação de H_2O_2 em solução antisséptica com GCE e o sensor contendo NPAP- Fe^{3+}	116
Tabela 12. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP- Fe^{3+} na quantificação de H_2O_2 em solução antisséptica.	119
Tabela 13. Determinação de H_2O_2 em enxaguante bucal com GCE e sensor contendo NPAP- Fe^{3+}	120
Tabela 14. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP- Fe^{3+} na quantificação de H_2O_2 em enxaguante bucal.	122

Tabela 15. Determinação de H_2O_2 em creme descolorante de pelos com GCE e sensor composto de NPAP- Fe^{3+} 123

Tabela 16. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP- Fe^{3+} na quantificação de H_2O_2 em creme descolorante de pelos..... 126

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

UV	Ultravioleta
°C	Graus Celsius
m	Massa
v	Volume
E°	Potencial padrão
V	Volts
AP	Azul da Prússia
NP	Nanopartículas
NPAP	Nanopartículas de azul da Prússia ou de derivados de azul da Prússia
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>glassy carbon electrode</i>
CPE	Eletrodo de pasta de carbono, do inglês <i>carbon paste electrode</i>
BDD	Eletrodo de diamante dopado com boro, do inglês <i>boron doped diamond</i>
C _{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
PtNP	Nanopartículas de platina
NTC	Nanotubos de carbono
LbL	Camada por camada, do inglês <i>layer-by-layer</i>
BiFE	Eletrodo de filme de bismuto, do inglês <i>bismuth film electrode</i>
ITO	Óxido de estanho dopado com índio, do inglês <i>indium tin oxide</i>
AuNP	Nanopartículas de ouro
SAM	Monocamada auto-organizada, do inglês <i>self-assembled monolayer</i>
MIP	Polímero de impressão molecular, do inglês <i>molecularly imprinted polymer</i>
NIP	Polímero não impresso, do inglês <i>non-imprinted polymer</i>
TNT	Trinitrotolueno
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>scanning electron microscopy</i>
TEM	Microscopia de transmissão eletrônica, do inglês <i>transmission electron microscopy</i>

CV	Voltametria cíclica, do inglês <i>cyclic voltammetry</i>
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica, do inglês <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
CA	Cronoamperometria
BR	Britton-Robinson
ET	Eletrodo de trabalho
EA	Eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
Ag/AgCl	Prata/cloreto de prata
KCl _{sat}	Cloreto de potássio saturado
v	Velocidade de varredura de potencial
E _{app}	Potencial aplicado
s	Segundos
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
DP	Desvio padrão
S	Coefficiente angular da melhor reta da curva de calibração
i	Corrente
E _{po}	Potencial de pico de oxidação
i _{pa}	Corrente de pico anódica
NPAP-Fe ³⁺	Nanopartículas de azul da Prússia contendo Fe ³⁺
NPAP-Cu ²⁺	Nanopartículas de azul da Prússia contendo Cu ²⁺
NPAP-Ni ²⁺	Nanopartículas de azul da Prússia contendo Ni ²⁺
NPAP-Co ²⁺	Nanopartículas de azul da Prússia contendo Co ²⁺
R _p	Resistência à polarização
Z _{re}	Impedância real
Z _{im}	Impedância imaginária (número complexo)
ω _{máx}	Frequência angular em que impedância é máxima
r ²	Coefficiente de determinação dos pontos da curva de calibração
DPR	Desvio padrão relativo
Er	Erro relativo entre os valores do método proposto e a titulação redox

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1 HISTÓRIA E IMPORTÂNCIA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	35
2.1.1 Aplicações do H₂O₂	35
2.1.2 Síntese de H₂O₂	36
2.1.3 Propriedades físico-químicas do H₂O₂	37
2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DE H ₂ O ₂	38
2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS	39
2.4 ELETRODOS EM ELETROQUÍMICA ANALÍTICA.....	41
2.4.1 Eletrodo de carbono vítreo	43
2.5 ELETRODOS QUÍMICAMENTE MODIFICADOS	43
2.5.1 Estado da arte	44
2.5.2 Substratos	46
2.5.3 Métodos de modificação	47
2.5.3.1 Modelos estruturais.....	47
2.5.3.2 Gotejamento (<i>casting</i>).....	48
2.5.3.3 Modificação camada por camada.....	48
2.5.3.4 Eletrodeposição.....	50
2.5.3.5 Aditivos em eletrodos de pasta de carbono.....	51
2.6 MODIFICADORES QUÍMICOS.....	52
2.6.1 Nanopartículas	52
2.6.2 Nanotubos de carbono	55
2.6.3 Polímeros molecularmente impressos	56
2.6.4 Complexo azul da Prússia e seus análogos	57
2.6.4.1 Obtenção de nanopartículas de azul da Prússia	62
3 OBJETIVOS	65
3.1 OBJETIVO GERAL.....	65
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
4 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 INSTRUMENTOS E APARATOS	67
4.2 REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES	67
4.3 CONSTRUÇÃO DOS SENSORES ELETROQUÍMICOS.....	69
4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	70
4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA	71
4.5.1 Comportamento eletroquímico do H₂O₂	71

4.5.2 Características analíticas	71
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS	72
4.6.1 Creme para clareamento dental	72
4.6.2 Antisséptico	72
4.6.3 Enxaguante bucal	73
4.6.4 Creme para descoloração de pelos	73
4.7 DETERMINAÇÃO DE H ₂ O ₂ NAS AMOSTRAS	74
4.7.1 Características analíticas obtidas pelas curvas de adição de padrão	74
4.7 MÉTODO COMPARATIVO	74
4.7.1 Titulação com KMnO₄ 0,02 mol L⁻¹	75
4.7.2 Titulação com Ce(SO₄)₂ 0,05 mol L⁻¹	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE H ₂ O ₂	77
5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA OXIDAÇÃO DE H ₂ O ₂ SOBRE GCE	79
5.2.1 Eletrólito suporte	80
5.2.2 Influência do E_{app}	81
5.2.3 Efeito do pH	82
5.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO H ₂ O ₂	83
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ANÁLOGOS DE AZUL DA PRÚSSIA	85
5.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DAS NPAP SOBRE GCE	89
5.5.1 Voltametria cíclica	89
5.5.2 Impedância eletroquímica	93
5.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA GCE-NPAP	97
5.6.1 Influência do E_{app}	99
5.6.2 Influência do pH	100
5.7 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA	102
5.7.1 Linearidade e curvas de calibração	102
5.7.2 Sensibilidade	105
5.7.3 Limites de detecção e de quantificação	106
5.7.4 Repetibilidade intradia e interdia	108
6 APLICAÇÃO DOS SENSORES DESENVOLVIDOS	111
6.1 DETERMINAÇÃO DE H ₂ O ₂ EM CREME PARA CLAREAMENTO DENTAL	111
6.1.1 Resultados e discussão	111

6.1.1.1 Linearidade	112
6.1.1.2 Seletividade.....	112
6.1.1.3 Exatidão	113
6.1.1.4 Precisão.....	114
6.1.1.5 Robustez	114
6.1.2 Considerações parciais	116
6.2 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM ANTISSEPTICO	116
6.2.1 Resultados e discussão	116
6.2.1 Linearidade	117
6.2.2 Seletividade.....	117
6.2.3 Exatidão	118
6.2.4 Precisão.....	118
6.2.5 Robustez	118
6.2.2 Considerações parciais	119
6.3 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM ENXAGUANTE BUCAL ..	119
6.3.1 Resultados e discussão	119
6.3.1.1 Linearidade	120
6.3.1.2 Seletividade.....	121
6.3.1.3 Exatidão	121
6.3.1.4 Precisão.....	121
6.3.1.5 Robustez	122
6.3.2 Considerações parciais	122
6.4 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM CREME PARA DESCOLORAÇÃO DE PELOS	123
6.4.1 Resultados e discussão	123
6.4.1.1 Linearidade	124
6.4.1.2 Seletividade.....	124
6.4.1.3 Exatidão	125
6.4.1.4 Precisão.....	125
6.4.1.5 Robustez	126
6.4.2 Considerações parciais	126
7 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

A química analítica é muito versátil, pois reúne dentro da mesma temática uma variedade de áreas da química e de outras ciências. O motivo principal para justificar o presente trabalho paira na utilização de métodos eletroanalíticos para detecção e quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este composto é muito importante devido ao seu uso abrangente.

As aplicações para H_2O_2 incluem todos os meios possíveis: ar, água, solo, lodo, resíduos, etc. O uso de H_2O_2 pode ser verificado em indústrias como clarificante de tecidos e papeis, descontaminante de solos, tratamento de água potável. Ele pode ainda estar presente em cosméticos, fármacos e produtos de higiene pessoal, com aplicações já bem estabelecidas como o uso de H_2O_2 em tratamentos odontológicos. A vantagem de se realizar a detecção de H_2O_2 em certos produtos comerciais é de que a matriz contém menos interferentes do que aqueles encontrados comumente nas situações de usos industriais.

Neste trabalho serão apresentados assuntos relacionados a determinação não-enzimática de H_2O_2 por técnica de cronoamperometria. A detecção eletroquímica utilizou eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*) modificado por nanopartículas de análogos de azul da Prússia (NPAP). A modificação do GCE ocorreu por gotejamento de 2,0 μ L da solução contendo as NPAP. Os eletrodos modificados foram utilizados na determinação de H_2O_2 em amostras comerciais de uso cosmético e de higiene pessoal.

O uso de eletrodos quimicamente modificados (EQM) para determinação não-enzimática de H_2O_2 em amostras comerciais foi avaliado para a promoção de um método eletroanalítico de aplicação fácil e viável para determinações rápidas e precisas, na elucidação de problemas analíticos.

O trabalho foi ordenado por capítulos que buscam uma apresentação lógica, abordando inicialmente o tipo de amostra analisada e posterior contextualização dos métodos usados para determinações específicas. A partir daqui, espera-se que o leitor possa tomar conhecimento a respeito do tema trabalhado nesta tese que se dirige à química eletroanalítica.

Boa leitura!

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA E IMPORTÂNCIA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O H_2O_2 é o composto mais simples entre os que possuem o grupo funcional peróxido (ligação simples oxigênio-oxigênio) e foi descoberto em 1818 pelo químico francês Louis Jacques Thenard (SAMANTA, 2008). Suas características ambientalmente corretas são uma atração para o uso contínuo deste composto e aumento na demanda de síntese (TUNDO *et al.* 2000).

2.1.1 Aplicações do H_2O_2

Pode-se perceber uma variedade grande de emprego de H_2O_2 na indústria e produtos comerciais, porém na maioria das vezes, sua função é a mesma: atuar como agente oxidante de outros compostos.

O H_2O_2 pode ser usado como agente oxidante em processos industriais no clareamento de tecidos e papel, tratamento de água potável na pré-oxidação de compostos orgânicos, como agente desinfetante de alimentos, bebidas e embalagens, ou em tratamento para clareamento dos dentes (WESTBROEK *et al.* 2007). O emprego do H_2O_2 nestas áreas de processos químicos fez crescer em muito o seu consumo nos últimos anos (CAMPOS-MARTIN *et al.* 2006). O H_2O_2 é ainda usado na agricultura em pequenas dosagens na irrigação do solo para fornecimento do O_2 , como reagente industrial para produção de plastificantes, em cosméticos para clareamento de pele, pelos e tingimento de cabelos, e mais recentemente em sabões em pó livres de cloro para alvejar as roupas (US PEROXIDE, 2014).

O comércio de H_2O_2 vem aumentando devido principalmente à inserção gradual deste reagente em detrimento de outros com eficiência semelhante, porém mais agressivos ao homem e ao meio ambiente. Cita-se que por causa de sua reatividade, as soluções de H_2O_2 podem perder até 1% (m/V) de conteúdo por ano (de MATTOS *et al.* 2003). Isso faz com que se estude também o uso de estabilizantes eficientes para H_2O_2 à fim de minimizar as perdas de reagente pela decomposição. Os produtos comercializados que contém peróxido usam estabilizantes do tipo quelantes, soluções coloidais de estanoato, pirofosfato e silicato, além de

nitratos e organofosfonatos. Todavia, o tempo de estabilidade da solução de H_2O_2 nem sempre é o mais importante, como por exemplo, no tratamento de água potável em que a pureza da solução é mais importante (US PEROXIDE, 2014).

2.1.2 Síntese de H_2O_2

A síntese de H_2O_2 é bastante explorada. Como este assunto não faz parte do interesse principal do trabalho deu-se uma atenção moderada para síntese de H_2O_2 .

Embora não possa ser considerado um processo ambientalmente correto ou ligado à química verde, o H_2O_2 pode ser obtido em escala industrial através da oxidação de antraquinona (CAMPOS-MARTIN *et al.* 2006). Este processo é o mais amplamente utilizado para síntese de H_2O_2 . Outra forma de produção em larga escala é com as células combustíveis, com utilização de O_2 .

A oxidação parcial de alcoóis primários e secundários tem como produtos o H_2O_2 mais a cetona ou o aldeído correspondente ao álcool (RUST, 1955). A mistura de produtos (álcool que não reagiu, H_2O_2 e cetona ou aldeído) é destilada e o H_2O_2 fica misturado com a água (CAMPOS-MARTIN *et al.* 2006). A síntese enzimática é outra fonte importantíssima de H_2O_2 . As enzimas peroxidase realizam a oxidação de compostos orgânicos na presença de O_2 , formando H_2O_2 como um dos produtos.

O H_2O_2 pode também ser sintetizado pela eletrólise da água (DROGUI *et al.* 2001). Os produtos desta reação são H_2 e O_2 , que podem ser dispostos na célula eletroquímica por fluxo ou borbulhados na solução e gerar H_2O_2 (HUTCHINGS, 2008; MAEHARA *et al.* 2008). A mesma reação entre H_2 e O_2 pode ser realizada para produção de H_2O_2 sem necessidade de eletrólise. Para tal, se faz necessário a presença de um catalisador eficiente (EDWARDS *et al.* 2007; RATCHANANUSORN *et al.* 2014). A mistura H_2 e O_2 pode também formar H_2O_2 sob plasma ou outros métodos físicos (MORINAGA, 1962).

Espécies reativas de oxigênio, como OH^\cdot , O_2^- e H_2O_2 , podem ser formadas sobre a superfície de óxidos semicondutores sob radiação ultravioleta (UV) (CAI *et al.* 2003; GOTO *et al.* 2004). O H_2O_2 pode ser formado a partir de radical superóxido ou por dois radicais hidroxila (PETRIER *et al.* 1994).

2.1.3 Propriedades físico-químicas do H₂O₂

Poucos compostos podem exibir tantas utilidades diferentes quanto o H₂O₂ (US PEROXIDE, 2015). A utilidade de um composto está associada às características e propriedades físico-químicas do mesmo. Para o uso de H₂O₂, sua abrangência está associada principalmente à propriedade deste composto de ser um agente oxidante muito forte (Tabela 1) (de MATTOS *et al.* 2003). Assim, algumas das principais propriedades do H₂O₂ serão expostas a seguir. Todos os dados apresentados daqui em diante nesta seção são referenciados pelo *Handbook* de Química e Física 76ª edição (LIDE, 1995).

O H₂O₂ é um líquido incolor podendo também existir na forma de gás em temperatura ambiente, com ponto de fusão de -0,43 °C e ponto de ebulição de 150,2 °C. A densidade do líquido puro é 1,44 g cm⁻³, e ele é altamente solúvel em água. Nas soluções comercializadas, sua densidade varia conforme a concentração, sendo que geralmente são vendidas soluções de H₂O₂ entre 1 a 30 % (m/v).

Os valores de potencial padrão (E°) para as semirreações envolvendo H₂O₂ são uma característica muito conhecida para este composto e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Potenciais padrão de semirreações do H₂O₂ e outros agentes oxidantes.

Semirreação	E° / V
H ₂ O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ 2H ₂ O	1,776
HO ₂ + H ⁺ + e ⁻ ↔ H ₂ O ₂	1,495
O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ H ₂ O ₂	0,695
O ₂ + 2H ₂ O + 2e ⁻ ↔ H ₂ O ₂ + 2OH ⁻	-0,146
MnO ₄ ⁻ + 8H ⁺ + 5e ⁻ ↔ Mn ²⁺ + 4H ₂ O	1,507
Ce ⁴⁺ + e ⁻ ↔ Ce ³⁺	1,720
Cl _{2(g)} + 2e ⁻ ↔ 2Cl ⁻	1,358
IO ₃ ⁻ + 6H ⁺ + 6e ⁻ ↔ I ⁻ + 3H ₂ O	1,085

A Tabela 1 traz os valores de E° para H₂O₂ e para alguns outros reagentes que são comumente utilizados como agentes oxidantes em processo químicos, como KMnO₄, Ce(SO₄)₂, Cl₂ e KIO₃. Estas outras semirreações que não envolvem H₂O₂ foram tabeladas para efeito de

comparação dos valores de E° , para mostrar o poder que H_2O_2 tem como agente oxidante.

O H_2O_2 pode ainda ser incompatível com alguns outros reagentes comumente encontrados em laboratório, como cobre, cromo, ferro e outros metais e seus sais, alcoóis, acetona, compostos orgânicos em geral, anilina, nitrometano e materiais combustíveis. O termo incompatibilidade química se refere a substâncias químicas que podem reagir entre si. Com o conhecimento acerca de algumas características do H_2O_2 , a próxima seção aborda o assunto de determinações analíticas de H_2O_2 , relatando alguns trabalhos que empregam metodologias e técnicas de análise para determinações deste analito.

2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DE H_2O_2

O método recomendado pela Farmacopéia Brasileira para análise do H_2O_2 é a titulação redox (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). As titulações iodométricas, permanganométricas e as com sulfato de cério são executadas há bastante tempo. Contudo, alguns inconvenientes como o fato do método ser destrutivo, a periculosidade das soluções (WOO e KIM, 2004) e ainda o erro associado ao método de aproximadamente 10% (CHAI *et al.* 2004) fazem com que novos métodos sejam desenvolvidos. Nesta seção, será feita uma revisão a respeito das técnicas utilizadas para determinação deste analito.

O uso de métodos espectrofotométricos para determinação de H_2O_2 está bem descrito na literatura, contendo publicações muito antigas (BEERS e SIZER, 1951; SELLERS, 1980) e outras bastante recentes (SOUZA *et al.* 2014; HOSHINO *et al.* 2014). Determinações utilizando espectroscopia na região do UV (CHAI *et al.* 2004) e do infravermelho (WOO, 2004) também são bem exploradas e existem algumas evoluções nestes métodos, como a portabilidade e não destruição das amostras. Para estes trabalhos, foi necessária a combinação do H_2O_2 com outros reagentes que possibilitem a detecção do sinal originado.

Contudo, os métodos alternativos mais amplamente encontrados na literatura para determinações analíticas de H_2O_2 são os métodos eletroquímicos, como os voltamétricos (WESTBROEK *et al.* 2007), amperométricos (GHADERI e MEHRGARDI, 2014) e impedimétricos (SHAMSIPUR *et al.* 2012). A partir de agora, serão descritos trabalhos que utilizam os métodos eletroquímicos de análise para determinações

relevantes de H_2O_2 em diversas condições diferentes. As proteínas são também uma fonte de modificação de eletrodos para detecção eletroquímica de H_2O_2 (CHEN *et al.* 2012). A maioria das vezes estas moléculas são utilizadas em combinação com outros componentes, para formar os biossensores para H_2O_2 .

Muito se tem publicado a respeito de determinações voltamétricas e amperométricas de H_2O_2 , sendo que pequenas modificações nos sistemas de análise são realizadas.

O azul da Prússia (AP) é o composto mais amplamente conhecido como catalisador para a reação de H_2O_2 , depois das enzimas peroxidases (KARYAKIN, 2001). A boa performance deste composto está associada à sua estrutura policristalina que permite a penetração de moléculas pequenas nos interstícios, como o H_2O_2 , enquanto que as moléculas maiores não conseguem realizar este caminho (KARYAKIN *et al.* 1996). Por este motivo, o AP e seus derivados estão sempre sendo explorados. Exceto o AP propriamente dito, existem trabalhos que relatam a detecção de H_2O_2 com outros catalisadores como hexacianoferratos de cobre (FIORITO *et al.* 2006), níquel (CHAI *et al.* 1997), cobalto (WANG, S. *et al.* 2009), cromo (LIN e TSENG, 1998), vanádio (TSIAFOULIS *et al.* 2005), rutênio (TIAN *et al.* 2007) e manganês (EFTEKHARI *et al.* 2001).

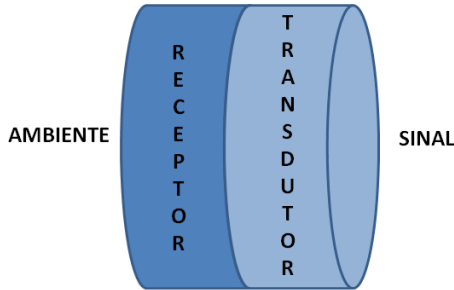
Para este trabalho, buscou-se um aprimoramento na nanoestruturação do AP na forma de nanopartículas (NP), por uma rota inédita, para buscar-se limites de detecção mais baixos possíveis e parâmetros de validação de método analítico satisfatórios.

2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Para relatar corretamente todos os procedimentos adotados no trabalho, é interessante um conhecimento concomitante a respeito dos princípios químicos que regem a presente pesquisa. Desta forma, uma maneira simples de apresentar este assunto seria afirmar que os sensores eletroquímicos são uma classe específica de sensores químicos. Para chegar aos sensores eletroquímicos, é preciso entender o que são os sensores.

Sensor é um dispositivo que tem a capacidade de reagir a uma variação física externa e transformá-la em um sinal mensurável (HANSMAN, 1999; SCHOLZ *et al.* 2008). A Figura 1 mostra a representação dos componentes de um sensor químico.

Figura 1. Representação dos componentes principais de um sensor químico.



De acordo com a Figura 1, tem-se da esquerda para direita, o ambiente, que é o local onde ocorrerá a variação de uma propriedade física. O receptor é o componente que consegue perceber a mudança no ambiente, realizando a amplificação e condicionamento do sinal do sensor químico. O transdutor tem a função de transmitir a energia do receptor na forma de uma grandeza passível de medição. Uma vez que o sinal analítico tenha sido obtido, ele será comunicado de maneira específica de acordo com o seu transdutor (WANG e ROGERS, 1995). Portanto, o transdutor é o componente que denomina a classe do sensor químico, ou seja, as variedades existentes de sensores químicos são dependentes da forma de transmissão no sinal do receptor através do transdutor (RIPKA, 2007; FRADEN, 2010), como os sinais ópticos e elétricos.

De acordo com o Dicionário de Eletroquímica (SCHOLZ *et al.* 2008), um sensor eletroquímico é o sensor em que a informação química obtida pelo receptor é transduzida como um sinal elétrico. Ainda, de acordo com a propriedade elétrica que é de fato medida, a classe dos sensores eletroquímicos pode ser dividida em três subcategorias (SCHOLZ *et al.* 2008; FRADEN, 2010):

- Sensores potenciométricos: detectam potencial;
- Sensores amperométricos: detectam corrente elétrica;
- Sensores condutométricos: detectam condutividade ou resistividade.

O eletrodo é o objeto utilizado para realizar as medidas sensoriais. A reação química de interesse ocorre na superfície dos eletrodos, que transmitem o estímulo na forma de uma resposta analítica. O material utilizado para os eletrodos que funcionam como sensores eletroquímicos é uma superfície eletrocatalítica (RIPKA, 2007). Na seção 2.4 será apresentada uma revisão a respeito das superfícies catalisadoras comumente utilizadas em eletrodos para funcionamento destes dispositivos como sensores eletroquímicos.

2.4 ELETRODOS EM ELETROQUÍMICA ANALÍTICA

Uma vez que a área de interesse deste trabalho é a de sensores eletroquímicos para serem usados em determinações analíticas, será apresentada uma revisão a respeito do alcance atual dos materiais utilizados em eletrodos. Mais à frente, a abordagem ficará cada vez mais aplicada ao objetivo do trabalho.

Os eletrodos à base de carbono foram um dos primeiros eletrodos sólidos usados para voltametria. O grafite pirolítico foi uma das primeiras formas de utilização de eletrodo sólido. O GCE também obteve muita notoriedade a partir das décadas de 60 e 70 na química analítica pelo trabalho pioneiro de Zittel e Miller (ZITTEL e MILLER, 1965) que realizaram um estudo analítico com alguns íons e complexos metálicos.

Outras formas bastante conhecidas de carbono condutor são o eletrodo de pasta de carbono (CPE, do inglês *carbon paste electrode*) (ADAMS, 1958; VITŘAS *et al.* 2009) e o diamante dopado com boro (BDD, do inglês *boron doped diamond*) (LUONG *et al.* 2009). Recentemente as formas nanoestruturadas como grafeno (BENVIDI *et al.* 2014), fulereno (GOYAL *et al.* 2007) e nanotubos de carbono (AHMAD *et al.* 2014) foram incorporadas aos eletrodos em vários trabalhos. O material que produziu grande expectativa a respeito de uma utilização eficiente são os eletrodos impressos à base de tintas de carbono (TUDORACHE e BALA, 2007).

Eletrodos à base de carbono vem sendo muito utilizados devido às características desejadas para os tipos de análise (HELLER *et al.* 2006). O eletrodo deve ser inerte na janela de potenciais de trabalho, de alta pureza e resistente a possíveis contaminações causadas por analitos e solventes, e ter logicamente, a superfície condutora para não influenciar a velocidade da reação de transferência de elétrons (BRETT,

1993). A estrutura e hibridização destas formas de carbono são variadas e a escolha do eletrodo “ideal” pode estar relacionada ao tipo de analito.

Existem algumas diferenças a respeito das propriedades dos materiais que compõem os eletrodos usados em eletroanalítica, e os eletrodos de carbono podem ainda ter suas propriedades divididas em duas subcategorias: propriedades do corpo do material (*bulk*) e as propriedades da superfície (McCREERY, 2008). Uma delas é a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl} , do inglês *double-layer capacitance*) (SHI, 1996; PAJKOSSY e KOLB, 2001), que é uma característica não comparável entre eletrodos de carbono e eletrodos metálicos. Muito porque existe uma diferença enorme quanto à porosidade relativa entre estes dispositivos. Outra característica é a janela eletroquímica de trabalho dos eletrodos. Os eletrodos de mercúrio tem conhecidamente as janelas eletroquímicas mais amplas na faixa de potenciais mais negativos, sendo que na faixa de potenciais mais positivos o eletrodo de mercúrio apresenta sinal de processo faradaico por causa da formação de óxidos (SKOOG, 2006).

De qualquer maneira, nos limites de potencial mais negativos, a sobretensão que deve ser aplicada aos eletrodos de mercúrio para desprendimento de $H_{2(g)}$ é muito alta. Eletrodos de carbono, de ouro ou de platina tem janelas eletroquímicas semelhantes, sem grande destaque de um destes eletrodos em relação aos demais.

Eletrodos de carbono apresentam uma vantagem sobre eletrodos metálicos no que diz respeito a aplicações eletroanalíticas. O carbono que compõe o eletrodo não apresenta sinal de processo faradaico na faixa de potenciais geralmente alcançada por estes dispositivos. Os processos faradaicos comumente observados em um voltamograma de eletrodos a base de carbono são a redução de oxigênio dissolvido na solução, desprendimento de hidrogênio nos limites de potenciais mais negativos e a oxidação da água nos limites de potenciais mais positivos. É possível encontrar mais informações sobre o perfil voltamétrico de eletrodos de carbono na literatura pertinente (LUO *et al.* 2001; LUONG *et al.* 2009; WILDGOOSE *et al.* 2009).

Os eletrodos metálicos utilizados em eletroanalítica apresentam processos faradaicos em seus componentes. Por exemplo, eletrodo de ouro ou eletrodo de platina, tem sinais de oxidação e de redução dentro da janela de potenciais de trabalho, que são relacionados a formação de óxidos metálicos. Assim como para os eletrodos de carbono, o perfil voltamétrico dos eletrodos metálicos citados anteriormente pode ser

encontrado na literatura adequada (BOND *et al.* 1997; ROBERTS *et al.* 2011; RODRIGUEZ e KOPER, 2014).

Estes processos faradaicos limitam a faixa de potenciais que se pode trabalhar, ou seja, limita a quantidade e variedade de analitos que se pode trabalhar, se estes eletrodos forem utilizados como sensores eletroquímicos por voltametria. Se o analito apresentar potencial de oxidação ou de redução que coincida com valores de potencial dos processos faradaicos do eletrodo em um experimento de voltametria, a medição desta grandeza será prejudicada. Para os eletrodos de carbono, qualquer analito que apresente potencial de oxidação ou de redução dentro da faixa de trabalho deste material, poderá ser medido sem maiores limitações.

2.4.1 Eletrodo de carbono vítreo

O carbono vítreo é um material dos mais importantes para ser usado como eletrodo (POCARD *et al.* 1992). Este material tem alcançado uma notabilidade incrível dentro da pesquisa na área de eletroquímica, e se tornou referência para o desenvolvimento de novos materiais, principalmente no quesito de superação de sua performance como sensor eletroquímico. Isto se deve às suas particularidades eletroquímicas que incluem resistividade elétrica baixa, impermeabilidade a gases, alta resistência química e uma janela de potenciais ampla (faixas de potenciais positivos e negativos) (van der LINDEN e DIEKER, 1980). Estes são requisitos básicos para utilização de um material como eletrodo em eletroanalítica.

2.5 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

A modificação química de eletrodos passou a ser uma alternativa útil já que a utilização dos eletrodos simples não satisfazia mais às necessidades da química eletroanalítica (ALKIRE, 2009). Inicialmente a modificação química de eletrodos foi justificada pelo aumento efetivo da área eletroativa que o eletrodo passava a adquirir. Ao invés de uma superfície plana, os eletrodos modificados apresentam uma estrutura tridimensional muito útil, pois o aumento da área efetiva permite que os analitos de interesse possam chegar mais facilmente ao centro catalítico condutor e permitir a reação de transferência de carga.

Os processos para obtenção de EQM que iniciaram com a adsorção de alguns reagentes químicos sobre a superfície de eletrodos inertes (MOSES *et al.* 1975; WATKINS *et al.* 1975) tiveram uma grande expansão e desenvolvimento até se chegar aos dias de hoje em que são obtidos revestimentos sobre os eletrodos para que estes atuem como os sensores eletroquímicos conhecidos atualmente (BAKKER, 2004; ZHANG e WANG, 2008; PRIVETT, 2010; KIMMEL, 2012).

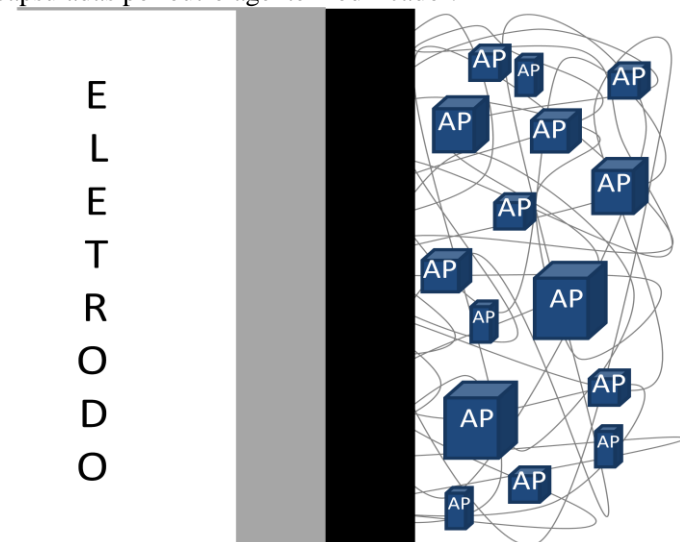
2.5.1 Estado da arte

Os revestimentos que se tem relatos na literatura são bastante variados. Tem-se modificações por eletrodeposição de preparo simples (de LIMA e SPINELLI, 2013) que tornam o trabalho mais atrativo, pois a facilidade de obtenção do material faz com que se possa ganhar tempo, para que a aplicação em eletroanalítica seja eficiente e relevante. Todavia, existem modificações mais sofisticadas por várias técnicas de modificação (JIANG *et al.* 2010; ZAPP *et al.* 2014; BRONDANI *et al.* 2014) que requerem habilidade e tempo na preparação do material. A maneira de obtenção do eletrodo modificado é muito particular e isso cria uma identidade única para cada eletrodo (ALKIRE, 2009).

A aplicação à qual o sensor será usado pode depender do resultado da modificação. A Figura 2 ilustra o resultado hipotético de uma modificação da superfície de um eletrodo genérico. A ilustração é feita para retratar o tipo de modificação que se deseja obter, onde se tem nanopartículas (cubos azuis que representam o complexo azul da Prússia) imobilizadas junto à superfície do eletrodo, com a ajuda de outros agentes modificadores. Estas modificações não são classificadas como simples.

Nesta figura, é ilustrado um eletrodo sólido simples com o seu suporte (cinza) e o material condutor, como por exemplo, carbono vítreo (preto). As NPAP são representadas pelos cubos azuis. Os tamanhos diferentes de partículas foram assim representados de forma proposital, pois o tamanho final dos compostos não é fixo e de acordo com o procedimento de obtenção, a faixa de tamanho das NP varia muito.

Figura 2. Ilustração de um eletrodo quimicamente modificado com NPAP encapsuladas por outro agente modificador.



Embora existam “receitas” para se obter partículas coloidais com o mesmo tamanho (MATIJEVIĆ, 1993), nota-se sempre haver uma faixa de distribuição de tamanhos. Continuando com a explicação da Figura 2, a linha contínua que envolve as NP representa outro modificador. Geralmente, utilizam-se polímeros para atuarem como modificadores adicionais em eletrodos convencionais. A cadeia polimérica, ou qualquer outro modificador secundário, serve neste caso de suporte para as NP na superfície do eletrodo assim como servem de estabilizante para as mesmas a fim de evitar aglomerações maiores.

Quando se trabalha com nanopartículas estabilizadas por polímeros na superfície de eletrodos, deve-se tomar cuidado de modo a evitar que a superfície condutora do eletrodo não seja totalmente recoberta pelo polímero, desta maneira bloqueando as áreas que antes estavam disponíveis para a aproximação do analito e dos eletrólitos. O interessante é obter um contato constante do material condutor do eletrodo com as nanopartículas eletrocatalíticas.

Ainda com relação à Figura 2, a espessura do material modificador também é um fator que pode ser controlado. A reprodução de uma superfície bem distribuída e organizada não é alcançada facilmente e também é fonte de estudo e otimização para uma boa

adequação desta necessidade ao resultado final de desempenho do eletrodo.

As técnicas de modificação de eletrodos mostram dependência de uma propriedade específica: a solubilidade. Os modificadores podem ser incorporados ao eletrodo pela preparação de uma solução contendo o modificador. Esta solução pode ser aplicada por gotejamento, imersão ou deposição eletrolítica. Contudo, quando o modificador não pode ser utilizado em sua forma solúvel, a alternativa é utilizar o modificador na forma de pó. Nestes casos, o CPE é um eletrodo muito útil, pois sua construção permite a incorporação de modificadores sólidos na forma de pó. Geralmente polímeros são os principais aditivos dos CPEs, além dos biossensores que usam enzimas.

As propriedades interfaciais oriundas da construção do eletrodo modificado, assim como em qualquer segmento da química de superfícies, não podem ser determinadas *a priori*, porém o efeito desejado pode ser alcançado pela correta construção do eletrodo. Não se pode esquecer o objetivo principal para se realizar uma modificação da superfície de um eletrodo, que é a melhora na sensibilidade e/ou seletividade do material para conduzir uma reação (ou reações) de transferência de elétrons. Se o modificador consegue obter uma resposta superior àquela obtida pelo eletrodo sem modificação, pode-se considerar que houve êxito na obtenção de um eletrodo modificado.

2.5.2 Substratos

Os eletrodos utilizados em eletroquímica analítica servem de substrato para realização das modificações. Os eletrodos sem modificação podem ser chamados de eletrodos convencionais. A performance destes eletrodos é limitada pela solução em que ele está imerso, o material do eletrodo e o potencial aplicado para mover a reação (ALKIRE, 2009). Uma maneira de contornar esta limitação do eletrodo é pela modificação de sua superfície (WANG, J. 1991).

Os modificadores químicos podem interagir com o substrato de duas maneiras possíveis: adsorção na superfície ou ligação covalente com o material do eletrodo (BLONDER *et al.* 1998). Com o eletrodo modificado, o material resultante é capaz de melhorar a seletividade, sensibilidade e eletrocatalise para a reação de interesse.

É possível se trabalhar com diversos substratos na modificação de eletrodos. Entre os mais utilizados pode-se citar o vidro

(KRASTEVA *et al.* 2002), carbono (WANG *et al.* 2006; LAOCHAROENSUK *et al.* 2007), substratos metálicos (SAHARI *et al.* 2008) e o papel recentemente (SANTHIAGO *et al.* 2014).

2.5.3 Métodos de modificação

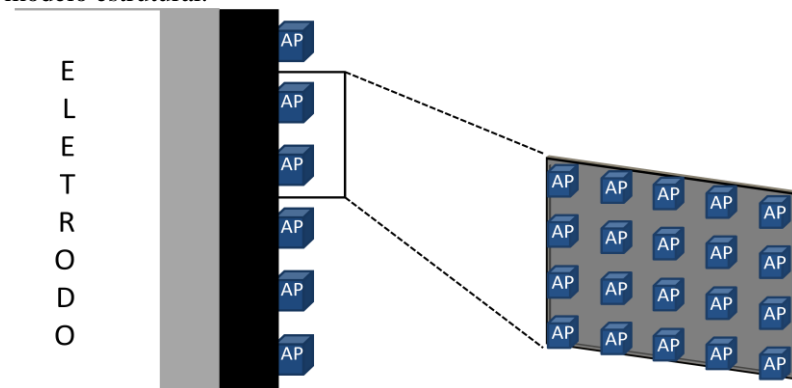
Como são muitas as rotas publicadas e conhecidas para modificação de um eletrodo, pode-se fazer um resumo acerca das possibilidades de modificação química da superfície deles. Como nos primeiros trabalhos de modificação da superfície de eletrodos os processos eram mais rústicos e menos planejados, as modificações funcionavam melhor para moléculas-alvo menores e simples como, por exemplo, espécies de oxigênio (HUANG *et al.* 2004), H₂O₂ (EVANS *et al.* 2002) ou metais em nível traço (AGRAZ *et al.* 1993).

2.5.3.1 Modelos estruturais

Com o conhecimento maior do que se desejava realmente com as modificações, foram elaboradas e desenvolvidas técnicas de modificação do eletrodo utilizando modelos estruturais. A Figura 3 mostra o resultado de uma modificação química sobre um eletrodo convencional, onde foi utilizado inicialmente um modelo estrutural para posterior deposição de partículas de AP.

Nesta figura é apresentado o resultado final da modificação. A distribuição uniforme e equidistante das NPAP foi assim representada para ilustrar a eficiência de atuação quando se utiliza um modelo estrutural, servindo de referência para a acomodação dos compostos a serem depositados. Estes compostos irão ocupar os espaços permitidos pelo modelo, que geralmente são compostos químicos que apresentam estrutura porosa com certa regularidade.

Figura 3. Modificação de um eletrodo com NPAP utilizando um modelo estrutural.



2.5.3.2 Gotejamento (*casting*)

O gotejamento (ou *casting*) é uma técnica de modificação de eletrodos das mais simples. Esta técnica consiste em gotejar uma solução contendo o agente modificador sobre a superfície do eletrodo a ser modificado. O volume de solução depende da área do eletrodo, mas geralmente é de poucos microlitros. Após o gotejamento da solução, o eletrodo é deixado em repouso para que o solvente possa evaporar, e então tem-se a formação de um filme sobre a superfície do eletrodo.

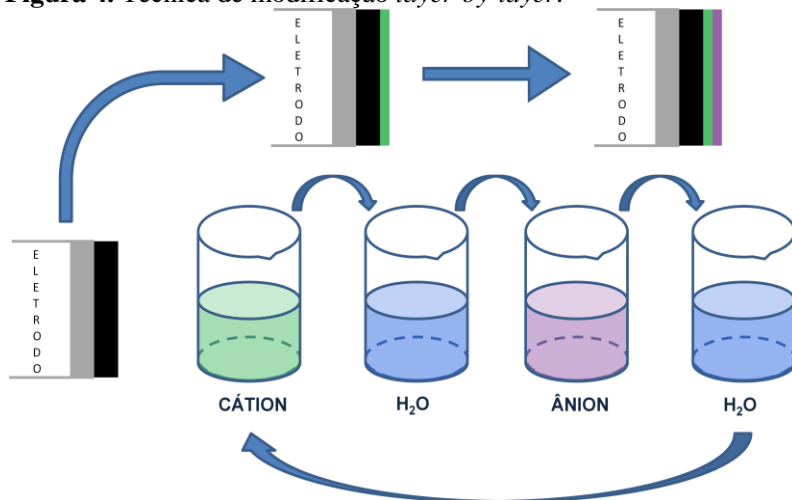
Para a detecção de H_2O_2 , pode-se citar a modificação de eletrodos com nanofios de Pt/TeO_2 (GUASCITO *et al.* 2013) pela técnica de *casting*, nanopartículas de platina (PtNP) combinadas com nanotubos de carbono (NTC) (HRAPOVIC e LOUNG, 2003) e ainda nanocompósitos de grafeno/ Fe_3O_4 (WANG, Y. *et al.* 2012). O *casting* é muito importante para os procedimentos de modificação de eletrodos pois utiliza pouca quantidade de solução e forma filmes reproduzíveis.

2.5.3.3 Modificação camada por camada

Uma forma de modificação química introduzida por Decher (DECHER *et al.* 1992) foi a chamada preparação camada por camada (ou em inglês *layer-by-layer* – LbL como é mais comumente conhecida esta técnica) onde se construía uma modificação a partir da imersão

alternada do eletrodo de trabalho em soluções contendo polieletrólitos carregados positiva e negativamente. A Figura 4 mostra o procedimento simples para o preparo de uma bicamada na superfície de um eletrodo através desta técnica.

Figura 4. Técnica de modificação *layer-by-layer*.



De acordo com a Figura 4, um eletrodo comum com sua superfície habitual pode ser modificado pela técnica de LbL. Tomando como exemplo um eletrodo com superfície metálica que é carregada negativamente, o procedimento de LbL deve iniciar com a imersão deste eletrodo metálico em uma solução (entre 5 e 30 min) contendo um componente carregado positivamente pois assim existe interação eletrostática favorável para aderência de uma camada heterogênea sobre a superfície do eletrodo. Após o período, o eletrodo deve ser retirado da solução e transferido para outro béquer contendo apenas água destilada para lavar o eletrodo e remover as moléculas que não estão adsorvidas na superfície do substrato.

A imersão posterior do eletrodo em uma solução (meso tempo de imersão) contendo um componente carregado negativamente leva à incorporação do mesmo sobre a superfície que estava com carga positiva na superfície. Em seguida o eletrodo deve ser imerso em água destilada para remover as moléculas que não ficaram adsorvidas de

forma efetiva. Este procedimento é compreendido como a preparação de uma bicamada.

2.5.3.4 Eletrodeposição

A eletrodeposição é uma técnica utilizada há mais de um século. A eletrodeposição é realizada em solução, e é baseada em deposição eletrolítica de um material sobre outro. Esta técnica consiste em depositar um composto sobre uma superfície, através da interação eletrostática causada por uma diferença de potencial ou de carga. Com esta técnica é possível a obtenção de filmes finos bem estruturados e de qualidade. Eletrodeposição tem aplicações muito amplas como na indústria de semicondutores, contatos metálicos, chapeamento e decoração (SCHWARZACHER, 2006).

Uma deposição eletrolítica pode render bons depósitos, sobretudo se for possível um controle acerca da velocidade de deposição, difusão do material, corrente de troca e ainda escolhendo-se adequadamente a estrutura do substrato (WADE, 2001). O eletrodo de filme de bismuto (BiFE, do inglês *bismuth film electrode*) é um dos exemplos mais claros sobre o que é eletrodo quimicamente modificado obtido por eletrodeposição. Foi possível a determinação de vitamina B2 (SÁ *et al.* 2015), vitamina B12 (KREFT *et al.* 2012), sulfadiazina (CAMPESTRINI *et al.* 2010) e progesterona (de LIMA e SPINELLI, 2013) com BiFE.

Eletrodeposição de outros metais como platina (SPĂRATU *et al.* 2009), ouro com grafeno (DING *et al.* 2014) e de antimônio (DEY *et al.* 2014) são exemplos de como a eletrodeposição é simples e eficiente, pois basta ter uma solução com o material de interesse e uma fonte de energia externa. Contudo, não são apenas compósitos metálicos que são eletrodepositados. Tem-se trabalhos sobre EQM por eletrodeposição de polianilina (ORATA e SEGOR, 2000), tetrametoxisilano (WANG, G. *et al.* 2008) e eletropolimerização com vários monômeros em solução (BRANZOI *et al.* 2009).

A eletrodeposição de azul da Prússia e seus análogos também foi estudada. Um sensor não enzimático para H_2O_2 foi construído pela eletrodeposição de AP sobre eletrodo de ouro (ZHANG, Y. *et al.* 2011). Ainda, a performance de AP eletrodepositado sobre diferentes eletrodos de carbono vítreo foi averiguada (RICCI *et al.* 2002). Um conteúdo

maior abordando a construção dos sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com AP é apresentado na seção 2.6.4.

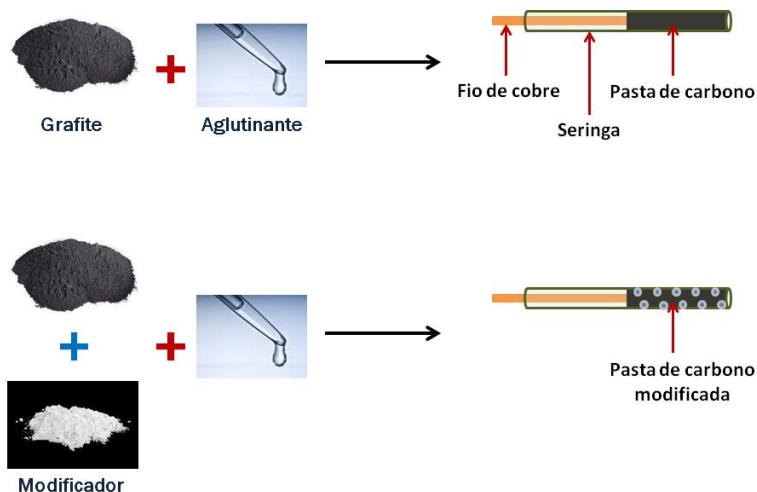
2.5.3.5 Aditivos em eletrodos de pasta de carbono

Os modificadores podem ser incorporados ao eletrodo pela preparação de uma solução contendo o modificador. Esta solução pode ser gotejada, pode ser utilizada para deposição eletrolítica ou o eletrodo pode ser imerso nela, etc., contudo nem sempre é possível utilizar o modificador em sua forma solúvel. A alternativa que resta é utilizar o modificador na forma de pó. Nestes casos, o CPE pode funcionar como substrato para a modificação. O CPE é muito útil, pois a construção deste eletrodo permite a incorporação de modificadores sólidos na forma de pó. Geralmente polímeros são os principais aditivos dos CPEs. A modificação do CPE é realizada por método diferente daquele utilizado para eletrodos sólidos.

O momento da construção do CPE é a única etapa para a adição de agentes modificadores. A Figura 5 ilustra o aspecto final de um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado. De acordo com a Figura 5, os componentes modificadores ficam distribuídos por toda a pasta de carbono.

Uma das vantagens do CPE é que sua superfície pode ser renovada apenas com a raspagem da superfície. Os outros eletrodos modificados precisam de uma renovação completa de suas superfícies pela construção de uma nova modificação. Como é possível renovar a superfície do CPE, é importante que a mistura grafite/modificador esteja bem uniforme, pois a quantidade de modificador na superfície do eletrodo deve ser sempre a mesma.

Figura 5. Esquema representativo de um eletrodo de pasta de carbono modificado.



2.6 MODIFICADORES QUÍMICOS

2.6.1 Nanopartículas

O uso de NP pode ser destacado dentro desta revisão sobre a modificação de eletrodos, pois muitos materiais nanoestruturados são ótimos catalisadores e podem assim fazer parte do sistema para detecção eletroquímica. A utilização de NP veio aflorar quando os pesquisadores da área de eletroanalítica perceberam a necessidade de um controle mais rigoroso da modificação em termos de nanoescala (ALKIRE, 2009). As NP podem melhorar o sinal analítico através do aumento efetivo da área disponível para reação, aumento da condutividade e/ou funcionar como catalisador.

A ideia de associar o controle de nanoescala ao uso de nanopartículas originou trabalhos nas áreas de eletrocatalise em células combustíveis (TIAN *et al.* 2007; XIAO *et al.* 2012) até aplicações como biossensores (KONG *et al.* 2008; BRONDANI *et al.* 2013; YU *et al.* 2015). Faz-se muito uso da interação eletrostática simples existente entre a superfície do eletrodo e da nanopartícula. Esta parte da

construção do sensor eletroquímico através do uso de NP incorporadas ao eletrodo pela ajuda de imobilizador é de interesse fundamental para o prosseguimento do trabalho.

Nanopartículas eletroativas são modificadores químicos que se pode usar para mudar as propriedades da superfície dos substratos. As NP tem aplicações em muitas áreas da química.

Quando o termo nanopartícula é utilizado, é importante entender e diferenciar a especificidade deste material. As nanopartículas abrangem o grupo de nanoestruturas eletroativas, nanoestruturas metálicas e os semicondutores. As NP eletroativas diferenciam-se das demais por causa de sua capacidade de sofrer processos de oxidação ou redução de todos os seus centros metálicos (BUTTRY, 2009). As NP metálicas e os semicondutores são conhecidos por sofrer processos de oxidação ou redução apenas na interface.

A ideia de ter-se uma superfície nanoestruturada é atrativa, pois o material em nanoescala possui características superiores e algumas vezes completamente diferentes daquela encontrada nos materiais com grãos maiores (GURRAPPÀ e BINDER, 2008). Estas propriedades incluem dureza, condutividade, difusão, densidade, resistência à corrosão e ao desgaste, entre outras. Geralmente, considera-se que o material deva ter tamanho de até 100 nm em pelo menos uma dimensão para ser classificado como nanomaterial.

Contudo, para que um nanomaterial tenha propriedade diferente daquela encontrada no material com dimensões maiores, o tamanho do nanomaterial deve estar abaixo do tamanho crítico capaz de modificar alguma de suas propriedades (ZARBIN, 2007).

Nanopartículas de óxidos metálicos tem sido amplamente empregadas na modificação de eletrodos convencionais (ALKIRE, 2009). Um dos materiais em nanoescala mais desenvolvidos é o dióxido de titânio (TiO_2), pois existem inúmeras publicações, além das formas de obtenção (GUPTA e TRIPATHI, 2010).

O TiO_2 na forma de NP é muito mais efetivo como fotocatalisador do que o material com dimensões maiores (HAN e BAI, 2009). Como material modificador de eletrodos, TiO_2 foi depositado sobre fios de titânio para oxidação de H_2 , CO e gerar metanol (HAYDEN *et al.* 2001), sobre eletrodo de óxido de estanho dopado com índio (ITO, do inglês *indium tin oxide*) para oxidação de hidroquinona, ácido ascórbico e dopamina (STOTT *et al.* 2006), e ainda em combinação com outras NP como de ouro, por exemplo, na oxidação de

NO e NO_3^- (MILSOM *et al.* 2007). As NP de TiO_2 apresentam geralmente um par redox referente à passagem de Ti(IV) para Ti(III) e vice-versa.

As nanopartículas de ouro (AuNP) mencionadas no parágrafo anterior também são amplamente utilizadas na modificação de eletrodos. As aplicações deste material são inúmeras (YAH, 2013) e isso faz com que as modificações de eletrodos com AuNP propiciem a investigação de uma faixa ampla de reações.

A oxidação de dopamina é uma das reações mais caracterizadas para EQM com AuNP (KURNIAWAN *et al.* 2009). O uso desta modificação (AuNP) para construção de biossensores também é bastante ampla (BRONDANI *et al.* 2013; DAVIS *et al.* 2013). Além de combinações com TiO_2 , AuNP também podem ser associadas com Ag (SHIBATA *et al.* 2002), Pd (SHAMSIPUR *et al.* 2014), Pt (CHAUHAN *et al.* 2012) entre outras.

Como visto, NP de metais nobres são bastante estudadas. Porém, alguns outros materiais que não são de metais nobres também são sintetizados na forma de nanopartículas. Tem-se a obtenção de NP compostas por Fe_2O_3 (KAMALI *et al.* 2014) e CuO (ASADBEIGI *et al.* 2012).

Uma das NP mais exploradas nos últimos anos, com aumento anual de publicações são as nanopartículas de azul da Prússia e seus análogos. Todavia, as NPAP serão abordadas com mais informações na seção 2.6.4.

Muitas nanopartículas eletroativas podem ainda ser utilizadas com sucesso na modificação da superfície de eletrodos (ALKIRE, 2009). Um grande salto, porém foi dado ao se examinar a necessidade de um agente adicional para minimizar os efeitos energéticos da aglomeração destes nanocompostos sobre a superfície dos eletrodos. As nanopartículas desempenham muitas funções dentro das áreas tecnológicas devido ao seu grande leque de propriedades.

A eletroatividade é o fator decisivo para o uso deste tipo de material na área de eletroanalítica. Quando se trabalha com nanopartículas, no próprio processo de síntese se utiliza um agente encapsulante com o objetivo de evitar aglomeração dos nanocompostos com a distribuição mais adequada da energia interfacial. Pode-se indicar então que o agente encapsulante da NP seja capaz de imobilizá-la junto à superfície do eletrodo através de interação eletrostática.

2.6.2 Nanotubos de carbono

Com o aumento do conhecimento e controle das variáveis envolvidas na modificação da superfície dos eletrodos, foi possível almejar estudos para o reconhecimento de sistemas mais complexos. A grande atenção dos trabalhos era voltada para o desenvolvimento de procedimentos para realizar a nanoestruturação controlada da modificação química. Além da utilização de nanopartículas incorporadas à superfície do eletrodo (de LIMA *et al.* 2014), utiliza-se muito os nanotubos de carbono (BALASUBRAMANIAN, 2006) e fios moleculares (LIU *et al.* 2007) imobilizados na superfície dos eletrodos.

Muito se tem publicado a respeito da utilização de NTC, e o grande aumento se deve à promessa deste material ser uma ferramenta promissora na funcionalização de superfícies (ALKIRE, 2009).

De fato, a funcionalização de NTC ocorre bastante, pois o carbono em todas as suas formas alotrópicas permite tal procedimento. A seguir serão citados alguns casos mais relevantes do uso de NTC na modificação de eletrodos.

O desenvolvimento de sensores e biossensores é um dos pilares das aplicações de NTC em eletroquímica. Os NTC são substratos muito bons para imobilização de proteínas e posterior modificação de eletrodos (AGŪÍ *et al.* 2008). Além de proteínas, as enzimas também são imobilizadas sobre NTC. Glicose oxidase foi imobilizada em NTC em vários trabalhos (GIUSEPPI-ELIE *et al.* 2002; RUBIANES e RIVAS 2003; WANG *et al.* 2003). Aplicados na análise de H₂O₂.

A funcionalização de NTC abre uma porta enorme para o desenvolvimento de novos materiais híbridos (ALKIRE, 2009), ainda mais porque este procedimento de funcionalização serve para superar um dos problemas que mais incomodam nos NTC, que é sua dispersão em solventes principalmente aquosos.

Para NP e CNT como modificadores, usa-se muito imobilizadores destes modificadores. O imobilizador pode ser um polímero, um surfactante ou um composto polar que tenha a capacidade de formar camadas auto-organizadas (SAM, do inglês *self assembled monolayer*) sobre a superfície do eletrodo. O emprego de uma SAM aliado ao uso de nanopartículas vem sendo estudada, além de que muitos autores consideram esta área muito nova, e com grande potencial para evolução (ALKIRE, 2009). Neste trabalho porém, não houve exploração desta técnica.

O imobilizador pode também desempenhar a função de um antiagregador. Já que é difícil a interação eletrostática entre o eletrodo e a nanopartícula, por compartilharem cargas de mesmo sinal, o imobilizador exerce um papel fundamental na busca pela modificação eficiente, pois ele permite a arquitetura do sistema idealizado.

Nota-se que quando é feita mais de uma etapa de acumulação na superfície de um imobilizador e da nanopartícula, o procedimento torna-se o método LbL, já mencionado no texto, que é a exposição alternada do eletrodo de trabalho a soluções contendo um componente imobilizador e outra contendo a nanopartícula (ou o modificador eletroativo).

2.6.3 Polímeros molecularmente impressos

O uso de polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymer*) e de polímeros não impressos (NIP, do inglês *non-imprinted polymer*) foi uma alternativa que produziu muitos resultados interessantes para a fabricação de sensores eletroquímicos. Alguns polímeros impressos possuem características específicas e fazem com que o tipo de modificação tenha que se adaptar a estas características.

Alguns MIPs e NIPs podem ser usados nos métodos tradicionais de modificação de superfícies de eletrodos, como o gotejamento (*casting*), imersão em solução contendo o modificador (*dip coating*, LbL) e eletrodeposição (YANG *et al.* 2011). Existe porém, casos em que os polímeros impressos são sólidos insolúveis nos solventes mais comuns e menos tóxicos, assim faz-se necessário utilizar o material obtido na forma sólida. O CPE é a melhor alternativa para superar esta limitação. A adição de MIPs à composição dos eletrodos de pasta de carbono é muito comum (ALIZADEH *et al.* 2012; GHOLIVAND *et al.* 2012) e sua exploração continua sendo útil na química eletroanalítica.

Os MIPs são polímeros sintetizados para desempenhar alguma especialidade conhecida (McCLUSKEY *et al.* 2007). Na maioria das vezes, procura-se que o MIP imite o comportamento de moléculas biológicas, ou seja, que consiga ser capaz de promover uma interação ou ligação química específica mimetizando os processos naturais. Para isto, os MIPs fazem uso de sítios de interação específicos, enquanto que sítios de interação não específicos podem existir em outros materiais (os

NIPs, por exemplo). O desenvolvimento dos MIPs busca como resultado que o material tenha uma afinidade preferencial pelo modelo utilizado para a impressão, em comparação a outras moléculas que possam também se ligar ao sítio de reconhecimento molecular (MAHONY *et al.* 2005; QUINT, 2014).

2.6.4 Complexo azul da Prússia e seus análogos

O uso do complexo azul da Prússia como modificador químico de eletrodos já é observado há algum tempo. Muito se tem publicado a respeito da síntese, preparação e caracterização de eletrodos modificados com AP e posterior aplicação como sensor ou detector óptico e eletroquímico.

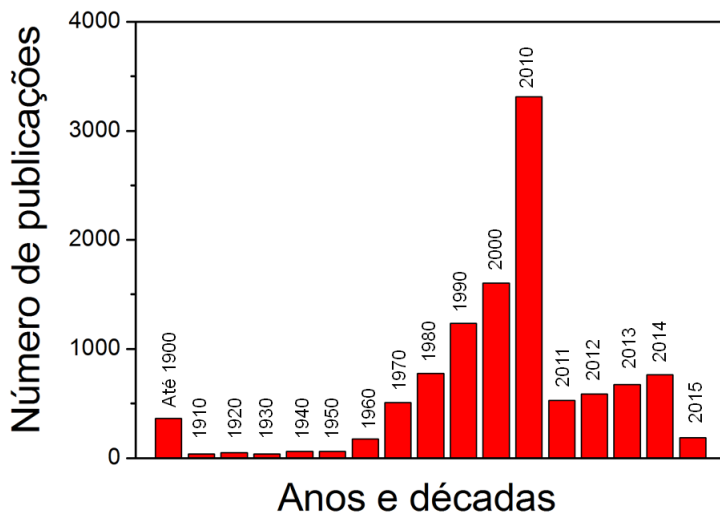
O primeiro registro de aplicação do complexo azul da Prússia foi publicado em 1824 (THE LANCET) no famoso periódico *The Lancet* que falava sobre o uso de complexos ácidos azuis contendo íons ferro para tratar animais envenenados com ácido cianídrico.

A partir das décadas de 1960 e 1970 começaram a ser publicados números maiores de trabalhos relatando o uso de complexos de AP e seus análogos, porém grande crescimento de aplicações foi visto a partir da década de 1980. A Figura 6 apresenta um gráfico de barras em que são contabilizados os trabalhos publicados com o tema azul da Prússia até a data de impressão deste manuscrito.

É notável o aumento significativo de trabalhos envolvendo este complexo. Do total, cerca de 20% dos trabalhos pertencem à área de eletroanalítica. Conforme é visto na Figura 6, o crescimento substancial de publicações a partir da década de 1980 coincide com o desenvolvimento mais acentuado da obtenção de sensores eletroquímicos. Nos tempos atuais em que esta área da química analítica está em grande expansão, nota-se o elevado número de trabalhos envolvendo AP.

O gráfico da Figura 6 está dividido em duas partes. Até a coluna representando 2010, a contagem de publicações foi dividida por décadas. A partir de 2011, a contagem foi realizada ano a ano. No ano de 2014 foi publicado o maior número de trabalhos dentro do período de um ano.

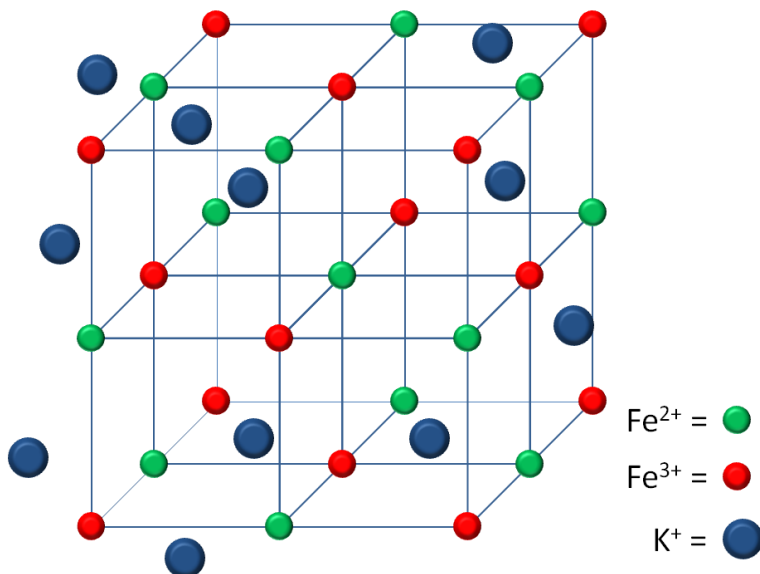
Figura 6. Quantidade de trabalhos publicados envolvendo o complexo azul da Prússia.



Alguns trabalhos que empregam AP como modificador de superfícies o usam como detector voltamétrico, amperométrico e óptico. Geralmente, o alvo preferido quando se usa AP como modificador químico é o H_2O_2 (RICCI e PALLESCHI 2005). Dentro da área de modificação de eletrodos, pode-se citar como trabalho importante que serve de referência para muitos outros o de Itaya *et al.* (ITAYA *et al.* 1981) em que a modificação de eletrodo de SnO_2 com AP foi utilizada para confecção de um dispositivo eletrocromico. A medida da banda de absorvância do eletrodo era usada para detecção da mudança do estado de oxidação do complexo. O princípio de funcionamento deste dispositivo é justificado pelas características diferenciadas do complexo azul da Prússia.

Consensualmente, o complexo azul da Prússia é formado por centros metálicos de Fe(II) e Fe(III), ligantes CN^- (posicionados nas arestas da estrutura) e contraíons de K^+ (distribuídos nos interstícios da estrutura), em uma geometria cúbica de face centrada. A Figura 7 apresenta a ilustração desta estrutura. Existem casos em que AP obtido por eletrodeposição origina uma estrutura considerada amorfa (ALAMINI *et al.* 2011).

Figura 7. Estrutura química do complexo azul da Prússia.



O comportamento eletroquímico deste complexo é também muito interessante, e faz com ele tenha versatilidade dentro das diferentes áreas da química. De acordo com publicações relatando o comportamento eletroquímico e eletrocromico deste complexo (DeLONGCHAMP e HAMMOND 2004), as habilidades analíticas do AP se explicam pelos pares redox presentes nele.

Quando os dois centros metálicos possuem Fe(III) o complexo apresenta coloração verde/amarela. Se nos centros metálicos se encontram apenas Fe(II), este complexo apresenta coloração branca. Se o complexo adquirir valência mista com Fe(II) e Fe(III), sua coloração torna-se azul intenso (azul da Prússia).

Baseado nesta propriedade, a modificação de eletrodos com AP encontra bons aliados para estimular sua produção, pois as detecções óptica e eletroquímica funcionam muito bem para este caso. Na seção 3.3.5.1 é feita uma explicação mais detalhada a respeito do comportamento eletroquímico dos complexos azul da Prússia e seus análogos, que foram utilizados no trabalho.

Com relação à detecção óptica utilizando AP, Koncki *et al.* (KONCKI *et al.* 2000) explicaram algumas formas de detecção

utilizando filmes finos de AP depositados sobre substrato não condutor. Interessante notar neste trabalho a capacidade de seleção do eletrodo modificado com AP no sinal analítico para compostos semelhantes com o mesmo grupo funcional.

O princípio de funcionamento do sistema de detecção é a redução do complexo azul da Prússia de um centro metálico de Fe(III) para Fe(II) enquanto ocorre a oxidação do analito. A redução do eletrodo fornece um complexo de coloração branca, sendo detectada a mudança no comprimento de onda refletido pelo eletrodo. Com o uso de espectrofotômetro, a geração do sinal analítico é detectada. O mesmo grupo de pesquisa ainda mostrou a possibilidade de análise de fármacos utilizando a mesma técnica (LENARCZUK *et al.* 2001).

Ressalta-se a comparação de eficiência do método óptico com eletrodo modificado com aquele indicado pela farmacopeia para análise de medicamentos. O uso do complexo azul da Prússia nestes casos é importante já que o mesmo possui a capacidade de desempenhar dois papéis no método de análise: um como agente oxidante dos analitos e outro como dispositivo de sensibilidade óptica.

A combinação de papéis simultâneos desempenhados pelo complexo AP foi também verificado por outro grupo de pesquisa (DeLONGCHAMP e HAMMOND, 2004), sendo obtida uma performance eletrocromica muito boa do eletrodo modificado com AP e polietilenoimina via modificação LbL e ainda a capacidade de dissolução controlada para liberação de fármacos simultaneamente.

O eletrodo modificado, ao reduzir um centro de Fe(III) a Fe(II), faz dissolver as camadas de modificador depositadas sobre o eletrodo pois ao ser reduzido, o complexo AP passa ao estado neutro não compartilhando mais carga elétrica necessária para interação na superfície do eletrodo e sustentação na estrutura, provocando, desta maneira, sua dissolução.

Como sensor eletroquímico o AP foi relatado recentemente (ORELLANA, 2009) como eficiente na detecção de hidrazina onde a presença do analito foi responsável pela mudança do perfil ciclovoltagemétrico do eletrodo de carbono vítreo modificado com AP nanoestruturado, que foi depositado eletroquimicamente sobre o eletrodo com o uso de um modelo estrutural de esferas de poliestireno. Este sistema de detecção indireta a partir da mudança de perfil voltamétrico do eletrodo pode ser muito eficiente na determinação de analitos que interagem de alguma forma com o modificador do eletrodo.

Esta detecção indireta difere da detecção eletroquímica direta no aspecto da origem do sinal analítico. A determinação direta é feita pelo sinal elétrico gerado pelo próprio analito e não um sinal oriundo da interação da molécula de interesse com um componente específico do eletrodo modificado.

No caso de biomoléculas, um GCE modificado com AP foi usado com o estabilizante polivinilpirrolidona e nanotubos de carbono de paredes múltiplas para detectar glicose (LI *et al.* 2008), e um eletrodo de ouro modificado com AP estabilizado com quitosana foi utilizado para imobilizar a enzima glicose oxidase (WANG *et al.* 2009) para detectar o mesmo analito. Para o primeiro trabalho mencionado neste parágrafo para determinação amperométrica de glicose, o GCE modificado respondeu bem para uma faixa ampla de concentrações ($2,0 \times 10^{-6}$ a $3,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) de glicose adicionada à solução, sendo que a reação catalisada foi com H₂O₂ liberado durante a reação enzimática.

No segundo caso, o eletrodo modificado com AP/quitosana também agiu como eletrocatalisador para H₂O₂. A determinação de H₂O₂ foi realizada com um sensor amperométrico com adições sucessivas de solução contendo glicose e aumento proporcional da corrente. Mesmo com a adição de possíveis interferentes como os ácidos úrico e ascórbico, a resposta do eletrodo ao composto de interesse não foi afetada de forma significativa.

O H₂O₂ foi também o analito de interesse para Ricci *et al.* (RICCI *et al.* 2002) no trabalho em que utilizam diferentes eletrodos de carbono vítreo para eletrodepositar AP e determinar H₂O₂ em sistema de injeção em fluxo. Através de microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *scanning electron microscopy*) eles analisaram a morfologia das superfícies dos diferentes eletrodos para entender a razão de terem sido obtidas respostas diferentes para o analito, que variam de acordo com a própria estrutura do material inicial do eletrodo.

Outra possibilidade de metodologia para se determinar H₂O₂ foi publicada (HORNOK e DÉKÁNY, 2007), que perceberam a necessidade de aliar a variável tempo para obter uma resposta melhor. Deste modo, o eletrodo modificado com AP era mantido em contato com o analito na fase de vapor para atingir o equilíbrio na interação entre os dois componentes e obter um ótimo sinal analítico.

Na mesma publicação, o eletrodo (microeletrodos interdigitalizados) modificado com AP foi mantido em contato também

com vapores de ácidos acético, clorídrico e sulfúrico, e posteriormente determinados amperometricamente.

Na análise de metais em nível traço, eletrodos modificados com AP foram empregados na determinação de Cr^{6+} (XING *et al.* 2009) e Ti^+ (YANG *et al.* 2008), sendo que são poucas as publicações que tratam de sistemas de AP na determinação de metais. Geralmente o alvo preferido dos pesquisadores é o H_2O_2 (RICCI e PALLESCHI, 2005).

Na área de sensores eletroquímicos também não se pode ignorar o fato de o sistema de AP ser um excelente catalisador para o subproduto das reações enzimáticas. No trabalho publicado por Ricci e Palleschi (RICCI e PALLESCHI, 2005) é apresentado um quadro geral contendo vários exemplos de eletrodos modificados com AP na detecção de H_2O_2 . Contudo, dois dos grandes trabalhos publicados na área de biossensores utilizando dispositivos contendo AP como modificador químico foram utilizados na detecção do H_2O_2 (KARYAKIN *et al.* 1994; KARYAKIN e KARYAKINA, 2001), e alavancaram inúmeros outros, pois estes dois trabalhos estão sempre presentes nas citações de publicações.

A capacidade catalítica dos centros metálicos com os íons Fe(II) e Fe(III) é também uma justificativa para o uso de AP como modificador químico de eletrodos. O par Fe(II)/Fe(III) se coordena bem em ponte com ligantes do tipo ciano, carboxilato, carbonato ou óxidos. Muita atenção é voltada para a síntese de novos complexos com centro de Fe(II) e Fe(III) , pois sua atividade catalítica tem funcionamento efetivo nas áreas de química inorgânica, bioinorgânica e química analítica.

2.6.4.1 Obtenção de nanopartículas de azul da Prússia

Para a construção de sensores eletroquímicos utilizando AP como o componente eletroativo do eletrodo modificado, é preciso também revisar a parte de obtenção do complexo azul da Prússia.

Neste trabalho a utilização de nanopartículas de azul da Prússia foi investigada mais detalhadamente do ponto de vista da obtenção, preparação, capacidade de nanoestruturação, propriedades químicas e eletroquímicas e por fim a aplicação deste material como modificador químico para construção de sensores eletroquímicos para o H_2O_2 e sua determinação em amostras comerciais.

A seguir, é apresentada uma revisão bibliográfica com as principais rotas de obtenção do AP para posterior utilização do complexo na modificação de eletrodos.

A maneira mais simples para obtenção do complexo azul da Prússia é através da combinação entre $K_3[Fe(CN)_6]$ (ferrocianeto) com uma fonte de Fe(II). Em água, a mistura propriamente dita dos reagentes citados acima produz uma solução coloidal estabilizada pelos contraíons de K^+ (ALKIRE, 2009). A mistura de $K_4[Fe(CN)_6]$ (ferricianeto) com uma fonte de Fe(III) também produz o complexo azul da Prússia (JIA, 2011), mas para se chegar a um controle estrutural e dimensional deste complexo existem algumas propostas para obtenção de AP.

O trabalho de Liu *et al.* (LIU *et al.* 2002) apresentou uma rota sintética muito simples e eficaz para obtenção de nanopartículas de AP. De acordo com o autor, são preparadas duas soluções, uma contendo $FeCl_3 + H_2O_2$ e a outra contendo $K_3[Fe(CN)_6] + H_2O_2$ e então a primeira solução é gotejada lentamente à segunda solução sob agitação. A professora Córdoba de Torresi (FIORITTO *et al.* 2005) publicou alguns trabalhos em que sua rota de obtenção do composto AP um pouco modificada em relação ao proposto por Liu que foi inclusive reproduzida por outros autores (HORNOK e DÉKÁNY, 2007). A reação entre $FeCl_3$ e $K_3[Fe(CN)_6]$ na presença de um pequeno excesso de H_2O_2 em banho de ultrassom produz partículas de AP estáveis e com pouca variação de tamanho.

Algumas publicações também relatam a possibilidade de obtenção de AP através de um método que utiliza apenas um passo (WANG, H. *et al.* 2012) assim como alguns derivados do hexacianoferrato (WANG, Z. *et al.* 2012) onde existe a mistura de duas fontes de Fe(III) em solução como $FeCl_3$ e $K_3[Fe(CN)_6]$ que posteriormente misturadas a um agente redutor proporciona a redução de um dos centros de Fe(III) a Fe(II) e consequente formação de AP.

Através desta rota é possível empregar uma substância como o polipirrol, que tem a capacidade de provocar a redução do Fe(III) a Fe(II) e ao mesmo tempo interagir de forma a estabilizar a energia superficial do composto formado e desempenhar o papel de estabilizante, como apresentado por Wang *et al.* (WANG, H. *et al.* 2012).

A obtenção de AP com a assistência de polímeros para imediatamente incorporarem as nanopartículas formadas é uma alternativa muito favorável (BORISOVA *et al.* 2009). Ding *et al.*

(DING *et al.* 2009) utilizaram quitosana para desempenhar este papel. No caso de Wang *et al.* foi utilizado pirrol como agente polimerizante (WANG, H. *et al.* 2012).

Com base nestes trabalhos, pode-se entender que o uso de polímeros para a estabilização e controle estrutural de nanopartículas pode ser bem sucedido. Em 2008 foi publicada uma revisão (ROZENBERG e TENNE, 2008) muito completa que fala da obtenção de NP com o uso de polímeros para ajudar na preparação. A publicação afirma que é possível preparar NP com formato, tamanho e propriedades funcionais controladas. Este aspecto é muito importante e interessante, pois o controle no preparo das NP faz também ser favorável obtenção de um filme mais reprodutível.

Outra rota muito difundida é a eletrossíntese de NPAP (TACCONI *et al.* 2003). Geralmente se utilizam novamente duas fontes de Fe(III) que são misturadas (ORELLANA, 2009). É possível eletrodepositar AP através da aplicação de uma corrente contínua (TOYODA *et al.* 2004), de um potencial constante (RICCI *et al.* 2003) ou ainda por ciclos voltamétricos (ALAMINI *et al.* 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter sensores eletroquímicos não-enzimáticos através da modificação de eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas de análogos de azul da Prússia encapsuladas por melanina e aplicá-los na determinação de H_2O_2 em amostras de uso cosmético e higiene pessoal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a oxidação do H_2O_2 através de técnicas eletroquímicas;
- Otimizar o eletrólito suporte, o potencial aplicado (E_{app}) e o pH da solução para detecção de H_2O_2 .
- Estudar o comportamento eletroquímico do H_2O_2 usando GCE sem modificações nas soluções de trabalho;
- Preparar modificadores químicos não-enzimáticos com análogos de AP e complexos de melanina na forma de NP para funcionalizar a superfície do GCE;
 - Testar a estabilidade das modificações;
 - Caracterizar:
 - ✓ A formação das nanopartículas através de imagens de microscopia de transmissão eletrônica (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*);
 - ✓ A presença de componentes eletroativos para os sistemas por voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*);
 - ✓ Processos de interface dos eletrodos modificados através de espectroscopia de EIS (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*);
- Examinar o comportamento dos eletrodos de carbono vítreo modificados;
- Verificar o desempenho dos eletrodos modificados na reação de oxidação do H_2O_2 ;
- Desenvolver metodologia analítica para determinação de H_2O_2 ;
- Avaliar as características analíticas de linearidade, curvas de calibração, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, exatidão, precisão e robustez, para solução padrão e amostras;

- Aplicar os sensores desenvolvidos na análise de H_2O_2 em amostras comerciais de creme para clareamento dental, solução antisséptica, enxaguante bucal e creme descolorante de pelos;
- Realizar a quantificação de H_2O_2 nas amostras comparando com as concentrações informadas pelo fabricante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTOS E APARATOS

A Tabela 2 apresenta a lista de equipamentos utilizados na parte experimental do trabalho e seus respectivos fabricantes.

Tabela 2. Instrumentos usados no trabalho.

Equipamento	Modelo/Fabricante
Balança analítica	Shimadzu 200G
pHmetro	Marte MB-10
Microscópio de transmissão eletrônica	JEOL JEM 1011
Potenciostato/galvanostato	VoltaLab PGZ100/Radiometer
Potenciostato	PalmSens/Palm Instruments BV
Água ultrapura	Milli Q Millipore/Belford
Centrifugador	208N/Excelsa Baby

As suspensões com os modificadores eram gotejadas sobre a grade de cobre específica para este tipo de análise. A distribuição de tamanhos das NPAP foram determinadas a partir das imagens de TEM utilizando o programa ImageJ. CV foi realizada para estudo do comportamento eletroquímico do H_2O_2 e para caracterização da presença dos modificadores sobre o substrato GCE. Cronoamperometria (CA) foi utilizada como técnica principal para otimização das condições experimentais da detecção de H_2O_2 e na caracterização analítica.

4.2 REAGENTES E PREPARO DAS SOLUÇÕES

A melanina utilizada neste trabalho foi sintetizada pelo aluno de doutorado Thiago Guimarães Costa, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Szpoganicz, no laboratório do Grupo de Bioinorgânica e Equilíbrio Químico, da Universidade Federal de Santa Catarina de acordo com o procedimento descrito por Szpoganicz *et al.* (SZPOGANICZ *et al.* 2002) e foi gentilmente cedida para este trabalho. À exceção deste, todos os demais reagentes são de grau analítico. A Tabela 4 apresenta a

procedência de todos os reagentes de grau analítico utilizados no trabalho.

Tabela 3. Procedência dos reagentes de grau analítico usados no trabalho.

Reagente	Fórmula química	Procedência
Ácido acético 99%	CH ₃ COOH	Vetec
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Ecibra
Ácido nítrico 65%	HNO ₃	Synth
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Vetec
Cloreto de ferro (III)	FeCl ₃ .6H ₂ O	Vetec
Cloreto de níquel (II)	NiCl ₂ .6H ₂ O	Vetec
Cloreto de potássio	KCl	Vetec
Ferroína	C ₃₆ H ₂₄ FeN ₆ ²⁺	Vetec
Hexacianoferrato de potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Vetec
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec
Permanganato de potássio	KMnO ₄	Vetec
H ₂ O ₂ 30%	H ₂ O ₂	Synth
Oxalato de sódio	Na ₂ C ₂ O ₄	Sigma-Aldrich
Sulfato de cério (IV)	Ce(SO ₄) ₂	Vetec
Sulfato de cobalto (II)	CoSO ₄ .7H ₂ O	Vetec
Sulfato de cobre (II)	CuSO ₄ .5H ₂ O	Vetec
Trióxido de arsênio	As ₂ O ₃	Sigma-Aldrich

Os estudos de pH foram realizados em solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ na faixa de 2,0 a 12,0. A solução tampão BR foi escolhida devido à sua versatilidade, já que mantém a capacidade tamponante do meio por toda a escala de pH. A solução de KCl foi incorporada ao tampão BR pois é necessária a presença de íons K⁺ em solução. O mecanismo de reação dos complexos azul da Prússia e seus análogos depende do balanço de cargas promovido pelo íon K⁺ (Seção 3.3.5.1).

O pH foi ajustado de acordo com a necessidade pela adição de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Preparou-se uma solução padrão de H₂O₂ 0,2 mol L⁻¹ para se realizar a otimização das condições experimentais na metodologia analítica, sendo que a concentração de H₂O₂ na célula eletroquímica foi de 1,0 mmol L⁻¹.

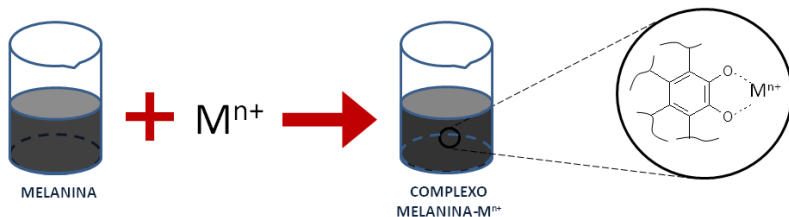
Preparou-se separadamente soluções aquosas dos sais FeCl₃.6H₂O, CuSO₄.5H₂O, NiCl₂.6H₂O e CoSO₄.7H₂O na concentração

de $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para as reações de complexação com melanina sintética. Solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada para a síntese das NPAP.

4.3 CONSTRUÇÃO DOS SENSORES ELETROQUÍMICOS

Primeiramente, o complexo melanina- $\text{M}^{\text{n}+}$ ($\text{M}^{\text{n}+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}) foi obtido de acordo com o procedimento descrito anteriormente (COSTA *et al.* 2012). Resumidamente, a massa de 10,0 mg de melanina foi dissolvida em água pura suficiente para a solubilização completa do composto (pouco mais de 5,0 mL) e então foram adicionados mais 5,0 mL de solução contendo $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de íons metálicos $\text{M}^{\text{n}+}$ ($\text{M}^{\text{n}+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}). A Figura 8 mostra esta etapa. A mistura foi mantida sob forte agitação durante 48 h.

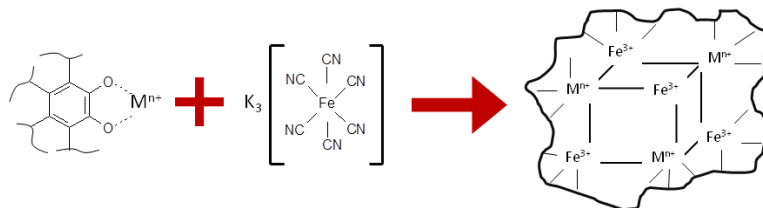
Figura 8. Reação de complexação da melanina com metais de transição ($\text{M}^{\text{n}+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}).



Em seguida, um volume de $862 \mu\text{L}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionado ao béquer que continha a solução do complexo melanina- $\text{M}^{\text{n}+}$ e foi mantido em banho de ultrassom durante 30 min. Após este período, foram obtidas NP encapsuladas pelo complexo melanina- $\text{M}^{\text{n}+}$ ($\text{M}^{\text{n}+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}). As suspensões contendo as nanopartículas foram armazenadas em um recipiente fechado de vidro âmbar protegidas da luz e guardadas sob refrigeração. A Figura 9 mostra a segunda etapa de forma detalhada.

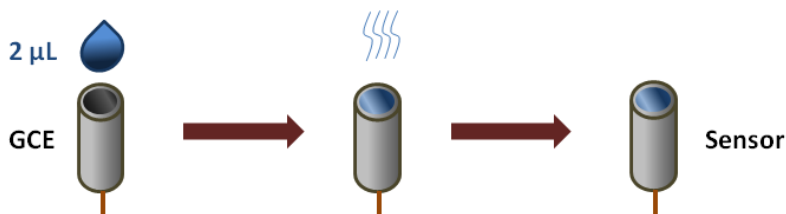
O GCE de 2,0 mm de diâmetro foi polido em pó de alumina com granulações decrescentes de 0,50 e 0,05 μm , e posteriormente lavado com água destilada e levado a banho de ultrassom em água desionizada durante 3 min.

Figura 9. Reação entre o complexo melanina- M^{n+} com ferrocianeto de potássio para obtenção de NPAP modificadas ($M^{n+} = Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}$ ou Co^{2+}).



Em seguida, 2,0 μL da suspensão de NPAP modificadas com melanina- M^{n+} foram gotejados sobre os eletrodos de trabalho e secos em temperatura ambiente (Figura 10) para obtenção dos sensores.

Figura 10. Ilustração do método *casting* para construção dos sensores eletroquímicos baseados em NPAP modificadas com complexos de melanina- M^{n+} ($M^{n+} = Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}$ ou Co^{2+}).



4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Os experimentos eletroquímicos (EIS, CV e CA) com substrato de carbono vítreo foram realizados em célula convencional para três eletrodos. Os eletrodos de trabalho (ET) utilizados foram o GCE e os sensores eletroquímicos construídos com as NPAP que serão descritos na próxima seção (seção 3.2.4). Um fio de Pt em espiral foi utilizado como eletrodo auxiliar (EA) e o eletrodo de referência (ER) era o eletrodo de $Ag/AgCl$ saturado com KCl ($Ag/AgCl, KCl_{sat}$). Os potenciais mencionados no texto são medidos em relação a este eletrodo de referência.

Os experimentos de EIS foram realizados sob potencial controlado de +1,5 V com uma varredura de frequências na faixa de 100 kHz a 10 mHz e um sinal de onda sinusoidal de 10 mV de amplitude. Voltamogramas cíclicos foram registrados de -1,0 a +2,0 V com uma velocidade de varredura de potencial (v) de 200 mV s⁻¹ para a caracterização dos sensores, e de 0,0 a +2,0 V com v de 100 mV s⁻¹ para a detecção de H₂O₂ usando GCE sem modificação. Para as medidas amperométricas, um potencial (E_{app}) constante foi aplicado ao eletrodo de trabalho durante 600 s antes do início das adições consecutivas de concentrações crescentes de H₂O₂. Adotou-se um intervalo de 60 s entre cada adição de H₂O₂.

4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

A seguir serão descritos os procedimentos experimentais relativos ao comportamento eletroquímico do analito, assim como toda a parte de caracterização analítica e os estudos de validação de metodologia eletroanalítica.

4.5.1 Comportamento eletroquímico do H₂O₂

Preparou-se 10 mL de uma solução padrão de H₂O₂ 0,2 mol L⁻¹ para ser utilizada nos estudos do comportamento eletroquímico do analito. A concentração de H₂O₂ na célula eletroquímica foi de 1,0 mmol L⁻¹. Este estudo foi realizado apenas para GCE não modificado. Como eletrólito suporte se utilizou tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹. Adicionou-se 10,0 mL da solução tampão à célula eletroquímica e foram obtidos voltamogramas cíclicos entre 0,0 e 2,0 V. Realizou-se estudo da variação da velocidade de varredura nos voltamogramas (10 a 1000 mV s⁻¹) e foram obtidos gráficos representativos do comportamento eletroquímico do peróxido.

4.5.2 Características analíticas

A validação da metodologia analítica foi feita para se obter informações confiáveis a respeito do trabalho desenvolvido (RIBANI *et al.* 2004). Na primeira etapa, avaliaram-se os parâmetros de validação obtidos a partir das curvas de calibração: linearidade e sensibilidade

foram estudadas respectivamente pelos coeficientes de determinação dos pontos das curvas de calibração e a inclinação destas curvas.

Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) obtidos respectivamente através das equações $LD = 3,3DP/S$ e $LQ = 10DP/S$, onde DP é o desvio padrão do coeficiente linear da melhor reta das curvas de calibração e S é o coeficiente angular da melhor reta das mesmas curvas.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

4.6.1 Creme para clareamento dental

Utilizou-se uma amostra de creme para clareamento dental contendo H_2O_2 para aplicar o sensor desenvolvido, que compreende o GCE modificado com NPAP encapsuladas por complexos de melanina- M^{n+} à fim de determinar H_2O_2 .

Segundo o fabricante, o conteúdo de H_2O_2 na seringa do produto era de 9,5% (m/m). Este creme foi retirado de sua embalagem original (uma seringa) e pesou-se 100 mg do produto em um copo de béquer. Esta quantidade foi dissolvida em eletrólito suporte tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Não foi necessário pré-tratamento, pois o produto comercial é solúvel no eletrólito suporte. A solução foi homogeneizada em banho de ultrassom durante 30 min e logo depois transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi aferido. Esta solução foi utilizada para as determinações quantitativas de H_2O_2 no creme para clareamento. Uma alíquota de 1,0 mL foi pipetada e adicionada à célula eletroquímica.

4.6.2 Antisséptico

Utilizou-se uma amostra de solução antisséptica contendo H_2O_2 para aplicar o sensor desenvolvido. Segundo o fabricante, o conteúdo de H_2O_2 na embalagem do produto era de 3,0% (m/m). Este produto foi aberto e não houve pré-tratamento do mesmo. Fez-se um teste de solubilidade do produto no eletrólito suporte e o resultado foi positivo. Esta solução contida na embalagem foi utilizada para as determinações quantitativas de H_2O_2 , sendo que uma alíquota de 100,0 μL foi pipetada

e adicionada à célula eletroquímica contendo 10,0 mL de eletrólito suporte.

4.6.3 Enxaguante bucal

Utilizou-se uma amostra de solução de enxaguante bucal específica para clareamento auxiliar dos dentes para aplicar o sensor composto por NPAP-Fe³⁺ desenvolvido. Segundo o fabricante, o conteúdo de H₂O₂ na embalagem do produto era de 1,5% (m/m). Este produto foi aberto e fez-se um teste de solubilidade do produto no eletrólito suporte e o resultado foi positivo. Deste modo, não houve necessidade de pré-tratamento da amostra.

A solução contida na embalagem do produto foi utilizada para as determinações quantitativas de H₂O₂, sendo que uma alíquota de 100,0 µL foi pipetada e adicionada à célula eletroquímica.

4.6.4 Creme para descoloração de pelos

Utilizou-se uma amostra de descolorante de pelos para uso doméstico como fonte de H₂O₂ para aplicar o sensor composto por NPAP-Fe³⁺ desenvolvido. Segundo o fabricante, o conteúdo de H₂O₂ na embalagem do produto era de 30% (m/m). Este produto foi aberto e realizou-se o pré-tratamento. Fez-se um teste de solubilidade do produto no eletrólito suporte e o resultado foi de solubilidade parcial.

Pesou-se 100,0 mg do creme descolorante e dissolveu-se em 10 mL de eletrólito suporte tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹. A suspensão foi colocada em banho de ultrassom durante 30 min, para solubilizar uma quantidade maior de H₂O₂ e diminuir a turbidez da suspensão. A quantidade de 10 mL foi transferida para um tubo de ensaio. Este tubo foi colocado em um centrifugador durante 15 min a uma velocidade de 3000 rotações por minuto.

Houve separação de três fases distintas: no fundo restou uma quantidade de creme sem solubilidade, na fase intermediária restou a solução aquosa e na fase menos densa formou-se uma emulsão. Utilizou-se a fase aquosa intermediária para realização das determinações. Pipetou-se uma alíquota de 100 µL e adicionou-se à célula eletroquímica.

4.7 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ NAS AMOSTRAS

Optou-se por realizar o método de adição de padrão para a determinação de H₂O₂ nas amostras. Foram obtidos cronoamperogramas para as determinações em amostras comerciais, sendo que a primeira adição de analito foi a alíquota da amostra, e os cinco pontos seguintes são referentes às adições consecutivas de 50,0 µL de solução padrão de H₂O₂ 0,2 mol L⁻¹. O procedimento de adição de padrão se seguiu idêntico para o eletrodo de trabalho (GCE), sem e com modificações para todas as amostras.

4.7.1 Características analíticas obtidas pelas curvas de adição de padrão

Os resultados obtidos com o método amperométrico foram comparados com aqueles obtidos com o método oficial, a titulação de oxirredução. Com a determinação de H₂O₂ realizada, avaliaram-se os seguintes parâmetros de validação: linearidade, seletividade através da comparação entre as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão; exatidão foi determinada pela comparação dos dados obtidos pelos métodos amperométrico e titulação redox, e pelos ensaios de recuperação; a precisão foi calculada através da concordância entre os dados obtidos por métodos diferentes e por medidas independentes do sinal intra e interdía. A robustez do método foi verificada através da modificação do valor de pH ótimo em $\pm 0,2$ unidades, com posterior avaliação da seletividade, exatidão e precisão.

4.7 MÉTODO COMPARATIVO

A titulação potenciométrica foi utilizada como método comparativo com o objetivo de se obter dados a respeito da determinação de H₂O₂ em amostras comerciais e posterior comparação da concordância dos dados obtidos por este método com aqueles obtidos através das medidas amperométricas. Fez-se uso de titulações potenciométricas utilizando KMnO₄ e Ce(SO₄)₂ como titulantes. Optou-se pelos dois titulantes diferentes para comprovar a eficiência da titulação potenciométrica na determinação de H₂O₂. A seguir serão descritos os procedimentos para ambas titulações.

4.7.1 Titulação com KMnO_4 0,02 mol L^{-1}

Preparou-se 250 mL de KMnO_4 0,02 mol L^{-1} para ser utilizado como titulante. Pesou-se 0,1675 g de padrão primário $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ seco que foram solubilizadas em 25 mL de água. Adicionou-se ainda 7,0 mL de H_2SO_4 concentrado à solução de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ e fez-se a padronização da solução de KMnO_4 0,02 mol L^{-1} a quente.

Para as titulações de H_2O_2 na amostra de creme para clareamento dental, pesou-se 100 mg do produto e diluiu-se em 10 mL de água. Adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 3,0 mol L^{-1} e procedeu-se à titulação com KMnO_4 0,02 mol L^{-1} padronizado.

Para as titulações de H_2O_2 na amostra de solução antisséptica, transferiu-se 1,0 mL do produto para um erlenmeyer e diluiu-se em 10 mL de água. Adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 3,0 mol L^{-1} e procedeu-se à titulação com KMnO_4 0,02 mol L^{-1} padronizado.

4.7.2 Titulação com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0,05 mol L^{-1}

Preparou-se 250 mL de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0,05 mol L^{-1} para ser utilizado como titulante. Pesou-se 0,120 g de padrão primário As_2O_3 , adicionou-se 15 mL de NaOH 0,1 mol L^{-1} e posteriormente 25 mL de H_2SO_4 3,0 mol L^{-1} . Adicionou-se ainda duas gotas de ferroína como indicador e fez-se a padronização da solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0,05 mol L^{-1} .

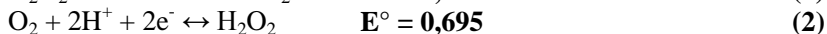
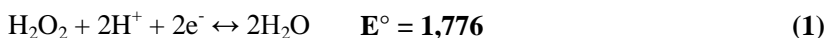
Para as titulações de H_2O_2 na amostra de enxaguante bucal transferiu-se 1,0 mL do produto para um erlenmeyer e diluiu-se em 10 mL de água. Adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 3,0 mol L^{-1} e procedeu-se à titulação com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0,05 mol L^{-1} padronizado.

Para as titulações de H_2O_2 na amostra de creme descolorante de pelos, a amostra passou pelo mesmo pré-tratamento descrito na seção 4.6.4. Transferiu-se 1,0 mL da fase líquida para um erlenmeyer e diluiu-se em 10 mL de água. Adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 3,0 mol L^{-1} e procedeu-se à titulação com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0,05 mol L^{-1} padronizado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE H₂O₂

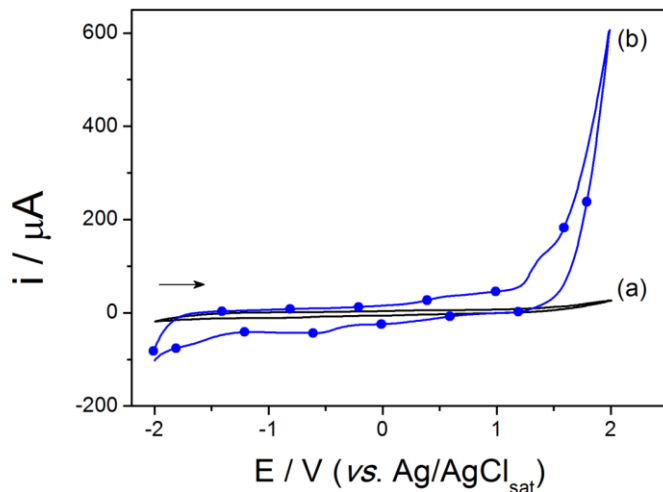
O H₂O₂ pode ser determinado eletroquimicamente através de reações de oxidação (IVANDINI *et al.* 2005; SALIMI *et al.* 2007; ENSAFI *et al.* 2013; CHANG *et al.* 2014; HELI e PISHAHANG, 2014) ou redução (SHI *et al.* 2011; MAŽEIKIENĖ *et al.* 2011; LI *et al.* 2013; HELI *et al.* 2014; ENSAFI *et al.* 2014). A decomposição do H₂O₂ é uma reação bem simples, cujos produtos são oxigênio molecular e água, conforme mostrado na Equação (3). O detalhamento desta reação é mostrada nas Equações (1) e (2), pelas respectivas semirreações eletroquímicas do H₂O₂.



Para dar início aos procedimentos de obtenção da melhor resposta analítica na detecção eletroquímica de H₂O₂, foram obtidos voltamogramas cíclicos utilizando GCE em eletrólito suporte KCl 0,1 mol L⁻¹ na ausência e na presença de H₂O₂ 1,0 mmol L⁻¹. A CV para GCE em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (Figura 11 - curva a) mostra que na varredura de ida (de -2,0 a +2,0 V) não existe um sinal analítico de processos faradaicos na superfície do ET. Nos limites positivos de potencial, existe apenas a oxidação da água, responsável pelo aumento de corrente observado no voltamograma. Na varredura de volta (de +2,0 a -2,0 V) existe um sinal pequeno de redução em -0,5 V referente à reação do oxigênio molecular dissolvido na solução.

O voltamograma cíclico após à adição de H₂O₂ 1,0 mmol L⁻¹ à célula eletroquímica (Figura 11 - curva b) mostra que existe um sinal em +1,4 V que está associado à oxidação do H₂O₂, de acordo com a Equação (2). Existe ainda, na varredura de volta, um aumento no sinal de redução do oxigênio molecular presente na solução. Este aumento é explicado pelo aumento da concentração de O₂ na solução, pois este é um dos produtos da reação de oxidação do H₂O₂, conforme explicado anteriormente.

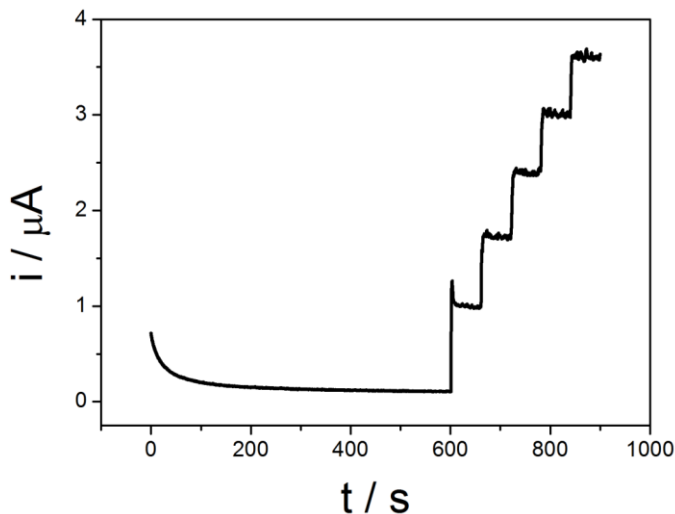
Figura 11. Voltamogramas cíclicos de GCE em KCl 0,1 mol L⁻¹ (a) na ausência e (b) na presença de H₂O₂ 1,0 mmol L⁻¹. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.



Há trabalhos que realizam a detecção voltamétrica de H₂O₂ cujo potencial de pico é diferente daquele encontrado no presente trabalho (GRISHAM, 2013). Isto porque a modificação é diferente. Todavia, o potencial de pico de oxidação (E_{po}) encontrado aqui para o H₂O₂ será utilizado para o prosseguimento do trabalho. Uma vez que a detecção voltamétrica de H₂O₂ tenha sido verificada, fez-se um experimento utilizando a técnica de cronoamperometria para saber se a detecção amperométrica de H₂O₂ é viável.

Inicialmente, foi aplicado um potencial (E_{app}) de +1,4 V por se tratar do E_{po} . A Figura 12 apresenta o cronoamperograma obtido para GCE em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. Foram realizadas cinco adições de H₂O₂ 1,0 mmol L⁻¹ com intervalos de 60 s entre cada uma delas. A resposta de corrente é observada para todas as adições de H₂O₂, com aumentos de corrente com incrementos proporcionais a quantidade de H₂O₂ adicionado.

Figura 12. Cronoamperograma para GCE em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ para cinco adições sucessivas de H₂O₂ 1,0 mmol L⁻¹. E_{app} = +1,4 V.



Até o momento, foi comprovado que H_2O_2 pode ser oxidado sobre a superfície do GCE com uma resposta de corrente. Como a maneira mais comum de se realizar as determinações de H_2O_2 é pela técnica de amperometria, a mesma será investigada de modo mais aprofundado para obter a melhor resposta possível.

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA OXIDAÇÃO DE H_2O_2 SOBRE GCE

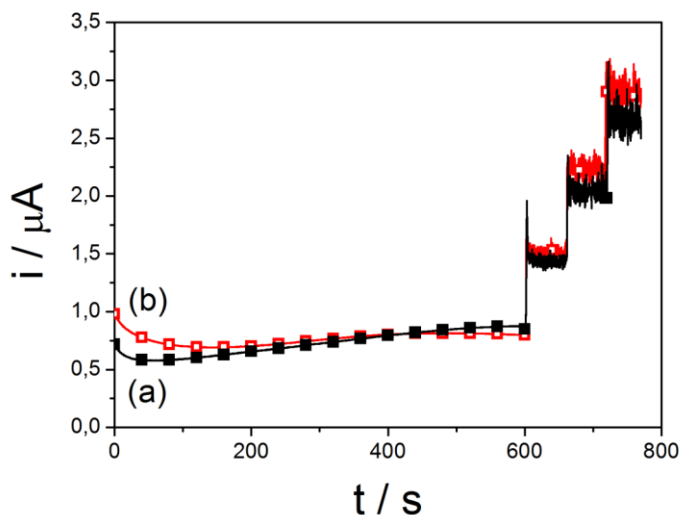
Nesta seção, serão apresentados os resultados referentes às variações das condições experimentais para otimizar a resposta analítica da oxidação de H_2O_2 . Na técnica de amperometria, testou-se E_{app} diferentes. A variação do pH da solução do eletrólito suporte foi testada também. Para isso, o eletrólito suporte foi modificado para uma solução contendo tampão Britton-Robinson (tampão BR) 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹, para poder variar os pHs das soluções, sem retirar completamente o eletrólito KCl já que, como será mostrado mais à

frente, os íons K^+ são importantes para o bom desempenho das modificações.

5.2.1 Eletrólito suporte

Fez-se um teste da resposta do GCE para H_2O_2 em eletrólitos suporte de KCl e de tampão BR + KCl, todas as soluções na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Este estudo foi feito para se verificar a possibilidade da incorporação de tampão BR ao eletrólito suporte de KCl utilizado inicialmente. Utilizou-se a técnica de cronoamperometria com um E_{app} de $+1,4 \text{ V}$, e foram realizadas três adições sucessivas de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ à célula eletroquímica. Os cronoamperogramas são apresentados na Figura 13.

Figura 13. Cronoamperogramas para três adições sucessivas de H_2O_2 em eletrólito suporte (a) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho GCE. $E_{app} = +1,4 \text{ V}$.



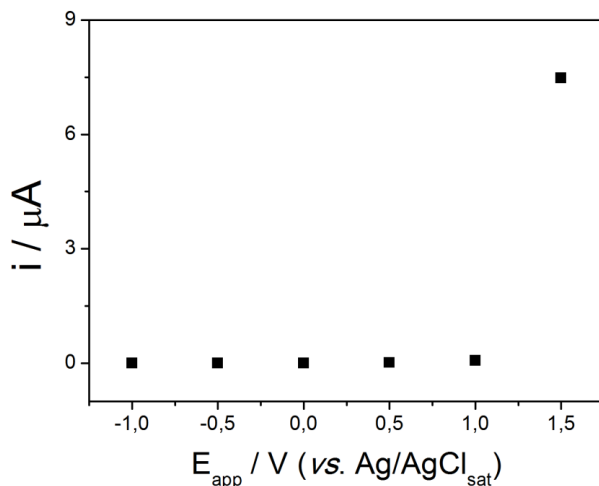
Pode-se verificar que não há diferença nas respostas de corrente para a oxidação do H_2O_2 para os dois eletrólitos usados. Deste modo, optou-se por utilizar o eletrólito suporte tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Embora este eletrólito seja mais trabalhoso de preparar, ele será importante para o estudo de pH que será apresentado a seguir.

5.2.2 Influência do E_{app}

Diversos E_{app} entre $-2,0 \text{ V}$ e $+2,0 \text{ V}$ foram testados para verificar-se o desempenho do GCE nas reações de oxidação ou redução do H_2O_2 . A Figura 14 apresenta um gráfico ilustrativo dos resultados obtidos com este estudo.

Obtiveram-se resultados consideráveis apenas para E_{app} de $+1,5 \text{ V}$, como demonstrado na Figura 14, em que foi verificada uma resposta de corrente de $7,48 \mu\text{A}$ para GCE na oxidação de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução. Este valor de E_{app} representa a mesma região onde se observa o E_{po} na CV, confirmando que a reação de oxidação do H_2O_2 em $+1,5 \text{ V}$ é a forma mais viável de proceder à detecção deste analito.

Figura 14. Influência do potencial aplicado nas reações de oxidação/redução de solução de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para GCE em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ L}^{-1}$.



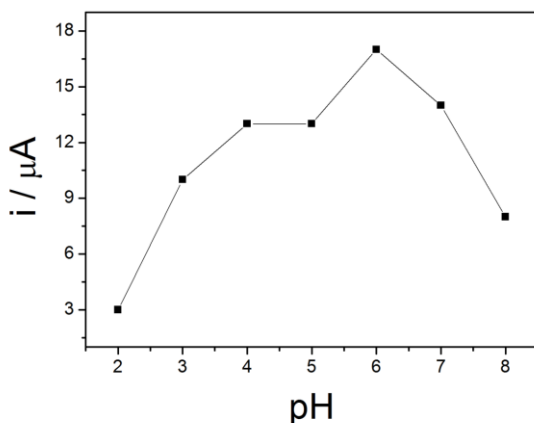
5.2.3 Efeito do pH

O efeito do pH também foi avaliado na reação de oxidação de interesse a +1,5 V. Foram obtidos cronoamperogramas na faixa de valores de pH entre 2,0 e 12,0 porém, a oxidação do H_2O_2 não foi observada em soluções com pH acima de 9,0. Desta forma, a faixa de pH realmente explorada foi de 2,0 a 8,0. O H_2O_2 pode ainda complexar com o íon borato proveniente do eletrólito suporte, o que causaria uma diminuição de sua atividade em solução.

A reação de oxidação do H_2O_2 será estudada apenas na faixa de pH citada acima, já que mais à frente, a melanina fará parte do sistema e este composto torna-se altamente solúvel em pH acima de 8,3, devido a sua desprotonação (pK_a), transformação em uma espécie iônica e consequente aumento de sua hidrofiliabilidade. A Figura 15 ilustra o estudo de pH citado acima, em que é possível observar visualmente o pH ideal para a melhor resposta.

A oxidação de H_2O_2 em GCE mostrou desempenho semelhante em soluções com pH entre 4 e 7, sendo que em pH 6 a oxidação do H_2O_2 gera corrente maior. Estes valores de pH foram otimizados também para os sensores eletroquímicos que serão construídos, assim como o estudo de E_{app} .

Figura 15. Efeito do pH da solução de eletrólito suporte na oxidação de H_2O_2 sobre GCE.



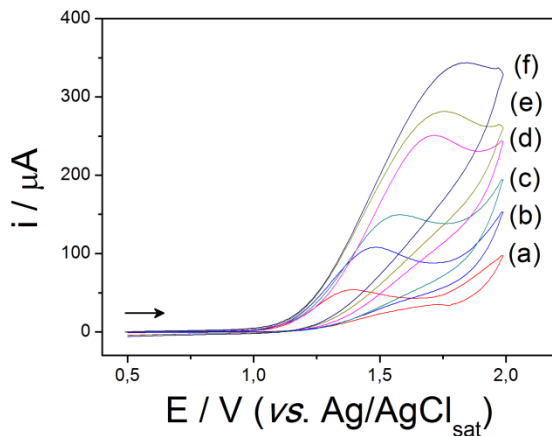
Estabelecendo-se que para o GCE o valor de E_{app} que provoca uma corrente de oxidação maior do H_2O_2 é de +1,5 V e que o pH que provoca melhor resposta de corrente é 6, pode-se partir para uma próxima etapa.

Uma das propostas do trabalho é a construção de sensores eletroquímicos através da modificação da superfície do GCE com nanopartículas de análogos de azul da Prússia. Assim um dos próximos assuntos será a avaliação destas modificações. Antes, para encerrar os estudos com GCE sem modificação, foi realizado o estudo do comportamento eletroquímico de H_2O_2 por CV.

5.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO H_2O_2

A Figura 16 apresenta voltamogramas cíclicos referentes ao comportamento eletroquímico do H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre GCE. Nesta figura é possível verificar a influência da velocidade de varredura do potencial na CV, sobre o potencial de oxidação de H_2O_2 . A velocidade de varredura foi investigada de 10 a 1000 mV s^{-1} .

Figura 16. Voltamogramas cíclicos para H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre GCE. $v =$ (a) 10, (b) 50, (c) 100, (d) 300, (e) 500 e (f) 1000 mV s^{-1} .



Os voltamogramas cíclicos são característicos de uma reação eletroquimicamente irreversível, pois existe a presença de apenas um pico de oxidação, sem um pico de redução na varredura de retorno na faixa de potenciais estudada. O potencial de pico de oxidação (E_{po}) é de +1,4 V a uma v de 10 mV s^{-1} , enquanto que o E_{po} é deslocado para o valor de +1,8 V a uma v de 1000 mV s^{-1} . O deslocamento do E_{po} para valores mais positivos de potencial é esperado para um aumento na velocidade de varredura do potencial quando se trata de um sistema irreversível (BARD e FAULKNER, 2001).

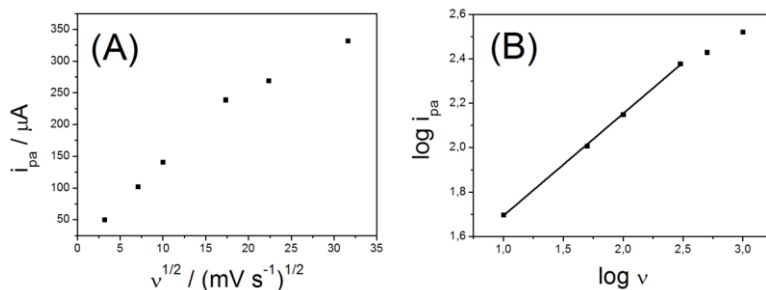
De acordo com os voltamogramas cíclicos da Figura 16, pode-se perceber que em velocidades de varredura mais baixas (10 a 100 mV), o pico de oxidação é bem definido para o H_2O_2 . O voltamograma cíclico com v de 10 mV s^{-1} (Figura 16 - curva a), pode ser interpretado da seguinte maneira: na varredura de ida, existe um sinal de oxidação com E_{po} em +1,4 V. Este sinal decai de acordo com a Eq. de Cottrell ($\alpha t^{-1/2}$) por causa do comportamento difusional do analito. Em seguida, nota-se um aumento da corrente nos limites mais positivos de potencial, que está relacionado com a oxidação da água ou dos íons Cl^- presentes no meio. A varredura de volta não apresenta nenhum sinal até o potencial de +0,5 V. Pode-se concluir que trata-se de uma reação irreversível.

A partir dos dados obtidos neste experimento, é possível investigar mais profundamente o comportamento eletroquímico do analito. Traçou-se um gráfico relacionando i vs. $v^{1/2}$, mostrado na Figura 17A. O comportamento linear observado no gráfico até velocidade de 300 mV s^{-1} ($v^{1/2} = 17,3 \text{ mV}^{1/2} \text{ s}^{-1/2}$) é característico para sistemas eletroquímicos cuja velocidade da reação redox é controlada pelo transporte de massa (BARD e FAULKNER, 2001). Para um aprofundamento no aspecto do controle da velocidade de reação, foi traçado um gráfico relacionando o logaritmo da corrente de pico anódica (i_{pa}) com o logaritmo da velocidade de varredura do potencial. O gráfico resultante é mostrado na Figura 17B.

A partir da inclinação deste gráfico $\log i$ vs. $\log v$ foi possível obter informações mais precisas a respeito do mecanismo da reação de interesse. A inclinação da melhor reta traçada foi de 0,46, confirmando que a velocidade da reação é controlada por difusão (BARD e FAULKNER, 2001) sem efeitos ou contribuições do processo de adsorção para reação em GCE.

Feita a análise detalhada do comportamento eletroquímico do analito, os próximos passos do trabalho foram a modificação do GCE com NPAP, a avaliação do desempenho destes sensores na reação de oxidação do H_2O_2 nas condições otimizadas para GCE, além da caracterização analítica do sistema e ainda a caracterização das nanopartículas e a confirmação de suas presenças sobre GCE.

Figura 17. Variação de i_{pa} com $v^{1/2}$ (A) e $\log i$ com $\log v$ (B) para H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre GCE imerso em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ANÁLOGOS DE AZUL DA PRÚSSIA

A etapa posterior ao uso de GCE na reação de interesse foi a modificação da superfície do GCE com nanopartículas de análogos de azul da Prússia. Estes análogos compreendem nanopartículas de AP modificadas por complexos de melanina- M^{n+} ($\text{M}^{n+} = \text{Fe}^{3+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$ e Co^{2+}).

Como explicado na parte experimental (Seção 3.2.3) a obtenção das NP foi realizada pela adição de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à solução dos complexos de melanina. Esta adição foi realizada de forma controlada em banho de ultrassom. Os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ligam-se aos metais de transição ($\text{Fe}^{3+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$ ou Co^{2+}) já presentes na solução através de pontes com o ligante cianeto. Os cátions metálicos de transição (exceto configuração d^{10}) são capazes de realizar até seis ligações coordenadas, proporcionando assim complexos metálicos com geometria octaédrica (HUHEEY *et al.* 1993; SHRIVER e ATKINS, 2003).

A estrutura do átomo metálico central com geometria octaédrica é compatível com a estrutura química do complexo AP (Figura 7). Uma vez que os cátions metálicos presentes na solução já estão ligados à melanina através dos sítios catecol, tem-se que duas ligações foram formadas. Restam agora quatro sítios de coordenação para os íons metálicos complexados com melanina, que permitem a formação de quatro ligações com ligantes CN⁻ oriundos do K₃[Fe(CN)₆]. Assim a formação da ligação em ponte com o cianeto do [Fe(CN)₆]³⁻ forma uma estrutura semelhante àquela do azul da Prússia.

O fato desta reação estar condicionada em banho de ultrassom faz com que as partículas formadas possam ficar mais bem distribuídas com relação ao seu tamanho médio, se comparado à eficiência de dispersão da agitação magnética. Este procedimento já foi descrito anteriormente (BAIONI *et al.* 2007) e proporcionou boa relação entre o tamanho das nanopartículas de AP modificadas com Cu²⁺.

Conforme já comentado (Seção 2.6.4), a estrutura do AP é bastante conhecida e estudada até os dias de hoje, e o comportamento eletroquímico e eletrocromático do AP foi descrito por completo e está bem estabelecido na literatura. No material sintetizado, os cátions metálicos Fe³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ e Co²⁺ substituem os centros de Fe²⁺ presentes no AP, e formam assim os chamados análogos de azul da Prússia. A estrutura destes análogos de AP foi mostrada anteriormente na Figura 7.

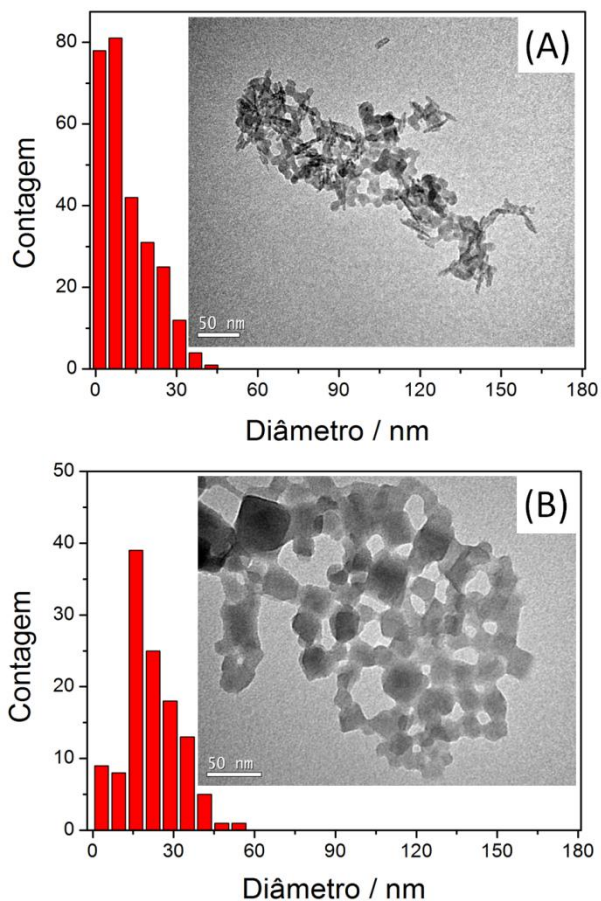
Os compostos obtidos neste trabalho tem ainda a vantagem de serem estabilizados tanto pelos íons K⁺, como ocorre comumente, assim como pela própria melanina, pois ela está ligada aos metais de transição e ficando assim ao redor destas NP estabilizando-as e não permitindo maiores aglomerações. Pode-se ressaltar aqui a importância da presença dos íons K⁺ em solução, o que justifica a escolha do eletrólito suporte tampão BR + KCl. O tampão BR permite uma variação do pH da solução, e o KCl fornece íons K⁺ para participarem dos processos de estabilização da estrutura das NP.

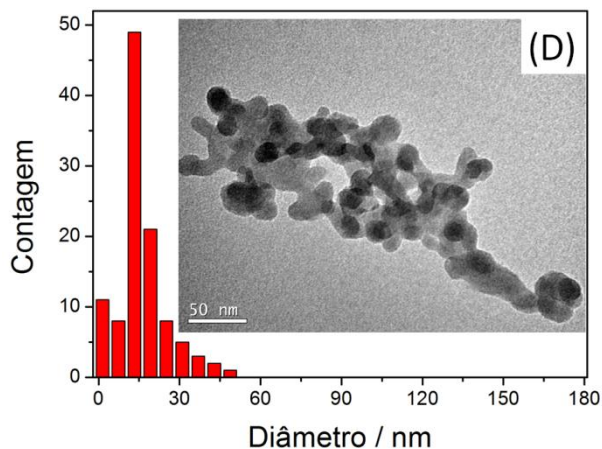
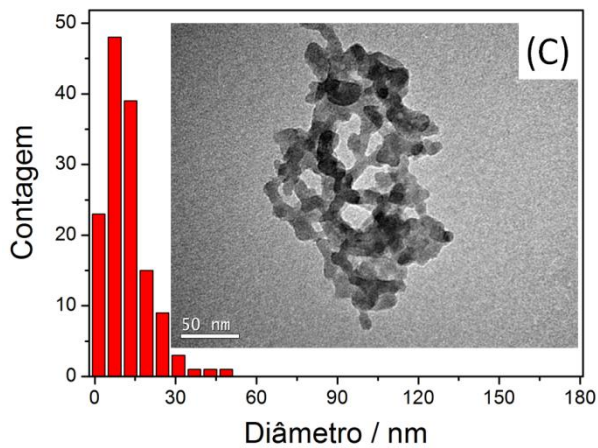
A formação das NPAP modificadas com os metais de transição complexados com melanina foi caracterizada por imagens de TEM, e o tamanho das NP foi calculado a partir destas imagens. A Figura 18 mostra estas imagens de TEM assim como a distribuição de tamanhos do diâmetro das NP.

A Figura 18A mostra a imagem de TEM obtida para NPAP modificadas com complexo melanina-Fe³⁺. A dispersão de NPAP foi

gotejada sobre uma grade de cobre revestida com carbono (própria para este tipo de análise) e seca sob luz UV. Como pode ser visto, foram obtidas nanopartículas uniformes e bem distribuídas, com tamanho médio de 11,2 nm. Porém, a geometria das NP não pode ser definida, já que as mesmas se alteram muito.

Figura 18. Imagens de TEM e distribuição de diâmetro para as NPAP modificadas com complexos de melanina com Fe^{3+} (A), Cu^{2+} (B), Ni^{2+} (C) e Co^{2+} (D).





Por outro lado, na Figura 18B é possível observar a geometria cúbica das NPAP modificadas com complexo melanina- Cu^{2+} . Esta observação está em concordância com resultados já reportados (YU *et al.* 2010), embora o tamanho das NPAP não seja igual para os dois casos, apenas a geometria. A partir da Figura 18B foi possível definir o tamanho médio das nanopartículas como sendo de 21,6 nm.

Para a imagem das NPAP modificadas com complexo melanina- Ni^{2+} apresentada na Figura 18C, foi possível verificar que a disposição das NPAP foi muito semelhante àquela observada para os complexos de melanina- Fe^{3+} . Assim como no caso da Figura 18A, a

geometria das nanopartículas é indefinida. A distribuição de tamanhos foi realizada para os compostos desta imagem, e o tamanho médio das NPAP-Ni²⁺ foi calculado como sendo 11,7 nm.

A Figura 18D apresenta imagem de TEM para NPAP modificadas com complexo melanina-Co²⁺, assim como a distribuição de tamanhos para os compostos desta imagem. De acordo com a imagem, nota-se uma distribuição semelhante às outras observadas para os demais compostos. No caso das NPAP-Co²⁺, existe uma propensão das NP para uma geometria arredondada, não muito comum para os hexacianoferratos. A distribuição de tamanhos foi satisfatória pois não houve muita dispersão, e o tamanho médio das NPAP-Co²⁺ foi de 16,1 nm.

Como comentado anteriormente, as NPAP modificadas com melanina-Mⁿ⁺ foram depositadas sobre GCE para construção de sensores eletroquímicos para detecção de H₂O₂, e nas próximas seções, serão apresentados os resultados referentes aos estudos com as NPAP para o substrato de carbono vítreo. Foram realizadas caracterizações eletroquímicas (CV e impedância) e em seguida, as caracterizações analíticas. O capítulo 6 subsequente é dedicado exclusivamente às análises em amostras comerciais que contém H₂O₂ em sua composição.

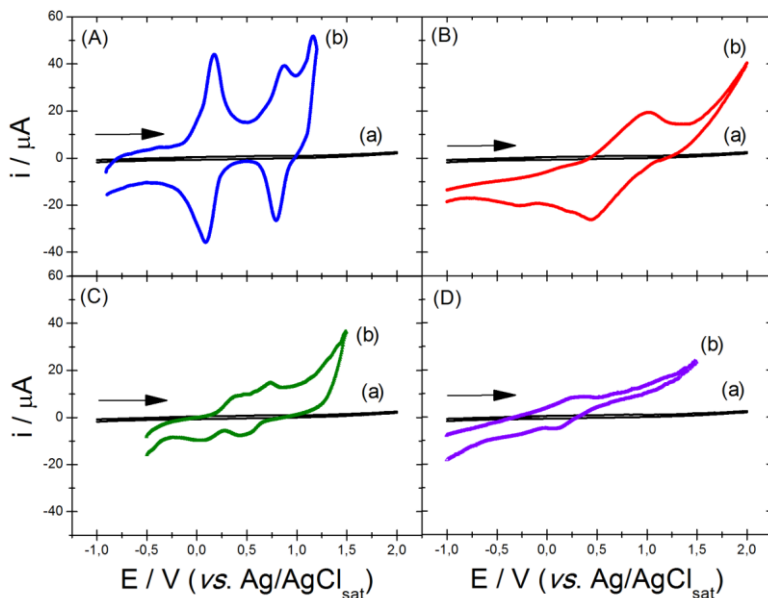
5.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DAS NPAP SOBRE GCE

5.5.1 Voltametria cíclica

A Figura 19 apresenta voltamogramas cíclicos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ referentes aos sensores eletroquímicos obtidos sobre substrato de carbono vítreo.

O voltamograma cíclico para o GCE sem modificação é apresentado em todos os quadros da Figura 19 como a curva (a). O voltamograma cíclico do branco, foi obtido em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹. O voltamograma foi registrado entre -1,0 a +2,0 V e não apresentou sinal eletroquímico na faixa de potenciais investigados, como esperado.

Figura 19. Voltamogramas cíclicos em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para GCE (a) em sobreposição com NPAP encapsuladas por complexos de melanina (b) com Fe^{3+} (A), Cu^{2+} (B), Ni^{2+} (C) ou Co^{2+} (D).



Para os sensores compostos por GCE modificado com NPAP encapsuladas com melanina- M^{n+} foram observados comportamentos distintos nos voltamogramas cíclicos, e eles estão representados na Figura 19 como as curvas (b). Faz-se a seguir, uma descrição detalhada dos voltamogramas cíclicos obtidos para estes eletrodos quimicamente modificados.

Para o sensor contendo o complexo melanina- Fe^{3+} (Figura 19A-curva b), foram observados dois picos de oxidação e dois picos de redução, conforme já descrito na literatura para o AP (DeLONGCHAMP e HAMMOND, 2004). O potencial inicial de $-1,0 \text{ V}$ é suficientemente negativo para reduzir todos os centros de Fe^{3+} a Fe^{2+} presentes nas NP. Quando o potencial é variado no sentido positivo, tem-se um primeiro pico de oxidação em torno de $+0,1 \text{ V}$, que é atribuído à oxidação de um centro de Fe^{2+} a Fe^{3+} (passagem de branco da Prússia para azul da Prússia). Um segundo pico de oxidação é visto

em +0,7 V e é atribuído à passagem do azul da Prússia para o amarelo da Prússia, devido à oxidação do segundo centro de Fe^{2+} a Fe^{3+} . A varredura no sentido reverso mostrou também dois picos de redução, que são atribuídos às reduções consecutivas dos centros de Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Durante os processos de oxidação e redução dos centros metálicos, a compensação de carga é realizada pelos íons K^+ presentes em solução, que entram ou saem dos interstícios da estrutura do AP para compensar a carga gerada pela oxidação ou redução. Este comportamento eletroquímico e sua interpretação estão de acordo com o que se tem relatado na literatura, para este sistema eletroquímico já muito bem estabelecido, que servirá como referência para as outras modificações do GCE.

O mesmo experimento de VC foi realizado para as demais NPAP modificadas com complexos de melanina com Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} (Figura 19B-D), nas mesmas condições. O voltamograma cíclico do GCE continua sendo representado em todas as figuras (Figura 19B-D) pela curva (a), para comparação do seu perfil com aquele do eletrodo modificado.

Para o sensor contendo o complexo melanina- Cu^{2+} (Figura 19B-curva b), a CV revelou a presença de apenas um pico de oxidação e um pico de redução. Um dos centros metálicos de ferro foi substituído por íons Cu^{2+} . Este é o motivo pelo qual se observa apenas um par de picos (oxidação e redução). O par de picos observado na Figura 19B-curva (b) está relacionado ao processo redox do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ do complexo em aproximadamente +1,0 V. O centro metálico de Cu^{2+} na estrutura das NP não sofre oxidação nem redução, e por este motivo, não gera sinal de corrente no voltamograma cíclico.

A separação dos picos redox para este processo foi de 580 mV, indicando que o processo de transferência de carga tem uma cinética lenta (COMPTON e BANKS, 2011). Como o centro metálico de Cu^{2+} não sofre processo redox para ser detectado por VC, assim o perfil do voltamograma cíclico da Figura 19B-curva (b) foi diferente daquele observado na Figura 19A-curva (b) para o AP. O comportamento redox para NPAP- Cu^{2+} descrito neste parágrafo já foi observado anteriormente por Baioni *et al.* (BAIONI *et al.* 2007). Este voltamograma cíclico para NPAP- Cu^{2+} é indicativo de que os íons Cu^{2+} ocuparam os sítios de coordenação que normalmente são ocupados por centros de Fe^{2+} na estrutura do complexo azul da Prússia.

Para o complexo de NPAP-Ni²⁺ (Figura 19C-curva b), pode-se observar através da CV que existem dois picos de oxidação e dois picos de redução. Os dois pares de picos de oxidação/redução são atribuídos ao par Fe²⁺/Fe³⁺. Nenhum dos dois pares de pico são atribuídos ao centro de Ni²⁺ presente na estrutura das NP. Todavia, os potenciais de pico e as intensidades de corrente são diferentes daqueles valores obtidos para NPAP-Fe³⁺, ainda que sejam os mesmos centros metálicos que estejam sofrendo oxidação/redução.

A presença de centros metálicos de Ni²⁺ faz mudar o perfil voltamétrico das NP imobilizadas sobre GCE. Considera-se que existam duas etapas redox dos centros de Fe³⁺ por causa da distribuição desigual de Ni²⁺ e íons K⁺ na estrutura do complexo (HAO *et al.* 2012). Como descrito anteriormente, os íons K⁺ são importantes para estabilização da carga da NP. Conforme os centros metálicos oxidados ou reduzidos, os íons K⁺ saem ou entram nos interstícios da estrutura da NP, minimizando os efeitos de transferência de carga. Como existe distribuição desigual de K⁺ dentro da estrutura das NP, o K⁺ não consegue mobilidade suficiente para compensar as cargas, e então a reação redox do centro de Fe³⁺ acontece em duas etapas. Se a distribuição de íons K⁺ for homogênea, observa-se apenas um sinal do par redox Fe²⁺/Fe³⁺ presente nas NP durante o experimento de VC (WANG, Z. *et al.* 2012).

A Figura 19D apresenta o voltamograma cíclico referente ao branco (curva a) e às NPAP-Co²⁺ (curva b). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos nas mesmas condições do que os anteriores descritos acima. O voltamograma para GCE modificado com NPAP-Co²⁺ apresentou um sinal de oxidação e um sinal de redução. A presença de apenas um par redox indica que um dos centros metálicos de Fe²⁺ foi substituído por Co²⁺. O centro metálico de Co²⁺ não apresentou sinal redox.

O par de picos para estas NP não teve uma intensidade de corrente semelhante àquela observada para NPAP-Fe³⁺ (Figura 19A). Esta intensidade menor pode ter interpretações distintas. A resposta de corrente é proporcional à concentração do composto na superfície do eletrodo, assim pode ser que as NPAP-Co²⁺ estejam numa concentração menor. Contudo, as concentrações usadas na síntese das NP foi a mesma para todos os casos, assim como a quantidade de solvente. Outra possibilidade é o bloqueio da superfície do GCE, que pode inibir o sinal analítico. Para isto, melanina em excesso poderia realizar este bloqueio

não desejado. Pode-se ainda, supor que as NPAP-Co²⁺ não tenham ficado imobilizadas eficientemente junto à superfície do GCE.

Apesar da intensidade baixa de corrente resultante dos processos faradaicos durante a voltametria, é possível ainda observar um sinal de oxidação e um sinal de redução. Na varredura de ida, o pico de oxidação representa a passagem de Fe²⁺ a Fe³⁺. Na varredura de volta, a espécie Fe³⁺ volta à condição inicial de Fe²⁺. A separação entre os picos é de 117 mV. Levando em consideração que é apenas um mol de elétrons envolvido na conversão Fe²⁺/Fe³⁺ (e vice-versa), a cinética do processo não é muito diferente daquela observada para o azul da Prússia (Figura 19A-curva b). Os íons Co²⁺ substituem um dos centros metálicos de Fe²⁺, fazendo com que apenas um par redox seja detectado pela CV. Voltamograma cíclico semelhante ao observado para NPAP-Co²⁺ neste trabalho já foi observado anteriormente (ARDUINI *et al.* 2009), onde se atribui apenas a substituição do centro de Fe²⁺ por centro Co²⁺.

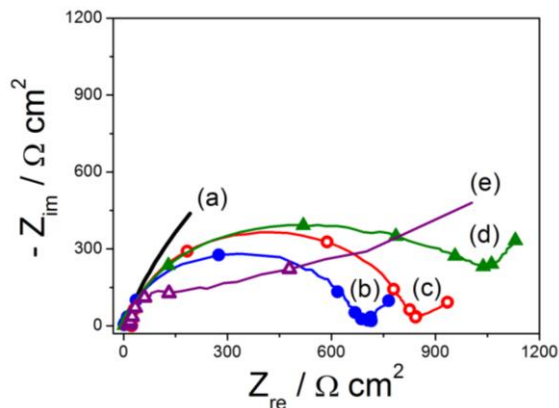
Até o momento, os experimentos de CV confirmaram que os complexos de NPAP encapsulados por melanina-Mⁿ⁺ foram imobilizados sobre a superfície do GCE. Esta conclusão também é sustentada pelas medidas de EIS, apresentadas no próximo item.

5.5.2 Impedância eletroquímica

Os diagramas de Nyquist para a impedância do GCE sem e com a sua superfície modificada com as NPAP-melanina-Mⁿ⁺ (Mⁿ⁺ = Fe³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ ou Co²⁺) são apresentados na Figura 20.

Os experimentos de impedância foram obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ em +1,5 V. Escolheu-se o potencial de +1,5 V pois é o E_{po} do H₂O₂ na solução de trabalho, e também porque a cronoamperometria mostrou um sinal analítico maior para este E_{app}. A impedância para o substrato de carbono vítreo (branco) é mostrado na Figura 20-curva a. Observou-se uma impedância relativamente alta para este substrato, pois o semicírculo esperado para diagramas de Nyquist não se completou. O gráfico apresentou um perfil apenas crescente, e não mostrou a tendência de retornar a valores próximos de zero para o componente de impedância imaginária em frequências menores, ou seja, tocar o eixo das abscissas nas frequências finais.

Figura 20. Diagramas de Nyquist obtidos a +1,5 V em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹ para GCE (a) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe³⁺ (b), Cu²⁺ (c), Ni²⁺ (d) ou Co²⁺ (e).



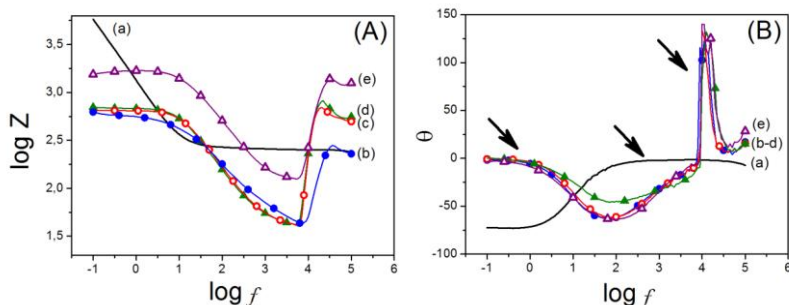
Para a maioria dos eletrodos modificados, os diagramas de Nyquist apresentaram um perfil muito semelhante entre si (Figura 20 curvas b-d). Os gráficos se mostraram com a presença de um semicírculo que se aproxima do eixo de impedância real em valores de frequência menores, sugerindo um processo eletroquímico dependente da velocidade de transferência de carga. O GCE modificado com NPAP-melanina-Co²⁺ não apresentou o mesmo perfil. Este perfil diferenciado dos demais sugere que a interface eletrodo|solução tenha componentes diferentes dos demais eletrodos modificados. Uma possibilidade é de que o filme modificador do eletrodo tenha lixiviado, o que causa a saída dos componentes modificadores da superfície do eletrodo, ou ainda que a superfície do sensor esteja bloqueada.

Com o experimento de impedância é possível obter informações úteis como a resistência à polarização (R_p) e a C_{dl} . Todavia, como os diagramas de Nyquist não apresentaram um perfil igual para todos os sensores, fez-se uso dos diagramas de Bode para obtenção das informações eletroquímicas citadas acima. Os diagramas de Bode podem ainda fornecer informações adicionais, como a quantidade de fases heterogêneas presentes na superfície do eletrodo. A Figura 21 apresenta os diagramas de Bode para as mesmas medidas de impedância representadas na Figura 20.

O diagrama de Bode para o GCE é mostrado como curva (a) nas Figuras 21A e 21B. O valor de R_p pode ser obtido pela Figura 21A-

curva a, e forneceu um valor de 5848 Ω . Para o sensor NPAP-melanina- Fe^{3+} (Figura 21A-curva b) o valor de R_p foi de 700 Ω , o menor valor entre os sensores avaliados. Para o sensor de NPAP-melanina- Cu^{2+} (Figura 21A-curva c) o valor de R_p foi de 850 Ω , para o sensor obtido a partir do complexo melanina- Ni^{2+} , o valor de R_p foi de 1050 Ω , e para aquele contendo complexos de melanina- Co^{2+} , R_p foi de 1549 Ω .

Figura 21. Diagramas de Bode de impedância total (A) e ângulo de fase (B) obtidos a +1,5 V em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1} para GCE (a) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b), Cu^{2+} (c), Ni^{2+} (d) ou Co^{2+} (e).



A diminuição de R_p dos sensores contendo Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em relação àquela observada para o GCE, pode ser explicada pelo aumento na C_{dl} da interface eletrodo|solução. O aumento da C_{dl} pode, por sua vez, ser explicado pelo aumento da área superficial devido à presença das NPAP encapsuladas por complexos de melanina. A C_{dl} pode ser calculada a partir dos diagramas de Nyquist ou dos diagramas de Bode, ou ainda, se R_p for conhecida, C_{dl} pode ser calculada de acordo com a Equação (4), onde $\omega_{m\acute{a}x}$ representa a frequência angular em que a impedância é máxima.

$$C_{dl} = \frac{1}{\omega_{m\acute{a}x} R_p} \quad (4)$$

De acordo com os gráficos de Nyquist apresentados na Figura 20, não foi possível calcular a capacitância para o GCE, pois, como se pode perceber, o gráfico apresenta um perfil ascendente, sem manifestação visível de que o mesmo retornaria a encontrar o eixo das abscissas ($y = 0$). Este comportamento é típico para sistemas puramente

capacitivos (da SILVA e DINIZ, 2014). Uma alternativa viável foi o uso dos diagramas de Bode para obter informações a respeito dos valores de C_{dl} e R_p . O valor de C_{dl} calculado para GCE a partir da Eq. (4), foi de 5,4 μF .

A C_{dl} foi calculada para os sensores contendo os complexos de melanina com os metais de transição, e a Tabela 4 apresenta estes valores de forma organizada.

Tabela 4. Dados de impedância para os sensores eletroquímicos de NPAP encapsuladas com melanina- M^{n+} ($M^{n+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}) sobre GCE.

Sensor	$R_p / \Omega \text{ cm}^2$	$C_{dl} / \mu\text{F}$
GCE	5848	$5,4 \times 10^{-3}$
NPAP- Fe^{3+}	700	11,1
NPAP- Cu^{2+}	850	1,34
NPAP- Ni^{2+}	1050	0,68
NPAP- Co^{2+}	1549	0,01

De acordo com Kahlert *et al.* (KAHLERT *et al.* 1998) os diagramas de EIS são influenciados pelo modo de operação do experimento, que pode ser realizado em circuito aberto ou com potencial controlado. Quando se tem o potencial controlado, a influência do transporte de massa é mais pronunciada em relação à condição de potencial de circuito aberto. Como visto na Figura 20, o diagrama de Nyquist para o GCE apresentou uma tendência de dependência do transporte de massa (comportamento ascendente), assim como os sensores contendo Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , que quando o diagrama de Nyquist completava o semicírculo, logo se observa uma nova ascendência do gráfico, causado pela influência do transporte de massa.

A partir dos diagramas de Bode para ângulo de fase mostrados na Figura 21B, é possível verificar a presença de duas fases heterogêneas para os sensores contendo NPAP. Cada fase heterogênea é apontada pelas setas na Figura 21B. O GCE apresentou apenas uma fase heterogênea, que é identificada como sendo a interface eletrodo|solução. As duas fases identificadas para os EQMs podem ser prontamente definidas. Uma delas é a interface GCE|filme NPAP, e a outra fase é filme NPAP|solução. Mesmo que o sensor contendo NPAP- Co^{2+} tenha apresentado perfil diferenciado no diagrama de Nyquist, o mesmo

sensor apresentou diagrama de Bode semelhante aos demais EQMs, o que significa que o filme modificador está presente.

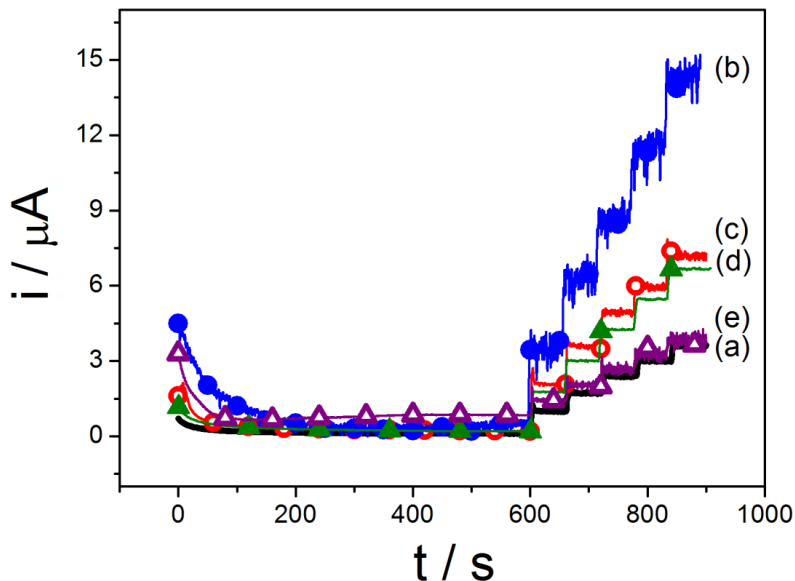
De acordo com as imagens de TEM, com os voltamogramas cíclicos e os diagramas de impedância, foi possível, indubitavelmente, caracterizar a formação das nanopartículas de azul da Prússia encapsuladas por complexo de melanina- M^{n+} , e a imobilização destes compostos sobre a superfície do carbono vítreo. As próximas etapas a partir daqui foram a aplicação deste nanomaterial na reação de oxidação de H_2O_2 , sua caracterização analítica e posteriormente, a análise de H_2O_2 em amostras comerciais.

5.6 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA GCE-NPAP

No presente trabalho, os melhores resultados em termos analíticos para GCE foram obtidos para a oxidação do peróxido sob E_{app} constante de +1,5 V. Nesta seção, foram avaliados os mesmos parâmetros para o GCE quimicamente modificado com NPAP-melanina- M^{n+} , os quais foram chamados de sensores eletroquímicos. Foram obtidos cronoamperogramas a +1,5 V para os sensores eletroquímicos, e estes são reunidos e apresentados na Figura 22.

O gráfico com o resultado obtido para GCE sem modificação que já havia sido apresentado é mostrado mais uma vez para efeito de comparação. A Figura 22-curva a, mostra o cronoamperograma obtido a +1,5 V para o GCE em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1} após cinco adições de 100 μL de uma solução de H_2O_2 1,0 mmol L^{-1} . Nota-se claramente que a corrente referente à oxidação do H_2O_2 aumenta com o aumento da concentração deste composto na célula eletroquímica. Porém, os melhores resultados para a oxidação do peróxido foram obtidos quando o mesmo experimento foi realizado com os eletrodos modificados com os complexos de NPAP encapsuladas com complexos de melanina- M^{n+} ($M^{n+} = Fe^{3+}$, Cu^{2+} ou Ni^{2+}) – Figura 22 curvas b-d.

Figura 22. Cronoamperogramas obtidos para GCE (a) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b), Cu^{2+} (c), Ni^{2+} (d) ou Co^{2+} (e) após cinco adições consecutivas de 100 μL de solução de H_2O_2 1,0 mmol L^{-1} .

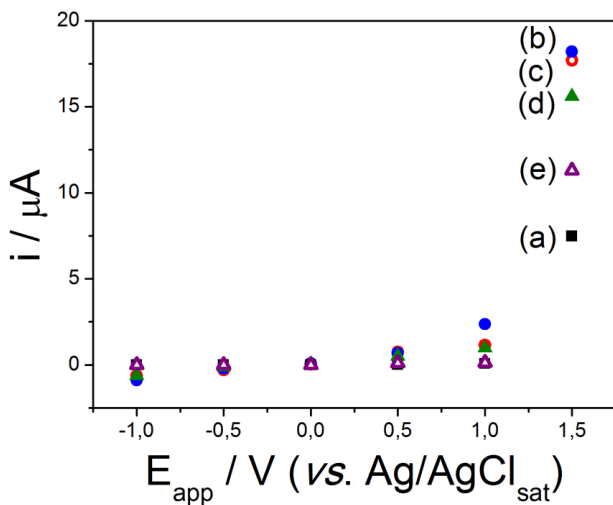


A melhora da performance analítica para os sensores propostos se deve à presença dos modificadores sobre a superfície do GCE. O desempenho do sensor composto por GCE modificado por NPAP-melanina- Co^{2+} não foi semelhante aos demais análogos. As adições sucessivas de peróxido à célula obtiveram um aumento de corrente muito baixo (Fig. 22-curva e), que pode ser comparado ao GCE sem modificação (Fig. 22-curva a). Assim, a modificação com NPAP- Co^{2+} apresentou um desempenho inferior no que diz respeito ao ganho de corrente. Pode-se perceber que o filme formado por este modificador não permanece durante muito tempo junto à superfície do substrato de carbono vítreo depois que o experimento é iniciado. Mesmo assim, este sensor foi testado na próxima etapa da otimização das condições experimentais para detecção de H_2O_2 .

5.6.1 Influência do E_{app}

Diversos E_{app} entre -2,0 V e +2,0 V foram testados mais uma vez para verificar-se o desempenho dos sensores propostos nas reações de oxidação ou redução do H_2O_2 , e a Figura 23 apresenta um gráfico ilustrativo dos resultados obtidos com este estudo. Obtiveram-se resultados consideráveis para E_{app} entre +1,0 V e +1,5 V, como demonstrado na Figura 23. A maior resposta de corrente para todos os sensores avaliados foi verificada para E_{app} de +1,5 V. Por conseguinte, os sensores preparados aqui fazem aumentar o sinal de resposta da reação de oxidação do H_2O_2 . Faz-se uma exceção ao sensor composto por NPAP-melanina- Co^{2+} , que novamente não teve um desempenho semelhante aos demais sensores. De qualquer maneira, o sensor contendo NPAP- Co^{2+} obteve uma resposta de corrente para a oxidação do H_2O_2 superior ao GCE.

Figura 23. Influência do potencial aplicado nas reações de oxidação/redução de solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 para GCE (a - ■) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (b - ●), Cu^{2+} (c - ○), Ni^{2+} (d - ▲) ou Co^{2+} (e - △).



Neste estudo particular, o sensor de NPAP- Ni^{2+} obteve sinais um pouco menos significativos quando comparado com os análogos contendo íons Fe^{3+} e Cu^{2+} , que apresentaram as maiores respostas para a

reação de interesse. As respostas de corrente para a reação do peróxido em outros E_{app} diferentes de +1,5 V, foram muito inferiores em todos os casos.

5.6.2 Influência do pH

O efeito do pH também foi avaliado novamente, agora para os sensores. Foram obtidos cronoamperogramas na faixa de pHs entre 2,0 e 12,0 porém, a oxidação do H_2O_2 não foi observada em soluções com pH acima de 9,0. Além do mais, outro fator importante para a ausência de condições necessárias para promover a reação de interesse, é de que a melanina torna-se altamente solúvel em pH 8,3 devido a sua desprotonação, transformação em uma espécie iônica e conseqüente aumento de sua hidrofiliçidade. Desta forma, a faixa de pH realmente explorada foi de 2,0 a 8,0.

A Figura 24 ilustra o estudo de pH citado acima, em que é possível observar visualmente o pH ideal para cada sensor diferente. A Tabela 5 apresenta os valores de corrente obtidos com a oxidação do H_2O_2 para cada sensor, apenas no pH em que foi obtida a melhor resposta. Estes valores de pH foram utilizados nas medidas subsequentes para cada sensor eletroquímico.

O sensor construído com NPAP- Co^{2+} não apresentou desempenho compatível com os demais sensores. As respostas de corrente para as adições de peróxido não foram de valores semelhantes àqueles obtidos para os outros três sensores. Duas possibilidades podem explicar o fato de o sinal analítico para o sensor contendo Co^{2+} não ser semelhante aos demais sensores em comparação ao GCE: as NPAP- Co^{2+} não permanecem junto a superfície do eletrodo durante a medida, pois lixiviam para a solução, ou as nanopartículas contendo Co^{2+} podem bloquear a área do eletrodo, possibilidade esta muito remota pois as NPAP são conhecidamente compostos condutores e conseguem aumentar o sinal das reações de oxidação ou de redução do H_2O_2 . Conforme já sugerido, a melanina poderia bloquear a superfície do eletrodo, mesmo que as quantidades utilizadas na síntese dos complexos e das NP tenham sido sempre as mesmas.

Figura 24. Efeito do pH da solução tampão BR na corrente de oxidação de 100 μL de solução de H_2O_2 1,0 mmol L^{-1} para GCE (a - ■) e NPAP encapsuladas por complexos de melanina- Fe^{3+} (b - ●), Cu^{2+} (c - ○), Ni^{2+} (d - ▲) ou Co^{2+} (e - △).

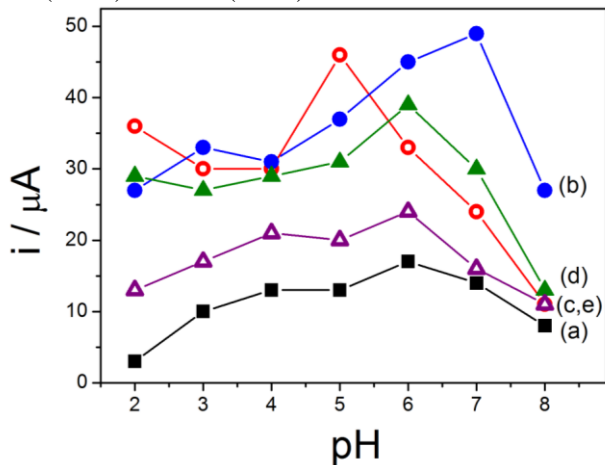


Tabela 5. Incrementos de corrente para os eletrodos de trabalho na oxidação do H_2O_2 1,0 mmol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} + KCl 0,1 mol L^{-1} com E_{app} de +1,5 V.

Eletrodo	pH	$i / \mu\text{A}$
GCE	6,0	7,48
NPAP- Fe^{3+} -GCE	7,0	18,2
NPAP- Cu^{2+} -GCE	5,0	17,7
NPAP- Ni^{2+} -GCE	6,0	15,6
NPAP- Co^{2+} -GCE	6,0	11,3

Levando-se em consideração o comportamento do eletrodo modificado supracitado nas caracterizações por CV e EIS, pode-se sugerir que a modificação dos eletrodos de trabalho com NPAP- Co^{2+} não ficam imobilizadas eficientemente sobre as superfícies dos eletrodos.

5.7 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA

A avaliação do desempenho dos sensores propostos para determinação de H_2O_2 em amostras comerciais foi realizada com uso de parâmetros de validação. O estudo completo de validação foi dividido em duas partes. Na primeira parte, foram descritos os parâmetros de linearidade, curvas de calibração, sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação, porque estes não necessitam de análise em amostras complexas nem método comparativo, apenas com uso de soluções padrão.

Na segunda parte, foram descritos os parâmetros de validação que necessitam de comparações dos resultados obtidos com soluções padrão, amostra e método comparativo. Estes parâmetros são seletividade, exatidão, precisão e robustez.

Esta divisão foi feita para adequar-se à divisão em capítulos do trabalho. No capítulo atual (Capítulo 5), estão sendo apresentados os resultados referentes à metodologia analítica para detecção de H_2O_2 por amperometria. No Capítulo 6 serão apresentados resultados referentes à determinação de H_2O_2 em amostras comerciais de uso cosmético e de higiene pessoal. Assim, os parâmetros de validação apresentados na segunda parte, conforme já esclarecido, só podem ser discutidos após a realização de determinações analíticas em amostras.

Quatro sensores eletroquímicos para H_2O_2 livres de enzimas foram construídos para testar as propriedades eletrocatalíticas e sensibilidade dos mesmos. Os sensores são constituídos por nanopartículas eletroativas de azul da Prússia encapsuladas por complexos de melanina- M^{n+} ($\text{M}^{n+} = \text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+}). Os resultados obtidos nesta seção foram comparados com aqueles obtidos para o GCE.

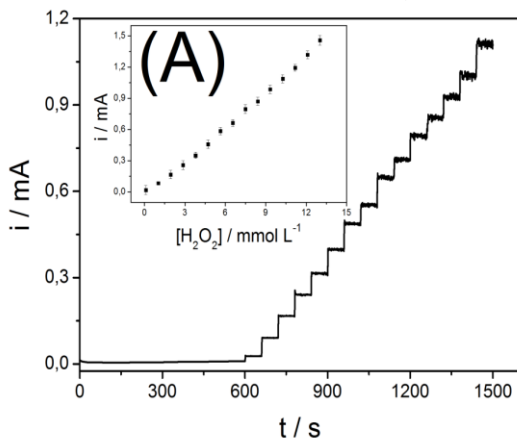
5.7.1 Linearidade e curvas de calibração

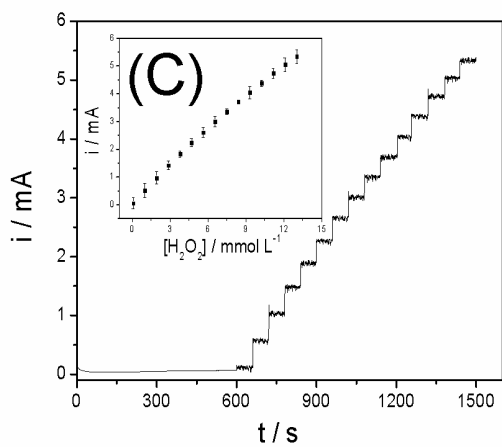
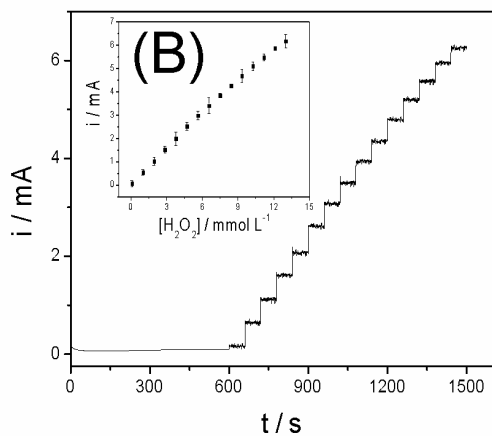
Uma vez que os parâmetros experimentais tenham sido otimizados para culminar com a melhor resposta possível para a reação de interesse, foi possível obter curvas de calibração para cada sensor. Neste momento do trabalho, não se faz necessário obter uma curva de calibração para o sensor contendo NPAP- Co^{2+} pois este modificador não apresentou resultados satisfatórios que justifiquem o prosseguimento do seu uso. Com uso das curvas de calibração, outros parâmetros de

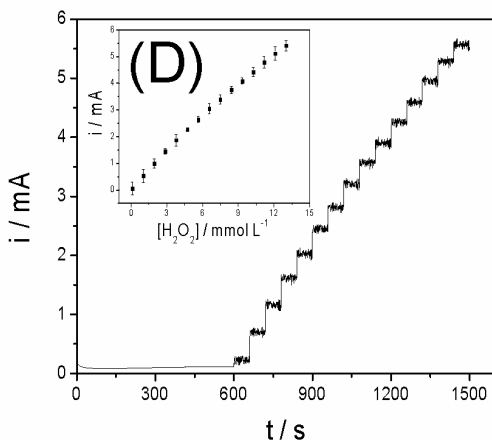
validação puderam ser obtidos. A linearidade foi avaliada de acordo com o coeficiente de determinação (r^2) dos pontos da curva de calibração.

Para os sensores contendo NPAP- Fe^{3+} , $-\text{Cu}^{2+}$ ou $-\text{Ni}^{2+}$, adicionaram-se alíquotas de volume adequado de uma solução padrão de H_2O_2 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ à célula eletroquímica contendo como eletrólito suporte solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com pH ajustado para aquele valor otimizado para cada sensor. Obteve-se uma curva de calibração para o GCE para comparação. Os amperogramas resultantes das adições citadas acima são apresentados na Figura 25. A inserção nestes amperogramas refere-se às curvas de calibração, que por sua vez correspondem a uma média de três curvas de calibração independentes ($n = 3$). Mais à frente, será apresentada uma tabela com informações compiladas das características analíticas das curvas de calibração extraídas da Figura 25.

Figura 25. Cronoamperogramas obtidos a $+1,5 \text{ V}$ em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para adições sucessivas de H_2O_2 em concentrações entre $0,1$ e $13,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para GCE (A) e sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (B), Cu^{2+} (C) ou Ni^{2+} (D). Inserção: Curvas de calibração externa.







Os dados apresentados na Figura 25 demonstram claramente que a corrente aumentou linearmente de acordo com a concentração de H_2O_2 . Usou-se a faixa linear de trabalho de concentração entre 0,1 e 13,0 mmol L⁻¹. As curvas de calibração mostraram boa linearidade na faixa de concentrações de 0,1 a 13,0 mmol L⁻¹. O sensor contendo NPAP-Fe³⁺ apresentou um r^2 de 0,9971 e isso faz com que ele obtenha a melhor linearidade entre os sensores testados. Contudo, todos os outros sensores incluindo o GCE, apresentaram valores de r^2 muito próximos, o que mostra o bom desempenho dos sensores eletroquímicos na geração de sinal analítico de H_2O_2 . Estes valores citados acima serão apresentados na Tabela 6.

5.7.2 Sensibilidade

A partir destas curvas, pode-se obter informações importantes a respeito do desempenho analítico dos sensores. Uma destas informações é a equação de reta, a qual informa sobre a sensibilidade de calibração de cada sensor ao analito. A Tabela 6 traz as equações de reta referentes às curvas de calibração da Figura 25.

As equações de reta trazem embutidas nelas, a inclinação das curvas de calibração. Este parâmetro indica a sensibilidade. A partir das inclinações mais acentuadas para os sensores contendo NPAP-Mⁿ⁺ é possível afirmar que a sensibilidade dos sensores propostos é maior do que aquela do GCE.

Tabela 6. Equações de reta para os sensores eletroquímicos.

Sensor	Equação de reta
GCE	$i/\mu\text{A} = -4,59 + 115,2(\text{H}_2\text{O}_2)/\text{mmol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,9969$)
NPAP-Fe ³⁺	$i/\mu\text{A} = 5,18 + 472,8(\text{H}_2\text{O}_2)/\text{mmol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,9971$)
NPAP-Cu ²⁺	$i/\mu\text{A} = 2,47 + 407,5(\text{H}_2\text{O}_2)/\text{mmol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,9961$)
NPAP-Ni ²⁺	$i/\mu\text{A} = 3,22 + 403,9(\text{H}_2\text{O}_2)/\text{mmol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,9955$)

Os valores de inclinação são dados em unidade de $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$. O sensor contendo NPAP-Fe³⁺ apresentou de novo a maior sensibilidade à detecção de H₂O₂. Neste parâmetro, cabe ressaltar que os valores de inclinação das curvas de calibração para os EQMs foi muito maior que o valor obtido para o GCE, cerca de quatro vezes maior. Este fator contribui para se afirmar que a modificação do GCE com NPAP encapsuladas por complexos de melanina-Mⁿ⁺ é satisfatória porque faz aumentar em quatro vezes a sensibilidade do sensor.

5.7.3 Limites de detecção e de quantificação

Os valores de LD e LQ foram obtidos com base nos parâmetros da curva de calibração. Os valores de LD e LQ foram calculados de acordo com as equações seguintes (RIBANI *et al.* 2004):

$$LD = 3,3 \frac{DP}{S} \quad (5)$$

$$LQ = 10 \frac{DP}{S} \quad (6)$$

onde DP é o desvio padrão do coeficiente linear das curvas de calibração, e S é o coeficiente angular da reta. O LD calculado para a detecção de H₂O₂ utilizando o GCE foi de 4,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ para o mesmo eletrodo foi de 13,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Quando a detecção de H₂O₂ foi realizada utilizando-se os eletrodos modificados com NPAP encapsuladas com complexos de melanina-Mⁿ⁺, os valores de LD e LQ foram mais baixos para todos os casos. A relação completa destes valores pode ser vista na Tabela 7. Os valores de LD e LQ estão condizentes com o método proposto.

Tabela 7. Parâmetros analíticos avaliados para a detecção de H_2O_2 usando os sensores desenvolvidos. $E_{\text{app}} = +1,5$ V. Faixa linear de 0,1 a 13,0 mmol L^{-1} .

Parâmetro	Sensor contendo NPAP-melaina- $\text{M}^{\text{n+}}$ ($\text{M}^{\text{n+}} = \text{Fe}^{3+}, \text{Cu}^{2+}$ ou Ni^{2+})			
	GCE	NPAP- Fe^{3+}	NPAP- Cu^{2+}	NPAP- Ni^{2+}
Coefficiente de determinação	0,9969	0,9971	0,9961	0,9955
Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	115,2	472,8	407,5	403,9
Desvio padrão da inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	1,67	1,21	1,16	1,16
Intercepto (μA)	-4,59	5,18	2,47	3,22
Desvio padrão do intercepto (μA)	0,16	0,02	0,04	0,07
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4,50	0,14	0,32	0,57

LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	13,5	0,42	0,96	1,72
Repetibilidade intradia da corrente ^{a, b}	0,65	0,90	1,06	2,98
Repetibilidade interdia da corrente ^{a, b}	1,20	1,71	1,47	1,89

^aDesvio padrão relativo (%) ^bn = 5

Estes resultados apresentados na Tabela 7 foram considerados como sendo muito positivos e satisfatórios, e puderam ser comparados a outros sensores eletroquímicos não enzimáticos para H_2O_2 . Por exemplo, um sensor composto por filme de ouro nanoporoso modificado com azul da Prússia (GHADERI, 2014) apresentou um LD de $0,36 \mu\text{mol L}^{-1}$, valor próximo ao encontrado neste trabalho. Para um eletrodo de cobre modificado com “nanoflores” de CuO (SONG, 2010), foi obtido um LD de $0,16 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que um sensor baseado em cobre/silício poroso (ENSAFI, 2014) obteve um LD de $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Outro sensor para H_2O_2 composto por hexacianoferrato de níquel/quitosana/nanotubos de carbono obteve um valor de LD de $0,28 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os sensores eletroquímicos propostos neste trabalho alcançaram limites de detecção mais baixos quando comparados a outros sensores não enzimáticos contendo nanopartículas metálicas como catalisadores das reações de interesse. Por exemplo, um sensor composto por NP de prata (SHI, 2011) forneceu um LD de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto outro sensor composto por nanoclusters de prata (LI, 2013) apresentou um LD de $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$.

5.7.4 Repetibilidade intradia e interdia

A repetibilidade e estabilidade dos filmes foram testadas a partir das respostas de corrente fornecidas pelos diferentes sensores,

verificadas através de medidas intradia e interdia, utilizando uma solução padrão de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ sob condições otimizadas. Cinco filmes diferentes foram obtidos sobre GCE para cada NPAP diferente. Testou-se a resposta de corrente da oxidação de H_2O_2 com soluções na mesma concentração preparadas no mesmo dia. As correntes foram obtidas dos cronoamperogramas correspondentes. Os desvios padrões relativos (DPR) foram calculados a partir destas correntes obtidas para as cinco medidas independentes dos filmes. Para o GCE, o DPR foi de 0,65%, enquanto que para os sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina- M^{n+} , os DPR foram 0,90%, 1,06% e 2,98%, para sensores contendo os complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+} , respectivamente.

A repetibilidade dos filmes foi também verificada através da obtenção da resposta de corrente para H_2O_2 durante cinco dias com soluções deste analito na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O DPR para as medidas interdia também foram calculados. O DPR para o GCE foi de 1,20%, enquanto que para os sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina- M^{n+} , os DPR foram respectivamente 1,71%, 1,47% e 1,89%, para sensores contendo os complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+} .

Além disto, a resposta de corrente para solução de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi verificada durante seis meses, para se obter informações a respeito da estabilidade dos filmes contendo os modificadores, e o DPR foi calculado para cada sensor. Estimou-se um DPR de 1,92% para o GCE, e para os sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina- M^{n+} , os DPR foram 3,08%, 3,52% e 3,20%, respectivamente para sensores contendo os complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+} . A obtenção de desvios padrão um pouco maiores está associada a possível aglomeração das NPAP com o tempo, e ainda a possibilidade de lixiviação dos filmes. Os resultados obtidos neste trabalho sustentam o fato de que os sensores propostos se adéquam confiavelmente para sua aplicação na detecção amperométrica de H_2O_2 .

6 APLICAÇÃO DOS SENSORES DESENVOLVIDOS

O emprego dos sensores amperométricos não-enzimáticos foi demonstrada através da aplicação dos mesmos na análise quantitativa de H_2O_2 em amostras comerciais de uso cosmético e de higiene pessoal. As classes de amostras comerciais foram as seguintes: creme para clareamento dental utilizado em tratamento doméstico, enxaguante bucal para clareamento dos dentes, solução antisséptica para pele e creme para descoloração de pelos e cabelos.

6.1 DETERMINAÇÃO DE H_2O_2 EM CREME PARA CLAREAMENTO DENTAL

6.1.1 Resultados e discussão

Foram realizadas três determinações independentes para cada sensor com a obtenção de curvas de adição de padrão, pela técnica de cronoamperometria. Para a construção das curvas de adição de padrão foi utilizado o valor médio da corrente obtida para as três medições da quantidade de H_2O_2 presente na amostra. As curvas de calibração externa são aquelas apresentadas na Figura 25. Os dados obtidos nesta série estão reunidos na Tabela 8. As características analíticas são comentadas a seguir.

Tabela 8. Determinação de H_2O_2 em creme para clareamento dental com eletrodos modificados em substrato de carbono vítreo.

Sensor/Método	Valor rotulado (%)	Valor encontrado (%)	Er (%) ^a	Teste-t ^b	Teste-F ^c
GCE	9,50	9,08	-4,8	2,12	1,10
NPAP-Melanina-Fe ³⁺	9,50	9,86	+3,3	3,68	1,07
NPAP-Melanina-Cu ²⁺	9,50	10,1	+5,9	1,82	1,12
NPAP-Melanina-Ni ²⁺	9,50	10,2	+6,9	2,26	1,14
Titulação Potenciométrica	9,50	9,54	-	1,10	1,00

^a Er = Erro relativo entre os valores do método proposto e da titulação potenciométrica.

^b Valor teórico = 4,30

^c Valor crítico = 19,0

6.1.1.1 Linearidade

Alguns parâmetros obtidos através das curvas de adição de padrão de cada sensor foram comparados àqueles obtidos pelas respectivas curvas de calibração. Como exemplo, pode-se citar primeiramente os coeficientes de determinação das curvas de adição de padrão. Os valores de r^2 para cada uma das curvas diferentes são semelhantes entre si. Os valores de r^2 foram 0,9916, 0,9992, 0,9994 e 0,9995 para respectivamente o GCE, e para os sensores de NPAP encapsulados por complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} . Todos estes valores são muito próximos daqueles apresentados na Tabela 6. Os valores de r^2 aumentaram na presença de interferentes, porém a quantidade de cinco pontos faz diferença em relação às curvas de calibração externa, que os valores de r^2 foram calculados para quinze pontos. Portanto, mais pontos representam dificuldade maior para ajuste dos pontos.

6.1.1.2 Seletividade

A seletividade do GCE e dos três sensores de NPAP encapsulados por complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , foi obtida pela comparação entre as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão. Os resultados foram considerados muito bons, com uma pequena diferença nos valores entre si, porém aceitável. As inclinações das equações de reta das curvas de calibração e de adição de padrão para o GCE e para os sensores construídos com complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} estão reunidos na Tabela 9. Estes valores estão na mesma ordem de grandeza que aqueles apresentados na Tabela 6 para as curvas de calibração.

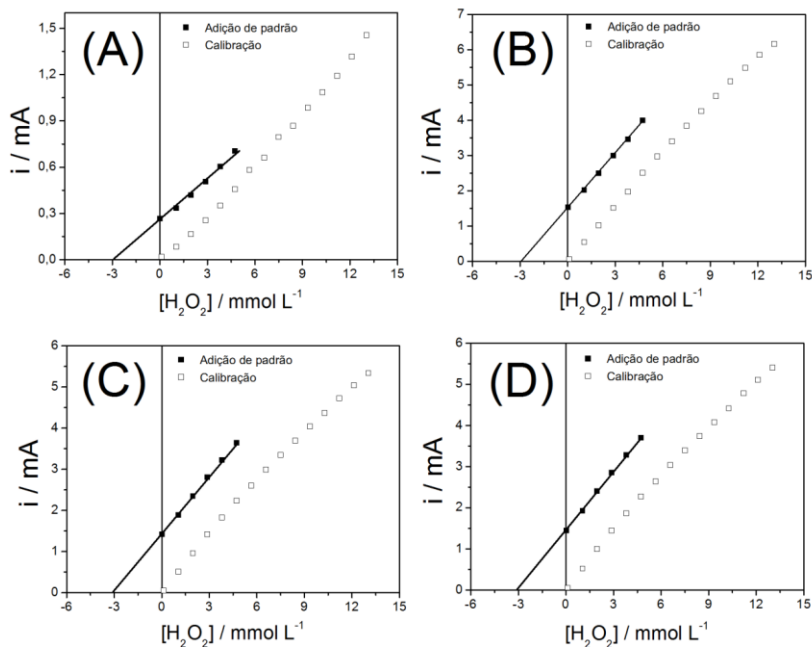
Tabela 9. Inclinações das equações de reta para cada um dos sensores eletroquímicos obtidas através de curva de calibração externa e de adição de padrão.

Sensor	Curva de calibração*	Adição de padrão*
GCE	115,2 (\pm 1,67)	104,0 (\pm 1,71)
NPAP-Melanina- Fe^{3+}	472,8 (\pm 1,21)	492,1 (\pm 1,54)
NPAP-Melanina- Cu^{2+}	407,5 (\pm 1,16)	444,8 (\pm 1,19)
NPAP-Melanina- Ni^{2+}	403,9 (\pm 1,16)	441,1 (\pm 1,96)

* Unidade em $\mu A L \mu mol^{-1}$

A seletividade de um método pode ainda ser obtida por outras maneiras (RIBANI *et al.* 2004) porém a comparação entre as duas inclinações mostradas na Tabela 10 é bastante confiável. A Figura 26 apresenta as curvas de calibração externa e de adição de padrão para cada sensor utilizado na determinação de H_2O_2 no creme para clareamento dental.

Figura 26. Curvas de calibração externa e de adição de padrão para determinação de H_2O_2 em creme para clareamento dental e curva de calibração para GCE (A) e sensores compostos por NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} (B), Cu^{2+} (C) ou Ni^{2+} (D).



6.1.1.3 Exatidão

A concentração determinada de H_2O_2 na amostra analisada por titulação amperométrica está de acordo com o conteúdo de peróxido determinado pelo método comparativo. Este parâmetro representa a exatidão do método proposto. De acordo com a Tabela 8, o método comparativo e o método proposto exibiram também concordância com o

valor rotulado para a quantidade de H_2O_2 . Como mencionado anteriormente, a titulação potenciométrica com permanganato de potássio (KMnO_4) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ como titulante, foi utilizada como método comparativo.

O erro relativo Er corrobora com as afirmações escritas acima. Além disso, ensaios de recuperação foram realizados para investigar a exatidão do método proposto com os novos sensores. Cinco adições foram realizadas à célula eletroquímica, a partir de uma solução padrão de H_2O_2 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com adição de volume adequado para fornecer concentrações finais de H_2O_2 na célula de $1,0$, $7,0$ e $13,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

As recuperações para a amostra ficaram entre $97,3$ e $110,1\%$, incluindo todos os três sensores desenvolvidos e o GCE. Este conjunto de experimentos mostra boa exatidão que está relacionada aos sensores não-enzimáticos propostos. Em validação de métodos analíticos, são admitidos valores de recuperação que estejam entre 80 e 120% (RIBANI *et al.* 2004) para a amostra em questão.

6.1.1.4 Precisão

Uma análise estatística foi realizada para os dados obtidos com os sensores propostos e com o método comparativo. Aplicando-se o teste-t e o teste F, todos os valores de t e de F calculados foram menores do que os valores teórico e crítico, respectivamente, conforme indicado na Tabela 8.

Isto significa que os sensores desenvolvidos neste trabalho, com substrato de carbono vítreo, fornecem dados precisos e exatos comparáveis ao método comparativo de titulação potenciométrica. Estas descobertas confirmaram que os sensores de NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em substrato de carbono vítreo podem ser devidamente utilizados para detecção de H_2O_2 . O sensor contendo NPAP encapsuladas pelo complexo de melanina- Co^{2+} não apresentou bons resultados nos testes de desempenho e por isso não foi usado na construção das curvas de calibração e validação do método.

6.1.1.5 Robustez

A robustez de um método é a capacidade de se manter a seletividade, exatidão e precisão mesmo com pequenas variações nas condições ótimas de análise. Neste trabalho, a robustez foi avaliada para

os filmes contendo os modificadores através da obtenção de curvas de adição de padrão com variações de pH de $\pm 0,2$ unidades. Obtiveram-se curvas de adição de padrão apenas para o sensor contendo NPAP-Fe³⁺, pois este foi o que apresentou os melhores resultados com as curvas de calibração externa e curvas de adição de padrão.

A Tabela 10 apresenta os dados obtidos com estes experimentos. São mostrados as inclinações das equações da melhor reta, os coeficientes de determinação dos pontos e ainda os valores do teste F, para cada valor de pH testado.

Tabela 10. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP-Fe³⁺ na quantificação de H₂O₂ em creme para clareamento dental.

pH	Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	r ²	Valor encontrado (%)	Teste F*
6,8	483,6	0,9951	9,79	1,03
7,0	492,1	0,9994	9,86	1,07
7,2	493,8	0,9957	9,87	1,08

* F_{crítico} = 19,0

De acordo com os dados obtidos nestes experimentos, pode-se afirmar que a seletividade do método se mantém praticamente inalterada, visto que as inclinações das equações de reta das curvas de adição de padrão são muito semelhantes para as pequenas variações nos valores de pH da solução. A exatidão mantém-se mesmo com a alteração no valor de pH da solução. Não houve mudança significativa nos valores da quantidade de H₂O₂ no creme para clareamento dental analisado, encontrados nos três experimentos realizados. Com base nos valores de quantidade de H₂O₂ encontrada, calculou-se os valores de F para cada uma das determinações. Os valores obtidos ficaram muito próximos entre si, indicando que a precisão se mantém.

Pode-se afirmar que o método proposto mantém os parâmetros de seletividade, exatidão e precisão para variações no pH da solução de trabalho, apresentando robustez.

6.1.2 Considerações parciais

A determinação de H_2O_2 em creme para clareamento dental foi realizada com eficiência pelo método proposto. Obtiveram-se parâmetros de validação satisfatórios. A linearidade foi semelhante entre as curvas de calibração externa e de adição de padrão, e todos os sensores mostraram seletividade. O tratamento estatístico dos dados mostrou que existem exatidão e precisão, e estes parâmetros resistem a pequenas variações de condições experimentais, assim como a seletividade do método, que indicam robustez. O método proposto provou-se exato.

6.2 DETERMINAÇÃO DE H_2O_2 EM ANTISSEPTICO

6.2.1 Resultados e discussão

Foram realizadas três determinações independentes para obtenção de curvas de adição de padrão, pela técnica de cronoamperometria. Para a construção das curvas de calibração foi utilizado o valor médio da corrente obtida para as três medições da quantidade de H_2O_2 presente na amostra. Os dados obtidos nesta série estão reunidos na Tabela 11.

Tabela 11. Determinação de H_2O_2 em solução antisséptica com GCE e o sensor contendo NPAP- Fe^{3+} .

Sensor/Método	Valor rotulado (%)	Valor encontrado (%)	Er (%) ^a	Teste- t ^b	Teste- F ^c
GCE	3,00	3,09	+2,00	2,18	1,04
NPAP-Melanina- Fe^{3+}	3,00	3,03	0,00	1,78	1,00
Titulação Potenciométrica	3,00	3,03	-	1,13	1,00

^a Er = Erro relativo entre os valores do método proposto e da titulação potenciométrica.

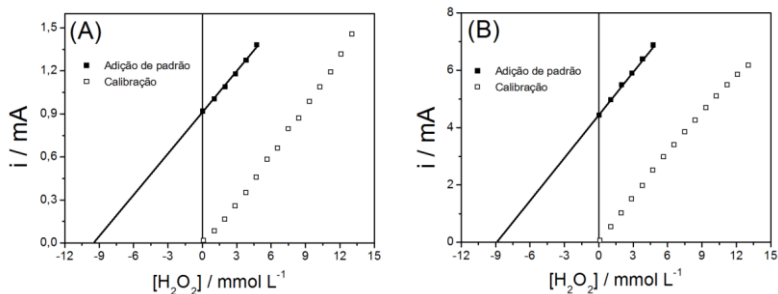
^b Valor teórico = 4,30

^c Valor crítico = 19,0

Daqui em diante, foi realizada apenas a determinação do analito usando o sensor composto por NPAP-Fe³⁺, pois ele apresentou os melhores resultados em todos os estudos até então. Sendo assim, não se faz necessário a utilização dos outros sensores porque não se espera que os demais sensores eletroquímicos venham a obter resultados melhores do que aquele composto por NPAP-Fe³⁺.

A Figura 27 apresenta a representação das curvas de calibração externa e de adição de padrão para o sensor utilizado na determinação de H₂O₂ na solução antisséptica.

Figura 27. Curvas de adição de padrão para determinação de H₂O₂ em solução antisséptica e curva de calibração para GCE (A) e sensor composto por NPAP-Fe³⁺ (B).



6.2.1 Linearidade

A linearidade foi obtida na curva de adição de padrão e comparada àquela obtida pela respectiva curva de calibração externa. De acordo com os coeficientes de determinação das curvas de adição de padrão, pode-se afirmar que a linearidade foi próxima para o GCE e para o sensor NPAP-Fe³⁺. Os respectivos valores de r^2 para as curvas de adição de padrão são 0,9958 e 0,9970. Todos estes valores são muito próximos daqueles apresentados na Tabela 6.

6.2.2 Seletividade

A seletividade do GCE e do sensor contendo NPAP-Fe³⁺ foi obtida pela comparação entre as inclinações das curvas de calibração e de adição de padrão. Os resultados foram considerados muito bons, com

uma pequena diferença nos valores entre si. As inclinações das curvas de adição de padrão para o GCE e para o sensor construídos com complexos de melanina com Fe^{3+} , foram respectivamente 107,3 e 443,9 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$. Estes valores estão na mesma ordem de grandeza que aqueles apresentados na Tabela 6 para as curvas de calibração externa.

6.2.3 Exatidão

A concentração determinada de H_2O_2 na amostra de solução antisséptica por cronoamperometria está de acordo com o conteúdo de peróxido rotulado pelo fabricante, indicando que o método proposto é exato. De acordo com a Tabela 12, o método comparativo de titulação potenciométrica com KMnO_4 0,02 mol L^{-1} como titulante, exibiu também concordância com o valor rotulado para a quantidade de H_2O_2 . O erro relativo E_r corrobora com as afirmações escritas acima.

6.2.4 Precisão

A análise estatística foi realizada para os dados obtidos com os sensores propostos e com o método comparativo. Aplicando-se o teste-t e o teste F, todos os valores calculados foram menores do que os valores teórico e crítico, conforme indicado na Tabela 11. Isto significa que o sensor desenvolvidos neste trabalho e que foi aplicado nesta determinação (NPAP- Fe^{3+}), fornecem dados precisos e exatos comparáveis ao método oficial de titulação redox. Tem-se desta maneira, a confirmação de que o sensor de NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} , em substrato de carbono vítreo pode ser devidamente utilizado para detecção de H_2O_2 em amostra comercial de solução antisséptica.

6.2.5 Robustez

Neste trabalho, a robustez foi avaliada através da obtenção de curvas de adição de padrão com variações de pH de $\pm 0,2$ unidades. A Tabela 12 apresenta os dados obtidos com estes experimentos. São mostradas as inclinações das equações da melhor reta, os coeficientes de determinação dos pontos e ainda os valores do teste F, para cada valor de pH testado.

Tabela 12. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP-Fe³⁺ na quantificação de H₂O₂ em solução antisséptica.

pH	Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	r ²	Valor encontrado (%)	Teste F*
6,8	461,7	0,9957	3,04	1,01
7,0	443,9	0,9970	3,03	1,00
7,2	447,1	0,9953	3,03	1,00

* F_{crítico} = 19,0

De acordo com os dados obtidos nestes experimentos, pode-se afirmar que a seletividade do método se mantém praticamente inalterada, a exatidão mantém-se mesmo com a alteração no valor de pH da solução assim como a precisão, pois o cálculo dos valores de F para o sensor com NPAP-Fe³⁺ ficou com valor próximo ao da curva de calibração externa do mesmo sensor, portanto apresentou robustez.

6.2.2 Considerações parciais

A determinação de H₂O₂ em solução antisséptica utilizando sensor eletroquímico composto por NPAP-Fe³⁺-melanina foi realizada com sucesso. Todos os parâmetros de validação foram satisfatórios. Curvas de calibração externa e de adição de padrão apresentaram linearidade semelhante entre si. Seletividade, exatidão e precisão foram evidenciados, assim como a robustez de método. O método proposto provou-se reprodutível.

6.3 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM ENXAGUANTE BUCAL

6.3.1 Resultados e discussão

Foram realizadas três determinações independentes para cada amostra com a obtenção de curvas de adição de padrão, pela técnica de cronoamperometria. Para a construção das curvas de calibração foi utilizado o valor médio da corrente obtida para as três medições da quantidade de H₂O₂ presente na amostra. Os dados obtidos nesta série

estão reunidos na Tabela 13. A Figura 28 apresenta a representação gráfica destas curvas citadas acima.

Tabela 13. Determinação de H_2O_2 em enxaguante bucal com GCE e sensor contendo NPAP- Fe^{3+} .

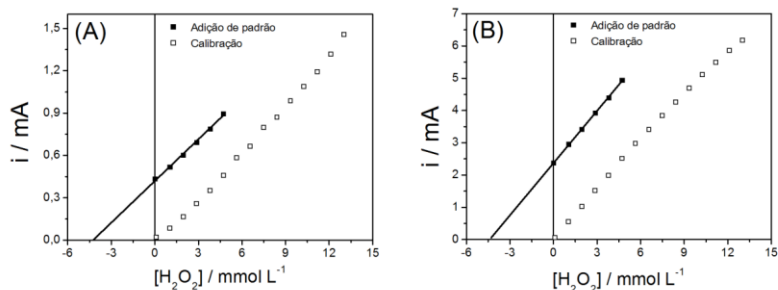
Sensor/Método	Valor rotulado (%)	Valor encontrado (%)	Er (%) ^a	Teste-t ^b	Teste-F ^c
GCE	1,50	1,43	-5,30	3,46	1,11
NPAP-Melanina- Fe^{3+}	1,50	1,47	-2,65	2,59	1,05
Titulação Potenciométrica	1,50	1,51	-	2,25	1,00

^a Er = Erro relativo entre os valores do método proposto e da titulação potenciométrica.

^b Valor teórico = 4,30

^c Valor crítico = 19,0

Figura 28. Curvas de calibração externa e de adição de padrão para determinação de H_2O_2 em enxaguante bucal e curva de calibração para GCE (A) e sensor composto por NPAP- Fe^{3+} (B).



6.3.1.1 Linearidade

Os coeficientes de determinação das curvas de adição de padrão foram comparados com aqueles das curvas de calibração apresentados na Tabela 6. Os valores de r^2 são semelhantes entre si. Os valores de r^2 foram 0,9958, 0,9995 para respectivamente o GCE e o sensor de NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} .

6.3.1.2 Seletividade

A seletividade do GCE e do sensor testado nesta seção foi obtida pela comparação entre as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão apresentadas na Figura 28. Houve pequena diferença entre os valores, mas pode-se considerar que os resultados foram bons. As inclinações das curvas de adição de padrão para o GCE e para o sensor construído com complexo de melanina com Fe^{3+} foi respectivamente 124,4 e 537,0 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$. Estes valores estão na mesma ordem de grandeza que aqueles apresentados na Tabela 6 para as curvas de calibração.

6.3.1.3 Exatidão

A concentração determinada de H_2O_2 na amostra analisada por titulação potenciométrica com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ como titulante, está de acordo com o conteúdo de peróxido rotulado pelo fabricante. Este parâmetro representa a exatidão do método proposto. De acordo com a Tabela 13, o método comparativo exibiu também concordância com o valor rotulado para a quantidade de H_2O_2 . O erro relativo E_r corrobora com as afirmações escritas acima. Este conjunto de experimentos mostra boa exatidão que está relacionada ao método amperométrico proposto utilizando sensor não-enzimático.

6.3.1.4 Precisão

A análise estatística foi realizada para os dados obtidos com os sensores propostos e com o método comparativo. Aplicando-se o teste-t e o teste F, todos os valores de t e de F calculados foram menores do que os valores teórico e crítico, respectivamente, conforme indicado na Tabela 13. Isto significa que o sensor desenvolvido neste trabalho e que foi aplicado nesta determinação (NPAP- Fe^{3+}), fornece dados precisos e exatos comparáveis ao método oficial de titulação potenciométrica. Tem-se desta maneira, a confirmação de que o sensor de NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} , em substrato de carbono vítreo pode ser devidamente utilizado para detecção de H_2O_2 em amostra comercial de enxaguante bucal para clareamento.

6.3.1.5 Robustez

A robustez foi avaliada através da obtenção de curvas de adição de padrão com variações de pH de $\pm 0,2$ unidades. A Tabela 14 apresenta os dados obtidos com estes experimentos, com exibição das inclinações das equações da melhor reta, os coeficientes de determinação dos pontos e ainda os valores do teste F, para cada valor de pH testado.

Tabela 14. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP-Fe³⁺ na quantificação de H₂O₂ em enxaguante bucal.

pH	Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	r ²	Valor encontrado (%)	Teste F*
6,8	512,3	0,9962	1,44	1,08
7,0	537,0	0,9995	1,47	1,05
7,2	531,7	0,9949	1,47	1,05

* F_{crítico} = 19,0

De acordo com os dados obtidos nestes experimentos, pode-se afirmar que a seletividade, exatidão e precisão do método se mantêm com a alteração no valor de pH da solução. Os cálculos dos valores de F para o sensor com NPAP-Fe³⁺ mostraram valor próximo ao da curva de calibração do mesmo sensor. Deste modo, pode-se afirmar que a determinação de H₂O₂ em enxaguante bucal utilizando sensor eletroquímico composto por NPAP encapsuladas por complexo de melanina-Fe³⁺ apresentou robustez.

6.3.2 Considerações parciais

A determinação de H₂O₂ em solução de enxaguante bucal com uso de sensor eletroquímico composto por NPAP-Fe³⁺-melanina foi realizada com sucesso. Na avaliação dos parâmetros de validação, as curvas de calibração e de adição de padrão apresentaram linearidade semelhante para todos os sensores. Seletividade, exatidão e precisão são mantidas mesmo com pequenas variações no pH da solução. O método proposto provou-se reprodutível.

6.4 DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM CREME PARA DESCOLORAÇÃO DE PELOS

6.4.1 Resultados e discussão

Foram realizadas três determinações independentes para cada amostra com a obtenção de curvas de adição de padrão, pela técnica de cronoamperometria. As curvas são mostradas na Figura 29. Para a construção das curvas de calibração foi utilizado o valor médio da corrente obtida para as três medições da quantidade de H₂O₂ presente na amostra. Os dados obtidos nesta série estão reunidos na Tabela 15.

Tabela 15. Determinação de H₂O₂ em creme descolorante de pelos com GCE e sensor composto de NPAP-Fe³⁺.

Sensor/Método	Valor rotulado (%)	Valor encontrado (%)	Er ₂ (%) ^a	Teste-t ^b	Teste-F ^c
GCE	30,0	15,4	-19,8	4,58	1,55
NPAP-Melanina-Fe ³⁺	30,0	15,9	-17,1	4,14	1,46
Titulação Potenciométrica	30,0	19,2	-	2,98	1,00

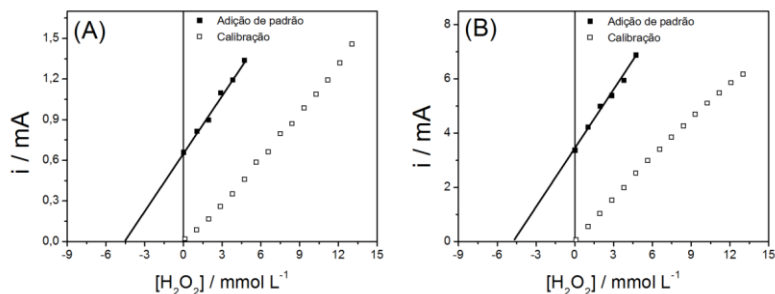
^a Er = Erro relativo entre os valores do método proposto e da titulação potenciométrica.

^b Valor teórico = 4,30

^c Valor crítico = 19,0

Os valores encontrados para esta amostra foram muito baixos. Por tratar-se de uma amostra não certificada, não se pode confiar valor fornecido pelo fabricante. De qualquer maneira, todos os valores encontrados são concordantes entre si, apenas com diferença para o valor rotulado.

Figura 29. Curvas de calibração externa e de adição de padrão para determinação de H_2O_2 em creme descolorante de pelos e curva de calibração para GCE (A) e sensor composto por NPAP- Fe^{3+} (B).



Possíveis causas desta diferença são o preparo da amostra e estabilidade de H_2O_2 no meio em que ele se encontra (complexado). Os manuais de preparo de amostras contendo peróxido são descritos para métodos titulométricos. Contudo, não aplicou-se o preparo completo da amostra de creme descolorante de pelos e cabelos.

6.4.1.1 Linearidade

Os coeficientes de determinação das curvas de adição de padrão foram comparados com aqueles das curvas de calibração apresentados na Tabela 6. Os valores de r^2 apresentaram semelhança entre si. Os valores de r^2 foram 0,9899 e 0,9856 para respectivamente o GCE e o sensor de NPAP encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} .

6.4.1.2 Seletividade

A seletividade do GCE e do sensor testado nesta seção foi obtida pela comparação entre as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão. Houve diferença entre os valores, e neste caso não se pode considerar que os resultados sejam satisfatórios. As inclinações das curvas de adição de padrão para o GCE e para o sensor construído com complexo de melanina com Fe^{3+} na determinação de H_2O_2 em creme descolorante não foram semelhantes às aquelas obtidas pelas curvas de calibração. As inclinações para as determinações de H_2O_2 desta seção foram de respectivamente 194,4 e 706,3 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$. Estes valores estão em ordem de grandeza próxima dos valores de inclinação exibidos na Tabela 6 para as curvas de calibração, porém

nota-se pela Figura 29 que as curvas de calibração e de adição de padrão não são paralelas. Este comportamento é explicado para determinações em que o efeito de matriz é percebido. Uma maneira para contornar isto seria a superposição de matriz (RIBANI *et al.* 2004).

6.4.1.3 Exatidão

A concentração determinada de H_2O_2 na amostra analisada por titulação potenciométrica com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ como titulante, está abaixo do conteúdo de peróxido rotulado pelo fabricante. Este parâmetro representa a exatidão do método proposto. De acordo com a Tabela 15, o método comparativo exibiu certa concordância com o valor da quantidade de H_2O_2 encontrada para as determinações com GCE e com o sensor contendo NPAP- Fe^{3+} . Todavia, os valores determinados não conferem com o valor rotulado. O erro relativo corroboram com as afirmações escritas acima. Este conjunto de experimentos não mostra exatidão.

Possíveis causas para isto podem estar relacionadas com a amostra. Por ser um creme parcialmente solúvel em água, é possível que nem todo o H_2O_2 presente na amostra tenha sido extraído para a fase aquosa. Mesmo embora o H_2O_2 seja altamente solúvel no meio, é conhecido que as indústrias utilizam estabilizantes para peróxido (agentes quelantes), e que estes estabilizantes possam ser insolúveis em água, o que causaria a permanência de parte do H_2O_2 na fase orgânica. Deste modo, a determinação de H_2O_2 em creme descolorante foi prejudicada e não exibiu valor exato.

6.4.1.4 Precisão

A análise estatística foi realizada para os dados obtidos com os sensores propostos e com o método comparativo. Aplicando-se o teste-t e o teste F, todos os valores de t e de F calculados foram menores do que os valores teórico e crítico, respectivamente, conforme indicado na Tabela 15, com exceção do GCE. Isto significa que embora os sensores testados nesta determinação não tenham obtido valores exatos, eles continuam com boa precisão. A titulação potenciométrica com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ foi importante para verificar que o método proposto ainda mantém boa precisão mesmo com uma amostra desfavorável.

6.4.1.5 Robustez

A robustez foi avaliada através da obtenção de curvas de adição de padrão com variações de pH de $\pm 0,2$ unidades. A Tabela 16 apresenta os dados obtidos com estes experimentos, com exibição das inclinações das equações da melhor reta, os coeficientes de determinação dos pontos e ainda os valores do teste F, para cada valor de pH testado.

Tabela 16. Dados obtidos com curvas de adição de padrão para avaliação da robustez do método, utilizando o sensor contendo NPAP-Fe³⁺ na quantificação de H₂O₂ em creme descolorante de pelos.

pH	Inclinação ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	r ²	Valor encontrado (%)	Teste F*
6,8	673,2	0,9824	15,5	1,53
7,0	706,3	0,9856	15,9	1,46
7,2	699,5	0,9871	15,8	1,48

* F_{crítico} = 19,0

De acordo com os dados obtidos nestes experimentos, pode-se afirmar que a seletividade, exatidão e precisão do método se mantém com a alteração no valor de pH da solução, apesar do efeito de matriz observado pelas inclinações das curvas de adição de padrão. Mesmo que a exatidão não tenha sido comprovada, não houve variações nos parâmetros de validação com a mudança dos valores de pH nas determinações. Deste modo, pode-se afirmar que a determinação de H₂O₂ em creme descolorante de pelos utilizando sensor eletroquímico composto por NPAP encapsuladas por complexo de melanina-Fe³⁺ apresentou robustez.

6.4.2 Considerações parciais

A determinação de H₂O₂ em creme descolorante de pelos e cabelos usando sensor eletroquímico composto por NPAP-Fe³⁺-melanina teve alguns resultados não satisfatórios. A curva de adição de padrão apresentou linearidade mais baixa em relação às demais determinações. A mesma curva de adição de padrão teve inclinação bem superior em relação à curva de calibração, mostrando pouca

seletividade. Exatidão e precisão foram prejudicadas por causa dos valores encontrados para H_2O_2 no creme. Mesmo com a separação da fase aquosa, a quantidade de H_2O_2 determinada pelo método difere daquele informado pelo fabricante. Todavia, a variação pequena de condições experimentais mostrou que são mantidos os valores.

7 CONCLUSÃO

A determinação de H_2O_2 em amostras comerciais de uso cosmético e de higiene pessoal utilizando o método proposto neste trabalho obteve um desempenho satisfatório. As determinações de H_2O_2 foram realizadas em cremes para clareamento dental, solução antisséptica, enxaguante bucal e creme descolorante de pelos e cabelos. Para amostra de creme descolorante não foi obtida exatidão nas análises eletroquímicas e titulação potenciométrica, ainda que o método tenha se apresentado robusto.

A oxidação do H_2O_2 foi verificada em ambos os eletrólitos suporte num potencial de +1,4 V e a detecção amperométrica foi realizada em E_{app} de +1,5 V no pH otimizado para um dos sensores desenvolvidos. Estudo do comportamento eletroquímico elucidou que a reação de transferência de carga é controlada por difusão.

As modificações da superfície do GCE com nanopartículas de azul da Prússia encapsuladas por complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} foram devidamente caracterizadas por TEM, CV e EIS. Estas NPAP contendo complexos de melanina com Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ou Co^{2+} apresentaram tamanhos médios de respectivamente 11,2 nm, 21,6 nm, 11,7 nm e 16,1 nm. Estes tamanhos foram determinadas a partir de imagens de TEM.

Todos os sensores apresentaram melhora no sinal de oxidação do H_2O_2 , em relação ao GCE. Esta melhora fez justificar o uso de EQM. Desenvolveu-se metodologia analítica para determinação de H_2O_2 e posterior aplicação dos sensores em amostras comerciais.

A validação do método analítico apresentou bons resultados para as amostras de uso cosmético e de higiene pessoal. Apenas a determinação de H_2O_2 em creme descolorante de pelos não forneceu resultados exatos. Foram obtidos LD e LQ mais baixos do que aqueles encontrados na literatura para detecção de H_2O_2 com sensores não-enzimáticos. As características analíticas obtidas com as curvas de adição de padrão foram satisfatórias.

Comparou-se os dados obtidos pelo método proposto com aqueles obtidos pelo método comparativo de titulação potenciométrica. E ainda, os valores encontrados com as determinações foram comparados com aqueles informados pelos fabricantes.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes, **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1756-1756, 1958.

AGRAZ, R.; SEVILLA, T. M.; HERNANDEZ, L. Chemically modified electrode for the simultaneous determination of trace metals and speciation analysis, **Analytica Chimica Acta**, v. 273, p. 205-212, 1993.

AGÜÍ, L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry - A review, **Analytica Chimica Acta**, v. 622, p. 11-47, 2008.

AHMAD, I.; ISLAM, M.; ALMAJID, A. A.; YAZDANI, B.; ZHU, Y. Investigation of yttria-doped alumina nanocomposites reinforced by multi-walled carbon nanotubes, **Ceramics International**, v. 40, p. 9327-9355, 2014.

ALAMINI, M. F.; DA SILVA, R. C.; ZOLDAN, V. C.; ISOPPO, E. A.; RODRIGUES FILHO, U. P.; REIS, F. D. A. A.; KLEIN, A. N.; PASA, A. A. Normal versus anomalous roughening in electrodeposited Prussian blue layers, **Electrochemistry Communications**, v. 13, p. 1455-1458, 2011.

ALIZADEH, T.; GANJALI, M. R.; ZARE, M.; NOROUZI, P. Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer, **Food Chemistry**, v. 130, p. 1108-1114, 2012.

ALKIRE, R. C.; KOLB, D. M.; LIPKOWSKI, J.; ROSS, P. N. **Chemically modified electrodes**, Advances in electrochemical science and engineering, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Vol. 11, Weinheim, Alemanha, 2009.

ANSIVA/Fundação Oswaldo Cruz, **Farmacopéia Brasileira**, Editora FioCruz, vol. 1, 5ª ed., Brasília, 2010.

ARDUINI, F.; CASSISI, A.; AMINE, A.; RICCI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Electrocatalytic oxidation of thiocholine at chemically

modified cobalt hexacyanoferrate screen-printed electrodes, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 626, p. 66-74, 2009.

ASADBEIGI, Z.; KHODADADI, A. A.; AFSHARPOUR, M.; MORTAZAVI, Y.; VESALI-NASEH, M. Enzymeless glucose biosensor using CuO nanoparticles on amine-functionalized carbon nanotubes, **14th International Meeting on Chemical Sensors**, 2012.

BAIONI, A. P.; VIDOTTI, M.; FIORITO, P. A.; PONZIO, E. A.; TORRESI, S. I. C. Synthesis and characterization of copper hexacyanoferrate nanoparticles for building up long-term stability electrochromic electrodes, **Langmuir**, v. 23, p. 6796-6800, 2007.

BAKKER, E. Electrochemical sensors, **Analytical Chemistry**, 76, 3285-3298, 2004.

BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Biosensors based on carbon nanotubes, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 452-468, 2006.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods, fundamentals and applications**, John Wiley & Sons Inc., 2nd Ed., New York City, 2001.

BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. **Electrochemical Dictionary**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Leipzig, 2008.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, **Journal of Biological Chemistry**, v. 188, p. 133-140, 1951.

BENVIDI, A.; RAJABZADEH, N.; MAZLOUM-ARDAKANI, M.; HEIDARI, M. M.; MULCHANDANI, A. Simple and label-free electrochemical impedance Amelogenin gene hybridization biosensing based on reduced graphene oxide, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 58, p. 145-152, 2014.

BLONDER, R.; SHEENY, L. Three-dimensional redox-active layered composites of Au–Au, Ag–Ag and Au–Ag colloids, **Chemical Communications**, v. 13, p. 1393-1394, 1998.

BOND, A. M.; KRATSI, S.; MITCHELL, S.; MOCAK, J. Comparison of the gold reduction and stripping processes at platinum, rhodium, iridium, gold and glassy carbon micro- and macrodisk electrodes, **Analyst**, v. 122, p. 1147-1152, 1997.

BORISOVA, A. V.; KARYAKINA, E. E.; COSNIER, S.; KARYAKIN, A. A. Current-free deposition of prussian blue with organic polymers: towards improved stability and mass production of the advanced hydrogen peroxide transducer, **Electroanalysis**, v. 21, p. 409-414, 2009.

BRANZOI, V.; BRANZOI, F.; PILAN, L. Characterization of electrodeposited polymeric and composite modified electrodes on cobalt based alloy, **Materials Chemistry and Physics**, v. 118, p. 197-202, 2009.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, methods and applications**, Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2 6DP, Reprinted Ed. 1994.

BRONDANI, D. ; SOUZA, B. ; SOUZA, B. S. ; NEVES, A. ; VIEIRA, I. C. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: A new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 42, p. 242-247, 2013.

BRONDANI, D. ; PIOVESAN, J. V. ; WESTPHAL, E. ; GALLARDO, H. ; DUTRA, R. A. F. ; SPINELLI, A. ; VIEIRA, I. C. Label-free electrochemical immunosensor based on ionic organic molecule and chitosan-stabilized gold nanoparticles for the detection of cardiac troponin T, **Analyst**, v. 139, p. 5200-5208, 2014.

BUTTRY, D. A. **Electrochemistry of electroactive surface-immobilized nanoparticles**, In: *Chemically modified electrodes, Advances in electrochemical science and engineering*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Vol. 11, Weinheim, Alemanha, 2009.

CAI, H.; LI, Z.; DAVIS, M. E.; KANNER, W.; HARRISON, D. G.; DUDLEY JR, S. C. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated

kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide, **Molecular Pharmacology**, v. 63, p. 325-331, 2003.

CAMPESTRINI, I.; DE BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine, **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 4970-4975, 2010.

CAMPOS-MARTIN, J. M.; BLANCO-BRIEVA, G.; FIERRO, J. L. G. Hydrogen peroxide synthesis: An outlook beyond the anthraquinone process, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 6962-6984, 2006.

CHAI, C. X.; XUE, K. H.; ZHOU, Y. M.; YANG, H. Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode, **Talanta**, v. 44, p. 339-347, 1997.

CHAI, X. S.; HOU, Q. X.; LUO, Q.; ZHU, J. Y. Rapid determination of hydrogen peroxide in the wood pulp bleaching streams by a dual-wavelength spectroscopic method, **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 281-284, 2004.

CHANG, S. H.; YEH, M. H.; RICK, J.; SU, W. N.; LIU, D. G.; LEE, J. F.; LIU, C. C.; HWANG, B. J. Bimetallic catalyst of PtIr nanoparticles with high electrocatalytic ability for hydrogen peroxide oxidation, **Sensors and Actuators B**, v. 190, p. 55-60, 2014.

CHAUHAN, N.; MEENA, J. N.; PUNDIR, C. S. An amperometric glutathione biosensor based on chitosan-iron coated gold nanoparticles modified Pt electrode, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 879-886, 2012.

COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding voltammetry**, Imperial College Press, 2nd Ed., London, 2011.

COSTA, T. G.; YOUNGER, R.; POE, C.; FARMER, P. J.; SZPOGANICZ, B. Studies on synthetic and natural melanin and its

affinity for Fe(III) ion, **Bioinorganic Chemistry and Applications**, Article ID 712840, 9 pages, 2012.

da SILVA, D. J. R.; DINIZ, F. B. Electrochemical impedance spectroscopy study of concanavalin a adsorption on glassy carbon electrode: an analysis of capacitance dispersion, **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 99-105, 2014.

DAVIS, J. J.; BUENO, P. LUO, X.; BRYAN, T. An optimised electrochemical biosensor for the label free detection of C-reactive protein in blood, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 39, p. 94-98, 2013.

DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .3. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces, **Thin Solid Films**, v. 210, p. 831-835, 1992.

de LIMA, C. A.; SPINELLI, A. Electrochemical behavior of progesterone at an *ex situ* bismuth film electrode, **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 542-548, 2013.

de LIMA, C. A.; da SILVA, P. S.; SPINELLI, A. Chitosan-stabilized silver nanoparticles for voltammetric detection of nitrocompounds, **Sensors and Actuators B, Chemical**, v. 196, p. 39-45, 2014.

DeLONGCHAMP, D. M.; HAMMOND, P. T. High-contrast electrochromism and controllable dissolution of assembled Prussian blue/polymer nanocomposites, **Advanced Functional Materials**, v. 14, p. 224-232, 2004.

de MATTOS, I. L.; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. H₂O₂: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, p. 373-380, 2003.

de SOUZA, G. C. S.; da SILVA, P. A. B.; LEOTERIO, D. M. S.; PAIM, A. P. S.; LAVORANTE, F. A. A multicommutated flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples, **Food Control**, v. 46, p. 127-135, 2014.

DEY, M. K.; SATPATI, A. K.; REDDY, A. V. R. Electrodeposited antimony and antimony–gold nanocomposite modified carbon paste electrodes for the determination of heavy metal ions, **Analytical Methods**, v. 6, p. 5207-5213, 2014.

DING, Y.; HU, Y. L.; GU, G.; XIA, X. H. Controllable synthesis and formation mechanism investigation of prussian blue nanocrystals by using the polysaccharide hydrolysis method, **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 14838-14843, 2009.

DING, L.; YUPING LIU, Y.; ZHAI, J.; BOND, A. M.; ZHANG, J. Direct electrodeposition of graphene-gold nanocomposite films for ultrasensitive voltammetric determination of mercury(II), **Electroanalysis**, v. 26, p. 121-128, 2014.

DROGUI, P.; ELMALEH, S.; RUMEAU, M.; BERNARD, C.; RAMBAUD, A. Hydrogen peroxide production by water electrolysis: Application to disinfection, **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 31, p. 877-882, 2001.

EDWARDS, J. K.; THOMAS, A.; SOLSONA, B. E.; LANDON, P.; CARLEY, A. F.; HUTCHINGS, G. J. Comparison of supports for the direct synthesis of hydrogen peroxide from H₂ and O₂ using Au–Pd catalysts, **Catalysis Today**, v. 122, p. 397-402, 2007.

EDWARDS, J. K.; HUTCHINGS, G. J. Palladium and gold–palladium catalysts for the direct synthesis of hydrogen peroxide, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 9192-9198, 2008.

EFTEKHARI, A. Aluminum electrode modified with manganese hexacyanoferate as a chemical sensor for hydrogen peroxide, **Talanta**, v. 55, p. 395-402, 2001.

ENSAFI, A. A.; JAFARI-ASL, M.; REZAEI, B. A novel enzyme-free amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Nafion/exfoliated graphene oxide–Co₃O₄ nanocomposite, **Talanta**, v. 103, p. 322-329, 2013.

ENSAFI, A. A.; ABARGHOUI, M. M.; REZAEI, B. Electrochemical determination of hydrogen peroxide using copper/porous silicon based non-enzymatic sensor, **Sensors and Actuators B**, v. 196, p. 398-405, 2014.

EVANS, S.A.G., ELLIOTT, J.M., ANDREWS, L.M., BARTLETT, P.N., DOYLE, P.J.; DENUAULT, G. Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes, **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1322–1326, 2002.

FIORITO, P. A.; GONCALES, V. R.; PONZIO, E. A.; de TORRESI, S. I. C. Synthesis, characterization and immobilization of Prussian blue nanoparticles. A potential tool for biosensing devices, **Chemical Communications**, v. 3, p. 366-368, 2005.

FIORITO, P. A.; BRETT, C. M. A.; DE TORRESI, S. I. C. Polypyrrole/copper hexacyanoferrate hybrid as redox mediator for glucose biosensors, **Talanta**, v. 69, p. 403-408, 2006.

FRADEN, J. **Handbook of modern sensors**, Springer-Verlag New York, Inc., 3rd Ed., NY City, 2010.

GHADERI, S.; MEHRGARDI, M. A.; Prussian blue-modified nanoporous gold film electrode for amperometric determination of hydrogen peroxide, **Bioelectrochemistry**, v. 98, p. 64-69, 2014.

GHOLIVAND, M. B.; KARIMIAN, N.; MALEKZDEH, G. Computational design and synthesis of a high selective molecularly imprinted polymer for voltammetric sensing of propazine in food samples, **Talanta**, v. 89, p. 513-520, 2012.

GOTO, H.; HANADA, Y.; OHNO, T.; MATSUMURA, M. Quantitative analysis of superoxide ion and hydrogen peroxide produced from molecular oxygen on photoirradiated TiO₂ particles, **Journal of Catalysis**, v. 225, p. 223-229, 2004.

GOYAL R. N.; GUPTA V. K.; BACHHETI, N. Fullerene-C₆₀-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone

– An anabolic steroid used in doping, **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 82-89, 2007.

GUASCITO, M. R.; CHIRIZZI, D.; MALITESTA, C.; SICILIANO, T.; TEPORE, A. Te oxide nanowires as advanced materials for amperometric nonenzymatic hydrogen peroxide sensing, **Talanta**, v. 115, p. 863-869, 2013.

GUISEPPI-ELIE, A.; LEI, C.; BAUGHMAN, R. H. Direct electron transfer to glucose oxidase using carbon nanotubes, **Nanotechnology**, v. 13, p. 559-564, 2002.

GUPTA, S. M.; TRIPATHI, M. A review of TiO₂ nanoparticles, **Chinese Science Bulletin**, v. 56, p. 1639-1657, 2011.

GURRAPP, I.; BINDER, L. Electrodeposition of nanostructured coatings and their characterization: A review, **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, p. 1-12, 2008.

HAN, H.; BAI, R. Buoyant photocatalyst with greatly enhanced visible-light activity prepared through a low temperature hydrothermal method, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 2891-2898, 2009.

HAO, X.; YAN, T.; WANG, Z.; LIU, S.; LIANG, Z.; SHEN, Y.; PRITZKER, M. Unipolar pulse electrodeposition of nickel hexacyanoferrate thin films with controllable structure on platinum substrates, **Thin Solid Films**, v. 520, p. 2438-2448, 2012.

HAYDEN, B. E.; MALEVICH, D. V.; PLETCHER, D. Electrode coatings from sprayed TiO₂ nanoparticles – behaviour in NaOH solutions, **Electrochemistry Communications**, v. 3, p. 390-394, 2001.

HELI, H.; PISHAHANG, J. Cobalt oxide nanoparticles anchored to multiwalled carbon nanotubes: Synthesis and application for enhanced electrocatalytic reaction and highly sensitive nonenzymatic detection of hydrogen peroxide, **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 518-526, 2014.

HELLI, H.; SATTARAHMADY, N.; VAIS, R. D.; MEHDIZADEH, A. R. Enhanced electrocatalytic reduction and highly sensitive nonenzymatic detection of hydrogen peroxide using platinum hierarchical nanoflowers, **Sensors and Actuators B**, v. 192, p. 310-316, 2014.

HELLER, I.; KONG, J.; WILLIAMS, K. A.; DEKKER, C.; LEMAY, S. G. Electrochemistry at single-walled carbon nanotubes: the role of band structure and quantum capacitance, **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 7353-7359, 2006.

HORNOK, V.; DEKANY, I. Synthesis and stabilization of Prussian blue nanoparticles and application for sensors, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, p. 176-182, 2007.

HOSHINO, M.; KAMINO, S.; DOI, M.; TAKADA, S.; MITANI, S.; YANAGIHARA, R.; ASANO, M.; YAMAGUCHI, T.; FUJITA, Y. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide with osmium(VIII) and m-carboxyphenylfluorone, **Spectrochimica Acta A**, v. 117, p. 814-816, 2014.

HRAPOVIC, S.; LUONG, J. H. T. Picoamperometric detection of glucose at ultrasmall platinum-based biosensors: preparation and characterization, **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3308-3315, 2003.

HUANG, X.; MENG, F.; PI, Z.; XU, W.; LIU, J. Gas sensing behavior of a single tin dioxide sensor under dynamic temperature modulation, **Sensors and Actuators B**, v. 99, p. 444-450, 2004.

HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. **Inorganic chemistry – Principles of structure and reactivity**, Harper Collins College Publishers, 4th Ed., NY City, 1993.

ITAYA, K.; SHIBAYAMA, K.; AKAHOSHI, H.; TOSHIMA, S. Prussian-blue-modified electrodes - an application for a stable electrochromic display device, **Journal of Applied Physics**, v. 53, p. 804-805, 1982.

IVANDINI, T. A.; SATO, R.; MAKIDE, Y.; FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y. Pt implanted boron-doped diamond electrodes and the application for electrochemical detection of hydrogen peroxide, **Diamond and Related Materials**, v. 14, p. 2133-2138, 2005.

JIA, Z. Q. Synthesis of Prussian blue nanocrystals with metal complexes as precursors: Quantitative calculations of species distribution and its effects on particles size, **Colloids and Surfaces A – Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 389, p. 144-148, 2011.

JIANG, W.; YUAN, R.; CHAI, Y. Q.; YIN, B. Amperometric immunosensor based on multiwalled carbon nanotubes/Prussian blue/nanogold-modified electrode for determination of α -fetoprotein, **Analytical Biochemistry**, v. 407, p. 65-71, 2010.

KAHLERT, H.; RETTER, U.; LOHSE, H.; SIEGLER, K.; SCHOLZ, F. On the determination of the diffusion coefficients of electrons and of potassium ions in copper(II) hexacyanoferrate(II) composite electrodes, **Journal of Physical Chemistry**, v. 102, p. 8757-8765, 1998.

KAMALI, K. Z.; ALAGARSAMY, P.; HUANG, N. M.; ONG, B. H.; LIM, H. N. Hematite nanoparticles-modified electrode based electrochemical sensing platform for dopamine, **Scientific World Journal**, Article ID 396135, 13 pages, 2014.

KARYAKIN, A. A.; GITELMACHER, O. V.; KARYAKINA, E. E. A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on prussian-blue modified electrodes, **Analytical Letters**, v. 27, p. 2861-2869, 1994.

KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. Prussian blue based amperometric biosensors in flow-injection analysis, **Talanta**, v. 43, p. 1597-1606, 1996.

KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E. Electrochemical applications of Prussian blue and its analogs, **Russian Chemical Bulletin International Edition**, v. 50, p. 1811-1817, 2001.

KIMMEL, D. W.; LeBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E.; CLIFFEL, D. E. Electrochemical sensors and biosensors, **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 685-707, 2012.

KONCKI, R.; LENARCZUK, T.; GLAB, S. Optical sensing schemes for Prussian blue/Prussian white film system, **Analytica Chimica Acta**, v. 424, p. 27-35, 2000.

KONG, J. M.; ZHANG, H.; CHEN, X. T.; BALASUBRAMANIAN, N.; KWONG, D. L. Ultrasensitive electrical detection of nucleic acids by hematin catalysed silver nanoparticle formation in sub-microgapped biosensors, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, p. 787-791, 2008.

KRASTEVA, N.; HARMS, U.; ALBRECHT, W.; SEIFERT, B.; HOPP, M.; ALTANKOV, G.; GROTH, T. Membranes for biohybrid liver support systems-investigations on hepatocyte attachment, morphology and growth, **Biomaterials**, v. 23, p. 2467-2478, 2002.

KREFT, G. L.; DE BRAGA, O. C.; SPINELLI, A. Analytical electrochemistry of vitamin B12 on a bismuth-film electrode surface, **Electrochimica Acta**, v. 83, p. 125-132, 2012.

KURNIAWAN, F.; TSAKOVA, V.; MIRSKY, V. M. Analytical applications of electrodes modified by gold nanoparticles: dopamine detection, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, p. 2407-2412, 2009.

LAOCHAROENSUK, R.; BULBARELLO, A.; MANNINO, S.; WANG, J. Adaptive nanowire-nanotube bioelectronic system for on-demand bioelectrocatalytic transformations, **Chemical Communications**, v. 32, p. 3362-3364, 2007.

LENARCZUK, T.; GLAB, S.; KONCKI, R. Application of Prussian blue-based optical sensor in pharmaceutical analysis, **Journal of Pharmaceutical Biomedicine**, v. 26, p. 163-169, 2001.

LI, L.; SHENG, Q. L.; ZHENG, J. B.; ZHANG, H. F. Facile and controllable preparation of glucose biosensor based on Prussian blue

nanoparticles hybrid composites, **Bioelectrochemistry**, v. 74, p. 170-175, 2008.

LI, B. L.; CHEN, J. R.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Electrocatalytic activity of polymer-stabilized silver nanoclusters for hydrogen peroxide reduction, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 706, p. 64-68, 2013.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of chemistry and physics**, 76th Ed., NY City, 1995.

LIU, S. Q.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Electrochemical behavior of nanosized Prussian blue self-assembled on Au electrode surface, **Electrochemistry Communications**, v. 4, p. 421-425, 2005.

LIU, G.; PADDON-ROW, M. N.; GOODING, J. J. A molecular wire modified glassy carbon electrode for achieving direct electron transfer to native glucose oxidase, **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 2218-2223, 2007.

LUO, H.; SHI, Z.; LI, N.; GU, Z.; ZHUANG, Q. Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode, **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 915-920, 2001.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications, **Analyst**, v. 134, p. 1965-1979, 2009.

McCLUSKEY, A.; HOLDSWORTH, C. I.; BOWYER, M. C. Molecularly imprinted polymers (MIPs): sensing, an explosive new opportunity?, **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 3233-3244, 2007.

McCREERY, R. L. **Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics**, In: BARD, A. J. *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 17, Marcel Dekker, NY City, 221, 1991.

MAEHARA, S.; TANEDA, M.; KUSAKABE, K. Catalytic synthesis of hydrogen peroxide in microreactors, **Chemical Engineering Research & Design**, v. 86, p. 410-415, 2008.

MAHONY, J.; NOLAN, K.; SMYTH, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers-potential and challenges in analytical chemistry, **Analytica Chimica Acta**, v. 534, p. 31-39, 2005.

MATIJEVIĆ, E. Preparation and properties of uniform size colloids, **Chemistry of Materials**, v. 5, p. 412-426, 1993.

MAŽEIKIENĖ, R.; NIAURA, G.; MALINAUSKAS, A. Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at Prussian blue modified electrode: An in situ Raman spectroelectrochemical study, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 660, p. 140-146, 2011.

MILSON, E. V.; NOVAK, J.; OYANA, M.; MARKEN, F. Electrocatalytic oxidation of nitric oxide at TiO₂-Au nanocomposite film electrodes, **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 436-442, 2007.

MORINAGA, B. K. The reaction of hydrogen and oxygen through a silent electric discharge in the formation of hydrogen peroxide, **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 35, p. 345-348, 1962.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode, **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 1882-1888, 1975.

ORATA, D.; SEGOR, D. Electrodeposition of polyaniline on acidified clay montmorillonite modified electrode, **Reactive & Functional Polymers**, v. 43, p. 305-314, 2000.

ORELLANA, M.; BALLESTEROS, L.; DEL RIO, R.; GREZ, P.; SCHREBLER, R.; CORDOVA, R. Electrosynthesis, characterization and electrocatalytic properties of Prussian Blue (PB) nanoparticles disposed on a template, **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 13, p. 1303-1308, 2009.

PAJKOSSY, T.; KOLB, D. M. Double layer capacitance of Pt(111) single crystal electrodes, **Electrochimica Acta**, v. 46, p. 3063-3071, 2001.

PAREDES-GARCIA, V.; VENEGAS-YAZIGI, D.; LATORRE, R. O.; SPODINE, E. Electronic properties of mixed valence iron(II,III) dinuclear complexes with carboxylate bridges, **Polyhedron**, v. 25, p. 2026-2032, 2006.

PETRIER, C.; LAMY, M. F.; FRANCONY, A.; BENAHCENE, A.; DAVID, B.; RENAUDIN, V.; GONDREXON, N. Sonochemical degradation of phenol in dilute aqueous solutions: comparison of the reaction rates at 20 and 487 kHz, **Journal of Physical Chemistry**, v. 98, p. 10514-10520, 1994.

POCARD, N. L.; AISMEYER, D. C.; McCREERY, R. L.; NEENAN, T. X.; CALLSTROM, M. R. Doped glassy carbon: A new material for electrocatalysis, **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, p. 771-784, 1992.

PRIVETT, B. J.; SHIN, J. H.; SCHOENFISCH, M. H. Electrochemical sensors, **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 4723-4741, 2010.

QUINT, M. L.; de SOUZA, F. S.; SPINELLI, A.; DOMINGOS, J. B. Low-range detection of the phosphate group by a molecularly imprinted polymer-modified carbon paste electrode, **IEEE Sensors Journal**, v. 15, p. 1012-1019, 2015.

RATCHANANUSORN, W.; GUDARZI, D.; TURUNEN, I. Catalytic direct synthesis of hydrogen peroxide in a novel microstructured reactor, **Chemical Engineering and Processing**, v. 84, p. 24-30, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods, **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RICCI, F.; PALLESCI, G.; YIGZAW, Y.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; KARYAKIN, A. Investigation of the effect of different glassy

carbon materials on the performance of Prussian Blue based sensors for hydrogen peroxide, **Electroanalysis**, v. 15, p. 175-182, 2002.

RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian blue modified electrodes, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, p. 389-407, 2005.

RIPKA, P.; TIPEK, A. **Modern sensors handbook**, Antony Rowe Ltd., Chippenham, Wiltshire, ISTE Ltd., 2007.

ROBERTS, J. G.; HAMILTON, K. L.; SOMBERS, L. A. Comparison of electrode materials for the detection of rapid hydrogen peroxide fluctuations using background-subtracted fast scan cyclic voltammetry, **Analyst**, v. 136, p. 3550-3556, 2011.

RODRIGUEZ, P.; KOPER, M. T. M. Electrocatalysis on gold, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 13583-13594, 2014.

ROZENBERG, B. A.; TENNE, R. Polymer-assisted fabrication of nanoparticles and nanocomposites, **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 40-112, 2008.

RUBIANES, M. D.; RIVAS, G. A. Carbon nanotubes paste electrode, *Electrochemistry Communications*, v. 5, p. 689-694, 2003.

RUST, F. F. N. **V. de Bataafsche Petroleum Maatschappij**, DE935303, 1955.

SÁ, E. S.; da SILVA, P. S.; JOST, C. L.; SPINELLI, A. Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B2 (riboflavin), **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 423-430, 2015.

SAHARI, A.; AZIZI, A.; FENINECHE, N.; SCHMERBER, G.; DINIA, A. Electrochemical study of cobalt nucleation mechanisms on different metallic substrates, **Materials Chemistry and Physics**, v. 108, p. 345-352, 2008.

SALIMI, A.; HALLAJ, R.; SOLTANIAN, S.; MAMKHEZRI, H. Nanomolar detection of hydrogen peroxide on glassy carbon electrode modified with electrodeposited cobalt oxide nanoparticles, **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 24-31, 2007.

SAMANTA, C. Direct synthesis of hydrogen peroxide from hydrogen and oxygen: An overview of recent developments in the process, **Applied Catalysis A: General**, v. 350, p. 133-249, 2008.

SANTHIAGO, M.; HENRY, C. S.; KUBOTA, L. T. Low cost, simple three dimensional electrochemical paper-based analytical device for determination of p-nitrophenol, **Electrochimica Acta**, v. 130, p. 771-777, 2014.

SATO, M.; HAYASHI, Y.; SHINTATE, H.; KATADA, M.; KAWATA, S. Oxidized Fe(II) ferrocenylacetylde complexes - A novel type of mixed-valence complex, **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 471, p. 179-184, 1994.

SCHWARZACHER, W. Electrodeposition: A technology for the future, **Interface**, v. 15, p. 32-33, 2006.

SELLERS, R. M. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using potassium titanium(IV) oxalate, **Analyst**, v. 105, p. 950-954, 1980.

SHAMSIPUR, M.; MEHDI ASGARI, M.; MARAGHEH, M. G.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. A novel impedimetric nanobiosensor for low level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase, **Bioelectrochemistry**, v. 83, p. 31-37, 2012.

SHAMSIPUR, M.; KARIMI, Z.; TABRIZI, M. A.; SHAMSIPUR, A. Electrocatalytic determination of traces of hydrazine by a glassy carbon electrode modified with palladium-gold nanoparticles, **Electroanalysis**, v. 26, p. 1-9, 2014.

SHI, H. Activated carbons and double layer capacitance, **Electrochimica Acta**, v. 41, p. 1633-2639, 1996.

SHI, Y.; LIU, Z.; ZHAO, B.; SUN, Y.; XU, F.; ZHANG, Y.; WEN, Z.; YANG, H.; LI, Z. Carbon nanotube decorated with silver nanoparticles via noncovalent interaction for a novel nonenzymatic sensor towards hydrogen peroxide reduction, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 29-33, 2011.

SHIBATA, T.; BUNKER, B. A.; ZHANG, Z.; MEISEL, D.; VARDEMAN II, C. F.; GEZELTER, J. D. Size-dependent spontaneous alloying of Au–Ag nanoparticles, **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 11989–11996. 2002.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**, Tradução da 3ª Ed., Bookman, Porto Alegre, 2003.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**, Thomson, Tradução da 8ª Ed., Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2006.

SONG, M. J.; HWANG, S. W.; WHANG, D. Non-enzymatic electrochemical CuO nanoflowers sensor for hydrogen peroxide detection, **Talanta**, v. 80, p. 1648-1652, 2010.

SPĂRATU, T.; MARCU, M.; BANU, A.; ROMAN, E.; SPĂRATU, N. Electrodeposition of platinum on polytyramine-modified electrodes for electrocatalytic applications, **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 3316-3319, 2009.

STOTT, S. J.; MORTIMER, R. J.; DANN, S. E.; OYAMAB, M.; MARKEN, F. Electrochemical properties of core-shell TiC–TiO₂ nanoparticle films immobilized at ITO electrode surfaces, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, p. 5437-5443, 2006.

SZPOGANICZ, B.; GIDANIANA, S.; KONGA, P.; FARMER, P. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, p. 45-53, 2002.

TACCONI, N. R.; RAJESHWAR, K.; LEZNA, R. O. Metal hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in situ characterization, and applications, **Chemistry of Materials**, v. 15, p. 3046-3062, 2003.

THE LANCET, DOI:10.1016/S0140-6736(02)95790-9 Properties and medical uses of Prussic acid, **The Lancet**, v. 1, p. 425-428, 1824.

TIAN, F.; LLAUDET, E.; DALE, N. Ruthenium purple-mediated microelectrode biosensors based on sol-gel film, **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 6760-6766, 2007.

TOYODA, Y.; KATOH, N.; KUWABARA, K. Dependence of redox characteristics in Prussian blue-modified electrode on pH of electrolytic solution, **Materials Science and Engineering B: Solid**, v. 108, p. 271-277, 2004.

TSENG, T. F. Chromium(III) hexacyanoferrate(II) based chemical sensor for the cathodic determination of hydrogen peroxide, **Analyst**, v. 123, p. 159-163, 1998.

TSIAFOULIS, C. G.; TRIKALITIS, P. N.; PRODRONIDIS, M. I. Synthesis, characterization and performance of vanadium hexacyanoferrate as electrocatalyst of H₂O₂, **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 1398-1404, 2005.

TUDORACHE, M.; BALA, C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 565-578, 2007.

TUNDO, P.; ANASTAS, P.; BLACK D. StC.; BREEN, J.; COLLINS, T.; MEMOLI, S.; MIYAMOTO, J.; POLYAKOFF, M.; TUMAS, W. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview, **Pure Applied Chemistry**, v. 72, p. 1207-1228, 2000.

US PEROXIDE. **Hydrogen peroxide is a powerful oxidizer**. Atlanta, Georgia, EUA. Disponível em <<http://www.h2o2.com/products-and-services/us-peroxide-technologies.aspx?pid=112&name=Hydrogen-Peroxide>>. Acessado em 01/12/2014.

van der LINDEN, W. E.; DIEKER, J. W. Glassy carbon as electrode material in electroanalytical chemistry, **Analytica Chimica Acta**, v. 119, p. 1-24, 1980.

VORONKOVA, V. K.; MROZINSKI, J.; YAMPOLSKAYA, M. A.; YABLOKOV, Y. V.; EVTUSHENKO, N. S.; BYRKE, M. S.; GERBELEU, N. V. Mixed-valence Fe(III)-Fe(IV) dimers - Preparation and physical-properties of oxidation-products of oxo-bridged binuclear Fe(III) complexes, **Inorganica Chimica Acta**, v. 238, p. 139-147, 1995.

WADE, T. L.; VAIDYANATHAN, R.; HAPPEK, U.; STICKNEY, J. L. Electrochemical formation of a III-V compound semiconductor superlattice: InAs/InSb, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 500, p. 322-332, 2001.

WANG, J. Modified electrodes for electrochemical sensors, **Electroanalysis**, v. 3, p. 255-259, 1991.

WANG, J.; ROGERS, K. Electrochemical sensors for environmental monitoring: a review of recent technology, **U.S. Environmental Protection Agency**, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, 1995.

WANG, J. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review, **Electroanalysis**, v. 17, p. 7-14, 2003.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, 3rd Ed., New Jersey, 2006.

WANG, G.; WANG, R.; WU, X.; ZHANG, Z. Electrodeposition of sol-gel imprinted films modified electrode and its application for 3,4-dihydroxybenzoic acids determination, **Journal of Electrochemistry**, v. 14, p. 130-134, 2008.

WANG, S.; LU, L.; YANG, M.; LEI, Y.; SHEN, G.; YU, R. A novel cobalt hexacyanoferrate nanocomposite on CNT scaffold by seed medium and application for biosensor, **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 220-226, 2009.

WANG, X. Y.; GU, H. F.; YIN, F.; TU, Y. F. A glucose biosensor based on Prussian blue/chitosan hybrid film, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, p. 1527-1530, 2009.

WANG, H. H.; GUO, C. F.; ZHOU, S. L.; HU, X.; HU, Y.; LI, F. F.; MIAO, Y. G. One-step synthesis and self-organization of polypyrrole ultrathin films inlaid with Prussian blue nanoparticles induced by a drop of toluene solution on water surface, **Thin Solid Films**, v. 520, p. 2026-2031, 2012.

WANG, Z. D.; HAO, X. G.; ZHANG, Z. L.; LIU, S. B.; LIANG, Z. H.; GUAN, G. Q. One-step unipolar pulse electrodeposition of nickel hexacyanoferrate/chitosan/carbon nanotubes film and its application in hydrogen peroxide sensor, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, p. 353-360, 2012.

WANG, Y.; PENG, X.; SHI, J.; TANG, X.; JIANG, J.; LIU, W. Highly selective fluorescent chemosensor for Zn^{2+} derived from inorganic-organic hybrid magnetic core/shell $Fe_3O_4@SiO_2$ nanoparticles, **Nanoscale Research Letters**, v. 86, 13 pages, 2013.

WATKINS, B. F.; BEHLING, J. R.; KARIV, E.; MILLER, L. L. A chiral electrode, **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, p. 3549-3550, 1975.

WESTBROEK, P.; HAKUZIMANA, J.; GASANA, E.; LOMBAERT, P.; KIEKENS, P. Voltammetric detection of hydrogen peroxide in teeth whitening gels, **Sensors and Actuators B**, v. 124, p. 317-322, 2007.

WILDGOOSE, G. G.; ABIMAN, P.; COMPTON, R. G. Characterizing chemical functionality on carbon surfaces, **Journal of Materials Chemistry**, v. 28, p. 4875-4886, 2009.

WOO, Y. A.; KIM, H. J. Rapid determination of hydrogen peroxide in whitening patches for teeth using a new portable near-infrared spectrometer, **Microchemical Journal**, v. 78, p. 167-173, 2004.

XIAO, L.; DAMIEN, J.; LUO, J.; JANG, H.; HUANG, J.; HE, Z. Crumpled graphene particles for microbial fuel cell electrodes, **Journal of Power Sources**, v. 208, p. 187-192, 2012.

XING, S. J.; XU, H.; SHI, G. Y.; CHEN, J. S.; ZENG, L. P.; JIN, L. T. A simple and sensitive method for the amperometric detection of trace chromium(VI) based on prussian blue modified glassy carbon electrode, **Electroanalysis**, v. 21, p. 1678-1684, 2009.

YAH, C. S. The toxicity of gold nanoparticles in relation to their physiochemical properties, **Biomedical Research**, v. 24, p. 400-413, 2013.

YANG, Y. S.; FAUSTINO, P. J.; PROGAR, J. J.; BROWNELL, C. R.; SADRIEH, N.; MAY, J. C.; LEUTZINGER, E.; PLACE, D. A.; DUFFY, E. P.; YU, L. X.; KHAN, M. A.; LYON, R. C. Quantitative determination of thallium binding to ferric hexacyanoferrate: Prussian blue, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 187-194, 2008.

YANG, Y.; YI, C.; LUO, J.; LIU, R.; LIU, J.; JIANG, J.; LIU, X. Glucose sensors based on electrodeposition of molecularly imprinted polymeric micelles: A novel strategy for MIP sensors, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, p. 2607-2612, 2011.

YU, H.; SONG, S. H.; LIAN, Y. Y.; LIU, Z. Y.; QI, G. C. Electrochemical preparation of copper hexacyanoferrate nanoparticles under the synergic action of EDTA and HAuCl_4 , **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, p. 82-89, 2010.

YU, G.; WU, W.; ZHAO, Q.; WEI, X.; LU, Q. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 68, p. 288-294, 2015.

ZAPP, E.; da SILVA, P. S.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H. A.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Troponin T immunosensor based on liquid crystal and silsesquioxane-supported gold nanoparticles, **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, p. 1638-1643, 2014.

ZARBIN, A. J. G. Química de (Nano)materiais, **Química Nova**, v. 30, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications, **Elsevier Inc. 1st Ed., San Diego, CA, 2008.**

ZHANG, Y.; LUO H. Q.; LI N. B. Hydrogen peroxide sensor based on Prussian blue electrodeposited on (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane polymer-modified gold electrode, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 215-221, 2011.

ZHANG, J.; CHEN, G. H.; WANG, Y. W.; ZHAO, J.; DUAN, H. F.; LIAO, L. M.; ZHANG, X. Z.; CHEN, Y. D.; CHEN, H. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction, **Chinese Medical Journal**, v. 125, p. 3472-3478, 2012.

ZITTEL, H. E.; MILLER, F. J. A glassy-carbon electrode for voltammetry, **Analytical Chemistry**, v. 37, p. 200-203, 1965.