

Caio Raphael Vanoni Forcinitti

**PLATAFORMA ELETROQUÍMICA COM NANOTUBOS DE
CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA
DETERMINAÇÃO DE MELATONINA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Cristiane Luisa
Jost

Florianópolis
2019

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

Vanoni Forcinitti, Caio Raphael

Plataforma eletroquímica com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro para determinação de melatonina / Caio Raphael Vanoni Forcinitti ; orientadora, Cristiane Luisa Jost, 2019.

104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

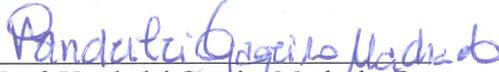
1. Química. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Nanotubos de carbono. 4. Plataforma eletroquímica. 5. Melatonina. I. Jost, Cristiane Luisa . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Caio Raphael Vanoni-Forcinitti

**PLATAFORMA ELETROQUÍMICA COM NANOTUBOS DE
CARBONO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA
DETERMINAÇÃO DE MELATONINA**

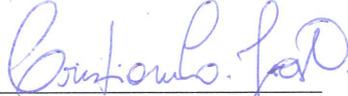
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2019.


Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.

Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof.^a Cristiane Luisa Jost, Dr.^a

Orientadora

DQ/UFSC - Florianópolis



Prof.^a Daniela Brondani, Dr.^a

DQ/UFSC - Blumenau



Prof. Luciano Vitali, Dr.

DQ/UFSC – Florianópolis

Com zelo e amor dedico esta dissertação à minha querida mãe por todo o seu apoio, respeito e luta conjuntos. Às minhas três filhas felinas que me alegram diariamente. Aos meus amigos e amigas e à minha orientadora, a qual demonstrou extrema pareceria e carinho, além da confiança na qualidade do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha mãe Célia por ser a melhor pessoa, uma mãe que nunca se ausentou e que constantemente demonstrou total parceria e amor. Obrigado por zelar-me e acreditar na minha humanidade e capacidade profissional; meu amor por si é pleno e inquestionável.

Às minhas três pequenas: Marcella, Consuello e Vitória. Criaturinhas felinas que me ensinaram ainda mais a amar e que trouxeram em suas histórias a superação aos maus-tratos; obrigado por me alegrarem ao chegar em casa.

Aos meus amigos e amigas de Florianópolis e de São Paulo, os/as quais me deram forças durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora professora Cristiane Jost. Um imenso agradecimento por ter sido professora, orientadora e amiga; obrigado pelo carinho, credibilidade e por ter me estendido as mãos (literalmente) durante os meus momentos de dificuldade. À professora Daniela Mezalira por ter me auxiliado na caracterização de alguns dos materiais utilizados neste trabalho.

À minha grande família científica do GEPEEA: Cris, Edson, Fran, Gabriela, Giles, João, Marília, Paola, Ray e Ricardo. Obrigado pela parceria diária, ajudas e pelo compartilhamento de nossas vitórias e sofrimentos. Em especial a Ray e a Marília por podermos ser tão profundos; obrigado pelo aconchego e amor.

Aos outros colegas e professores e às nossas parcerias atuais e futuras; grato por me mostrarem corriqueiramente que a ciência é muito melhor quando feita em conjunto.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”
(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Este trabalho reporta a preparação, caracterização e aplicação de uma nova plataforma eletroquímica modificada com filme de nanopartículas de ouro (AuNps) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados (f-MWCNTs) para a determinação de melatonina (MEL) em amostras de fluidos biológicos sintéticos. As nanopartículas de ouro foram sintetizadas e estabilizadas pelo cloreto de 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano ($\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$) e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espectroscopia UV-vis, espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta, mostrando uma estabilização eletroestérea e um material com carga superficial positiva. Para f-MWCNTs dispersos em Nafion[®] 117 conduziram-se testes de TEM e potencial zeta, apresentando um material com carga superficial negativa. A mistura das AuNps com os f-MWCNTs mostrou-se por TEM uma estrutura integrada e dispersa. A partir de estudos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica foi escolhida a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ por apresentar um perfil eletrocatalítico e aumento de corrente em 7,5 vezes quando comparado ao carbono vítreo não modificado. A reação da MEL sobre GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ mostrou-se irreversível, controlada por difusão e com participação de dois mols de elétrons e um mol de prótons. O melhor sinal de corrente foi otimizado para solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) e o modo de varredura escolhido foi o de onda quadrada (SWV) devido à sua maior sensibilidade frente ao analito. Os parâmetros e valores otimizados foram frequência = 50 Hz, incremento de potencial = 5 mV e amplitude de pulso = 70 mV. Os voltamogramas com um sinal em ca. +0,640 V foram obtidos com adições sucessivas de MEL e a intensidade de corrente de pico variou linearmente na faixa de concentração de 4,9 a 55,5 μmol L⁻¹ ($R^2 = 0,9936$), obtendo-se os valores de LoD = 1,6 μmol L⁻¹ e LoQ = 4,7 μmol L⁻¹. A avaliação do método eletroanalítico proposto permitiu a utilização da nova plataforma eletroquímica para determinação de MEL em amostras simuladas de saliva, soro sanguíneo e urina. Os ensaios de recuperação mostraram valores no intervalo de 80 a 110%, corroborando com a técnica comparativa de UV-vis. Com testes estatísticos a um nível de confiança de 95% concluiu-se que não houve diferenças expressivas de precisão e exatidão entre o método voltamétrico e o espectrométrico.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro. Silsesquioxano. Nanotubos de carbono. Plataforma eletroquímica modificada. Melatonina.

ABSTRACT

This work reports the preparation, characterization and application of a new electrochemical platform modified with gold nanoparticles (AuNps) and functionalized multi-walled carbon nanotubes (f-MWCNTs) film for the determination of melatonin (MEL) in synthetic biological fluids. The AuNps were synthesized and stabilized by 3-*n*-propyl-(4-methylpyridinium)silsesquioxane chloride (Si4Pic⁺Cl⁻) and characterized by transmission electron microscopy (TEM), UV-vis spectroscopy, dynamic light scattering and zeta potential, showing an electrostatic stabilization and a material with a positive surface charge. For the f-MWCNTs dispersed in Nafion[®] 117, tests were conducted by TEM and zeta potential, presenting a negatively charged material. The mixture of the AuNps with the f-MWCNTs was shown by TEM to be an integrated and dispersed structure. From the studies carried by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry, the GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ platform was chosen because it presents an electrocatalytic profile and a current increasing of 7.5 times when compared to unmodified vitreous carbon. The MEL reaction on GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ was shown to be irreversible, diffusional controlled and with participation of two mols of electrons and one mole of protons. The best current signal was optimized for 0.2 mol L⁻¹ PBS buffer solution (pH 2) and the chosen voltammetric operation mode was square wave (SWV) due to its greater sensitivity. The optimized parameters and values were frequency = 50 Hz, potential step = 5 mV and pulse amplitude = 70 mV. The voltammograms with a signal in ca. +0.640 V were obtained with successive additions of MEL and the intensity of peak current varied linearly in the concentration range of 4.9 to 55.5 μmol L⁻¹ (R² = 0,9936), obtaining the values of LoD = 1.6 μmol L⁻¹ and LoQ = 4.7 μmol L⁻¹. The evaluation of the proposed electroanalytical method allowed the use of the new electrochemical platform for determination of MEL in simulated samples of saliva, blood serum and urine. The recovery tests showed values in the range of 80 to 110%, corroborating with the comparative technique of UV-vis. With statistical tests at a 95% confidence level, it was concluded that there were no significant differences between the voltammetric and the spectrometric method.

Keywords: Gold nanoparticles. Silsesquioxane. Carbon nanotubes. Modified electrochemical platform. Melatonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota da síntese bioquímica da melatonina.....	23
Figura 2. Representação esquemática da modificação da superfície de um GCE pelo procedimento <i>drop coating</i>	31
Figura 3. Representação esquemática da modificação da superfície de um GCE pelo procedimento <i>layer-by-layer</i>	31
Figura 4. Representação dos tipos de estabilização de nanopartículas. Estabilização (a) estérea e (b) eletrostática.....	35
Figura 5. Representação do tipo de estabilização eletroestérea.....	36
Figura 6. Representação de algumas estruturas de silsesquioxanos.....	38
Figura 7. Representação da estrutura molecular do híbrido silsesquioxano organofuncionalizado com 4-metilpiridina.....	39
Figura 8. Representação das estruturas nanométricas de carbono.....	40
Figura 9. Imagens da (a) solução de HAuCl_4 e (b) dispersão das $\text{AuNps-Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$	53
Figura 10. Espectros de UV-vis das $\text{AuNps-Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$ na síntese (—) e após 15 dias (—), 30 dias (—), 45 dias (—), 60 dias (—), 75 dias (—) e 90 dias (—).....	54
Figura 11. (a) Distribuição de tamanho e (b) curva de correlação com ajuste exponencial de segunda ordem para a dispersão de AuNps estabilizadas em $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$	55
Figura 12. (a) Imagem obtida por TEM e (b) distribuição do tamanho das AuNps estabilizadas em $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$	56
Figura 13. Padrões SAED para as AuNps estabilizadas em $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$	57
Figura 14. Imagens obtidas por TEM dos (a) MWCNTs e (b) f-MWCNTs.....	58
Figura 15. Imagem obtida por TEM da dispersão integrada de f-MWCNTs- $\text{AuNps-Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$	59
Figura 16. Imagens obtidas por SEM-FEG para (a) GCE, (b) GCE/ $\text{AuNps-Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$, (c) GCE/f-MWCNTs e (d) GCE/f-MWCNTs- $\text{AuNps-Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$	60
Figura 17. Diagramas de Nyquist obtidos por EIS para as plataformas eletroquímicas.....	62
Figura 18. Circuito equivalente de Randles para as plataformas eletroquímicas.....	62
Figura 19. Voltamogramas cíclicos para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) para as plataformas GCE (—), GCE/ $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$ (—), GCE/ $\text{AuNps-Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$ (—), GCE/f-MWCNTs	

(—), Branco (----) e modificada GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ (—), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 63

Figura 20. Voltamogramas obtidos por DPV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ nos valores de pH (a) 2 a 5 e (b) 6 a 10; $a = 50 \text{ mV}$, $t_p = 5 \text{ ms}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Em (c) a correlação da variação entre o pH e (i_p ; E_p) para o 1º sinal de oxidação da MEL ($n = 3$). 65

Figura 21. (a) Voltamogramas obtidos por DPV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções tampão PBS, B-R e CBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) cada, utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $t_p = 5 \text{ ms}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Valores de (b) i_p e (c) E_p para cada tipo de solução tampão ($n = 3$). 67

Figura 22. (a) Voltamogramas obtidos por DPV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em soluções tampão PBS $0,1$ a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $t_p = 5 \text{ ms}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Valores de (b) i_p e (c) E_p para cada concentração ($n = 3$). 68

Figura 23. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e f entre 5 e 50 Hz. (a) 25, (b) 50, (c) 75, (d) 100, (e) 125, (f) 150, (g) 175, (h) 200, (i) 225 e (j) 250 mV s^{-1} . (b) i_p vs. $v^{1/2}$, (c) $\log i_p$ vs. $\log v$ e (d) i_p vs. v 70

Figura 24. Gráfico dos valores de E_p vs. $\log v$ obtidos a partir do estudo de velocidade de varredura..... 71

Figura 25. Mecanismo proposto para a oxidação da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. 72

Figura 26. Voltamogramas obtidos por DPV, SWV e LSV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 73

Figura 27. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e f entre 10 e 80 Hz. (b) Gráfico de i_p vs. f ($n = 3$). 74

Figura 28. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$ e ΔE_s variando entre 1 e 10 mV. (b) Gráfico de i_p vs. ΔE_s ($n = 3$). 74

Figura 29. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a

plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e a variando entre 10 e 90 mV. (b) Gráfico de i_p vs. a ($n = 3$). 75

Figura 30. (a) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de MEL em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. [MEL]: (a) branco; (b) 4,9; (c) 9,7; (d) 14,5; (e) 19,2; (f) 23,9; (g) 28,5; (h) 33,1; (i) 37,7; (j) 42,2; (k) 46,7; (l) 51,0 e (m) 55,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 70 \text{ mV}$. (b) Curva de calibração externa para MEL ($n = 4$). 77

Figura 31. (a) Voltamogramas de onda quadrada para (a) branco; (b) amostra; (c-g) adições sucessivas de 50 μL de solução padrão MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 70 \text{ mV}$. (b) Curva de (a) adição de padrão e (b) calibração externa para saliva ($n = 4$). 80

Figura 32. (a) Voltamogramas de onda quadrada para amostra de (I) soro sanguíneo e (II) urina; (a) branco; (b) amostra; (c-f) adições sucessivas de 50 μL de solução padrão MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 70 \text{ mV}$. (b) Curva por adição de padrão para (I) soro sanguíneo e (II) urina, ($n = 4$). 81

Figura 33. (a) Espectros obtidos para as amostras de (I) saliva, (II) soro sanguíneo e (III) urina; (a) branco; (b) amostra; (c-f) adições sucessivas de 20 μL de solução padrão MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2). (b) Curvas de calibração por dição de padrão para (I) saliva, (II) soro sanguíneo e (III) urina; ($n = 4$). 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Especificações dos reagentes empregados.	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos de R_{ct} para as plataformas eletroquímicas. .	62
Tabela 2. Otimização dos parâmetros de SWV para determinação de melatonina.	76
Tabela 3. Parâmetros e valores para MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	79
Tabela 4. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo MEL.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a - Amplitude de pulso

AuNps - (do inglês *gold nanoparticles*) - Nanopartículas de ouro

AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ - Nanopartículas de ouro estabilizadas em cloreto de 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano

B-R - (do inglês *Britton-Robinson buffer solution*) - Solução tampão Britton-Robinson

CBS - (do inglês *chloroacetate buffer solution*) - Solução tampão cloroacetato

CE - (do inglês *capillary electrophoresis*) - Eletroforese capilar

CMEs - (do inglês *chemically modified electrodes*) - Eletrodos quimicamente modificados

CPE - (do inglês *carbono paste electrode*) - Eletrodo de pasta de carbono

CV - (do inglês *cyclic voltammetry*) - Voltametria cíclica

DC - (do inglês *drop coating*) - Revestimento com gota

DLS - (do inglês *dynamic light scattering*) - Espalhamento de luz dinâmico

DPV - (do inglês *differential pulse voltammetry*) - Voltametria de pulso diferencial

EIS - (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) - Espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA - (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) - Ensaio de imunoabsorção enzimática

E_p - Potencial de pico

f-MWCNTs - (do inglês *functionalized multi-walled carbon nanotubes*) - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados

GCE - (do inglês *glassy carbon electrode*) - Eletrodo de carbono vítreo

GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ - Eletrodo de carbono vítreo modificado com AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻

GCE/f-MWCNTs - Eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs

GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ - Eletrodo de carbono vítreo modificado com f-MWCNTs e AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻

GCE/Si4Pic⁺Cl⁻ - Eletrodo de carbono vítreo modificado com Si4Pic⁺Cl⁻

HPLC-MS - (do inglês *high-performance liquid chromatography - mass spectrometry*) - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

HPLC-MS/MS - (do inglês *high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem

i_p - Corrente de pico

LC-MS/MS - (do inglês *liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

LoD - (do inglês *limit of detection*) - Limite de detecção

LoQ - (do inglês *limit of quantification*) - Limite de quantificação

LSV - (do inglês *linear scan voltammetry*) - Voltametria de varredura linear

MEL - Melatonina

MEPS-HPLC - (do inglês *high-performance liquid chromatography with sample preparation by microextraction by packed sorbent*) - Cromatografia líquida de alta eficiência com preparo de amostra via microextração por sorvente empacotado

MWCNTs - (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*) - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

PBS - (do inglês *phosphate buffer solution*) - Solução tampão fosfato

Potencial ζ - Potencial zeta

RIA - (do inglês *radioimmunoassay*) - Radioimunoensaio

SAED - (do inglês *selected area electron diffraction*) - Difração de elétrons de área selecionada

SCE - (do inglês *saturated calomel electrode*) - Eletrodo de calomelano saturado

SEM-FEG - (do inglês *field emission gun scanning electron microscopy*) - Microscopia eletrônica de varredura com canhão emissor de campo

Si4Pic⁺Cl⁻ - Cloreto de 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano

SWCNTs - (do inglês *single-walled carbon nanotubes*) - Nanotubos de carbono de paredes simples

SWV - (do inglês *square wave voltammetry*) - Voltametria de onda quadrada

TEM - (do inglês *transmission electron microscopy*) - Microscopia eletrônica de transmissão

t_p - Tempo de pulso

ΔE_s - Incremento de potencial

v - Velocidade de varredura

f - Frequência de pulso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	A IMPORTÂNCIA BIOQUÍMICA DA MELATONINA....	23
2.1.1	Os distúrbios do sono e a popularização da melatonina: do uso controlado ao risco da automedicação.....	24
2.2	AS TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DA MELATONINA	26
2.2.1	As técnicas eletroanalíticas	27
2.3	ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	29
2.3.1	Procedimentos utilizados na modificação de eletrodos	30
2.3.1.1	Eletrodo de carbono vítreo	31
2.4	MATERIAIS NANOESTRUTURADOS	32
2.4.1	As nanopartículas de ouro	32
2.4.1.1	Mecanismos de estabilização de nanopartículas	34
2.4.1.1.1	<i>Materiais híbridos.....</i>	<i>36</i>
2.4.2	Nanotubos de carbono	40
2.5	AuNps E MWCNTs COMO AGENTES MODIFICADORES EM SENSORES ELETROQUÍMICOS	41
2.6	DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE MELATONINA	42
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	47
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	47
4.1.1	Reagentes	47
4.1.2	Soluções	47
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	48
4.2.1	Medidas eletroquímicas	48

4.2.2	Medidas de DLS	49
4.2.3	Medidas de espectroscopia UV-vis	49
4.2.4	Medidas de microscopia eletrônica	49
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	50
4.3.1	Síntese das AuNps-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	50
4.3.2	Funcionalização dos MWCNTs	50
4.3.3	Preparação da dispersão dos f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	51
4.3.4	Construção do eletrodo modificado.....	51
4.3.5	Preparação e determinação de MEL em amostras	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	53
5.1.1	Nanopartículas de ouro	53
5.1.2	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	58
5.1.3	f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	58
5.1.4	Caracterização das plataformas eletroquímicas	59
5.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	61
5.2.1	Estudo impedimétrico das plataformas eletroquímicas ..	61
5.2.2	Comportamento eletroquímico da melatonina.....	63
5.2.2.1	Estudo de pH eletrólito de suporte	64
5.3	ESTUDOS ELETROANALÍTICOS	72
5.3.1	Seleção da técnica voltamétrica	72
5.3.1.1	Otimização dos parâmetros para SWV	73
5.4	AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO ELETROANALÍTICO.....	76
5.4.1	Construção da curva de calibração externa para a melatonina e estudos de precisão.....	76
5.4.2	Determinação de melatonina em fluidos humanos simulados	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87

REFERÊNCIAS	89
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios do sono são abordados na sociedade contemporânea como um problema de extrema relevância dada a produção profissional diária em velocidade e eficiência altas, o que corrobora para a diminuição do tempo e qualidade do repouso noturno, levando ao uso de substâncias estimulantes durante o dia e relaxantes à noite.

Um dos principais hormônios para a manutenção do sono é a melatonina (MEL), composto produzido majoritariamente na glândula pineal e que regula o ciclo circadiano. A melatonina é uma substância que também auxilia o sistema cardíaco e imunológico, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Entretanto, a sua presença em excesso no corpo humano pode estar relacionada com perda de consciência, depressão, nervosismo e aumento da pressão arterial, por exemplo. Sendo assim, para um tratamento coerente e sem riscos, a sua quantificação no organismo torna-se necessária.

Frente às técnicas eletroanalíticas, as quais podem ser aplicadas para a determinação da melatonina, a voltametria é uma alternativa que viabiliza a realização de medidas diretamente nas amostras, além de ser de baixo custo em relação à instrumentação requerida, de simples operacionalidade e, muitas vezes, portátil. Portanto, a junção de sensores eletroquímicos à voltametria abre novas possibilidades para a detecção de inúmeros compostos e contribui para o processo analítico.

Em relação aos sensores eletroquímicos, os eletrodos quimicamente modificados (CMEs, do inglês *chemically modified electrodes*) são compostos condutores que podem ser alterados com espécies químicas. O eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*) é versátil e facilmente modificado de maneira superficial com materiais formadores de filme, tornando a reposição deste simples, rápida e garantindo alta repetibilidade e reprodutibilidade durante as análises. Portanto, torna-se possível a construção de dispositivos eletroquímicos mais sensíveis e seletivos para a detecção de substâncias de interesse.

Materiais nanoestruturados, tais como as nanopartículas de ouro (AuNps, do inglês *gold nanoparticles*), são amplamente aplicados na modificação de eletrodos, já que sua presença em quantidades apropriadas colabora com a transferência de elétrons entre analito e eletrodo. Para garantir estabilidade às AuNps, materiais híbridos orgânico-inorgânicos são utilizados como estabilizantes. Dentre eles, os silsesquioxanos apresentam propriedades diferenciadas e asseguram boa estabilidade às nanopartículas. Por consequência, uma melhora do sinal

analítico, tanto em intensidade de corrente quanto em termos eletrocatalíticos, pode ser alcançada.

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados (f-MWCNTs, do inglês *functionalized multi-walled carbon nanotubes*) com ácido nítrico, também são estruturas em escala nanométrica que, quando depositadas sobre substratos sólidos condutores, garantem um aumento significativo na transferência de carga e uma diminuição no perfil impedimétrico. Assim sendo, a sua aplicação na eletroquímica vem se ampliando, pois é um material versátil e que possui boa estabilidade química, o que o torna atrativo para uso em CMEs.

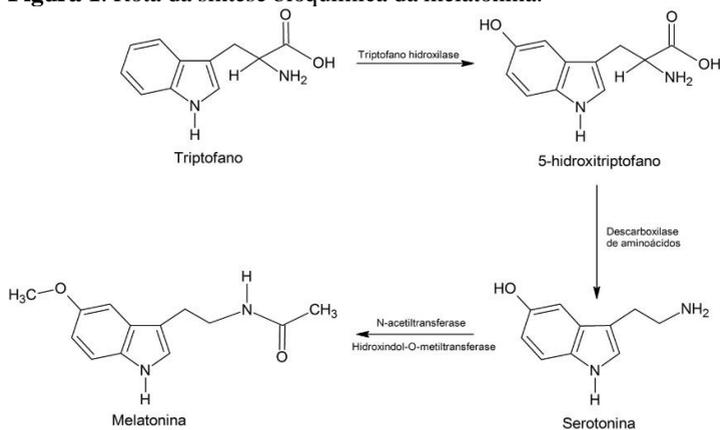
Logo, este trabalho visou a preparação e aplicação de uma nova plataforma eletroquímica modificada em uma única etapa com f-MWCNTs e AuNps. Buscou-se caracterizar o eletrodo e estudar a resposta eletroquímica da MEL frente a ele. Por fim, com a otimização das características desejadas, validar o método analítico e aplicá-lo em amostras biológicas sintéticas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA BIOQUÍMICA DA MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio derivado da serotonina e secretado pela glândula pineal em situação de escuridão, com sua concentração tendendo ao mínimo durante o dia [1]. Adicionalmente, a melatonina pode ser encontrada em alimentos como mostarda, erva-doce e em leite, porém em baixas quantidades. Desta maneira, é comumente sintetizada por meio da sua rota sintética no corpo humano (Figura 1) partindo do aminoácido triptofano (presente em carnes, derivados de leite, ovos e oleaginosas) e passando por quatro transformações enzimáticas até sua formação final em melatonina [2].

Figura 1. Rota da síntese bioquímica da melatonina.



Fonte. Adaptado de Majidinia et al., 2018 [2].

O isolamento e estudo da melatonina foi publicado pela primeira vez em 1958 com a evidência de sua manifestação em meios escuros e presença ou ausência em inúmeros órgãos e tecidos do corpo de cobaias [3]. Desde então, outros grupos de pesquisa deram continuidade a trabalhos de estudo, demonstrando a importância bioquímica da melatonina não só como uma substância reguladora do sono [4], mas também o seu papel mediador em funções fisiológicas do corpo humano, tais como o desenvolvimento e regulação da atividade

reprodutiva sazonal [5], redução da pressão sanguínea [6], ação antioxidante e anti-inflamatória [7,8], relação com distúrbios psiquiátricos e neurológicos [9] e associação com doenças ligadas à depressão, já que a baixa concentração de serotonina causa uma consequente diminuição de melatonina conforme sua rota de síntese bioquímica [10].

De forma complementar, pesquisas científicas vinculadas ao estudo de doenças patológicas e médicas em geral retratam o uso da melatonina como agente oncostático de prevenção e tratamento dos cânceres de mama e próstata [11,12], para doença de Alzheimer, neurointoxicação induzida pela presença de glutamato [13] e ainda para terapia causada por disritmia circadiana [14].

2.1.1 Os distúrbios do sono e a popularização da melatonina: do uso controlado ao risco da automedicação

Com o aumento das pressões sociais relacionadas à produção excessiva, o número de profissionais portadores de algum tipo de oscilação no ciclo circadiano tem crescido significativamente nos últimos tempos [15]. Em países desenvolvidos, 20% da força de trabalho é pautada em turnos e um terço dela atua durante a noite e a madrugada; já nos países em desenvolvimento tal fração pode chegar a ser até maior [16,17].

De maneira generalizada, empregados que exercem ou estendem seus horários de trabalho são passíveis de problemas relacionados à privação do sono, assim como fadiga, queda na capacidade cognitiva, aumento de acidentes e erros humanos [18], faltas no trabalho, diminuição da produtividade e, inclusive, dificuldades nos relacionamentos profissionais e pessoais [19].

Outro público bastante numeroso e que vem a apresentar problemas de sono é o grupo das crianças. Pesquisas mostraram no decorrer dos anos que o total de crianças atendidas por pediatras e que possuem dificuldades para dormir pode chegar até 40% dessa população [20]. Por consequência, elas progridem para implicações fisiológicas e psicológicas, como queda nas suas atividades escolares [21], problemas de relacionamento [22], problemas de cognição e comportamentais [23] e desarranjo emocional [24].

Devido aos transtornos oriundos da escassez do sono, a melatonina começou a tornar-se popular. Alguns países do mundo, tais como Estados Unidos e Canadá, a comercializam deliberadamente e sem prescrição médica, sendo possível encontrá-la em formas farmacêuticas

de cápsulas e tabletes nas redes de lojas de suplementos e até mesmo em supermercados [25]. Já no continente europeu, a lei de regulação (178/2002) [26] e a Diretiva (2002/46) [27] garantem a venda da melatonina e a englobam não como medicamento, mas sim como suplemento alimentar, inclusive recomendando doses diárias de 0,5 mg para problemas com fadiga após viagem e 1,0 mg recomendado para complicações persistentes de sono [28]. Desta forma, o seu consumo tem se tornado elevado e facilitado, contando com uma exposição midiática comercial vinculada a um produto natural que não causa riscos e também aos seus preços relativamente baixos.

Por um outro lado, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atualizou em dezembro de 2018 em seu *site* informações relativas à melatonina. Segundo o órgão, a melatonina não pode ser livremente comercializada no país. Entretanto, a lei garante que pacientes que possuam receituário podem importa-la via internet ou mesmo trazê-la do exterior em sua bagagem de mão. A partir de uma decisão judicial de 2017, a ANVISA permitiu que farmácias de manipulação iniciassem a venda do remédio manipulado seguindo a diretiva RDC 67/2007, sendo que a única empresa até agora que pode importar a melatonina e distribuí-la para tais farmácias é a Active Pharmaceutica Ltda ME, que é a autora e favorecida pela decisão [29]. Por fim, vale salientar que a única maneira de se obter a melatonina em território nacional é por meio da prescrição feita por um profissional médico legalmente habilitado.

Alguns poucos estudos têm reportado os pontos negativos da automedicação da melatonina exógena, inclusive a longo prazo. Ainda assim, é considerável os riscos de sua posologia acima dos níveis recomendados, visto que se trata de um hormônio que interfere em vários órgãos e ciclos biológicos do corpo humano. Pesquisadores identificaram que a melatonina administrada em excesso pode causar desconfortos físicos como dores-de-cabeça e diarreia [30], porém pode evoluir para complicações mais graves, inclusive se não fornecida nos horários corretos do dia. Isto pôde ser acompanhado no trabalho que observou o desenvolvimento de tumores quando em contato com a melatonina; no período matutino estes sofriam crescimento, a mesma dose fornecida à tarde nada causava aos abcessos; todavia, à noite, retardava os seus aumentos [31]. Estudos com animais sugeriram que a melatonina em doses extremamente altas causou hipogonadismo masculino e atraso na puberdade, mas em doses reguladas e baixas não alteraram níveis de testosterona no sangue [32].

Pesquisas adicionais evidenciaram que a melatonina reduz a mobilidade do esperma [33] e, quando em concentrações elevadas, aumenta a citotoxicidade em tratamentos radioterápicos e quimioterápicos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço [34] e eleva a concentração intracelular de íons Ca^{2+} ocasionando dano à mitocôndria [35].

Portanto, surge uma necessidade de monitorar o nível de melatonina no corpo humano para que haja um controle de sua concentração e um tratamento médico efetivo e seguro, resguardando a saúde de quem procura um recurso terapêutico pautado no uso de tal hormônio.

2.2 AS TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DA MELATONINA

A literatura científica revela técnicas e métodos variados para a determinação da melatonina em amostras com diferentes graus de complexidade. Dentre elas, podem ser destacadas a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS, do inglês *high-performance liquid chromatography - mass spectrometry*) [36], cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS, do inglês *high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) [37], cromatografia líquida de alta eficiência com preparo de amostra via microextração por sorvente empacotado (MEPS-HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography with sample preparation by microextraction by packed sorbent*) [38], cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) [39], eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) [40], ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) [41] e radioensaio (RIA, do inglês *radioimmunoassay*) [42]. Entretanto, as técnicas supracitadas requerem desde alto grau de formação técnica para operação dos equipamentos até elevado custo em termos de maquinário, manutenção e de insumos químicos.

Conforme trabalho de Ghareghani *et al.* [36], a técnica de HPLC foi aplicada para a determinação de melatonina em soro sanguíneo de cobaias expostas à administração de melatonina em fase aguda da doença de esclerose múltipla, tendo como faixa de quantificação do analito $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados mostraram-se adequados aos objetivos do trabalho; contudo, os pesquisadores

relataram que fora necessário um estudo prévio de cálculos cromatográficos para o aumento da performance da separação e quantificação. Ademais, ocorreu a utilização de metanol na mistura da fase móvel, resultando em um resíduo tóxico após a análise.

Há inúmeros protocolos e procedimentos padrão na literatura científica sobre quantificação da melatonina em fluidos corporais, sendo ELISA e RIA amplamente utilizados, inclusive por serem vendidos em forma de *kit* [43]. A alta sensibilidade de tais técnicas é um atrativo. No entanto, elevado custo, separação prévia e risco de reatividade cruzada podem ocorrer de acordo com evidências de trabalhos antecessores [44][45]. Um exemplo atual é exposto por Bagci *et al.* [41], estes que quantificaram melatonina em fluido amniótico durante a gravidez de cobaias utilizando-se de dois *kits* de ELISA, um direto e outro indireto. Experimentos conduzidos sem prévia extração da melatonina, o qual é mais simples, mostraram-se inválidos quando comparados com o indireto, particularmente no final da gestação. Ademais, os estudos com prévia extração necessitaram de metanol, passagem por uma coluna de fase reversa, reconstituição do extrato e seu recobrimento com o anticorpo, tornando o procedimento demorado e complexo.

Desta maneira, são apresentadas como uma alternativa de alto potencial as técnicas eletroanalíticas, já que podem fornecer valores de limite de detecção e de quantificação (LoQ, do inglês *limit of quantification*) satisfatórios a partir do emprego de eletrodos quimicamente modificados (CMÉs, do inglês *chemically modified electrodes*) e com fortificação e/ou acúmulo da amostra, caso necessário.

2.2.1 As técnicas eletroanalíticas

A repercussão do emprego das técnicas eletroanalíticas têm causado com o passar dos anos aumento do interesse em estudar e aprimorar seus procedimentos operacionais. A maior parte das técnicas são baseadas na aplicação de um potencial sobre um eletrodo e à sua adjacente camada de solução (interface eletrodo-solução), medindo como resposta a corrente gerada a partir de uma reação de oxirredução de um composto eletroquimicamente ativo [46,47].

Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltamétrica tem se tornado largamente utilizada e discutida na comunidade científica. O princípio da voltametria dá-se na aplicação crescente de um potencial por um determinado tempo sobre a superfície de um eletrodo, obtendo-se uma

resposta analítica em forma de corrente que é proporcional à concentração do analito em solução [48].

Mediante aos modos de varredura na voltametria, três deles merecem destaque. A voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*) é a mais comum para estudos iniciais e consiste na aplicação de uma rampa de potencial sobre um eletrodo. A partir dela é possível analisar qualitativamente os sinais de oxirredução (correntes de pico e potenciais formais), reversibilidade da reação e perfil electrocatalítico [49,50]. Já a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) e a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *square wave voltammetry*) são modos de varredura mais sensíveis e que trabalham com o aumento progressivo de pulsos de potencial; o sinal gerado é proporcional à concentração do analito em solução [51,52].

A célula eletrolítica é composta por um conjunto de três eletrodos, sendo eles o de referência, contra eletrodo e de trabalho. Os eletrodos de referência mais usados podem ser o de calomelano saturado (SCE, do inglês *saturated calomel electrode*) ou de prata/cloreto de prata ($\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{KCl}_{(\text{sat})}$) e sua função é de fornecer um potencial elétrico conhecido sem sofrer polarização. Já o contra eletrodo precisa ser constituído por um material bastante condutor e serve para manter o balanço de cargas elétricas no sistema, além de fechar o circuito iônico junto ao eletrodo de trabalho. Por fim, o eletrodo de trabalho é onde transcorre a reação e é feito de materiais também condutores, sendo os carbonáceos os mais comuns [53].

Ao meio é adicionada uma solução denominada de eletrólito de suporte, a qual é, pelo menos, cem vezes mais concentrada do que a concentração do analito presente. O soluto que constitui o eletrólito de suporte precisa, obrigatoriamente, ter alta solubilidade, alto grau de dissociação e ser estável química e eletroquimicamente no solvente e na janela de potencial empregada. As funções mais importantes do eletrólito de suporte são reduzir a resistência do meio, eliminar o transporte de massa por migração, estabilizar a viscosidade da solução, aumentar a condutividade e, inclusive, poder ser usado como uma solução tampão [54].

Com o objetivo principal de quantificar de maneira rápida e seletiva espécies químicas de interesse, torna-se possível na voltametria a modificação de eletrodos de trabalho, o que une a versatilidade da técnica aos mais variados interesses analíticos.

2.3 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

O termo eletrodo quimicamente modificado foi introduzido em 1975 por um grupo de pesquisadores que modificaram covalentemente superfícies de eletrodos de óxido de estanho com ligantes do tipo amina, piridina e etilenodiamina com o objetivo de compreender e controlar o equilíbrio heterogêneo físico-químico da interface eletrodo/solução [55]. No ano de 1997 a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) publicou um documento de recomendação para a terminologia e definição de CMEs, sendo estes dispositivos compostos por um material condutor ou semicondutor recobertos com um componente químico seletivo monomolecular, multimolecular, iônico ou filme polimérico, e que, em relação à transferência de carga e ao potencial de superfície apresentem propriedades químicas, eletroquímicas e/ou ópticas diferentes [56]. Sendo assim, a modificação de um eletrodo não pode ser feita de maneira aleatória, já que para que seja satisfatória deve ocorrer um aumento da sensibilidade e seletividade na detecção de um analito e o agente modificador deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e adequadas ao procedimento, tais como confiabilidade, estabilidade e alta performance.

A exemplificar, de acordo com a pesquisa de Manikandan et al. [57], eletrodos quimicamente modificados foram desenvolvidos para a determinação simultânea dos hormônios melatonina e dopamina e do acetaminofeno, fármaco utilizado no tratamento de dores corporais. Os pesquisadores modificaram a superfície de eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*) com nanopartículas de Fe_2O_3 , Fe_2O_3 dopadas com platina, Fe_2O_3 decoradas superficialmente com platina e Fe_2O_3 dopadas e decoradas com platina. Os resultados obtidos foram satisfatórios em termos de linearidade e sensibilidade da detecção dos três analitos em questão, mostrando um aumento de dez vezes o sinal analítico para o eletrodo modificado com Fe_2O_3 dopado e decorado com platina em relação ao somente modificado com nanopartículas de Fe_2O_3 . Sendo assim, a dopagem e decoração com nanopartículas de platina propiciaram uma faixa de trabalho entre 10^{-6} mol L^{-6} e $1,4 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} e o valor de LoD de 10^{-10} mol L^{-1} , confirmando que a presença das nanopartículas aumentou a sensibilidade do método.

Outro trabalho relacionado aos CMEs foi de Cincotto et al. [58], os quais modificaram um eletrodo magnético com nanopartículas de óxido de ferro decoradas com pontos quânticos de carbono para a determinação simultânea de substâncias relacionadas à oscilação de

humor, tais como amitriptilina, melatonina e triptofano, o que gerou limites de detecção de $5,9 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, $4,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ e $4,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, respectivamente. O material híbrido desenvolvido foi extremamente estável em solução e mostrou-se como potencial sensor para aplicação em amostras clínicas reais.

A possibilidade dos sensores quimicamente modificados também pode ser ampliada aos eletrodos de pasta de carbono para determinação de neurotransmissores. Devido à necessidade de se monitorar dopamina e melatonina no corpo humano para que haja um controle saudável de suas concentrações, cientistas desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono (CPE, do inglês *carbon paste electrode*) modificado com nanobastões de óxido de zinco e ácido 3-(4-amino-3-hidroxibifenil-4-il)acrílico para a detecção de dopamina, melatonina, cafeína e metionina. Inicialmente, foram feitos testes somente para a determinação de dopamina e concluíram que com o eletrodo modificado a oxidação da dopamina ocorria a um potencial 180 mV menos positivo do que daquele com o eletrodo sem modificação e com LoD de $5,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Subsequentemente, testes simultâneos foram realizados e possíveis devido aos diferentes picos de oxidação de cada analito (240, 680, 990 e 1380 mV; valores correspondentes à dopamina, melatonina, metionina e cafeína, respectivamente) [59].

2.3.1 Procedimentos utilizados na modificação de eletrodos

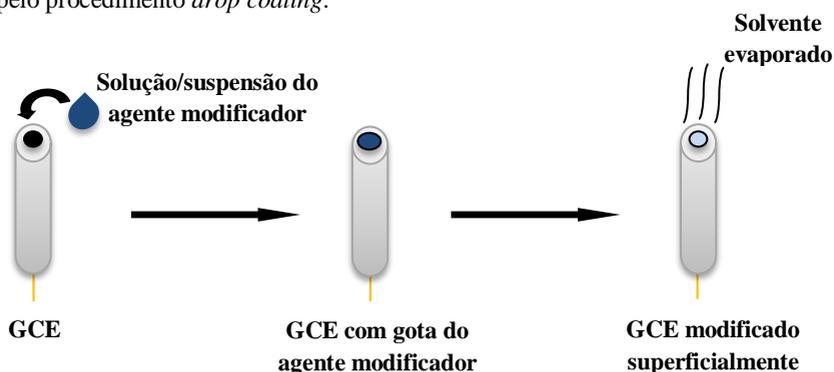
A partir da definição e critérios básicos para a produção de CMEs, é possível encontrar na literatura científica procedimentos conhecidos para a modificação de sensores eletroquímicos, desde protocolos extremamente simples e rápidos até procedimentos mais complexos. Com o passar dos anos, pôde-se acompanhar a evolução na modificação de eletrodos de pasta de carbono [60-63], porém os sensores do tipo GCE tornaram-se também atrativos e utilizados na eletroquímica.

Os eletrodos de carbono vítreo foram produzidos por Yamada e Sato em 1962, gerando um material cerâmico e isotrópico, o qual apresentou uma composição de mais de 99% de átomos de carbono, agregando ao material propriedades como elevada dureza e impermeabilidade a gases [64]. Ademais, é possível a sua produção em qualquer forma, tem boa estabilidade química e condutividade elétrica desejáveis [65] e é biocompatível [66], tornando-o um sensor eletroquímico de interesse.

2.3.1.1 Eletrodo de carbono vítreo

Dentre os mais variados procedimentos para a modificação dos dispositivos GCE, dois deles são simples e de grande espectro de utilização, tais como o método de revestimento com gota (DC, do inglês *drop coating*) e o camada por camada (LbL, do inglês *layer-by-layer*). O DC (Figura 2) consiste na deposição consecutiva de gotas de uma solução/suspensão contendo o agente modificador sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo com posterior evaporação do solvente [67].

Figura 2. Representação esquemática da modificação da superfície de um GCE pelo procedimento *drop coating*.



Fonte. O autor.

Já a modificação LbL (Figura 3) visa a produção de filmes poliméricos através da imersão do substrato em soluções que contenham compostos com carga oposta, como polímeros orgânicos ou materiais inorgânicos, gerando um sistema auto-organizado [68].

Figura 3. Representação esquemática da modificação da superfície de um GCE pelo procedimento *layer-by-layer*.



Fonte. O autor.

Entre os dois tipos de modificação acima apresentados, o do tipo *drop coating* consiste na opção mais fácil e rápida, visto que não é preciso imergir o GCE em uma solução, gasta-se um pequeno volume de agente modificador e não é necessário repetir o processo consecutivamente para a construção do sensor modificado. Portanto, protocolos que garantam facilidade na modificação e melhoria do transporte de cargas na superfície de CMEs, aliados a compostos que proporcionam tais características, despertam intenso interesse na eletroanalítica e estão em crescente estudo e aplicação para o desenvolvimento de novas plataformas eletroquímicas.

2.4 MATERIAIS NANOESTRUTURADOS

O estudo e utilização de materiais nanoestruturados está em constante ascensão nos setores da pesquisa e industrial. A aplicação de tais materiais tem ganhado destaque e projeção em função das novas características físico-químicas alcançadas pelo tamanho reduzido que é comumente definida entre 1 e 100 nanômetros [69].

A presença de estruturas nanométricas data de mais de 4500 anos, quando foram encontradas em cerâmicas nanofibras de amianto, assim como nanopartículas metálicas em corantes para cabelos e pigmentos sintéticos feitos de vidro e quartzo para funções decorativas descobertos no antigo Egito, Mesopotâmia e Grécia. O conhecimento e aperfeiçoamento da nanotecnologia aprimorou sua aplicação e, hoje em dia, ela é utilizada nas indústrias automotiva, cosmética, de alimentos, tecnológica, médica e de sensores [70,71].

Portanto, elaborar novos procedimentos de síntese mais simples, baratos, com baixa geração de resíduos e de amplo espectro de aplicação têm instigado pesquisadores nos últimos séculos. Um dos focos de tal trabalho continua sendo as nanopartículas metálicas e sua aplicação em diversos ramos da ciência e tecnologia.

2.4.1 As nanopartículas de ouro

A utilização de nanopartículas de ouro (AuNps, do inglês *gold nanoparticles*) parte de 400 a.C. quando eram aplicadas em vidro para colori-lo. Um dos exemplos de tal artefato apareceu com o cálice de Lycurgus, o qual apresentava a cor verde durante o dia e mudava para vermelha à noite ao ser iluminado de dentro pra fora. Esta sensação visual era gerada pelo espalhamento de luz das nanopartículas de ouro e

prata e pelo ângulo do observador, causando o efeito óptico na taça [69-72].

A síntese e explicações científicas sobre as propriedades físicas das nanopartículas foram reportadas em 1857, quando Michael Faraday preparou uma solução coloidal de ouro, revelando que as características ópticas de tal material deveriam ser entendidas diferentemente de uma solução de sal de ouro [73]. A partir de 1908, Mie explicou a razão que envolvia as cores específicas de variados colóides metálicos [69], porém foi somente com John Turkevich e com o uso do microscópio eletrônico que foi confirmado o tamanho médio das nanopartículas de ouro (10 nm), oriundas de uma solução avermelhada [74].

Com o conhecimento adquirido no decorrer dos tempos, hoje é sabido que a forma, tamanho e grande área superficial das nanopartículas atribuem-lhes uma região de alta reatividade e, por consequência, propriedades ópticas, físico-químicas e magnéticas diferenciadas [75]. A dimensão das AuNps é correlacionada à sua coloração e pode ser explicada quando o campo elétrico de um feixe de luz interage com os elétrons livres da superfície das nanopartículas, os quais entram em ressonância (oscilação) combinada na mesma frequência da luz incidente, gerando a banda plasmônica [76]. Devido ao tamanho de cada estrutura e a maneira como se encontram distribuídos os elétrons superficiais, a ressonância plasmônica de superfície varia; AuNps de 30 nm apresentam uma cor vermelha, já que há uma absorção de energia em 450 nm (porção azul-esverdeada do espectro) e refletância em 700 nm (porção avermelhada do espectro). Sendo assim, as AuNps começam a exibir uma coloração violeta conforme aumentam de tamanho, resultado da expansão de estados eletrônicos e diminuição da energia de transição entre as bandas plasmônicas [74-77].

O método de síntese das nanopartículas de ouro comumente conhecido foi estudado e elaborado por John Turkevich e colaboradores em 1951. O artigo de sua autoria descreveu a adição do íon citrato à solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), sendo aquele agente redutor e estabilizante da formação das AuNps com diâmetros de 20 nm [78]. Com o passar dos tempos, novas rotas sintéticas surgiram com o emprego de tantos outros agentes redutores/estabilizantes das AuNps, tais como o borohidreto de sódio, flavonóides, polissacarídeos e biopolímeros [79,80].

De acordo com revisão recente, aplicações de nanopartículas de ouro têm crescido desde 1996 até 2016, totalizando 61,15% somente na área eletroquímica [75]. Em termos eletroanalíticos, as AuNps mostram-

se multifuncionais ao serem imobilizadas em sensores eletroquímicos, podendo ser eletrodepositadas (a partir de uma solução áurica) ou pingadas via DC sobre eletrodos, melhorando significativamente a transferência eletrônica e, por consequência, a sensibilidade analítica [79]. Ademais, propriedades como rapidez, conveniência, fácil manuseio, monitoração *in situ* e baixo custo são atrativos [75].

Daizong e colaboradores [81] desenvolveram um sistema e um eletrodo impresso para determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico. Óxido de grafeno e AuNps (rGO/AuNPS) foram reduzidos sobre a plataforma eletroquímica e o sistema pôde ser operado a partir de um smartphone. Comparando-se o eletrodo não modificado com o rGO/AuNPS, o valor de corrente aumentou três vezes e os valores de LoD para ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico foram $1,04 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,29 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Outros exemplos da aplicação de nanopartículas de ouro sobre GCE para determinação do neurotransmissor serotonina são encontradas nos trabalhos de Wei et al. [82] e Xue et al. [83]. O primeiro trabalho retratou a modificação de um sensor com cisteína e AuNps, o qual exibiu uma resistência à transferência de carga muito menor do que o eletrodo sem modificação. Além disto, foi possível trabalhar numa faixa linear de concentração entre $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e com LoD de 20 nmol L^{-1} . Já Xue e colaboradores [83] construíram uma membrana de dupla camada baseada em um compósito de óxido de grafeno e polianilina embebidos nas AuNps. O novo sensor exibiu um LoD de $11,7 \text{ nmol L}^{-1}$ mesmo na presença de interferentes. Os dois trabalhos aqui citados submeteram os eletrodos modificados à quantificação de serotonina em soro sanguíneo humano, o que se mostrou satisfatório para os devidos fins analíticos.

Para garantir a boa atuação de nanopartículas tanto em sensores eletroquímicos quanto em quaisquer outros dispositivos, conhecimento de mecanismos de estabilização de nanoestruturas consiste em um pré-requisito para sua aplicação.

2.4.1.1 Mecanismos de estabilização de nanopartículas

O sistema nanométrico consiste em um meio termodinamicamente não favorável, já que as nanopartículas tendem a se aglomerar para diminuir a energia integral do conjunto. Ademais, fatores como gravidade, frequência de colisões e probabilidade de coesão são também relevantes [84]. Desta maneira, estudar mecanismos

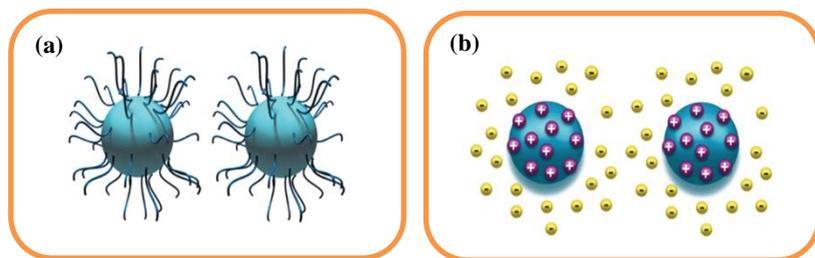
de estabilização vem a ser necessário para que sejam mantidas as propriedades inerentes ao sistema.

Existem dois mecanismos de estabilização de nanopartículas, sendo o terceiro a junção dos dois primeiros. A estabilização cinética é provida das forças gravitacionais e das características do meio, assim como viscosidade. Neste caso, para que o sistema seja estável a velocidade de precipitação das partículas precisa ser muito pequena, ao ponto de ser negligenciada. Para gerar tal estabilização, faz-se o uso do mecanismo conhecido como estabilização estérea, onde polímeros são adsorvidos superficialmente às nanopartículas, produzindo uma força de repulsão espacial adicional [85].

A estabilidade de agregação de sistemas nanométricos vincula-se à sua capacidade de preservar o seu grau de dispersidade. Para tal fim, é utilizado o mecanismo de estabilização eletrostática, onde à superfície das nanopartículas podem ser adsorvidos compostos iônicos. A camada formada consiste nos íons propriamente ditos e nos seus contra-íons, originando uma dupla camada elétrica que garante uma repulsão elétrica entre as nanopartículas e diminui o seu grau de agregação [85].

A Figura 4 representa, genericamente, os mecanismos de estabilização supracitados.

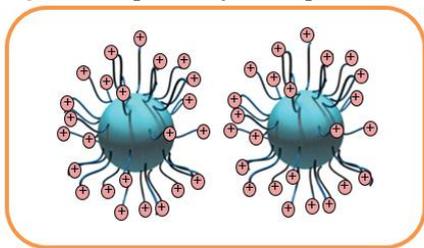
Figura 4. Representação dos tipos de estabilização de nanopartículas. Estabilização (a) estérea e (b) eletrostática.



Fonte. Adaptado de Kamatchi, R.; Venkatachalapathy, S., 2011 [84].

Por fim, tem-se a estabilização eletroestérea (Figura 5), onde moléculas carregadas são utilizadas. Um exemplo claro é o emprego de surfactantes iônicos, onde a sua parte lipofílica (cauda) garante a estabilidade estérea e a parte com carga (cabeça) a eletrostática [86].

Figura 5. Representação do tipo de estabilização eletroestérea.



Fonte. Adaptado de Kamatchi, R.; Venkatachalapathy, S., 2011 [84].

Ainda, é importante o estudo de materiais estabilizantes que garantam às nanopartículas a sua boa performance e funcionalidade nos sensores eletroquímicos. Sendo assim, amplia-se o espectro de possibilidades e o interesse do uso de novos reagentes durante a síntese de nanoestruturas.

2.4.1.1.1 *Materiais híbridos*

Materiais híbridos são descritos na literatura como estruturas nanométricas [87] abaixo ou à nível supramolecular [88] compostos por dois ou mais materiais que possuem propriedades químicas ou físicas distintas. Entretanto, quando juntos, sua complementariedade fornece características não encontradas em uma única substância, criando uma sinergia interfacial pautada na origem e na energia superficial de cada material [89].

Os híbridos orgânico-inorgânicos são estruturas que agregam em um único material as propriedades de espécies inorgânicas, tais como estabilidade mecânica e térmica e fornecimento de uma rede porosa acessível e interconectada para sensores ou catalisadores, contribuindo para propriedades magnéticas, eletrônicas e eletroquímicas. Já com o material orgânico é possível a modulação de propriedades que propiciem a formação de filmes e fibras, de poros e conectividade das redes cristalinas, além da mediação perante os caracteres hidrofóbicos e hidrofílicos do material. Ademais, as espécies orgânicas auxiliam nas características ópticas, eletrocatalíticas e bioquímicas e possuem alta resistência à tração [89,90].

Em relação aos materiais híbridos, a produção científica e de patentes desde 2005 até 2016 só tem crescido, partindo de um número absoluto em 2005 de publicações e patentes de 1000 e 200, respectivamente; já em 2016, o valor chegou a 1500 e 500 [89]. Alguns

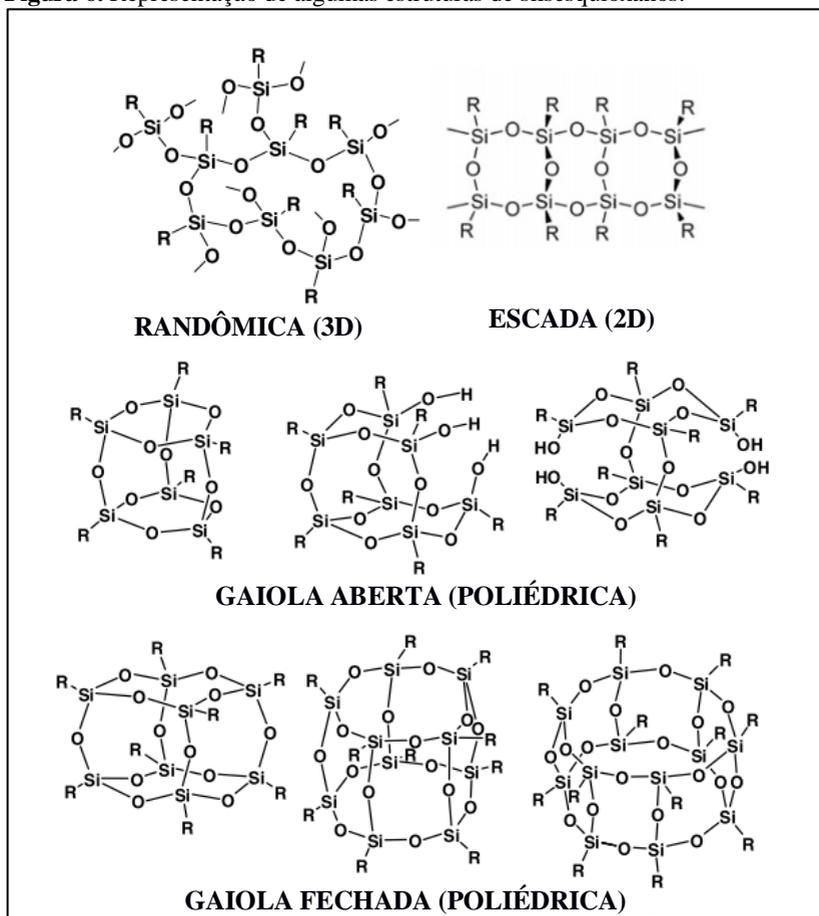
exemplos e potencialidades multifuncionais de tais estruturas são reportados em eletrônica [91] e em sensores eletroquímicos [92,93].

Sendo assim, a síntese de materiais híbridos pode envolver variados tipos de reagentes, ampla gama de processos e de aplicação, os quais são baseados no seu conjunto de qualidades como um produto inovador.

Materiais denominados silsesquioxanos têm recebido especial atenção devido à sua potencialidade, funcionalidade e emprego nos mais variados campos da tecnologia de ponta [94].

Silsesquioxanos são polímeros híbridos orgânico-inorgânicos caracterizados pela presença de estruturas híbridas de fórmula geral $(\text{RSiO}_{3/2})_n$ onde o termo R pode ser constituído de um átomo de hidrogênio ou de radicais alquil, aril, alquenil, alquinila ou derivados organo funcionalizados de quaisquer um desses radicais. Com a adição de grupos funcionais reativos que estejam colgados ao átomo de silício, ocorre a combinação e conseqüente formação de uma rede polimérica de ligações cruzadas, originando um material com estruturas distintas (Figura 6) [95].

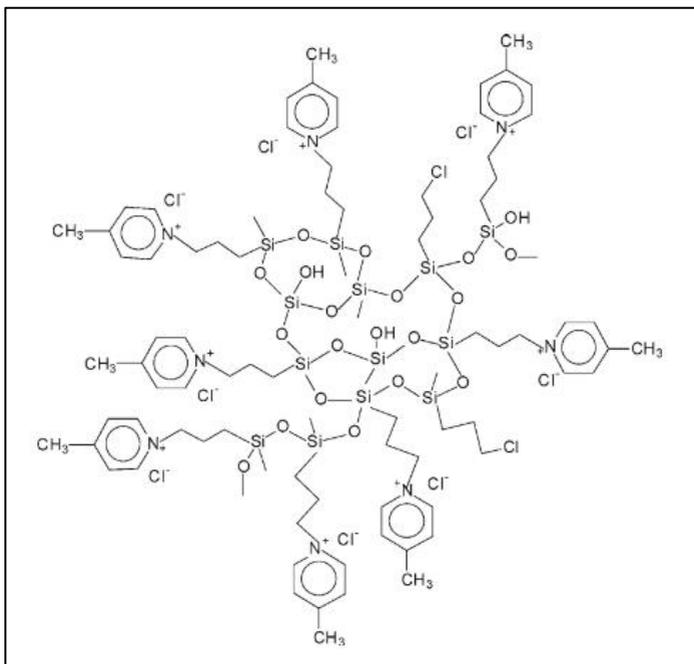
Normalmente, estes híbridos são sintetizados a partir do método sol-gel, o qual se baseia em reações de hidrólise e policondesação. Para a produção do xerogel, utilizam-se precursores alcoxissilanos (ex. ortossilicato de tetraalquila – TEOS) e, para a modificação, compostos funcionalizados que, por fim, dão origem aos silsesquioxanos [97].

Figura 6. Representação de algumas estruturas de silsesquioxanos.

Fonte. Adaptado de Kawakami, Y., 2007 [96].

Alguns trabalhos científicos retratam os silsesquioxanos solúveis (ex. do cloreto de 3-*n*-propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano, abreviado como Si4Pic⁺Cl⁻) – Figura 7, em meio aquoso como estabilizantes de nanopartículas, já que sua estrutura pode lhes garantir uma estabilização eletroestérea [99]. Tais materiais possuem também a propriedade de formar filmes estáveis sobre substratos sólidos, propiciando aplicação efetiva no desenvolvimento de sensores eletroquímicos [100].

Figura 7. Representação da estrutura molecular do híbrido silsesquioxano organofuncionalizado com 4-metilpiridina.



Fonte. Adaptado de Magosso et al., 2006 [98].

O híbrido $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$ foi sintetizado por Winiarski et al. [99] para a determinação eletroquímica de sulfito em amostras de bebida. Os pesquisadores construíram dispositivos do tipo CPE modificados com AuNps estabilizadas em $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$, este que mostrou um efeito eletrocatalítico quando comparado ao eletrodo sem modificação. Para os fins analíticos, foi possível obter valores de LoD e LoQ iguais a $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $33,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método foi validado e aplicado em amostras de vinho e de água de coco e a exatidão comparada à titulação iodimétrica, o que se mostrou bem-sucedido e de acordo com o objetivo proposto.

Santana e colaboradores [101] desenvolveram um novo GCE modificado com um filme de nanopartículas de óxido de ferro sobre outro filme de AuNps, ambas nanoestruturas estabilizadas com $\text{Si}_4\text{Pic}^+\text{Cl}^-$ para a quantificação de bisfenol A. O sinal de corrente do eletrodo modificado mostrou-se quatro vezes maior do que o eletrodo sem modificação e os autores atribuíram isto à boa condutividade

provinda nas nanopartículas que se encontravam muito bem estabilizadas no silsesquioxano. Ademais, a faixa de trabalho deu-se entre 20 e 1400 nmol L⁻¹ e o LoD igual a 7,0 nmol L⁻¹. Diferentes materiais plásticos foram submetidos à determinação de bisfenol A e o método foi validado.

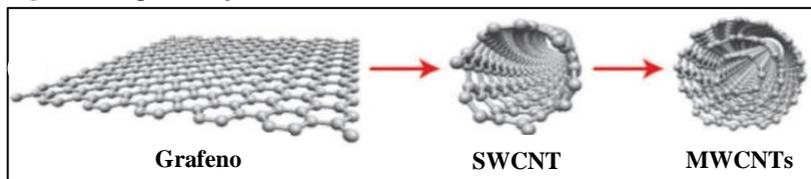
AuNps estabilizadas em Si₄Pic^{+Cl}⁻ também foram utilizadas para a construção de um GCE a partir da modificação DC. O eletrodo modificado foi utilizado para determinar simultaneamente isômeros de nitrofenol numa faixa de trabalho de 0,1 a 1,5 μmol L⁻¹. Os valores de LoD para o orto-nitrofenol e para-nitrofenol foram de 46 nmol L⁻¹ e 55 nmol L⁻¹, respectivamente. Desta forma, a versatilidade e facilidade de modificação do sensor indicaram que o material estabilizante foi crucial para a boa adsorção das AuNps, além de possuir grupos carregados e contra-íons que proveram melhora na condução elétrica e alta estabilidade do filme formado [100].

2.4.2 Nanotubos de carbono

Outros materiais também nanoestruturados e que incitam curiosidade são os nanotubos de carbono. Estas estruturas tornaram-se foco de pesquisa há mais de 20 anos e, desde então, sua produção comercial chega a toneladas todos os anos [102]. Alguns exemplos do uso de nanotubos de carbono estão presentes nas áreas da microeletrônica flexível [103], sensores [104] e biossensores eletroquímicos [76].

Nanotubos são divididos, basicamente, em nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*). Os SWCNTs são considerados uma folha de grafeno enrolada em forma cilíndrica e os MWCNTs várias folhas de grafeno enroladas concêntricamente [104] – Figura 8.

Figura 8. Representação das estruturas nanométricas de carbono.



Fonte. Adaptado de Gooding, J. J., 2005 [105].

A síntese de nanotubos de carbono é feita a partir da deposição química de vapor, onde precursores como o etileno (matéria-prima do carbono) e catalisadores metálicos suportados sobre um substrato de alumina são submetidos à vaporização em temperaturas elevadas até a formação das estruturas nanométricas [102,103].

O ecletismo dos nanotubos de carbono permite que haja funcionalizações à sua estrutura, garantindo o desenvolvimento de dispositivos com alta aplicabilidade, eficiência catalítica, grande área superficial ativa e inserção de grupos funcionais [80]. Um exemplo é a modificação covalente na presença de ácido nítrico e/ou ácido sulfúrico, onde os nanotubos ficam em contato com a solução ácida no banho de ultrassom por 6 horas [106]. Neste caso, grupos funcionais contendo oxigênio, como por exemplo hidroxila e carboxila, são introduzidos na superfície dos MWCNTs. Desta maneira, a condutividade elétrica dos nanotubos aumenta dada a presença de espécies que injetam elétrons nas camadas de valência e condução dos nanotubos de carbono. Ademais, modificação com polímeros condutores, além da alta pureza do material, melhoram a sua condução eletrônica [104].

O uso de MWCNTs imobilizados em substratos sólidos para uso eletroanalítico vem crescendo nos últimos anos. Um GCE modificado com polímero, grafeno e MWCNTs mostrou ótima resposta catalítica frente à determinação de ácido úrico e dopamina na presença de ácido ascórbico. Os valores de LoD para ácido úrico e dopamina foram $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻⁴ e $5,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os autores explicaram que a sinergia e o grande sistema superficial π das estruturas facilitaram o transporte eletrônico [107].

Um outro exemplo foi apresentado por Baghayeri e colaboradores [108] ao desenvolverem um sensor não enzimático para determinação eletrocatalítica de glicose. Um nanocompósito poroso e construído a partir da interconexão de f-MWCNTs e nanopartículas de prata mostrou-se excelente numa faixa de trabalho entre 1,0 nmol L⁻¹ até 350 μ mol L⁻¹, uma resposta de análise gerada em 4 segundos, LoD de 0,0003 μ mol L⁻¹ e alta seletividade.

2.5 AuNps E MWCNTs COMO AGENTES MODIFICADORES EM SENSORES ELETROQUÍMICOS

Desde a chamada “corrida do ouro” com o intenso estudo e aplicação das AuNps, o interesse em conhecer a sinergia entre tais estruturas com outros materiais nanométricos veio de encontro com um

vasto campo tecnológico e sua aplicação na construção de plataformas eletroquímicas de fácil preparação, baratas e com ampla aplicabilidade.

Alguns trabalhos já foram realizados mostrando o efeito positivo da união de AuNps com MWCNTs. Shi e colaboradores [109] criaram um simples método de modificação de eletrodo com nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono. A diminuição da tensão interfacial dos nanotubos com a dispersão contendo AuNps foi conseguida com a presença de etanol e imagens de microscopia evidenciaram a presença das nanopartículas sobre a superfície dos nanotubos de carbono. Medidas em CV mostraram a potencialidade eletrocatalítica do novo material.

Uma plataforma eletroquímica impressa foi construída com AuNps e MWCNTs na presença do polímero Nafion[®] 117 e imobilização superficial da enzima álcool desidrogenase. A faixa de determinação de álcool em sangue variou de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 25.000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um valor de LoD de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido. Os pesquisadores também verificaram a robustez do método perante variação de valores de pH, temperatura e interferentes. Sendo assim, a construção de um sensor modificado com nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono mostrou-se resistente e aplicável na construção de biossensores [110].

Atualmente, um grupo de pesquisadores modificou com MWCNTs e AuNps um GCE para determinação de docetaxel, um medicamento anticâncer, em sangue e urina de humanos. As nanopartículas de ouro foram eletrodepositadas no GCE previamente modificado com os nanotubos. A quantificação do analito deu-se por DPV e o sensor utilizado numa faixa de trabalho de 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ até 3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LoD obtido de 90 nmol L^{-1} . Imagens de microscopia de força atômica mostraram que o eletrodo modificado apresentou uma topologia muito mais irregular, decorrente da modificação e, por consequência, aumento da área superficial ativa [111].

Uma explicação para a interação entre nanopartículas metálicas e MWCNTs vem do advento da funcionalização dos nanotubos com grupos funcionais do tipo carboxila, fenol, aldeído, hidroxila, os quais interagem eletrostaticamente com íons metálicos e nanopartículas estabilizadas por agentes com carga positiva [102,111].

2.6 DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE MELATONINA

Novas técnicas e métodos estão constantemente sendo retratados na literatura científica para a determinação de melatonina. A

voltametria, por ser uma técnica com características peculiares de versatilidade e custos baixos em termos operacionais, têm tomado espaço e sido amplamente adotada nas áreas acadêmica e tecnológica. Alguns trabalhos atuais utilizando-se de CMEs para detecção de MEL são reportados a seguir.

Tavakkoli et al. [112] desenvolveram um CPE modificado com uma heteroestrutura nanométrica de zinco e óxido de ferro para determinação de acetaminofeno, epinefrina e melatonina em amostras de sangue humano enriquecidas com os analitos. Os modificadores propiciaram uma maior área superficial ativa e um efeito eletrocatalítico, visto que o sinal de oxidação mais intenso da MEL dá-se próximo à +0,8 V (vs. Ag/AgCl, KCl_(sat)), porém neste trabalho deu-se em +0,55 V sob condições otimizadas. A faixa de trabalho para a melatonina foi entre 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 145 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LoD de 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o que os autores definiram como valores satisfatórios para o propósito da análise.

Eletrodos impressos de carbono e outro modificado com grafeno foram utilizados para a determinação de melatonina em suplementos alimentares por DPV. O sensor composto por grafeno foi o utilizado para a quantificação em três níveis de pH, sendo eles 7, 7,4 e 6,4; os valores de LoD para uma amostra foram de 0,13; 0,26 e 0,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os autores explicaram que a melhora da sensibilidade pode se dar pela área superficial do grafeno, a qual é mais rugosa e apresenta maior número de sítios eletroativos [113].

Outro trabalho que vem de encontro à miniaturização da voltametria aplicada na área médica é apresentado por Hensley e colaboradores [114]. Foi desenvolvido um microeletrodo implantado em nódulos linfáticos vivos para determinar MEL. Uma varredura realizada entre +0,2 e +1,3 V à 600 V s⁻¹ mostrou um sinal de oxidação definido próximo à +1,2 V e um LoD de 0,024 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mesmo em presença de interferentes. Portanto, o método forneceu medições em tempo real dentro do nódulo linfático por CV, o que possibilitou estudar mecanismos de imunomodulação durante uma doença inflamatória.

A propriedade eletrocatalítica de eletrodos modificados por estruturas nanométricas é descrito por Kumar et al. [115] na modificação de um GCE com nanopartículas de paládio, óxido de grafeno e um polímero condutor em uma única etapa de preparação. O sinal de redução da MEL aumentou quase três vezes com o eletrodo modificado em comparação ao não modificado. O sinal deu-se próximo à -0,656 V (vs. Ag/AgCl, NaCl_(sat)) e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Por SWV foi possível trabalhar em um intervalo de concentração de

5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ até 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e obter um valor de LoD igual a 0,09 $\mu\text{mol L}^{-1}$, quantificando MEL em amostras farmacêuticas e em urina humana.

Eletrodos carbonáceos estruturados com nanomateriais têm se tornado um campo de explorações. Smajdor e colaboradores [116] modificaram um GCE com *carbon black*, suspendendo este em DMF e modificando o eletrodo via DC, seguido de secagem por 12 h a temperatura ambiente. A determinação de MEL deu-se por DPV e pré-concentração de 45 segundos com LoD igual a 0,019 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo o método adequadamente aplicado em produtos farmacêuticos.

Neste cenário, o atual trabalho relata o desenvolvimento e caracterização de uma nova plataforma eletroquímica para a determinação de MEL.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma plataforma eletroquímica, sobre um GCE, modificada em um único passo com f-MWCNTs e AuNps estabilizadas em $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ via *drop coating* para determinação de melatonina em amostras biológicas sintéticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as AuNps com $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ e caracteriza-las por espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês *dynamic light scattering*), potencial zeta (ζ) e UV-vis;
- Construir plataformas eletroquímicas, sobre um GCE com e sem modificação por *drop coating*, e caracterizá-las por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*);
- Caracterizar as superfícies das plataformas eletroquímicas por técnicas de microscopia;
- Estudar o comportamento eletroquímico da MEL;
- Investigar e propor o mecanismo eletroquímico da MEL sobre a plataforma escolhida;
- Otimizar os parâmetros experimentais, tais como pH, eletrólito de suporte e sua concentração analítica;
- Escolher o modo de operação voltamétrico e otimizar seus parâmetros de acordo com a melhor resposta analítica;
- Aplicar testes de avaliação do método eletroanalítico desenvolvido, determinando MEL em fluidos biológicos humanos simulados, tais como saliva, soro sanguíneo e urina.

4 MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

4.1.1 Reagentes

Os reagentes químicos que foram utilizados durante o trabalho são descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Especificações dos reagentes empregados.

REAGENTES	FÓRMULA	MARCA	PUREZA
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	Vetec	$\geq 99,7\%$
Ácido bórico	H_3BO_3	Acros Organics	$\geq 99,5\%$
Ácido cloroacético	$C_2H_3O_2Cl$	Merck	$\geq 99\%$
Ácido cloroáurico	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$	Sigma-Aldrich	$\geq 99,9\%$
Ácido fosfórico	H_3PO_4	Grupo Química	$\geq 85\%^a$
Borohidreto de sódio	$NaBH_4$	Sigma-Aldrich	$\geq 96\%$
Cloreto de 3- <i>n</i> -propil-(4-metilpiridínio)silsesquioxano	$Si_4Pic^+Cl^-$	^b	-----
Cloreto de potássio	KCl	Isofar	$\geq 99\%$
Ferrocianeto de potássio	$K_3Fe(CN)_6$	Vetec	$\geq 99\%$
Ferrocianeto de potássio	$K_4Fe(CN)_6$	Vetec	$\geq 98,5\%$
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	$\geq 99\%$
Melatonina	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	Sigma-Aldrich	$\geq 98\%$
MWCNTs	C	^c	$\geq 95\%$
f-MWCNTs	C; grupos contendo oxigênio ^d	-----	-----
Nafion [®] 117	$C_7HF_{13}O_5S \cdot C_2F_4$	Sigma-Aldrich	$5\%^e$

^a teor dissolvido em água.

^b sintetizado e caracterizado por Winiarski et al., 2017 [99].

^c obtidos comercialmente do Laboratório de Nanomateriais, Dep. de Física (UFMG).

^d funcionalização em meio ácido (HNO_3 5 mol L⁻¹) pelo Laboratório de Catálise Heterogênea, Dep. de Química (UFSC).

^e dissolvido em álcoois alifáticos de baixa massa molecular e água.

4.1.2 Soluções

As soluções foram preparadas a partir dos reagentes elencados no Quadro 1 e a água utilizada para tal fim foi do tipo ultrapura em sistema Milli-Q da empresa Millipore (Bedford, MA, USA) com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C.

A solução de KCl foi preparada a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e as soluções de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ a $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ cada.

Uma massa de $0,05 \text{ g}$ de $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ foi dispersa em 12 mL de água ultrapura e submetida ao banho de ultrassom em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos até a solubilização do material. A concentração final da dispersão foi de $4,2 \text{ mg mL}^{-1}$.

A massa de $1,0 \text{ mg}$ de f-MWCNTs foi dispersa em Nafion[®] 117 ($0,3\%$ em etanol) e levada ao banho de ultrassom por 30 minutos obtendo-se uma concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ do material. O mesmo procedimento foi adotado para os MWCNTs.

Solução tampão Britton-Robinson (B-R, do inglês *Britton-Robinson buffer solution*) foi preparada a partir da mistura de ácidos acético, bórico e fosfórico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em uma faixa de pH de 2 a 10 . A solução tampão cloroacetato (CBS, do inglês *chloroacetate buffer solution*), composta por ácido cloroacético a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e as soluções tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer solution*), compostas por ácido fosfórico, foram utilizadas unicamente em pH 2 em um intervalo de concentração entre $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Todos os valores de pH foram ajustados com NaOH $7,0 \text{ mol L}^{-1}$. Por um período de 90 dias as soluções mantiveram-se estáveis quando mantidas sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

A solução estoque de MEL ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada com a mistura de etanol e água ($1:1$) e, aquelas de concentração inferior, diluídas conforme necessidade. Devido à fotossensibilidade do analito, as soluções foram preparadas e imediatamente utilizadas.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

4.2.1 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula com volume total de 10 mL e possibilidade de inserção de três eletrodos, sendo o de referência do tipo $\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{KCl}_{(\text{sat})}$, o contra eletrodo constituído por um fio de platina e os eletrodos de trabalho com e sem (GCE) modificação.

A caracterização inicial das plataformas eletroquímicas modificadas foi realizada por EIS com o uso de um potenciostato/galvanostato PalmSens (Palm Instruments BV – Holanda) conectado a um computador contendo o *software* PSTrace (versão 5.5). A partir deste sistema conectado por fios aos eletrodos da célula eletroquímica obtiveram-se os perfis impedimétricos. Os espectros de

impedância foram obtidos numa célula contendo 10 mL de KCl 0,1 mol L⁻¹ (eletrólito de suporte) com 0,005 mol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e K₄Fe(CN)₆, cada.

As análises voltamétricas foram realizadas com o auxílio do mesmo equipamento e *software* supracitados. Os dados extraídos foram tratados no programa gráfico Origin (versão 8.5).

As verificações de pH foram feitas com o uso de um conjunto medidor de eletrodo de vidro combinado Ohaus (Modelo ST3100-F), após calibração.

A agitação das soluções na célula eletroquímica foi feita por um agitador magnético da marca Hanna Instrument HI 190M.

4.2.2 Medidas de DLS

Características como raio hidrodinâmico e potencial zeta (ζ) foram feitas no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS[®] 4 mW com laser de He/Ne de comprimento de onda 638 nm conectado a um computador com o *software* Zetasizer (versão 7.12). Os dados gerados foram tratados no programa gráfico Origin (versão 8.5).

4.2.3 Medidas de espectroscopia UV-vis

A caracterização das AuNps foi feita a partir da obtenção de espectros decorrentes da banda plasmônica do material numa faixa de comprimento de onda de 400 a 800 nm em um período de 90 dias para estudo de estabilidade. O aparelho utilizado foi o espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu - Japão) – resolução de $\pm 0,2$ nm conectado ao *software* UVProbe (versão 2.50) para aquisição e processamento de dados. A célula utilizada foi do tipo de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

O mesmo equipamento foi utilizado para as medidas de determinação da MEL pelo método comparativo para a verificação da exatidão do método proposto. Para isso, os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 240 a 340 nm e a curva de calibração construída pelo método de adição de padrão. Todos os dados gerados foram tratados no programa gráfico Origin (versão 8.5).

4.2.4 Medidas de microscopia eletrônica

Para a caracterização das AuNps e dos f-MWCNTs foi feito uso da microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *transmission*

electron microscopy) por meio de um microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução modelo JEM-2100 (JEOL - Japão) a uma tensão de 100 kV. A preparação deu-se com o gotejamento das dispersões sobre um grid de cobre recoberto com carbono (300 *mesh*) e mantida a temperatura ambiente até total evaporação de solventes. Os padrões oriundos da difração de elétrons de área selecionada (SAED, do inglês *selected area electron diffraction*) também foram obtidos no mesmo equipamento e nas mesmas condições; os padrões gerados foram analisados de forma comparativa com o *software* CrysTBox. O diâmetro médio das AuNps foi estimado com o uso do software ImageJ e a curva de distribuição construída no programa gráfico Origin (versão 8.5).

As imagens tridimensionais das plataformas eletroquímicas foram realizadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão emissor de campo (SEM-FEG, do inglês *field emission gun scanning electron microscopy*) por meio de um microscópio JSM-6701F (JEOL - Japão) a uma tensão de 10 kV ou mais. A preparação deu-se pelo gotejamento sucessivo sobre uma placa de carbono vítreo e mantida a temperatura ambiente até total evaporação de solventes.

As análises supracitadas foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME - UFSC).

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Síntese das AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻

As nanopartículas estabilizadas pelo Si4Pic⁺Cl⁻ (AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻) foram sintetizadas com base em Calaça et al. [94]. Um volume de 4 mL da solução de HAuCl₄.3H₂O (3 mmol L⁻¹) foi misturado com 4 mL de Si4Pic⁺Cl⁻ (4,2 mg mL⁻¹) e a nova solução levada à forte agitação por cerca de 20 minutos. A seguir, 4 mL da solução de NaBH₄ (6 mmol L⁻¹) foi gotejada lentamente na solução contendo o ácido cloroáurico e o silsesquioxano. Após a total adição, a dispersão foi deixada sob agitação por cerca de 30 minutos e mantida sob refrigeração a 4 °C.

4.3.2 Funcionalização dos MWCNTs

A funcionalização dos MWCNTs adquiridos comercialmente foi feita com base em Francisco et al. [106]. Uma quantidade de 10 mg de nanotubos de carbono foi adicionada a 125 mL de ácido nítrico HNO₃ 5 mol L⁻¹ e a dispersão foi refluxada por 2h a 140 °C. A seguir, os

nanotubos foram lavados com água destilada até atingirem um valor de pH 5,5. Por fim, o material foi seco em estufa pelo período de um dia a 70 °C e os f-MWCNTs acondicionados a temperatura ambiente.

4.3.3 Preparação da dispersão dos f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻

Uma alíquota de 100 µL das AuNps foi adicionada à dispersão de f-MWCNTs (0,5 mg mL⁻¹) dispersos em 1,9 mL de Nafion[®] 117 (0,3% em etanol). A nova mistura (f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻) foi deixada em banho de ultrassom por 45 minutos em recipiente fechado e, a seguir, acondicionada sob refrigeração a 4 °C. A concentração das nanopartículas de ouro na dispersão foi 19,7 µg mL⁻¹.

4.3.4 Construção do eletrodo modificado

A nova plataforma eletroquímica foi modificada de acordo com o que se segue: um GCE (diâmetro de 2 mm) foi polido com óxido de alumínio de diferentes granulometrias, iniciando-se em 0,5 µm, 0,3 µm e 0,05 µm. Posteriormente, o GCE foi lavado com água destilada e etanol, além de ser submetido ao banho de ultrassom por 1 minuto. Após seco, uma alíquota de 3 µL da mistura f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ foi depositada cuidadosamente sobre a parte carbonácea do GCE. Prontamente à rápida secagem em temperatura ambiente, formou-se o filme e a plataforma denominada GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ utilizada para as medidas eletroquímicas posteriores. O eletrodo sem modificação (GCE) e outros modificados foram preparados similarmente, sendo eles com Si4Pic⁺Cl⁻ (GCE/Si4Pic⁺Cl⁻), GCE com AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ (GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻) e o GCE com f-MWCNTs (GCE/f-MWCNTs).

4.3.5 Preparação e determinação de MEL em amostras

As amostras de saliva e soro sanguíneo sintéticas foram preparadas de acordo com alguns protocolos presentes na literatura. Para a elaboração da saliva empregou-se o modelo AFNOR [117], constituindo-se de Na₂HPO₄ (0,065 g), NaCl (1,675 g), KSCN (0,0825 g), KH₂PO₄ (0,05 g), KCl (0,3 g) e NaHCO₃ (0,375 g). Os reagentes foram adicionados a um balão e este avolumado com água ultrapura até 250 mL. O soro sanguíneo foi preparado de acordo com Parhama, H. e Zargar, B. [118] adicionando os reagentes elencados a seguir em um balão volumétrico de 250 mL: NaCl (1,3 g), NaHCO₃ (0,16 g), glicina

(2,3 mg), triptofano (3,5 mg), tirosina (3,7 mg), serina (3,2 mg), fenilalanina (6,6 mg), lisina (9,1 mg), histidina (6,3 mg), ácido aspártico (0,029 g), arginina (10 mg), alanina (9,1 mg) e cisteína (7,0 mg).

A urina sintética *SurineTM Negative Urine Control* é um material de referência certificado (Sigma-Aldrich).

Todas as amostras foram fortificadas com MEL como se segue: para as medidas voltamétricas, um volume de 100 μL de uma solução padrão de MEL $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada em um balão e avolumado até 1 mL; em seguida, 170 μL desta solução foram levados à célula eletroquímica contendo 10 mL de solução tampão PBS 0,2 mol L^{-1} (pH 2). Para a construção da curva de calibração por adição de padrão ($n = 4$), alíquotas de 50 μL de uma solução padrão de MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas.

O método comparativo por espectrometria UV-vis foi baseado em Zafra-roldán et al. [119] como se segue: as amostras foram enriquecidas com 100 μL uma solução padrão de MEL $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e avolumadas até 1 mL. Seguidamente, 100 μL desta solução foram levados à cubeta de quartzo contendo 3 mL de solução tampão PBS 0,2 mol L^{-1} (pH 2). Para a construção da curva de calibração por adição de padrão, alíquotas de 20 μL de uma solução padrão de MEL $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram acrescentadas.

A avaliação da precisão do método eletroanalítico foi realizada em períodos intra-dia e inter-dia a um nível de concentração de MEL 35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,2 mol L^{-1} (pH 2). Primeiramente foi avaliada a repetibilidade intra-dia, a qual consistiu em sete medidas intercaladas no mesmo dia; já a análise inter-dia compreendeu sete medidas do analito em sete dias consecutivos, sendo uma por dia e sob as mesmas circunstâncias e condições utilizadas para a intra-dia.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com o recomendado pela IUPAC [58,120] a partir da leitura do desvio padrão da média de dez brancos no potencial de pico da MEL.

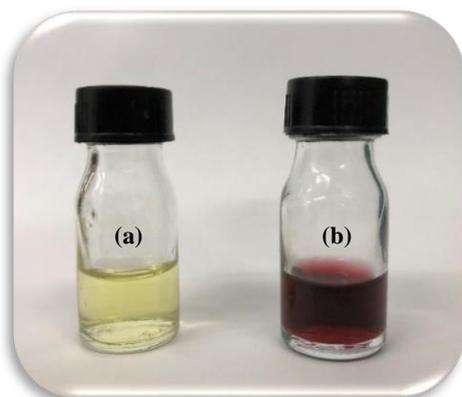
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

5.1.1 Nanopartículas de ouro

A formação das AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ conforme síntese (seção 4.3.1) foi imediatamente perceptível com a mudança da coloração amarelada da solução de HAuCl₄ para avermelhada (AuNps), após a adição da solução contendo o agente redutor (NaBH₄) – Figura 9. Tal coloração está relacionada à ressonância plasmônica de superfície, a qual abrange um intervalo de comprimento de onda máximo entre 520 e 550 nm para dispersões contendo AuNps de tamanhos inferiores à 100 nm [121].

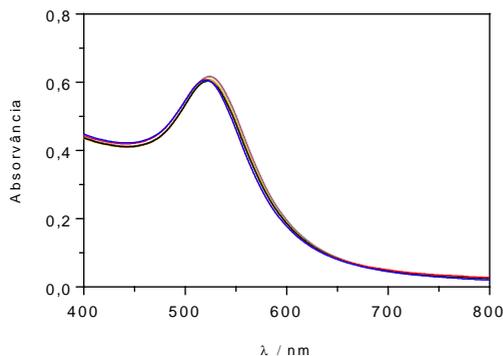
Figura 9. Imagens da (a) solução de HAuCl₄ e (b) dispersão das AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻.



Fonte. O autor.

A caracterização por espectroscopia UV-vis foi utilizada como técnica primária para, além de indicar a presença de AuNps, estimar o tamanho das partículas e acompanhar sua estabilidade por 90 dias. A Figura 10 retrata as bandas de ressonância plasmônica das AuNps estabilizadas no polímero Si4Pic⁺Cl⁻ por um total de 90 dias (leituras realizadas a cada 15 dias) diluídas na proporção 1:3 (AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻/H₂O).

Figura 10. Espectros de UV-vis das AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ na síntese (—) e após 15 dias (—), 30 dias (—), 45 dias (—), 60 dias (—), 75 dias (—) e 90 dias (—).



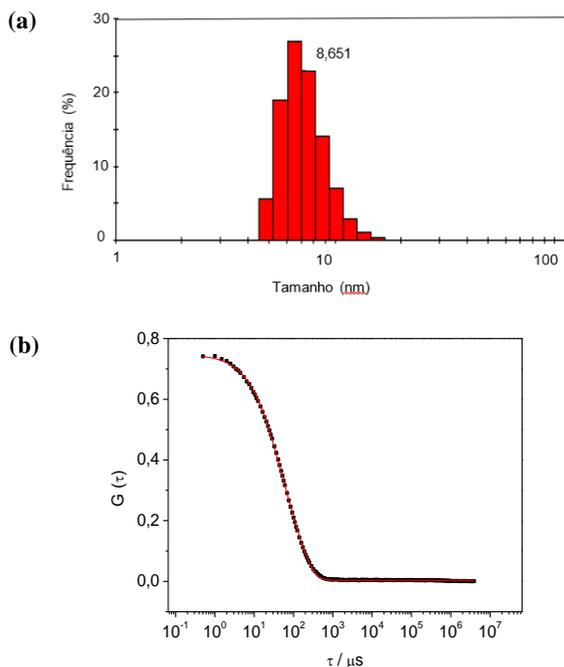
Nota-se que a banda de absorção máxima se deu próxima a 520 nm em todos os casos, ocorrendo um deslocamento mínimo mediante os 90 dias de análise. Portanto, pode-se inferir que as AuNps formadas possuem um tamanho inferior à 100 nm [121] e que a estabilidade no Si4Pic⁺Cl⁻ ocorreu sem formação de agregados.

Para uma caracterização mais detalhada e compreensão dos mecanismos de estabilização, medidas por DLS e potencial ζ foram realizadas posteriormente. A análise por DLS possibilitou estimar o diâmetro hidrodinâmico médio (D_H) da dispersão AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. O princípio do espalhamento de luz dinâmico baseia-se na interação entre o material nanométrico e um feixe polarizado de luz incidente. Inicialmente, incide-se um laser de comprimento de onda conhecido sobre a dispersão que se move aleatoriamente em solução, polarizando os seus elétrons superficiais. A radiação espalhada de maneira elástica chega ao detector, transformando os fótons em volts durante intervalos de nano segundos. Informações obtidas são coletadas e tratadas matematicamente a partir da teoria de espalhamento de Rayleigh, o que gera o valor de D_H . Admite-se para esta análise partículas esféricas e com raio inferior à relação $\lambda/10$, parâmetros fundamentais para garantir confiabilidade técnica [122].

A Figura 11a mostra por DLS a distribuição de tamanho para uma população de 99,9% de AuNps estabilizadas em Si4Pic⁺Cl⁻ com valor de $D_H = 8,651$ nm. A presença de mais uma população de 0,1% é sugerida pela curva de correlação com ajuste exponencial de segunda ordem (Figura 11b). O tratamento matemático do ajuste aponta a

existência de duas populações de tamanhos diferentes, corroborando com os valores de DLS. Ademais, constata-se o decaimento rápido do coeficiente de correlação em função do tempo, o que é característico de partículas muito pequenas e que difundem rapidamente através do solvente.

Figura 11. (a) Distribuição de tamanho e (b) curva de correlação com ajuste exponencial de segunda ordem para a dispersão de AuNps estabilizadas em $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$.



O potencial ζ (ou eletrocinético) também é amplamente aplicado para a caracterização de materiais nanoestruturados e é definido como o potencial no plano de cisalhamento de partículas que se movem sob influência de um campo elétrico. Portanto, o potencial ζ reflete a diferença entre o potencial da dupla camada elétrica das partículas móveis e a camada dispersante em torno do plano de cisalhamento. O resultado desta análise permite obter informações sobre as cargas superficiais e a estabilidade de nanopartículas [122].

O potencial ζ foi medido tanto para o polímero $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ quanto para as nanopartículas de ouro nele estabilizadas. Os valores

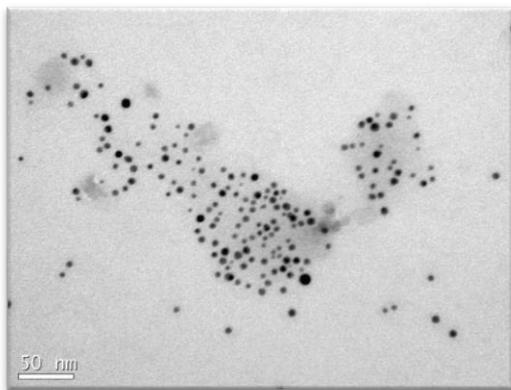
encontrados foram de +29,0 mV para o $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ e +35,6 mV para $\text{AuNps-Si4Pic}^+\text{Cl}^-$. Sendo assim, pode-se afirmar que as $\text{AuNps-Si4Pic}^+\text{Cl}^-$ apresentam cargas positivas distribuídas em sua superfície, o que é devido à presença do polímero $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$, este que as mantém afastadas umas das outras pelo mecanismo de estabilização eletroestérea.

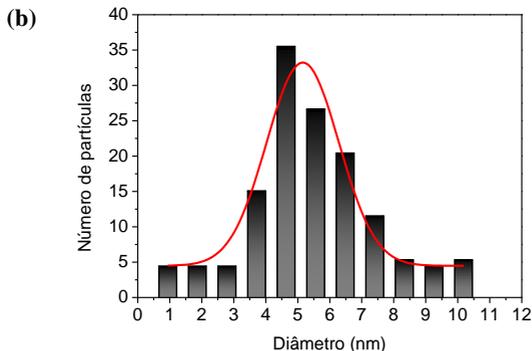
De forma geral, é aceito que coloides com potencial ζ foi do intervalo entre -25 e +25 mV são estáveis e que aglomerações só ocorrem quando as forças de atração entre as nanopartículas vencem as forças repulsivas entre elas, levando o potencial ζ à zero [121]. Adicionalmente, somente valores acima de 40 mV (em módulo) podem ser considerados mecanismos de estabilização puramente eletrostático [123]. Portanto, observa-se que o valor do potencial ζ deslocou para um valor mais positivo na dispersão $\text{AuNps-Si4Pic}^+\text{Cl}^-$, indicando um aumento na estabilização das nanopartículas. Complementar a isto, o potencial ζ não ultrapassou o valor de +40 mV, demonstrando a existência de uma estabilização também estérea no sistema coloidal, o que foi evidenciado anteriormente por outros autores [99].

A Figura 12a retrata a análise por TEM das AuNps sintetizadas. Percebe-se na imagem que as nanopartículas de ouro possuem uma forma esférica, apresentam-se bem distribuídas e sem formação de agregados. Figura 12b estima o valor do diâmetro médio das AuNps em 5 nm a partir do histograma de distribuição de tamanhos construído pela medida de 100 nanopartículas.

Figura 12. (a) Imagem obtida por TEM e (b) distribuição do tamanho das AuNps estabilizadas em $\text{Si4Pic}^+\text{Cl}^-$.

(a)

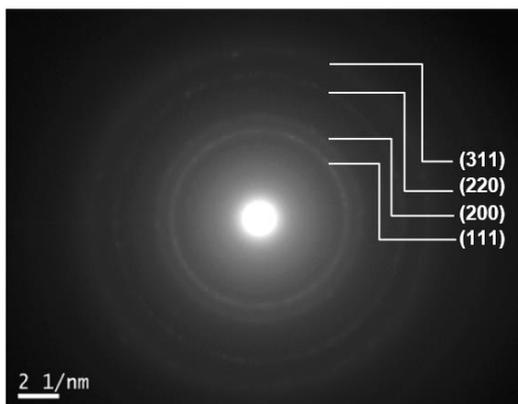




O diâmetro médio das nanopartículas de ouro obtido por TEM é de menor valor em comparação ao dado gerado por DLS. Isto ocorre devido ao fato de que, no DLS, o tamanho é estimado a partir do diâmetro hidrodinâmico, ou seja, considerando a mobilidade da partícula e o efeito do solvente. Já por TEM, o solvente é evaporado e o tamanho é exclusivo das nanopartículas de ouro, o que gera um valor menor.

A cristalinidade das AuNps-Si₄Pic⁺Cl⁻ foi investigada por SAED utilizando o modelo de comparação oferecido pelo *software* CrysTBox. Na Figura 13 é possível perceber, a partir do padrão de difração de uma área selecionada, que as nanopartículas de ouro são altamente cristalinas e seus padrões correspondem à planos de um cubo de face centrada. Os anéis circulares luminosos correspondem aos planos (111), (200), (220) e (311), estes característicos do ouro metálico [121].

Figura 13. Padrões SAED para as AuNps estabilizadas em Si₄Pic⁺Cl⁻.

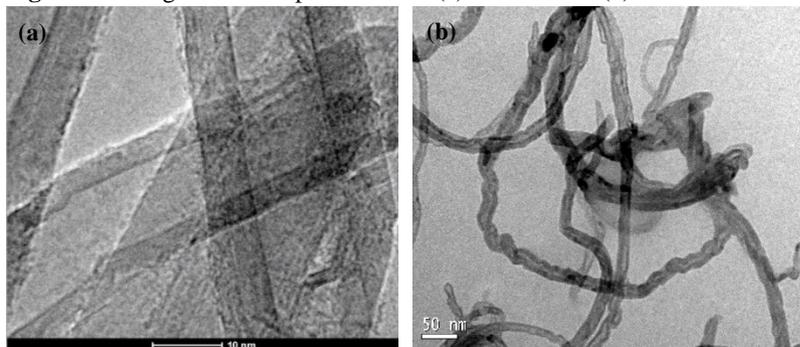


5.1.2 Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Os MWCNTs e f-MWCNTs foram previamente dispersos em Nafion[®] 117, garantindo fácil dispersidade e boa estabilidade aos nanotubos. A seguir, foi realizada a caracterização por potencial ζ a fim de se conhecer a carga superficial e estabilidade do material. Os valores para os MWCNTs e f-MWCNTs foram -12,9 mV e -52,4 mV, respectivamente. De acordo com a literatura [124], o valor de potencial ζ alto (em módulo) é indicativo do elevado grau de funcionalização do material, mantendo a dispersão dos MWCNTs estável por tempo prolongado. O incremento no valor do potencial ζ é um indício de que a estabilização dos nanotubos deu-se pela sua efetiva funcionalização em meio ácido, garantindo um mecanismo de estabilização eletrostático e de alta qualidade.

A Figura 14 mostra um comparativo entre (a) MWCNTs e (b) f-MWCNTs. Nota-se uma morfologia capilar característica dos nanotubos em ambas as imagens, porém para os f-MWCNTs são vistas rugosidades distribuídas em toda a sua estrutura, o que são, possivelmente, oriundas do tratamento ácido para sua funcionalização.

Figura 14. Imagens obtidas por TEM dos (a) MWCNTs e (b) f-MWCNTs.



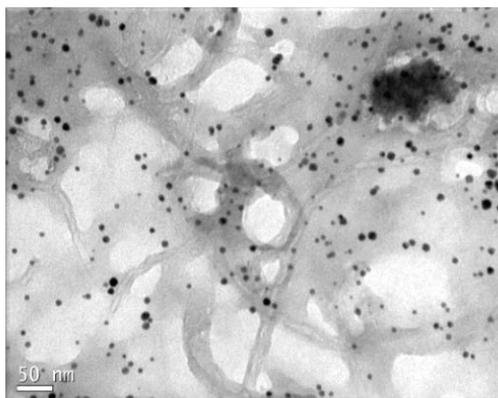
* os MWCNTs foram caracterizados pelo Laboratório de Nanomateriais, Dep. de Física (UFMG).

5.1.3 f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻

A preparação da dispersão conjunta dos nanotubos de carbono funcionalizados com as nanopartículas de ouro estabilizadas em Si4Pic⁺Cl⁻ foi realizada conforme descrito em 4.3.3. A imagem obtida por TEM (Figura 15) mostra uma área composta por nanopartículas de

ouro bem distribuídas e próximas aos nanotubos de carbono. Isto pode ser explicado, primeiramente, pelos valores de potencial ζ das AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ (+35,6 mV) e dos f-MWCNTs (-52,4 mV), materiais com cargas opostas que devido à interação eletrostática aproximam-se [104]. Ademais, em virtude da propriedade selante do copolímero Nafion[®] 117, é provável que ele aja como um material que favoreça essa aproximação. Outrossim, como reportado por Shi e colaboradores [109], a presença de álcoois de baixa massa molecular no Nafion[®] 117 (0,3% em etanol) diminui a tensão interfacial entre as paredes dos f-MWCNTs e a dispersão aquosa das nanopartículas de ouro, formando uma estrutura integrada.

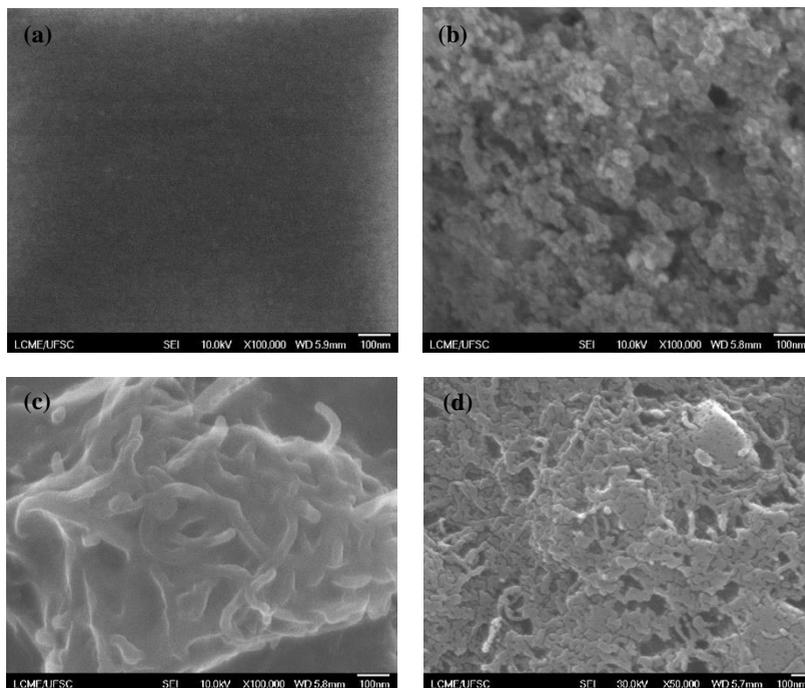
Figura 15. Imagem obtida por TEM da dispersão integrada de f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻.



5.1.4 Caracterização das plataformas eletroquímicas

As plataformas eletroquímicas foram caracterizadas pela técnica microscópica SEM-FEG objetivando-se a análise morfológica e a comparação entre elas de acordo com a presença de cada agente modificador. A Figura 16 traz as imagens obtidas para GCE (sem modificador), GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻, GCE/f-MWCNTs e GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻.

Figura 16. Imagens obtidas por SEM-FEG para (a) GCE, (b) GCE/AuNps-Si₄Pic⁺Cl⁻, (c) GCE/f-MWCNTs e (d) GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si₄Pic⁺Cl⁻.



A mudança progressiva na superfície das plataformas eletroquímicas evidencia a presença e a disposição dos agentes modificadores. A Figura 16a mostra o GCE livre de qualquer alteração, dispondo somente de uma superfície lisa. Já a Figura 16b apresenta a plataforma GCE/AuNps-Si₄Pic⁺Cl⁻ onde se observa a formação coesa das estruturas do polímero Si₄Pic⁺Cl⁻ sobre o carbono vítreo. Os f-MWCNTs encontram-se na Figura 16c em uma forma bem mais condensada; esta estruturação é dada, provavelmente, pela presença do Nafion[®] 117 que age como uma substância que agrega os nanotubos e sela a superfície. Por fim, a Figura 16d reporta a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si₄Pic⁺Cl⁻. A imagem apresenta a superfície contendo os f-MWCNTs e as AuNps-Si₄Pic⁺Cl⁻ formando uma estrutura integrada, rugosa e irregular, onde o polímero silsesquioxano encontra-se em meio aos nanotubos de carbono recobrendo de forma completa a superfície do GCE.

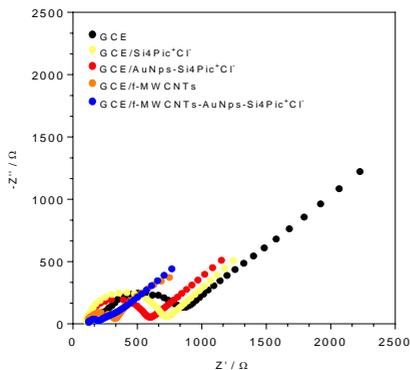
5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

5.2.1 Estudo impedimétrico das plataformas eletroquímicas

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi aplicada para o estudo da resistência à transferência de carga entre as plataformas eletroquímicas e a solução.

O experimento realizado ocorreu em uma célula contendo 10 mL de KCl 0,1 mol L⁻¹ com 0,005 mol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e K₄Fe(CN)₆ cada, sendo o intervalo de frequência aplicado entre 0,1 e 50.000 Hz. O diagrama obtido é denominado de Nyquist e constitui-se de duas partes, o semicírculo e a linha. O diâmetro do semicírculo evidencia a resistência à transferência de carga (R_{ct}) e a porção linear representa o processo difusional do produto para a solução; logo, quanto menor o semicírculo, mais rápida a transferência eletrônica [115]. Na Figura 17 estão representados os diagramas de Nyquist para todas as plataformas eletroquímicas. Observa-se que o Si4Pic⁺Cl⁻ já apresenta uma resistência à transferência de carga menor do que o GCE, o que pode estar relacionada com a presença de grupos com carga na superfície do material, acelerando a transferência eletrônica. A partir da integração das AuNps, o material torna-se menos resistivo, já que as nanopartículas, além de serem pequenas e bem estabilizadas no silsesquioxano, apresentam superfície altamente reativa, a qual auxilia a troca de elétrons. Já a plataforma contendo os f-MWCNTs exibe um R_{ct} ainda menor do que a GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻, característica explicada pela composição de uma rede de sílica não condutora e que limita um pouco a transferência de carga que compõe a GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. Por fim, a GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ é o sensor com melhor performance, exibindo o menor semicírculo e mais rápida transferência de carga, isto graças ao efeito sinérgico proveniente da interação eletrostática entre os sistemas AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ e f-MWCNTs, mecanismo já reportado na literatura [102].

Figura 17. Diagramas de Nyquist obtidos por EIS para as plataformas eletroquímicas.



A Tabela 1 resume os valores de R_{ct} para cada medida e a massa dos respectivos agentes modificadores sobre as plataformas.

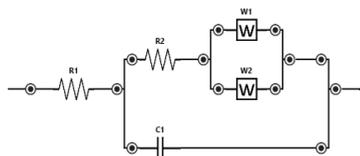
Tabela 1. Valores obtidos de R_{ct} para as plataformas eletroquímicas.

Plataforma eletroquímica	R_{ct} / Ω	Massa (μg)
GCE	778	-----
GCE/Si4Pic ⁺ Cl ⁻	610	12,3
GCE/AuNps-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	486	0,06 (AuNps) ^a ; 12,3 (Si4Pic ⁺ Cl ⁻)
GCE/f-MWCNTs	220	1,5 (f-MWCNTs)
GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic ⁺ Cl ⁻	79	0,06 (AuNps) ^a ; 12,3 (Si4Pic ⁺ Cl ⁻) 1,5 (f-MWCNTs)

^a considerando a total conversão dos íons Au^{3+} em Au^0 .

A partir dos valores de R_{ct} , foi plotado um circuito elétrico equivalente (circuito de Randles) que melhor se ajusta ao perfil dos diagramas de Nyquist. A Figura 18 exhibe um modelo composto por um componente R_1 que está relacionado à resistência da solução eletrolítica, R_1+R_2 à transferência de carga entre eletrodo e solução, o capacitor C_1 ao carregamento da dupla-camada elétrica e W_1+W_2 (impedância de Warburg) à resistência na transferência de massa [125].

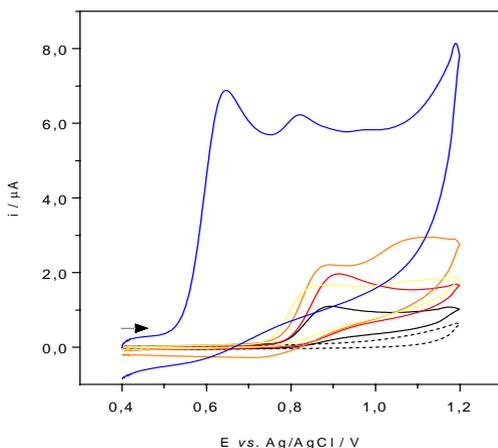
Figura 18. Circuito equivalente de Randles para as plataformas eletroquímicas.



5.2.2 Comportamento eletroquímico da melatonina

Após os estudos realizados por EIS, foram conduzidas medidas por CV a fim de conhecer o desempenho da MEL na superfície das plataformas eletroquímicas de trabalho. Buscou-se com a análise a melhor resposta voltamétrica de corrente e potencial. A Figura 19 traz os voltamogramas cíclicos obtidos para a melatonina numa concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) para GCE, GCE/Si4Pic⁺Cl⁻, GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻, GCE/f-MWCNTs e GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. O intervalo de potencial aplicado deu-se entre +0,4 e +1,2 V seguido da varredura reversa de +1,2 V a +0,4 V com velocidade de varredura (v) de 50 mV s^{-1} .

Figura 19. Voltamogramas cíclicos para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) para as plataformas GCE (—), GCE/Si4Pic⁺Cl⁻ (—), GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ (—), GCE/f-MWCNTs (—), Branco (-----) e modificada GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ (—), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Os sinais na faixa de potencial estudado mostraram o resultado da oxidação da MEL para todas as plataformas. São evidenciados processos irreversíveis em todos os casos e com valores de corrente e potencial seguintes: GCE ($0,850 \mu\text{A}$ e $0,861 \text{ V}$), GCE/Si4Pic⁺Cl⁻ ($0,972 \mu\text{A}$ e $0,894 \text{ V}$), GCE/AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ ($1,866 \mu\text{A}$ e $0,898 \text{ V}$), GCE/f-MWCNTs ($2,015 \mu\text{A}$ e $0,889 \text{ V}$) e GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ ($6,407 \mu\text{A}$ e $0,620 \text{ V}$ para 1º sinal e $0,501 \mu\text{A}$ e $0,821 \text{ V}$ para o 2º sinal).

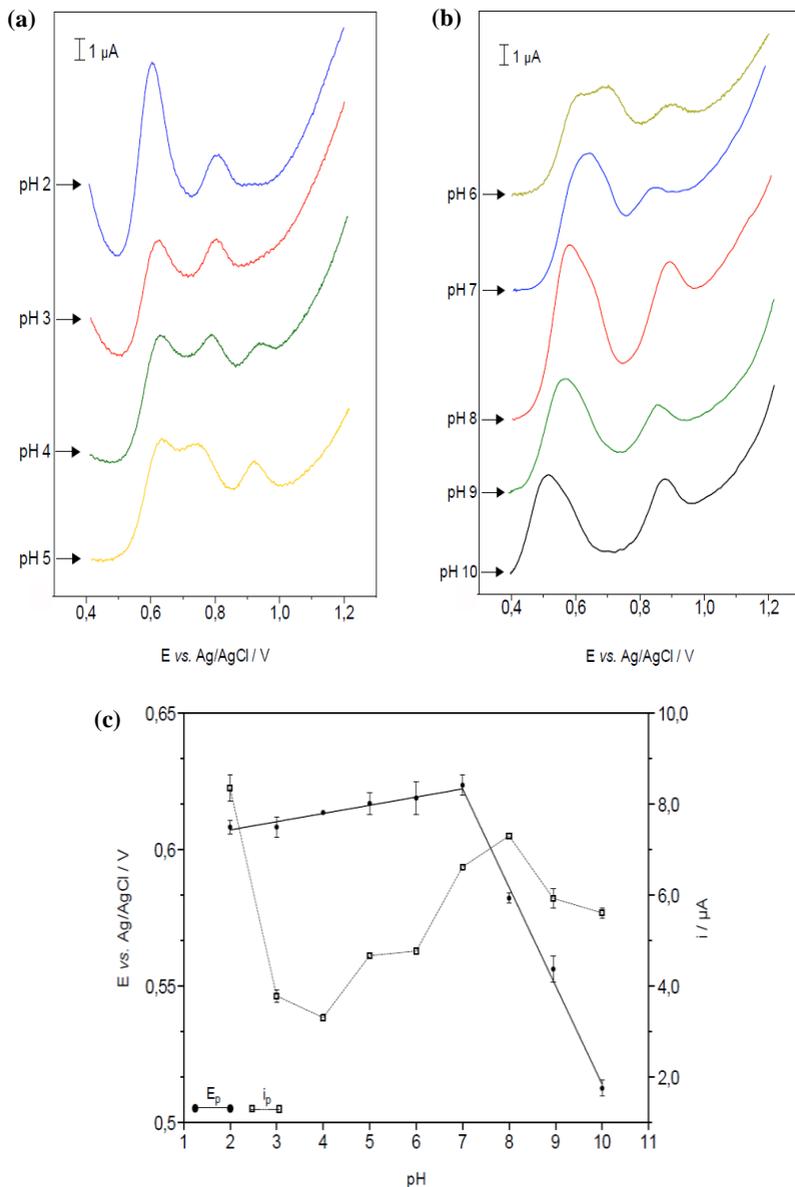
Observa-se que o 1º sinal de corrente para a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ foi 7,5 vezes mais intenso e definido

quando comparado ao GCE, além do potencial que se deslocou 241 mV para valores mais negativos, caracterizando o processo como eletrocatalítico, particularidade já observada em outros trabalhos [110][112]. O 2º sinal de oxidação pode ser oriundo do produto gerado pelo 1º sinal, conforme já reportado por Radi, A.; Bekhiet, G. E. [126]. Os autores descrevem que o produto do primeiro processo de oxidação, o qual é uma quinoneimina altamente reativa, está sujeita a um ataque nucleofílico, gerando como produto um dímero ou então um composto do tipo 4,5-dihidroxiindol. Este derivado indol pode sofrer oxidação e, possivelmente, gerar o segundo sinal observado sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. Sendo assim, foi escolhida a GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻, pois o estudo voltamétrico indicou que a melhora da resposta do analito em questão deu-se em decorrência da junção entre as AuNps estabilizadas em Si4Pic⁺Cl⁻ e os f-MWCNTs, beneficiando a transferência eletrônica.

5.2.2.1 Estudo de pH eletrólito de suporte

Experimentos posteriores foram conduzidos para compreensão da natureza e influência do pH e eletrólito de suporte frente à resposta eletroquímica da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. Visto que a corrente capacitiva na CV é muito alta e com o objetivo de melhor acompanhar os sinais de corrente faradaica gerados, foi utilizada a DPV para a obtenção dos voltamogramas. As medidas ocorreram no intervalo de pH 2 ao 5 (Figura 20a) e pH 6 ao 10 (Figura 20b), com MEL $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ com parâmetros de amplitude de pulso (a) = 50 mV, tempo de pulso (t_p) = 5 ms e $v = 50$ mV s⁻¹. A Figura 20c mostra a correlação entre a variação do pH e seus respectivos valores de corrente (i_p) e potenciais de pico (E_p) para o 1º sinal de oxidação da melatonina. Observa-se que o maior valor de corrente se dá em pH 2, com valores inferiores na faixa entre pH 3 a 10. Posto isto, conclui-se que o processo oxidativo é dependente da variação do pH e necessita de um eletrólito de suporte tamponante. Por fim, buscando a melhor sensibilidade analítica para a determinação de MEL e um perfil voltamétrico mais definido, optou-se pelo pH 2 para análises posteriores.

Figura 20. Voltamogramas obtidos por DPV para MEL $5,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ em solução tampão B-R 0,1 mol L $^{-1}$ utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic $^{+}$ Cl $^{-}$ nos valores de pH (a) 2 ao 5 e (b) 6 ao 10; $a = 50$ mV, $t_p = 5$ ms e $v = 50$ mV s $^{-1}$. Em (c) a correlação da variação entre o pH e (i_p ; E_p) para o 1 $^{\circ}$ sinal de oxidação da MEL ($n = 3$).



Para o 1º sinal da MEL, as Figuras 20a e 20b mostram que os valores de E_p deslocam-se no sentido negativo de potencial com o aumento do valor de pH, indicando o envolvimento de prótons na oxidação da MEL. Na Figura 20c ocorre a variação do E_p originando uma região praticamente constante e outra seguida de um trecho linear decrescente, gerando nessa quebra de linearidade um valor de coeficiente angular no valor de $-0,03605$. Esta variação resultou na equação E_p (V) = $-0,03605\text{pH} + 0,833$ ($R^2 = 0,9801$). A inclinação no valor de $-0,03605$ mV pH^{-1} é relacionada com o valor teórico de $-0,0592$ mV pH^{-1} (Equação 1, onde m são prótons e n elétrons), sugerindo que o número de mols de elétrons transferidos na oxidação do primeiro sinal da MEL é o dobro do de prótons, mecanismo similar ao já reportado por outros autores [127][128].

$$\text{coeficiente angular} = -\frac{0,0592m}{n} \quad (1)$$

$$-0,03605 = -\frac{0,0592m}{n}$$

$$\frac{m}{n} = -\frac{0,03605}{-0,0592}$$

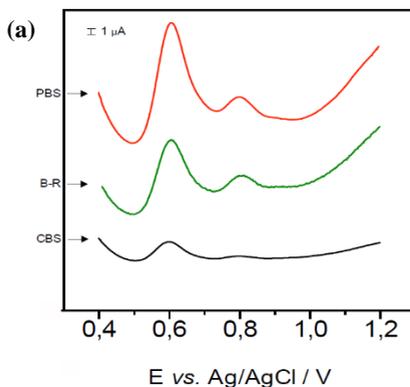
$$\frac{m}{n} = 0,6 \sim 0,5$$

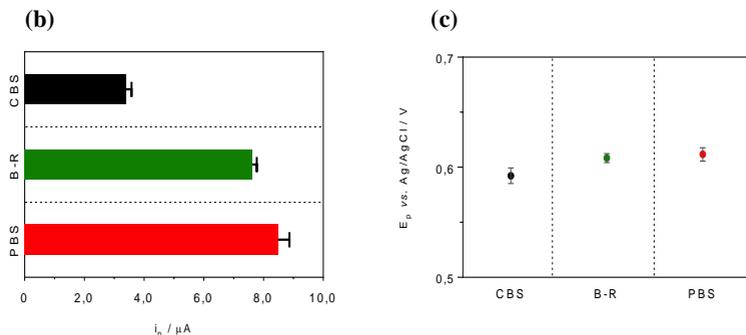
O estudo de prótons e elétrons envolvidos para os outros sinais de oxidação torna-se difícil com a variação de pH. Para o 2º sinal, o qual consiste na aparente oxidação do produto gerado pela primeira oxidação, é impossível monitorar seu deslocamento, pois seu sinal funde-se ao primeiro, dificultando a leitura do valor de E_p na faixa de pH estudada. Para o 3º sinal, este que aparece a partir de pH 4, é observado um deslocamento oscilante e muito pequeno, impossibilitando também a sua monitoração. Estes fatores já foram retratados por Radi, A.; Bekhiet, G. [126], os quais sugerem o possível acúmulo de produtos de oxidação sobre a superfície do eletrodo e que impede um estudo eletroquímico mais aprofundado dos outros sinais, quando em relação à variação de pH.

Ademais, segundo estudos atuais realizados por Zafra-Roldán e colaboradores [119], existe uma distribuição de espécies da MEL no intervalo de pH estudado, ou seja, não somente os produtos da oxidação estão presentes, mas também as moléculas oriundas da desprotonação ocasionada com o aumento do valor de pH. Neste trabalho os autores, de forma experimental, elucidam valores de pK_{a1} e pK_{a2} iguais à $5,772 \pm 0,011$ e $10,201 \pm 0,024$, respectivamente. Portanto, para o melhor compromisso analítico, será monitorado somente o 1º sinal de oxidação da MEL e estudos posteriores serão realizados em pH 2, onde a MEL está em sua forma protonada, sem contribuição de outras espécies desprotonadas e possivelmente eletroativas e o sinal de i_p com sua maior magnitude e melhor perfil voltamétrico.

Neste contexto, três diferentes tipos de solução tampão 0,1 mol L^{-1} (pH 2) foram testadas como eletrólito de suporte, as quais: Britton-Robinson (B-R), cloroacetato (CBS) e fosfato (PBS). A Figura 21a traz os voltamogramas de DPV obtidos para MEL $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} . Já a Figura 21b estabelece a relação entre solução tampão e i_p , com maior intensidade proveniente do PBS. Por fim, a Figura 21c mostra a variação do E_p nas três soluções, o qual não apresentou oscilação significativa. Portanto, o tampão PBS foi o selecionado para experimentos posteriores.

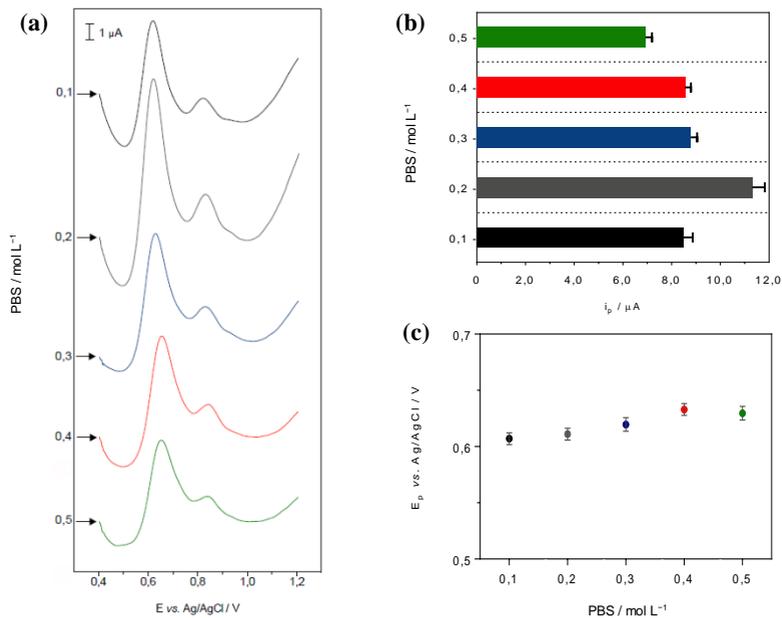
Figura 21. (a) Voltamogramas obtidos por DPV para MEL $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em soluções tampão PBS, B-R e CBS 0,1 mol L^{-1} (pH 2) cada, utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50$ mV, $t_p = 5$ ms e $v = 50$ mV s^{-1} . Valores de (b) i_p e (c) E_p para cada tipo de solução tampão ($n = 3$).





A otimização da concentração do eletrólito de suporte foi realizada em seguida, com valores de 0,1 a 0,5 mol L⁻¹ da solução PBS (pH 2). A Figura 22 compila (a) os voltamogramas para MEL 5,0×10⁻⁵ mol L⁻¹, (b) os valores de i_p e (c) de E_p . A concentração de PBS geradora de um sinal definido e com maior intensidade foi a de 0,2 mol L⁻¹, sendo esta designada para estudos eletroanalíticos subsequentes.

Figura 22. (a) Voltamogramas obtidos por DPV para MEL 5,0×10⁻⁵ mol L⁻¹ em soluções tampão PBS 0,1 a 0,5 mol L⁻¹ (pH 2), utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50$ mV, $t_p = 5$ ms e $v = 50$ mV s⁻¹. Valores de (b) i_p e (c) E_p para cada concentração ($n = 3$).



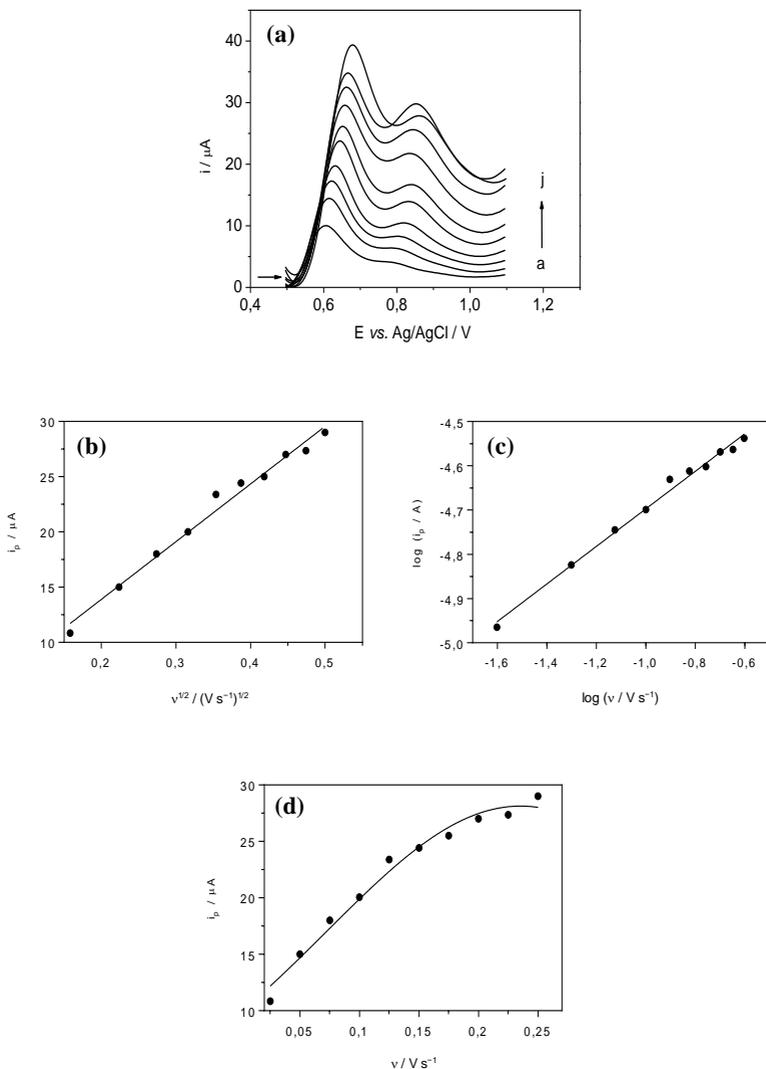
Experimentos de velocidade de varredura foram realizados em solução PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) para conhecimento do processo determinante da transferência eletrônica. Devido à dificuldade de proceder tais estudos por DPV, visto que os sinais não apresentaram deslocamento proporcional com o aumento da velocidade de varredura, estes foram realizados por SWV e com os seguintes parâmetros: incremento de potencial (ΔE_s) = 5 mV, a = 50 mV e variação da frequência de pulso (f) entre 5 e 50 Hz. Ressalta-se que a velocidade de varredura por SWV é calculada multiplicando-se ΔE_s e f . Portanto o estudo de velocidade de varredura deu-se no intervalo entre 25 a 250 mV s⁻¹ e os voltamogramas são apresentados na Figura 23a.

Nota-se que os valores de potencial sofreram deslocamento para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, o que está de acordo com o comportamento característico de reações irreversíveis [129].

A partir dos valores obtidos com o estudo da velocidade foi investigada a relação entre os valores de i_p e o quadrado da velocidade de varredura (função corrente). Na Figura 23b é apresentada a curva obtida e sua tendência linear ($R^2 = 0,9846$), o que indica que a etapa determinante da reação de oxidação da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ consiste em um processo controlado por difusão. Para confirmar esta indicação, na Figura 23c é plotado o gráfico do logaritmo da corrente de pico ($\log i_p$) vs. logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$). O comportamento linear ($R^2 = 0,9920$) e a equação $\log i = 0,4243 \log v - 4,273$ evidenciam uma reta com o valor de coeficiente angular igual a 0,4243. De acordo com a literatura científica, valores iguais ou próximos à 0,5 indicam um processo controlado por difusão [129]. Portanto, pode-se afirmar que a etapa determinante da reação de oxidação da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ consiste em um processo difusional.

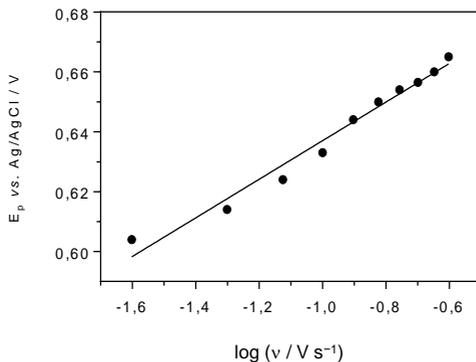
Adicionalmente, o gráfico da corrente de pico (i_p) vs. velocidade de varredura (v) – Figura 23d foi gerado para confirmar que o processo determinante não é controlado por adsorção. Caso a curva fosse linear, o processo seria adsorptivo, entretanto, é evidente uma tendência não linear da curva, o que corrobora com os resultados anteriores e reafirma um processo do tipo difusional.

Figura 23. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2), utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic+Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e f entre 5 e 50 Hz. (a) 25, (b) 50, (c) 75, (d) 100, (e) 125, (f) 150, (g) 175, (h) 200, (i) 225 e (j) 250 mV s^{-1} . (b) i_p vs. $v^{1/2}$, (c) $\log i_p$ vs. $\log v$ e (d) i_p vs. v .



Para finalizar os estudos eletroquímicos, foi plotado o gráfico correlacionando o E_p e $\log v$ (Figura 24).

Figura 24. Gráfico dos valores de E_p vs. $\log v$ obtidos a partir do estudo de velocidade de varredura.



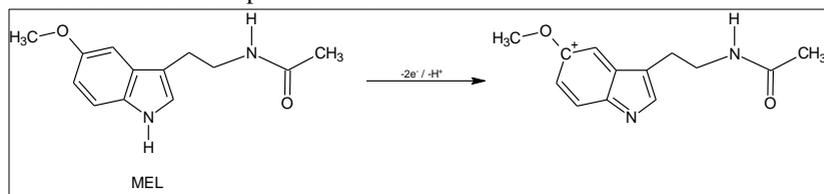
Percebe-se um deslocamento linear ($R^2 = 0,9761$) dos valores de E_p com relação ao $\log v$ e obtenção da equação $E_p = 0,06444 \log v + 0,7014$. Utilizando-se da equação de Laviron [112][130] – Equação 2 para cálculo do número de mols de elétrons envolvidos (n), sendo que $E^{o'}$ é o potencial formal de redução, R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura (298 K), α o coeficiente de transferência eletrônica, F a constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$) e k^o a constante de velocidade heterogênea, tem-se que:

$$E_p = E_o + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log \left(\frac{RT k^o}{\alpha n F} \right) + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log v \quad (2)$$

Desta maneira, a partir da correlação dos valores de E_p e $\log v$, o coeficiente angular obtido pode ser igualado à $\left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right)$. Atribuindo a α o valor de 0,5, pois o processo de transferência eletrônica é irreversível [47], tem-se que o número de mols de elétrons transferidos entre a MEL e a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ vale 1,8, valor este que pode ser aproximado à 2. Este resultado corrobora com o obtido no estudo anterior de pH, onde fora encontrado o envolvimento de 2 mols de elétrons para 1 mol de prótons.

Assim sendo, conclui-se que a oxidação da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ apresenta um processo determinante controlado por difusão e envolve a participação proporcional de 2 mols de elétrons para 1 mol de prótons. Um mecanismo é proposto na Figura 25 e está em concordância a outros já reportados [58][115][127][128][131].

Figura 25. Mecanismo proposto para a oxidação da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻.



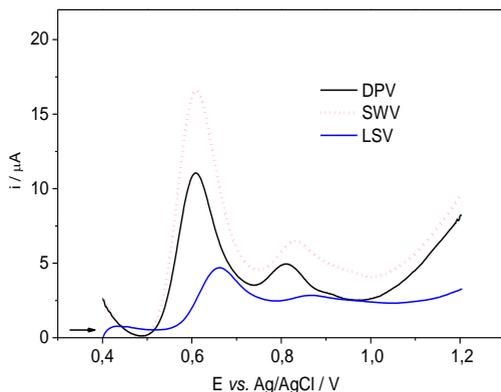
Fonte. Adaptado de Cincotto et al., 2018 [58]; Kumar et al., 2016 [115]; Levent, A., 2012 [127]; Santander et al., 2001 [128]; Apetrei, I. M.; Apetrei, C., 2016 [131].

5.3 ESTUDOS ELETROANALÍTICOS

5.3.1 Seleção da técnica voltamétrica

Com o enfoque analítico para o desenvolvimento de um método sensível para a determinação de MEL em amostras biológicas *a posteriori*, foram utilizados três diferentes modos de varredura de potenciais, sendo eles a voltametria linear (LSV), de pulso diferencial (DPV) e de onda quadrada (SWV). O comparativo entre a magnitude e perfil do sinal voltamétrico são apresentados na Figura 26. As respostas de corrente de pico são mais intensas em DPV e SWV. Isto é coerente com o fato de que tais modos minimizam a contribuição da corrente capacitiva gerada pelo carregamento da dupla camada elétrica, deixando o sinal mais definido. Para SWV o sinal de corrente foi o maior entres os três modos e, portanto, escolhido para estudos posteriores.

Figura 26. Voltamogramas obtidos por DPV, SWV e LSV para MEL $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $\nu = 50$ mV s⁻¹.

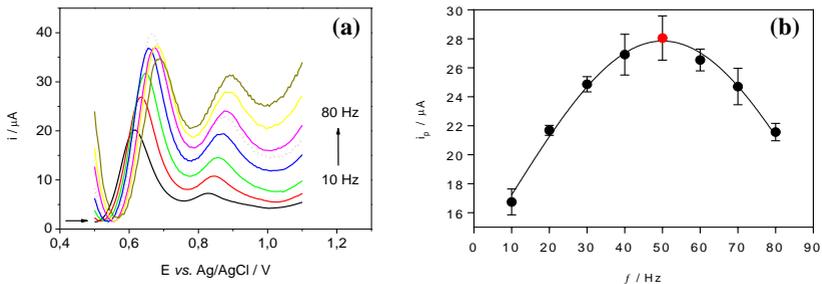


5.3.1.1 Otimização dos parâmetros para SWV

Após a escolha do modo de operação voltamétrico, o qual fora a voltametria de onda quadrada, fez-se necessária a otimização dos parâmetros que a compõem com o intuito de obter um melhor compromisso analítico entre intensidade de corrente e perfil voltamétrico. Os parâmetros otimizados, e que serão aplicados a seguir na avaliação das figuras de mérito do método, foram frequência de pulso (f), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude de pulso (a), respectivamente.

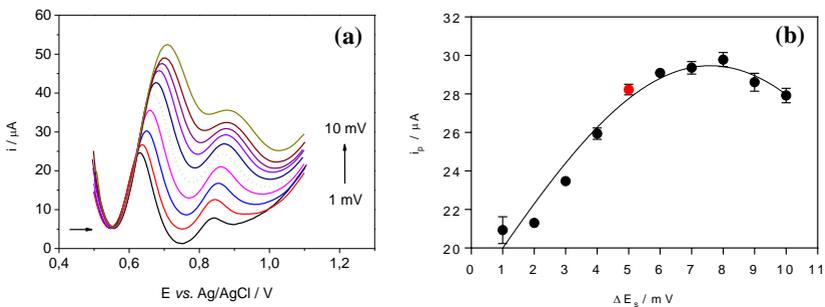
A frequência de pulso é o primeiro parâmetro para ser otimizado em SWV, visto que faz parte da composição do valor total da velocidade de varredura e contribui majoritariamente para este. Para reações irreversíveis, o aumento da frequência é um dos artifícios para a melhora do sinal analítico, pois se as outras variáveis forem fixadas, a sensibilidade é dada em função apenas da frequência [132]. Logo, o valor de f variou entre 10 e 80 Hz, mantendo fixas a amplitude em 50 mV e o incremento de potencial em 5 mV. A Figura 27a traz os voltamogramas obtidos para esta otimização e a Figura 27b uma distribuição dos valores de i_p com a mudança da frequência. O maior valor de corrente foi obtido para $f = 50$ Hz e este utilizado nos experimentos seguintes.

Figura 27. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e f entre 10 e 80 Hz. (b) Gráfico de i_p vs. f ($n = 3$).



Em seguida, o incremento de potencial foi otimizado. O aumento do valor de ΔE_s também contribuiu para a melhora da sensibilidade analítica [132], visto que integra o cálculo da velocidade de varredura e também reflete na definição do voltamograma. Por conseguinte, o valor de ΔE_s variou entre 1 e 10 mV, mantendo fixos os valores de $a = 50 \text{ mV}$ e de $f = 50 \text{ Hz}$. A Figura 28a compreende os voltamogramas obtidos e a Figura 28b uma distribuição dos valores de i_p com o aumento de ΔE_s . Foi escolhido o valor de 5 mV, mesmo com o sinal de maior corrente estar vinculado a 8 mV de incremento. Tal decisão foi pautada na definição do sinal analítico, comprometido em valores superiores a 5 mV.

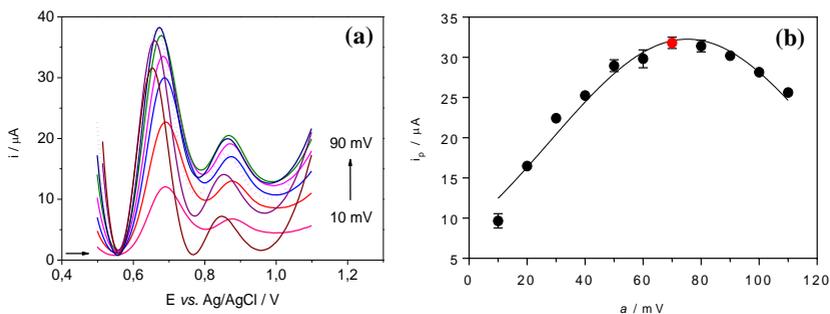
Figura 28. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $a = 50 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$ e ΔE_s variando entre 1 e 10 mV. (b) Gráfico de i_p vs. ΔE_s ($n = 3$).



Até este momento, é relevante ressaltar que o valor de velocidade de varredura otimizado foi de 250 mV s^{-1} . Isto indica que a transferência eletrônica da MEL sobre a plataforma consiste em um processo relativamente alto e que o valor de v necessita ser elevado para poder acompanhar tal reação. Segundo Christie e colaboradores [133], reações irreversíveis e de cinética com velocidades maiores do que 200 mV s^{-1} geram sinais de corrente mais intensos no modo onda quadrada, postulado que corrobora com o obtido até então na otimização dos parâmetros em SWV.

Por fim, fora otimizado o valor de amplitude de pulso, parâmetro também relevante para aumento da sensibilidade analítica [132]. Logo, o valor de a variou entre 10 e 90 mV, mantendo fixos os valores de $f = 50 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. A Figura 29a compreende os voltamogramas obtidos e a Figura 29b uma distribuição dos valores de i_p com o aumento da amplitude de pulso. Buscando um compromisso entre o sinal de corrente e o perfil do voltamograma, fora escolhido o valor de 70 mV para a amplitude de pulso.

Figura 29. (a) Voltamogramas obtidos por SWV para MEL $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e a variando entre 10 e 90 mV. (b) Gráfico de i_p vs. a ($n = 3$).



Os parâmetros, intervalos e valores selecionados para a aplicação no desenvolvimento e avaliação das figuras de mérito do método analítico estão compilados na Tabela 2.

Tabela 2. Otimização dos parâmetros de SWV para determinação de melatonina.

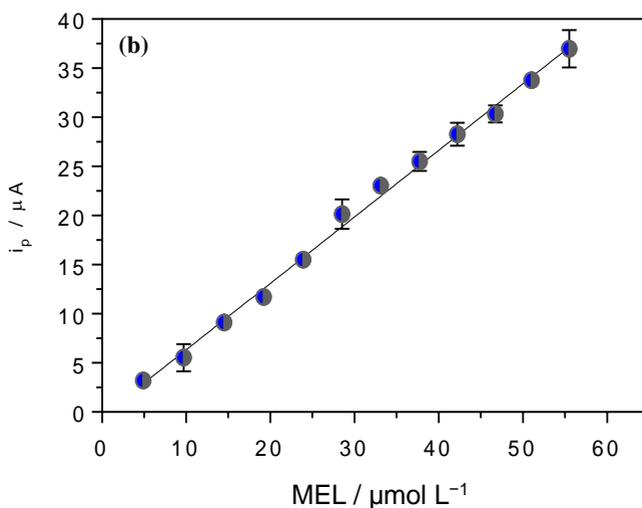
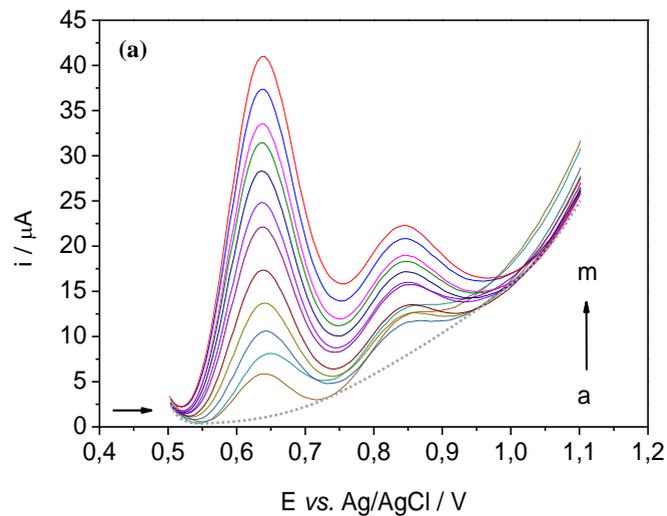
Parâmetro	Modo/Intervalo de estudo	Modo/Valor selecionado
Modo de operação	LSV, DPV ou SWV	SWV
Frequência (<i>f</i>)	10 a 80 Hz	50 Hz
Incremento (ΔE_s)	1 a 10 mV	5 mV
Amplitude (<i>a</i>)	10 a 90 mV	70 mV

5.4 AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO ELETROANALÍTICO

5.4.1 Construção da curva de calibração externa para a melatonina e estudos de precisão

Após a otimização dos parâmetros, foi construída uma curva de calibração externa com adições sucessivas de MEL na célula. A Figura 30a apresenta os voltamogramas obtidos por SWV para várias concentrações de MEL em eletrólito de suporte PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2). Observa-se um sinal definido em +0,640 V, cuja magnitude da corrente aumenta com o aumento da concentração de MEL em um intervalo de 4,9 a 55,5 μmol L⁻¹. Para concentrações de MEL acima de 55,5 μmol L⁻¹ não foi observado aumento na intensidade de corrente, sugerindo uma saturação da superfície da plataforma eletroquímica. Na Figura 30b encontra-se a curva de calibração para a MEL e a equação matemática linear que rege a relação entre concentração do analito e corrente é dada por $i_p = 0,6771 [\text{MEL}] - 0,4339$ ($R^2 = 0,9936$), onde i_p é a corrente de pico em μA e [MEL] é a concentração de MEL em μmol L⁻¹.

Figura 30. (a) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações de MEL em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻. [MEL]: (a) branco; (b) 4,9; (c) 9,7; (d) 14,5; (e) 19,2; (f) 23,9; (g) 28,5; (h) 33,1; (i) 37,7; (j) 42,2; (k) 46,7; (l) 51,0 e (m) 55,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 70 \text{ mV}$. (b) Curva de calibração externa para MEL ($n = 4$).



Os limites de detecção (LoD) – Equação 3 e de quantificação (LoQ) – Equação 4 foram calculados de acordo com o recomendado pela IUPAC [58]]:

$$LoD = \frac{3,3\sigma}{ca} \quad (3)$$

$$LoQ = \frac{10\sigma}{ca} \quad (4)$$

Onde σ é o desvio padrão da média da leitura de dez brancos no potencial de pico ($1,55 \pm 0,32$) e ca o coeficiente angular (0,6771) obtido a partir da regressão linear da curva de calibração. Os valores obtidos correspondem ao nível de confiança de 95% e foram $LoD = 1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $LoQ = 4,7 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Outro parâmetro a ser analisado foi a repetibilidade. Primeiramente foi avaliada a repetibilidade intra-dia com MEL $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻, em PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) e sob as condições otimizadas conforme Tabela 3. Já a análise inter-dia foi feita sob as mesmas circunstâncias e condições utilizadas para a intra-dia. As fórmulas utilizadas para cada situação foram:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})}{n - 1}} \quad (5)$$

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde para as medidas de corrente s é o desvio padrão absoluto, x_i o valor de cada, \bar{x} a média dos valores e n o número de ensaios. O desvio padrão relativo (RSD) obtido para as medidas intra-dia foi 1,3% ($n = 7$) e para inter-dia 3,6% ($n = 7$). Portanto, os valores obtidos mostraram que a determinação de MEL se utilizando da plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ apresenta boa repetibilidade mesmo em momentos diferentes do mesmo dia e em dias distintos.

Parâmetros e valores oriundos dos estudos até aqui mencionados estão compilados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros e valores para MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico (V)	+0,640
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4,9 a 55,5
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9936
Coefficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,6771
Desvio padrão do coeficiente angular ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	0,008012
Coefficiente linear (μA)	-0,4339
Desvio padrão do coeficiente linear (μA)	0,2745
LoD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,6
LoQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4,7
Repetibilidade intra-dia ^{a,b}	1,3
Repetibilidade inter-dia ^{a,b}	3,6

^a RSD – Desvio padrão relativo (%).

^b $n = 7$.

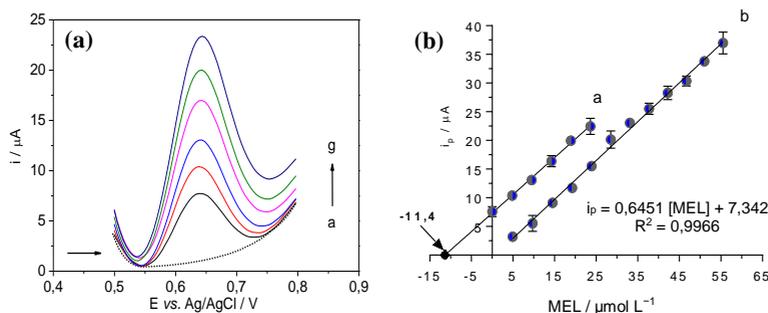
5.4.2 Determinação de melatonina em fluidos humanos simulados

Nesta etapa foi verificada a aplicabilidade da plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ para a determinação de MEL em amostras simuladas de saliva, urina e soro sanguíneo conforme procedimento experimental descrito na seção 4.3.5. Foram construídas curvas por adição de padrão para cada amostra com o intuito de minimizar o efeito de matriz. Visto que o sinal de interesse analítico é dado somente pelo primeiro pico de oxidação, o intervalo de varredura de potencial foi reduzido para valores entre +0,5 e +0,8 V para todas as amostras.

Na Figura 31a são apresentados os voltamogramas obtidos para MEL em amostra de saliva. São representados (a) branco, (b) amostra e (c-g) adições sucessivas de solução padrão de melatonina. Nota-se que os sinais apresentam picos bem definidos em +0,640 V e os valores de i_p crescem com o acréscimo das alíquotas de MEL. Na Figura 31b encontram-se as curvas construídas por (a) adição de padrão e (b) curva de calibração externa. Por extrapolação da curva de adição de padrão nota-se que a concentração de MEL foi de $11,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, representando um valor teórico de $11,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ conforme o processo de fortificação. Por fim, o valor presente de MEL na saliva sintética foi de $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, indicando um valor de recuperação de 97,1%.

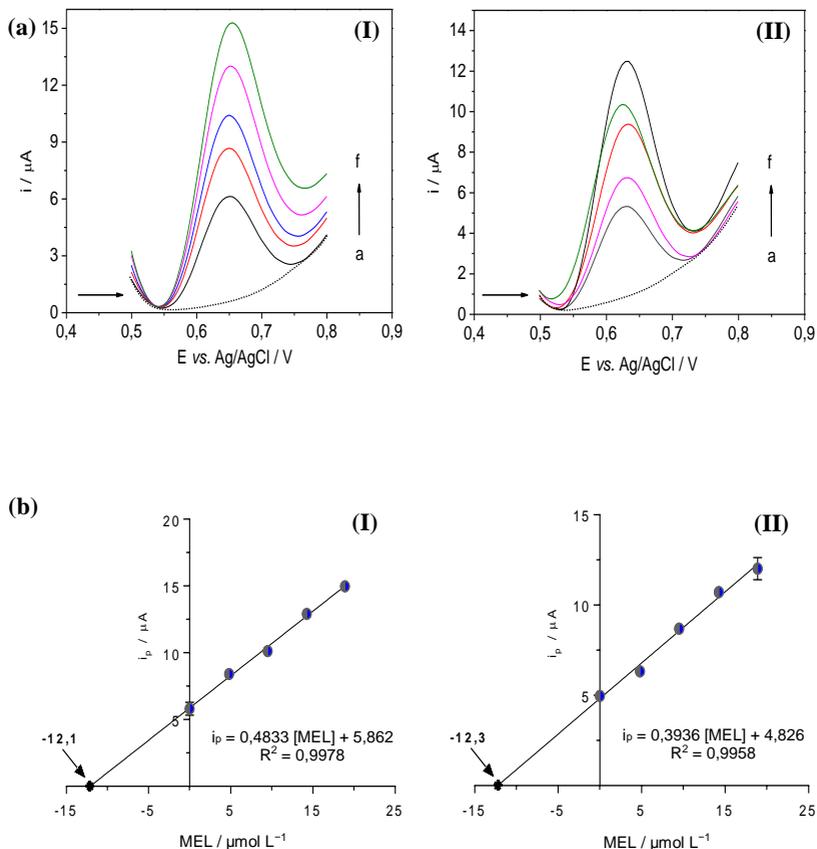
Ademais, verifica-se na Figura 31b que o valor do coeficiente angular da curva de adição de padrão na saliva ($0,6451 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$) é muito próximo ao da curva de calibração externa ($0,6771 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$), similaridade que indica a ausência de interferência dos componentes da matriz durante a determinação da MEL. Segundo Almeida e colaboradores [43], a concentração de MEL na saliva consiste em 40% da presente em soro sanguíneo; entretanto, sua quantificação é vantajosa, já que os procedimentos de coleta não são invasivos. Sendo assim, o método aqui proposto é seletivo e aplicável na determinação de MEL em saliva.

Figura 31. (a) Voltamogramas de onda quadrada para (a) branco; (b) amostra; (c-g) adições sucessivas de $50 \mu\text{L}$ de solução padrão MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 70 \text{ mV}$. (b) Curva de (a) adição de padrão e (b) calibração externa para saliva ($n = 4$).



A determinação de MEL nas amostras de urina e soro sanguíneo simuladas seguiram as mesmas quantidades de fortificação, procedimentos e parâmetros utilizados na saliva. A Figura 32a apresenta os voltamogramas obtidos para MEL e na Figura 32b encontram-se as curvas construídas pelo método de adição de padrão. Os numerais (I) e (II) indicam dados provenientes da amostra de soro sanguíneo e urina, respectivamente.

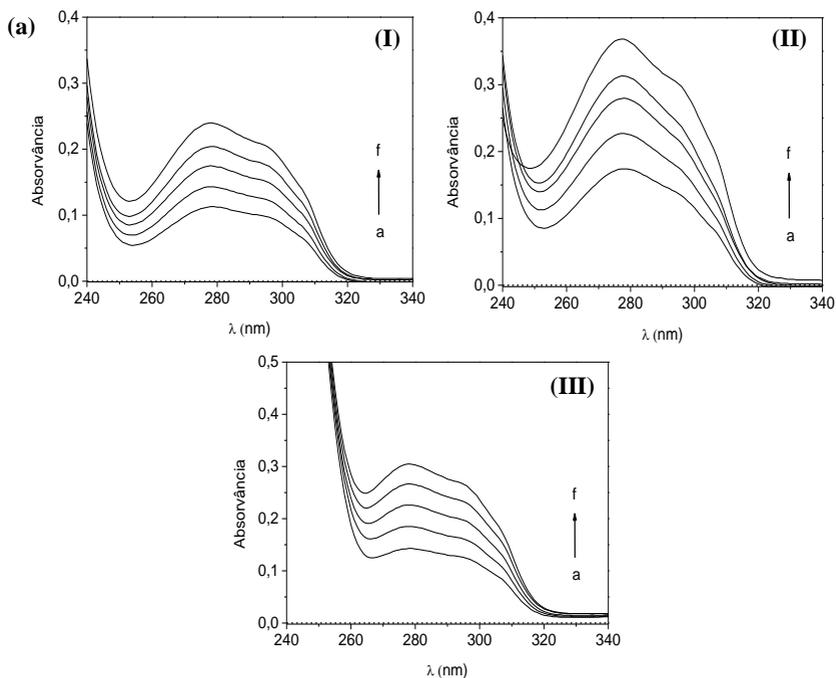
Figura 32. (a) Voltamogramas de onda quadrada para amostra de (I) soro sanguíneo e (II) urina; (a) branco; (b) amostra; (c-f) adições sucessivas de 50 μL de solução padrão MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2) utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻; $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $a = 70 \text{ mV}$. (b) Curva por adição de padrão para (I) soro sanguíneo e (II) urina, ($n = 4$).

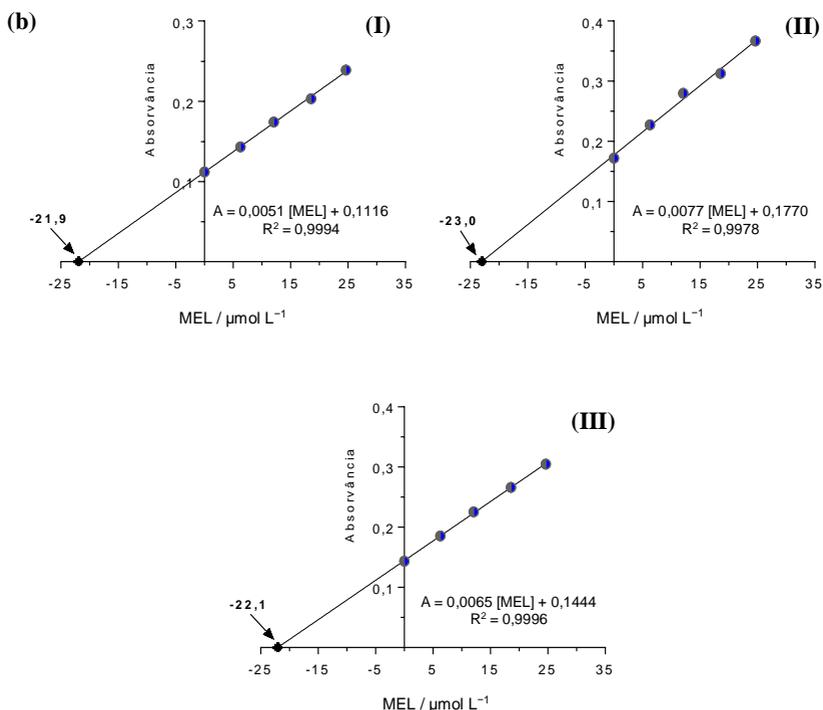


Por extrapolação das curvas obteve-se uma concentração de MEL igual a 12,1 e 12,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo o valor teórico de 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ conforme o processo de fortificação. Sabendo-se que o valor adicionado nas amostras foi de $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, os valores de recuperação nas amostras de soro sanguíneo e urina foram 103,4% e 104,3%, respectivamente.

Para verificação da exatidão do método proposto, foram comparados os resultados obtidos por espectrometria UV-vis pela coleta de dados no comprimento de onda máximo igual a 278 nm baseando-se no artigo de Zafra-rolbán et al. [119]. Curvas de calibração por adição de padrão foram construídas para as três amostras. Os espectros obtidos e as curvas de calibração para a MEL são apresentados na Figura 33a e Figura 33b, respectivamente. Os numerais (I), (II) e (III) indicam dados provenientes da amostra de saliva, soro sanguíneo e urina.

Figura 33. (a) Espectros obtidos para as amostras de (I) saliva, (II) soro sanguíneo e (III) urina; (a) branco; (b) amostra; (c-f) adições sucessivas de 20 μL de solução padrão MEL $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2). (b) Curvas de calibração por dição de padrão para (I) saliva, (II) soro sanguíneo e (III) urina; ($n = 4$).





Por extrapolação das curvas os valores achados para MEL em saliva, soro sanguíneo e urina foram 21,9; 23,0 e 22,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Sabendo-se que a concentração de MEL adicionada nas amostras era de $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, os valores de recuperação para cada amostra foram de 97,0% para saliva, 101,8% para soro sanguíneo e 98,6% para urina.

Para conferir confiabilidade estatística ao método proposto, foram aplicados dois testes, sendo eles o t de Student e o teste F . As equações matemáticas são:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_a \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$F = \frac{S_{maior}^2}{S_{menor}^2}$$

Onde \bar{x}_1 é a média dos valores obtidos pela técnica voltamétrica, \bar{x}_2 a média proveniente das leituras espectrométricas, S_a o valor do desvio padrão agregado, n_1 o número de replicatas da voltametria e n_2 da espectrometria e S o desvio padrão amostral de cada uma delas.

O valor de F calculado para as amostras de saliva, soro sanguíneo e urina foram 2,32; 5,23 e 2,46, respectivamente. Tais resultados mostraram-se inferiores ao valor de F crítico que é 9,28 (para três graus de liberdade). Logo, pode-se dizer que não houve diferença significativa para a precisão dos valores obtidos em cada amostra a partir dos dois métodos para um nível de confiança de 95%.

O teste t foi utilizado para os três tipos de amostra. Os valores correspondentes à saliva, soro e urina foram de 0,0600; 0,527 e 1,644. O valor de t crítico para seis graus de liberdade é 2,447 (nível de confiança de 95%), indicando que não houve diferença significativa nos valores médios obtidos no novo método proposto e no utilizado para nível comparativo. Portanto, o método voltamétrico pode ser usado como alternativa ao espectrométrico. A Tabela 4 resume os parâmetros estatísticos obtidos a partir das determinações de MEL em amostras de fluidos humanos sintéticos para as duas técnicas utilizadas.

A técnica de UV-vis pode ser utilizada para a determinação da MEL. Entretanto, por haver a incidência de um feixe de luz diretamente sobre a amostra, a melatonina degrada-se, provocando uma possível mudança espectral [119]. Isto foi observado durante as medidas, as quais, para contornar o problema da fotossensibilidade, tiveram de ser realizadas rapidamente e com um módulo de escaneamento rápido, diminuindo a resolução dos espectros. Sendo assim, o método voltamétrico aqui proposto vem ao encontro da característica do analito em questão, pois a realização das medidas à meia-luz ambiente é suficiente para garantir dados confiáveis e de alta qualidade analítica.

Tabela 4. Parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo MEL.

Amostra Técnica	Saliva		Soro sanguíneo		Urina	
	SWV	UV-vis	SWV	UV-vis	SWV	UV-vis
Adicionado ^a		7,0 ^b		7,0 ^b		7,0 ^b
Encontrado ^a	6,8 ^b	6,79 ^b	7,24 ^b	7,13 ^b	7,3 ^b	6,9 ^b
Recuperado (%) ^c	97,1	97,0	103,4	101,8	104,3	98,6
Erro (%) ^d		0,15		1,54		5,8
RSD (%) ^a	1,2	0,8	2,25	1,00	3,0	2,0
F_{valor}^e		2,32		5,23		2,46
f_{valor}^f		0,0600		0,527		1,644

^a $n = 4$. ^b $\times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

^c Recuperado = [(Valor encontrado / Valor adicionado) \times 100].

^d Erro = [(Método proposto – Método comparativo) / (Método comparativo)] \times 100.

^e $F_{\text{crítico}} = 9,28$. ^f $f_{\text{crítico}} = 2,447$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma nova plataforma eletroquímica foi desenvolvida a partir da modificação de uma superfície de carbono vítreo com a deposição de um filme de AuNps estabilizadas no polímero Si4Pic⁺Cl⁻ e f-MWCNTs para determinação de MEL em amostras biológicas simuladas.

As nanopartículas de ouro foram caracterizadas por DLS e TEM, mostrando um diâmetro médio de 8,651 nm e de 5 nm, respectivamente. A estabilização das AuNps no silsesquioxano ocorreu pelo mecanismo eletroestéreo, sem a formação de agregados conforme acompanhadas por UV-vis. Os f-MWCNTs mostraram boa dispersão em Nafion[®] 117 e exibiram um potencial ζ mais negativo do que os nanotubos não funcionalizados, o que indicou uma satisfatória funcionalização em meio ácido.

A junção das AuNps e dos f-MWCNTs foi identificada por TEM, mostrando uma aproximação dos dois materiais e a composição de uma estrutura integrada. Fatores como as cargas positivas das AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ e negativas dos MWCNTs podem indicar tal proximidade.

A caracterização tridimensional das plataformas eletroquímicas deu-se por FEG-SEM e, análises por EIS e CV, revelaram que a GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ apresentou o menor perfil impedimétrico e a maior condutividade elétrica, além da atividade eletrocatalítica provinda da junção das AuNps e dos f-MWCNTs. Estudos de mecanismo elucidaram que a oxidação da MEL sobre a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ ocorreu com a transferência de um mol de prótons para dois de elétrons, sendo um processo irreversível e controlado por difusão.

O método eletroanalítico desenvolvido para a determinação de MEL foi otimizado no modo SWV com os seguintes parâmetros: $f = 50$ Hz, $\Delta E_s = 5$ mV, $a = 70$ mV em solução tampão PBS 0,2 mol L⁻¹ (pH 2). A curva de calibração abrangeu a faixa de trabalho de 4,9 a 55,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9936$) com LoD e LoQ de 1,6 e 4,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A determinação de MEL foi realizada em amostras sintéticas de saliva, soro sanguíneo e urina, gerando resultados satisfatórios e validados por testes estatísticos. Por fim, o método utilizando a plataforma GCE/f-MWCNTs-AuNps-Si4Pic⁺Cl⁻ para determinação de melatonina conferiu figuras de mérito de qualidade e mostrou-se potencial detector em amostras de fluidos biológicos reais.

Com o intuito de minimizar os valores de LoD e LoQ, experimentos serão conduzidos com pré-concentração. Sendo assim, o método aqui proposto poderá abranger tanto compostos com alta concentração de MEL, tais como medicamentos e suplementos, assim como com baixa concentração, como é o caso de fluido biológicos reais. Por fim, serão estudados possíveis interferentes das matrizes de saliva, soro sanguíneo e urina.

REFERÊNCIAS

- [1] Terauchi, M.; Tamura, A.; Yamaguchi, S.; Yui, N. *Enhanced cellular uptake and osteogenic differentiation efficiency of melatonin by inclusion complexation with 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin*. **Int. J. Pharm.**, vol. 547, n. 1-2, p. 53-60, 2018.
- [2] Majidinia, M., Reiter, R. J.; Shakouri, S. K.; Yousefi, B. *The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing*. **Ageing Res. Rev.**, vol. 47, p. 198-213, 2018.
- [3] Lerner, A. B.; Case, J. D.; Takahashi, Y.; Lee, T. H.; Mori, W. *Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes*. **J. Am. Chem.**, vol. 80, n. 10, p. 2587, 1958.
- [4] Baandrup, L.; Glenthøj, B. Y.; Jennum, P. J. *Objective and subjective sleep quality: Melatonin versus placebo add-on treatment in patients with schizophrenia or bipolar disorder withdrawing from long-term benzodiazepine use*. **Psychiatry Res.**, vol. 240, p. 163–169, 2016.
- [5] Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Manchester, L. C.; Paredes, S. D.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M. *Melatonin and reproduction revisited*. **Biol. Reprod.**, vol. 81, n. 3, p. 445-456, 2009.
- [6] Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Korkmaz, A. *The circadian melatonin rhythm and its modulation: Possible impact on hypertension*. **J. Hypertens.**, vol. 27, n. 6, p. S17–S20, 2009.
- [7] Esposito, E.; Cuzzocrea, S. *Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system*. **Curr. Neuropharmacol.**, vol. 8, n. 3, p. 228-242, 2010.
- [8] Mańka, S.; Majewska, E. *Immunoregulatory action of melatonin: The mechanism of action and the effect on inflammatory cells*. **Postepy Hig. Med. Dosw.**, vol. 70, n. 0, p. 1059–1067, 2016.
- [9] Macchi, M. M.; Bruce, J. N. *Human pineal physiology and functional significance of melatonin*. **Front. Neuroendocrinol.**, vol. 25, n. 3-4, p. 177-195, 2004.

- [10] Adamczyk-Sowa, M.; Pierzchala, K.; Sowa, P.; Mucha, S.; Sadowska-Bartos, I.; Adamczyk, J.; Hartel, M. *Melatonin acts as antioxidant and improves sleep in MS patients*. **Neurochem. Res.**, vol. 39, n. 8, p. 1585–1593, 2014.
- [11] Pacini, N.; Borziani, F. *Oncostatic-cytoprotective effect of melatonin and other bioactive molecules: A common target in mitochondrial respiration*. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 17, n. 3, p. 1-27, 2016.
- [12] Sabzichi, M.; Samadi, N.; Mohammadian, J.; Hamishehkar, H.; Akbarzadeh, M.; Molavi, O. *Sustained release of melatonin: a novel approach in elevating efficacy of tamoxifen in breast cancer treatment*. **Colloids Surf., B**, vol. 145, p. 64-71, 2016.
- [13] Babu, R. J.; Dayal, P.; Singh, M. *Effect of cyclodextrins on the complexation and nasal permeation of melatonin*. **Drug Delivery**, vol. 15, n. 6, p. 381–388, 2008.
- [14] Crespi, F. *Influence of melatonin or its antagonism on alcohol consumption in ethanol drinking rats: A behavioral and in vivo voltammetric study*. **Brain Res.**, vol. 1452, p. 39-46, 2012.
- [15] Kazemi, R.; Motamedzade, M.; Golmohammadi, R.; Mokarami, H.; Hemmatjo, R.; Heidarimoghadam, R. *Field Study of Effects of Night Shifts on Cognitive Performance, Salivary Melatonin, and Sleep*. **SH W**, vol. 9, n. 2, p. 203-209, 2018.
- [16] Rouch, I.; Wild, P.; Ansiau, D.; Marquié, J.-C. *Shiftwork experience, age and cognitive performance*. **Ergonomics**, vol. 48, n. 10, p. 1282-1293, 2005.
- [17] Costa, G. *Shift work and occupational medicine: an overview*. **Occup. Med.**, vol. 53, n. 2, p. 83-88, 2003.
- [18] Haidarimoghadam, R.; Kazemi, R.; Motamedzadeh, M.; Golmohammadi, R.; Soltanian, A.; Zoghiyaydar, M. R. *The effects of consecutive night shifts and shift length on cognitive performance and sleepiness: a field study*. **Int. J. Occup. Saf. Ergon.**, vol. 23, n. 2, p. 251-258, 2017.

- [19] Yazdi, Z.; Sadeghniaat-Haghighi, K.; Loukzadeh, L.; Elmizadeh, K.; Abbasi, M. *Prevalence of Sleep Disorders and Their Impacts on Occupational Performance: A Comparison between Shift Workers and Nonshift Workers*. **Sleep Disord.**, vol. 2014, p. 1-5, 2014.
- [20] Fricke-Oerkermann, L.; Plück, J.; Schredl, M.; Heinz, K.; Mitschke, A.; Wiater, A.; Lehmkuhl, G. *Prevalence and course of sleep problems in childhood*. **Sleep**, vol. 30, n. 10, p. 1371–1377, 2007.
- [21] Meijer, A. M. *Chronic sleep reduction, functioning at school and school achievement in preadolescents*. **J. Sleep Res.**, vol. 17, n. 4, p. 395-405, 2008.
- [22] Meijer, A. M.; Reitz, E.; Deković, M.; van Den Wittenboer; Godfried, L. H.; Stoel, R. D. *Longitudinal relations between sleep quality, time in bed and adolescent problem behaviour*. **J. Child. Psychol. Psychiatry**, vol. 51, n. 11, p. 1278-1286, 2010.
- [23] Durmer, J. S.; Dinges, D. F. *Neurocognitive consequences of sleep deprivation*. **Semin. Neurol.**, vol. 25, n. 1, p. 117-129, 2005.
- [24] Blunden, S. L.; Chervin, R. D. *Sleep problems are associated with poor outcomes in remedial teaching programmes: a preliminary study*. **J. Paediatr. Child Health**, vol. 44, n. 5, p. 237-242, 2008.
- [25] Pola, M. L.; Algarra, M.; Becerra, A.; Hernandez, M. *Cyclodextrin enhanced spectrofluorimetric determination of melatonin in pharmaceuticals and urine*. **Anal. Lett.**, vol. 33, n. 5, p. 891–903, 2000.
- [26] *Regulation (EC) 178/2002 of the European Parliament and of the Council laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety*. **Off. J. Eur. Communities**, L31, p. 1-24, 2002.

- [27] *Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements.* **Off. J. Eur. Union**, L183, p. 51-57, 2002.
- [28] *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to melatonin and alleviation of subjective feelings of jet lag (ID 1953), and reduction of sleep onset latency, and improvement of sleep quality (ID 1953) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA).* **EFSA J.**, vol. 8, p. 1467, 2010.
- [29] **ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA esclarece: *melatonina*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/anvisa-esclarece?p_p_id=baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet_assuntoId=13&_baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet_conteudoId=1103&_baseconhecimentoportlet_WAR_baseconhecimentoportlet_view=detalhamentos>. Acesso em Set., 2018.
- [30] Malhotra, S.; Sawhney, G.; Pandhi, P. *The Therapeutic Potential of Melatonin: A Review of the Science.* **MedGenMed**, vol. 6, n. 2, p. 46, 2004.
- [31] Bartsch, H.; Bartsch C. *Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration.* **J. Neural Transm.**, vol. 52, n. 4, p. 269-279, 1981.
- [32] Wright, J.; Aldhous, M.; Franey, C.; English, J.; Arendt, J. *The effect of exogenous melatonin in endocrine function in man.* **Clin. Endocrinol.**, vol. 24, n. 4, p. 375-382, 1986.
- [33] Gwayi, N.; Bernard, R. T. *The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats.* **Andrologia**, vol. 34, n. 6, p. 391-396, 2002.

- [34] Escames, G.; Fernández-Gil, B. I.; Guerra-Librero, A.; Shen, Y.; García-López, S.; Florido, J.; Sayed, R.; Acuña-Castroviejo, D.; Esposito, J. *PO-089: Melatonin enhances the toxicity of radio- and chemotherapy in head and neck cancer cells*. **Radiother. Oncol.**, vol. 122, p. 43-43, 2017.
- [35] Subbaiah, G. K.; Manoj, P.; Mohan, T. R.; Mahadevappa, H.; Mahalingam, S. S.; Subbegowda, R. K.; Kempaiah, K. *Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 438, n. 1, p. 198-204, 2013.
- [36] Ghareghani, M.; Dokoohaki, S.; Ghanbari, A.; Farhadi, N.; Zibara, K.; Khodadoust, S.; Parishani, M.; Ghavamizadeh, M.; Sadeghi, H. *Melatonin exacerbates acute experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing the serum levels of lactate: A potential biomarker of multiple sclerosis progression*. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, vol. 44, n. 1, p. 52–61, 2017.
- [37] Gomez, F. J. V.; Raba, J.; Cerutti, S.; Silva, M. F. *Monitoring melatonin and its isomer in Vitis vinifera cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle*. **J. Pineal Res.**, vol. 52, n. 3, p. 349–355, 2012.
- [38] Mercolini, L.; Mandrioli, R.; Raggi, M. A. *Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: Measurement using a MEPS-HPLC-F method*. **J. Pineal Res.**, vol. 53, n. 1, p. 21–28, 2012.
- [39] Zhao, H.; Wang, Y.; Yuan, B.; Liu, S.; Man, S.; Xu, H.; Lu, X. A *novel LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of melatonin and its two major metabolites, 6-hydroxymelatonin and 6-sulfatoxymelatonin in dog plasma: Application to a pharmacokinetic study*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, vol. 117, p. 390–397, 2016.
- [40] Gomez, F. J. V.; Martín, A.; Silva, M. F.; Escarpa, A. *Microchip electrophoresis-single wall carbon nanotube press-transferred electrodes for fast and reliable electrochemical sensing of melatonin and its precursors*. **Electrophoresis**, vol. 36, n. 16, p. 1880–1885, 2015.

- [41] Bagci, S.; Altuntas, O.; Katzer, D.; Berg, C.; Willruth, A.; Reutter, H.; Bartmann, P.; Müller, A.; Zur, B. *Evaluation of two commercially available ELISA kits for the determination of melatonin concentrations in amniotic fluid throughout pregnancy.* **Ann. Clin. Biochem.**, vol. 54, n. 1, p. 107-113, 2017.
- [42] Juszcak, M.; Krzywińska, A.; Bojanowska, E.; Roszczyk, M. *The role of the cAMP/PKA signalling pathway in the inhibitory influence of melatonin on oxytocin and vasopressin secretion from the rat hypothalamo-neurohypophysial system.* **Endokrynol. Pol.**, vol. 69, n. 5, p. 560-567, 2018.
- [43] De Almeida, E. A.; Di Mascio, P.; Harumi, T.; Spence, D. W.; Moscovitch, A.; Hardeland, R.; Cardinali, D. P.; Brown, G. M.; Pandi-Perumal, S. R. *Measurement of melatonin in body fluids: Standards, protocols and procedures.* **Child's Nerv. Syst.**, vol. 27, n. 6, p. 879–891, 2011.
- [44] Di, W. L.; Kadva, A.; Djahanbakhch, O.; Silman, R. *Radioimmunoassay of bound and free melatonin in plasma.* **Clin. Chem.**, vol. 44, n. 2, p. 304-310, 1998.
- [45] Lemaitre, B. J.; Hartmann, L. *Preparation of anti-melatonin antibodies and antigenic properties of the molecule.* **J. Immunol. Methods**, vol. 32, p. 339–347, 1980.
- [46] Wang, J. **Electroanalytical Chemistry**, 3rd ed. Ed. Wiley-VCH Pub, New Jersey, 2006.
- [47] Bard, A. J.; L. R. Faulkner. **Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications Chemistry**, 2nd ed. Ed. Wiley, New York, 2001.
- [48] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8^a Edição norte-americana, Ed. Cengage, Thomson, São Paulo-SP, 2006.
- [49] Zoski, C. G. **Handbook of Electrochemistry**, 1st ed., Ed. Elsevier Pub, Amsterdam, 2007.

- [50] Jin, W.; Maduraiveeran, G. *Nanomaterial-based environmental sensing platforms using state-of-the-art electroanalytical strategies*. **J. Anal. Sci. Technol.**, vol. 9, n. 1, p. 1-11, 2018.
- [51] Hamann, C. H.; Hamnett, A.; Vielstich, W. **Electrochemistry**, 2nd ed. Ed. Wiley-VCH Pub, Weinheim, 2007.
- [52] O’Dea, J. J.; Osteryoung, J.; Osteryoung, R. A. *Theory of square wave voltammetry for kinetic systems*. **Anal. Chem.**, vol. 53, n. 4, p. 695-701, 1981.
- [53] Wang, J. **Analytical Electrochemistry**, 2nd ed. Ed. Wiley-VCH Pub, New York, 2001.
- [54] Agostinho, S. M. L.; Villamil, R. F. V.; Neto, A. A.; Aranha, H. *O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo*. **Quím. Nova**, vol. 27, n. 5, p. 813-817, 2004.
- [55] Moses, P. R.; Wier, L.; Murray, R. W. *Chemically Modified Tin Oxide Electrode*. **Anal. Chem.**, vol. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.
- [56] Durst, R. A.; Baumer, A. J.; Murray, R. W.; Buck, R. P.; Andrieux, C. P. *Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions (IUPAC recommendation 1997)*. **Pure and App. Chem**, vol. 69, n. 6, p. 1317-1323, 1997.
- [57] Manikandan, P. N.; Dharuman, V. *Electrochemical Simultaneous Sensing of Melatonin, Dopamine and Acetaminophen at Platinum Doped and Decorated Alpha Iron Oxide*. **Electroanalysis**, vol. 29, n. 6, p. 1524–1531, 2017.
- [58] Cincotto, F. H.; Carvalho, D. A. S.; Canevari, T. C.; Toma, H. E.; Fatibello-Filho, O.; Moraes, F. C. *A nano-magnetic electrochemical sensor for the determination of mood disorder related substances*. **RSC Adv.**, vol. 8, n. 25, p. 14040–14047, 2018.

- [59] Molaakbari, E.; Mostafavi, A.; Beitollahi, H. *Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine*. **Sens. Actuators, B**, vol. 208, p. 195–203, 2015.
- [60] Bellido-Milla, D.; Cubillana-Aguilera, L. M.; El Kaoutit, M.; Hernández-Artiga, M. P.; Cisneros, J. L. H.-H.; Naranjo-Rodríguez, I.; Palacios-Santander, J. M. *Recent advances in graphite powder-based electrodes*. **Anal. Bioanal. Chem.**, vol. 405, n. 11, p. 3525–3539, 2013.
- [61] Adams, R. N. *Carbon Paste Electrodes*. **Anal. Chem.**, vol. 30, n. 9, p. 1576–1576, 1958.
- [62] Kalcher, K. *Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis*. **Electroanalysis**, vol. 2, n. 6, p. 419–433, 1990.
- [63] Li, Y.; Li, Y.; Gao, J.; Wang, L.; Zou, L.; Ye, B. *A Novel Strategy of Electrochemically Treated $ZrOCl_2$ Doped Carbon Paste Electrode for Sensitive Determination of Daidzein*. **Electroanalysis**, vol. 27, n. 7, p. 1719–1725, 2015.
- [64] Yamada, S.; Sato, H. *Some Physical Properties of Glassy Carbon*. **Nature**, vol. 193, n. 4812, p. 261–262, 1962.
- [65] Van der Linden, W. E.; Dieker, J. W. *Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry*. **Anal. Chim. Acta**, vol. 119, n. 1, p. 1–24, 1980.
- [66] Dhanjai, Sinha, A.; Lu, X.; Wu, L.; Tan, D.; Li, Y.; Chen, J.; Jain, R. *Voltammetric sensing of biomolecules at carbon based electrode interfaces: A review*. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, vol. 98, p. 174–189, 2018.
- [67] Gao, X.; Gui, R.; Xu, K. Q.; Guo, H.; Jin, H.; Wang, Z. *A bimetallic nanoparticle/graphene oxide/thionine composite-modified glassy carbon electrode used as a facile ratiometric electrochemical sensor for sensitive uric acid determination*. **New J. Chem.**, vol. 42, n. 18, p. 14796–14804, 2018.

- [68] Kwon, S. R.; Elinski, M. B.; Batteas, J. D.; Lutkenhaus, J. L. *Robust and Flexible Aramid Nanofiber/Graphene Layer-by-Layer Electrodes*. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, vol. 9, n. 20, 2017.
- [69] Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y. S.; Dufresne, A.; Danquah, M. K. *Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations*. **Beilstein J. Nanotechnol.**, vol. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018.
- [70] Heiligt, F. J.; Niederberger, M. *The fascinating world of nanoparticle research*. **Mater. Today**, vol. 16, n. 7/8, p. 262–271, 2013.
- [71] Johnson-Mcdaniel, D.; Barrett, C. A.; Sharafi, A.; Salguero, T. T. *Nanoscience of an ancient pigment*. **J. Am. Chem. Soc.**, vol. 135, n. 5, p. 1677–1679, 2013.
- [72] Leonhardt, U. *Optical metamaterials: Invisibility cup*. **Nat. Photonics**, vol. 1, n. 4, p. 207–208, 2007.
- [73] Faraday, M. *The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light*. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, vol. 147, p. 145–181, 1857.
- [74] Martins, M. A.; Trindade, T. *Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico*. **Quím. Nova**, vol. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- [75] Qin, L.; Zeng, G.; Lai, C.; Huang, D.; Xu, P.; Zhang, C.; Cheng, M.; Liu, X.; Liu, S.; Li, B.; Yi, H. “Gold rush” in modern science: Fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing. **Coord. Chem. Rev.**, vol. 359, p. 1–31, 2018.
- [76] Krishna, V. D.; Wu, K.; Su, D.; Cheeran, M. C. J.; Wang, J. P.; Perez, A. *Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety*. **Food Microbiol.**, vol. 75, p. 47–54, 2018.

- [77] Sigma-Aldrich/Merck. **Gold Nanoparticles: Properties and Applications.** Disponível em:<
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>>. Acesso em Dez., 2018.
- [78] Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold.* **Discuss. Faraday Soc.**, vol. 11, p. 55–75, 1951.
- [79] Sierra-Rosales, P.; Torres, R.; Sepúlveda, C.; Kogan, M. J.; Arturo S. J. *Electrochemical Characterization and Electrocatalytic Application of Gold Nanoparticles Synthesized with Different Stabilizing Agents.* **Electroanalysis**, vol. 30, n. 2, p. 386–396, 2018.
- [80] Alim, S.; Vejayan, J.; Yusoff, M. M.; Kafi, A. K. M. *Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review.* **Biosens. Bioelectron.**, vol. 121, p. 125–136, 2018.
- [81] Ji, D.; Liu, Z.; Liu, L.; Low, S. S.; Lu, Y.; Yu, X.; Zhu, L.; Li, C.; Liu, Q. *Smartphone-based integrated voltammetry system for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid with graphene and gold nanoparticles modified screen-printed electrodes.* **Biosens. Bioelectron.**, vol. 119, p. 55–62, 2018.
- [82] Wei, X.; Wang, F.; Yin, Y.; Liu, Q.; Zou, L.; Ye, B. *Selective detection of neurotransmitter serotonin by a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode.* **Analyst**, vol. 135, n. 9, p. 2286–2290, 2010.
- [83] Xue, C.; Wang, X.; Zhu, W.; Han, Q.; Zhu, C.; Hong, J.; Zhou, X.; Jiang, H. *Electrochemical serotonin sensing interface based on double-layered membrane of reduced graphene oxide/polyaniline nanocomposites and molecularly imprinted polymers embedded with gold nanoparticles.* **Sens. Actuators, B**, vol. 196, p. 57–63, 2014.

- [84] Kamatchi, R.; Venkatachalapathy, S. *A Review on Nanofluids: Preparation, Stability: Mechanisms, and Applications*. **J. Nanomater.**, vol. 2012, p. 1–17, 2011.
- [85] Pomogailo, A. *Principles and Mechanisms of Nanoparticle Stabilization by Polymers*. In: **Metallopolymer Nanocomposites**, Ed. Springer Series in Materials Science, vol. 81, Berlin, Heidelberg, 2005.
- [86] Fritz, G.; Willenbacher, N. *Electrosteric stabilization of colloidal dispersions*. **Langmuir**, vol. 8, n. 16, p. 6381 – 6390, 2002.
- [87] Albinati, A.; Faccini, F.; Gross, S.; Kickelbick, G.; Rizzato, S.; Venzo, A. *New methacrylate-functionalized Ba and Ba-Ti oxoclusters as potential nanosized building blocks for inorganic-organic hybrid materials: Synthesis and characterization*. **Inorg. Chem.**, vol. 46, n. 9, p. 3459-3466, 2007.
- [88] Hsu, C. H.; Dong, X. H.; Lin, Z.; Ni, B.; Lu, P.; Jiang, Z.; Tian, D.; Shi, A. C.; Thomas, E. L.; Cheng, S. Z. D. *Tunable affinity and molecular architecture lead to diverse self-assemble supramolecular structures in thin films*. **ACS Nano**, vol. 10, n. 1, p. 919-929, 2016.
- [89] Mir, S. H.; Nagahara, L. A.; Thundat, T.; Mokarian-Tabari, P.; Furukawa, H.; Khosla, A. *Review—Organic-Inorganic Hybrid Functional Materials: An Integrated Platform for Applied Technologies*. **J. Electrochem. Soc.**, vol. 165, n. 8, p. B3137-B3156, 2018.
- [90] Giamberini, M.; Malucelli, G. *Hybrid organic-inorganic UV-cured films containing liquid-crystalline units*. **Thin Solid Films**, vol. 548, p. 150-156, 2013.
- [91] Chen, C.; Tang, Y.; Ye, Y. S.; Xue, Z.; Xue, Y.; Xie, X.; Mai, Y. W. *High-performance epoxy/silica coated silver nanowire composites as underfill material for electronic packaging*. **Compos. Sci. Technol.**, vol. 105, p. 80–85, 2014.

- [92] Qian, Q.; Hu, Q.; Li, L.; Shi, P.; Zhou, J.; Kong, J.; Zhang, X.; Sun, G.; Huang, W. *Sensitive fiber microelectrode made of nickel hydroxide nanosheets embedded in highly-aligned carbon nanotube scaffold for nonenzymatic glucose determination*. **Sens. Actuators, B**, vol. 257, p. 23-28, 2018.
- [93] Ansari, S.; Ansari, M. S.; , Devnani, H.; Satsangee, S. P.; Jain, R. *CeO₂/g-C₃N₄ nanocomposite: A perspective for electrochemical sensing of anti-depressant drug*. **Sens. Actuators, B**, vol. 273, p. 1226–1236, 2018.
- [94] Calaça, G. N.; Erdmann, C. A.; Soares, A. L.; Pessôa, C. A.; Fujiwara, S. T.; Garcia, J. R.; Vidotti, M.; Wohnrath, K. *Layer-by-Layer AuNPs-SiPy⁺/Prussian blue nanoparticles modified electrodes: characterization and electrocatalytic effects*. **Electrochim. Acta**, vol. 249, p. 104–112, 2017.
- [95] Takeuchi, H.; Konno, T.; Mori, H. *Synthesis of multifunctional silsesquioxane nanoparticles with hydroxyl and polymerizable groups for UV-curable hybrid coating*. **React. Funct. Polym.**, vol. 115, p. 43–52, 2017.
- [96] Kawakami, Y. *Structural control and functionalization of oligomeric silsesquioxanes*. **React. Funct. Polym.**, vol. 67, n. 11(SPEC.), p. 1137–1147, 2007.
- [97] Benvenuti, E. V.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Gallas, M. R. *Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel*. **Quím. Nova**, vol. 32, n. 7, p. 1926-1933, 2009.
- [98] Magosso, H. A.; Panteleimonov, A. V.; Kholin, Y. V.; Gushikem, Y. *Synthesis, characterization and metal adsorption properties of the new ion exchanger polymer 3-n-propyl(4-methylpyridinium) silsesquioxane chloride*. **J. Colloid Interface Sci.**, vol. 303, n. 1, p. 18–24, 2006.
- [99] Winiarski, J. P.; de Barros, M. R.; Magosso, H. A.; Jost, C. L. *Electrochemical reduction of sulfite based on gold nanoparticles/silsesquioxane-modified electrode*. **Electrochim. Acta**, vol. 251, p. 522-531, 2017.

- [100] Silva, P. S.; Gasparini, B. C.; Magosso, H. A.; Spinelli, A. *Gold nanoparticles hosted in a water-soluble silsesquioxane polymer applied as a catalytic material onto an electrochemical sensor for detection of nitrophenol isomers*. **J. Hazard. Mater.**, vol. 273, p. 70-77, 2014.
- [101] Santana, E. R.; de Lima, C. A.; Piovesan, J. V.; Spinelli, A. *An original ferroferric oxide and gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode for the determination of bisphenol A*. **Sens. Actuators, B**, vol. 240, p. 487-496, 2017.
- [102] Schroeder, V.; Savagatrup, S.; He, M.; Lin, S.; Swager, T. M. *Carbon Nanotube Chemical Sensors*. **Chem. Rev.**, vol. 119, n. 1, p. 599-663, 2018.
- [103] Park, S.; Vosguerichian, M.; Bao, Z. *A Review of Fabrication and Applications of Carbon Nanotube Film-Based Flexible Electronics*. **Nanoscale**, vol. 5, n. 5, p. 1727-1752, 2013.
- [104] Beitollahi, H.; Movahedifar, F.; Tajik, S.; Jahani, S. *A Review on the Effects of Introducing CNTs in the Modification Process of Electrochemical Sensors*. **Electroanalysis**, vol. 30, p. 1-10, 2018.
- [105] Gooding, J. J. *Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing*. **Electrochim. Acta**, vol. 50, n. 15, p. 3049-3060, 2005.
- [106] Francisco, W.; Ferreira, F. V.; Ferreira, E. V.; Cividanes, L. S.; Coutinho, A. R.; Thim, G. P. *Functionalization of multi-walled carbon nanotube and mechanical property of epoxy-based nanocomposite*. **J. Aerosp. Technol. Manag.**, vol. 7, p. 289-293, 2015.
- [107] He, S.; Yu, Y.; Chen, Z.; Shi, Q.; Zhang, L. *Synergistic Effect of Graphene and Multiwalled Carbon Nanotubes on a Glassy Carbon Electrode for Simultaneous Determination of Uric Acid and Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid*. **Anal. Lett.**, vol. 49, n. 14, p. 248-258, 2014.

- [108] Baghayeri, M.; Amiri, A.; Farhadi, S. *Development of Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on Efficient Loading Ag Nanoparticles on Functionalized Carbon Nanotubes*. **Sens. Actuators, B**, vol. 225, p. 354–362, 2016.
- [109] Shi, Y.; Yang, R.; Yuet, P. K. *Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold nanoparticles and the use of the material as an electrocatalyst*. **Carbon**, vol. 47, n. 4, p. 1146-1151, 2009.
- [110] Jaiswal, N.; Tiwari, I. *Recent build outs in electroanalytical biosensors based on carbon-nanomaterial modified screen printed electrode platforms*. **Anal. Methods**, vol. 9, n. 26, p. 3895-3907, 2017.
- [111] Najari, S.; Bagheri, H.; Monsef-khoshhesab, Z.; Hajian, A.; Afkhami, A. *Electrochemical sensor based on gold nanoparticle-multiwall carbon nanotube nanocomposite for the sensitive determination of docetaxel as an anticancer drug*. **Ionics**, vol. 24, p. 3209-3219, 2018.
- [112] Tavakkoli, N.; Soltani, N.; Shahdost-fard, F.; Ramezani, M.; Salavati, H. *Simultaneous voltammetric sensing of acetaminophen, epinephrine and melatonin using a carbon paste electrode modified with zinc ferrite nanoparticles*. **Microchim. Acta**, vol. 185, n. 10, p. 1-11, 2018.
- [113] Miccoli, A.; Restani, P.; Floroian, L.; Taus, N.; Badea, M.; Cioca, G.; Bungau, S. *Sensitive electrochemical detection method of melatonin in food supplements*. **Rev. Chim. (Bucharest, Rom.)**, vol. 69, n. 4, p. 854-859, 2018.
- [114] Hensley, A. L.; Colley, A. R.; Ross, A. E. *Real-Time Detection of Melatonin Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry*. **Anal. Chem.**, vol. 90, n. 14, p. 8642-8650, 2018.
- [115] Kumar, N.; Rosy; Goyal, R. N. *Nanopalladium grained polymer nanocomposite based sensor for the sensitive determination of Melatonin*. **Electrochim. Acta**, vol. 211, p. 18-26, 2016.

- [116] Smajdor, J.; Piech, R.; Pięk, M.; Paczosa-Bator, B. *Carbon black as a glassy carbon electrode modifier for high sensitive melatonin determination*. **J. Electroanal. Chem.**, vol. 799, p. 278–284, 2017.
- [117] Meyer, J. M. *Corrosion resistance of Nickel-Chromium dental casting alloys*. **Corros. Sci.**, vol. 17, p. 971-982, 1977.
- [118] Parhama, H.; Zargar, B. *Determination of isosorbide dinitrate in arterial plasma, synthetic serum and pharmaceutical formulations by linear sweep voltammetry on a gold electrode*. **Talanta**, vol. 55, n. 2, p. 255-262, 2001.
- [119] Zafra-roldán, A.; Corona-avendaño, S.; Montes-sánchez, R.; Palomar-pardavé, M. *New insights on the spectrophotometric determination of melatonin pKa values and melatonin- β CD inclusion complex formation constant*. **Spectrochim. Acta, Part A**, vol. 190, p. 442-449, 2018.
- [120] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*. **Quím. Nova**, vol. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [121] Sierra, J. A.; Vanoni, C. R.; Tumelero, M. A.; Plá Cid, C. C.; Faccio, R.; Franceschini, D. F.; Creczynski-Pasa, T. B.; Pasa, A. A. *Biogenic approaches using citrus extracts for the synthesis of metal nanoparticles: The role of flavonoids in gold reduction and stabilization*. **New J. Chem.**, vol. 40, n. 2, p. 1420-1429, 2016.
- [122] Bhattacharjee, S. *DLS and zeta potential - What they are and what they are not?* **J. Controlled Release**, vol. 235, p. 337-351, 2016.
- [123] Schneid, A. C.; Roesch, E. W.; Sperb, F.; Matte, U.; Silveira, N. P.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V.; Menezes, E. W. *Silver nanoparticle-ionic silsesquioxane: a new system proposed as an antibacterial agent*. **J. Mater. Chem. B**, vol. 2, n. 8, p. 1079-1086, 2014.

- [124] Kharissova, O. V.; Kharisov, B. I. **Solubilization and dispersion of carbon nanotubes**, E-book, Ed. Springer International Publishing, 2017.
- [125] Carvalho, L. A.; Andrade, A. R.; Bueno, P. R. *Espectroscopia de Impedância Eletroquímica Aplicada ao Estudo das Reações Heterogêneas em ânodos Dimensionalmente estáveis*. **Quím. Nova**, vol. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.
- [126] Radi, A.; Bekhiet, G. E. *Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules*. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, vol. 45, n. 2, p. 275-279, 1998.
- [127] Levent, A. *Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode*. **Diamond Relat. Mater.**, vol. 21, p. 114-119, 2012.
- [128] Santander, P.; Nuñez-Vergara, L. J.; Sturm, J. C.; Squella, J. A. *Voltammetric determination of melatonin and pyridoxine (vitamin b6) in tablets*. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, vol. 46, n. 2, p. 131-136, 2001.
- [129] Nicholson, R. S.; Shain, I. *Theory of Stationary Electrode Polarography*. **Anal. Chem.**, vol. 36, n. 4, p. 706-723, 1964.
- [130] Laviron, E. *Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry*. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.**, vol. 52, n. 3, p. 355-393, 1974.
- [131] Apetrei, I. M.; Apetrei, C. *Voltammetric determination of melatonin using a graphene-based sensor in pharmaceutical products*. **Int. J. Nanomed.**, vol. 11, p. 1859-1866, 2016.
- [132] Souza, D., Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. *Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos*. **Quím. Nova**, vol. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- [133] Christie, J. H.; Turner, J. A.; Osteryoung, R. A. *Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: theory*. **Anal. Chem.**, vol. 49, n. 13, p. 1899-1903, 1977.