



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

Giles Gillyard Gerent

**DETERMINAÇÃO DE DINITROANILINAS COM POTENCIAL PARA SEREM
DESREGULADORES ENDÓCRINOS COM ELETRODOS QUIMICAMENTE
MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS**

Florianópolis

2021

Giles Gillyard Gerent

**DETERMINAÇÃO DE DINITROANILINAS COM POTENCIAL PARA SEREM
DESREGULADORES ENDÓCRINOS COM ELETRODOS QUIMICAMENTE
MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina como um
requisito para a obtenção do Título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

Florianópolis

2021

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

Gerent, Giles Gillyard

DETERMINAÇÃO DE DINITROANILINAS COM POTENCIAL PARA
SEREM DESREGULADORES ENDÓCRINOS COM ELETRODOS QUIMICAMENTE
MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS / Giles
Gillyard Gerent ; orientador, Almir Spinelli, 2021.
108 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Dinitroanilinas. 3. Desreguladores
endócrinos. 4. Eletroanalítica. 5. Eletrodos quimicamente
modificados. I. Spinelli, Almir. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

Giles Gillyard Gerent

**Determinação de dinitroanilinas com potencial para serem desreguladores endócrinos
com eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas bimetálicas**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Leandro Machado de Carvalho, Dr.

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Luiz Humberto Marcolino, Dr.

Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof.^a Iolanda Cruz Vieira, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgada adequada para obtenção do título de doutor em Química.

Prof Giovanni Finoto Caramori, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC

Prof. Almir Spinelli, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando no que fosse possível, que vivenciaram tanto os momentos alegres quanto os tristes e que sempre me empurravam para frente sem medir esforço algum.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar essa vida. Aos meus pais, Luiz e Marcia, por terem me apoiado e ajudado nessa longa jornada. Aos meus irmãos Gunnar e Günther, por estarem ao meu lado sempre me apoiando.

Ao professor Dr. Almir Spinelli, pela orientação e paciência durante a realização deste trabalho e também por me ensinar lições valiosas que levarei para vida toda.

Aos meus colegas de trabalho do GEPEEA: Edinho, Caio, João, Rayane, Marília, Paola, Daniel, Everton, Markus, Franciele, Kelline, Eduardo, Ricardo, Isabelle e Andreza pela amizade, pelos momentos alegres, divertidos e por me ajudarem.

Aos meus amigos: Elvis, Juliana, Carlos, Cassiel, Kevin, Patrícia, Natália, Ana e Izabela por me aturarem há tanto tempo. Aos meus parceiros: Marcelo, Lucas e Thiago por sempre saírem comigo, deixando os meus dias mais alegres.

A todos os integrantes da banca examinadora, por aceitarem fazer parte da mesma.

Ao LCME pelas imagens de microscopia eletrônica.

E por fim, à Universidade Federal de Santa Catarina, CAPES, CNPq e FAPESC pelo suporte financeiro.

*“For a certainty, back then,
We loved so many, yet hated so much,
We hurt other and were hurt ourselves.
Yet even then, we ran like the wind,
Whilst our laughter echoed,
Under cerulean skies.”*
(Chrono Cross)

TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (período 2016-2020)

Artigos publicados em revistas científicas

1. Gerent, G. G.; Spinelli, A. Ag-Au core-partial shell bimetallic nanoparticles applied in electrochemical determination of the potential endocrine disruptor oryzalin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 855, 113484, 2019.
2. Gerent, G. G.; Santana, E. R.; Martins, E. C.; Spinelli, A. A non-mercury electrode for voltammetric determination of butralin in foods. **Food Chemistry**, 343, 128419, 2021.

Resumos publicados em congressos

1. GERENT, G. G.; SPINELLI, A. Eletrodo modificado com nanopartículas de platina e de magnetita para a determinação de isômeros de nitrofenóis. *In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*, 2017, Natal - RN. Anais do XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.
2. GERENT, G. G.; SPINELLI, A. Comportamento eletroquímico da orizalina sobre um eletrodo modificado com nanopartículas bimetálicas de prata e ouro. *In: XXIV Encontro de Química da Região Sul*, 2017, Florianópolis - SC. Anais eletrônicos da XXIV Encontro de Química da Região Sul, 2017.
3. MOREIRA, F.; PIOVESAN, J.V.; GERENT, G. G.; SANTANA, E.R.; SPINELLI, A. Determinação eletroanalítica de 17β -estradiol utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de Fe_3O_4 e BMI.PF6. *In: XXIV Encontro de Química da Região Sul*, 2017, Florianópolis - SC. Anais eletrônicos da XXIV Encontro de Química da Região Sul, 2017.
4. GERENT, G. G.; SPINELLI, A. Non-mercury electrode for the electroanalytical determination of oryzalin. *In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2019, Joinville - SC. Anais da 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019.
5. GERENT, G. G.; SPINELLI, A. A novel electrode for the electroanalytical determination of butralin. *In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*, 2019, Ribeirão Preto - SP. Anais do XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2019.

RESUMO

Este trabalho descreve dois métodos novos para a determinação eletroanalítica de dinitroanilinas com potencial para serem desreguladores endócrinos. O primeiro método consiste na modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas bimetálicas de prata e ouro do tipo *core-partial shell* estabilizadas em quitosana. As nanopartículas bimetálicas foram obtidas pela redução sequencial dos íons Ag^+ e Au^{3+} , sendo caracterizadas em seguida pelas técnicas de espectroscopia UV-vis, microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de raios X por dispersão em energia. Após a modificação, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi analisada usando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de impedância eletroquímica. O eletrodo modificado com as nanopartículas bimetálicas de ouro e prata estabilizadas em quitosana foi empregado para determinar o desregulador endócrino e herbicida orizalina. O segundo método proposto neste trabalho consiste na modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas bimetálicas de cobalto e prata do tipo *core-shell* estabilizadas em poli(vinilpirrolidona). As nanopartículas bimetálicas foram obtidas pela redução sequencial dos íons Co^{2+} e Ag^+ . Tanto a dispersão das nanopartículas bimetálicas quanto o eletrodo quimicamente modificado foram caracterizados utilizando as mesmas técnicas aplicadas no primeiro método apresentado. O eletrodo modificado com nanopartículas bimetálicas de cobalto e prata foi usado na determinação do desregulador endócrino e herbicida butralina. Para estudar o comportamento eletroquímico da orizalina e da butralina sobre os eletrodos quimicamente modificados e a otimização dos parâmetros experimentais, foi empregada a técnica de voltametria cíclica. As devidas modificações mostraram-se alternativas bastante viáveis, pois aumentaram a sensibilidade dos sensores na determinação das dinitroanilinas. A curva de calibração para a orizalina foi obtida por voltametria de onda quadrada e foi linear na faixa de $0,1 - 7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção e de quantificação de 30 e 100 nmol L^{-1} , respectivamente. A curva de calibração para a butralina foi obtida por voltametria de onda quadrada e foi linear na faixa de $0,1 - 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção e de quantificação de 32 e 107 nmol L^{-1} , respectivamente. Assim, o eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas bimetálicas de prata e ouro estabilizadas em quitosana foi utilizado na quantificação de orizalina em amostras de suco de uva, enquanto que o eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas bimetálicas de cobalto e prata estabilizadas em poli(vinilpirrolidona) foi usado na quantificação de butralina em amostras de mel e de geleia de maçã. Ambas metodologias proporcionaram resultados com elevada precisão e exatidão, comparáveis às obtidas com as técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Palavras-chave: Dinitroanilinas; Desreguladores endócrinos; Eletroanalítica; Eletrodos quimicamente modificados; Nanopartículas bimetálicas.

ABSTRACT

This work describes two new methods for the electroanalytical determination of dinitroanilines with the potential to be endocrine disruptors. The first method consists in the modification of a glassy carbon electrode with silver and gold core-partial shell bimetallic nanoparticles stabilized in the chitosan polymer. The bimetallic nanoparticles were obtained by sequential reduction of Ag^+ and Au^{3+} ions, and then characterized by UV-vis spectroscopy, transmission electron microscopy and energy dispersion X-ray spectroscopy. After modification with the bimetallic nanoparticles' dispersion, the surface of the glassy carbon electrode was analyzed using scanning electron microscopy and electrochemical impedance spectroscopy techniques. The modified glassy carbon electrode with gold and silver bimetallic nanoparticles stabilized in chitosan was used to determine the endocrine disruptor and herbicide oryzalin. The second method proposed in this work consists in the modification of a glassy carbon electrode with bimetallic cobalt and silver core-shell nanoparticles stabilized in polyvinylpyrrolidone. The bimetallic nanoparticles were obtained by sequential reduction of Co^{2+} and Ag^+ ions. Both the dispersion of bimetallic nanoparticles and the chemically modified electrodes were characterized using the same techniques that were applied in the first method presented earlier. The chemically modified glassy carbon electrode with cobalt and silver bimetallic nanoparticles was used to determine the endocrine disrupter and herbicide butralin. To study the electrochemical behavior of oryzalin and butralin on the chemically modified electrodes and to optimize experimental parameters, the cyclic voltammetry technique was employed. The modifications with bimetallic nanoparticles proved to be quite viable alternatives, as they increased the sensitivity of the sensors in the dinitroanilines determination. The calibration curve for oryzalin was obtained by applying the square wave voltammetry technique and was linear in the concentration range $0.1 - 7.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, with limit of detection and limit of quantification of 30 and 100 nmol L^{-1} , respectively. While the calibration curve for butralin was obtained by the square wave voltammetry technique and was linear in the concentration range $0.1 - 1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, with limit of detection and limit of quantification of 32 and 107 nmol L^{-1} , respectively. Thus, the chemically modified glassy carbon electrode with silver and gold bimetallic nanoparticles stabilized in chitosan was used to quantify oryzalin in grape juice samples. The chemically modified glassy carbon electrode with cobalt and silver bimetallic nanoparticles stabilized in polyvinylpyrrolidone was used to quantify butralin in honey and apple jelly samples. Both methodologies provided results with high precision and accuracy, comparable to those obtained with chromatographic and spectroscopic techniques.

Keyword: Dinitroanilines; Endocrine disruptors; Electroanalysis; Chemically modified electrode; Bimetallic nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química básica das dinitroanilinas.	28
Figura 2: Estrutura química da ORZ.	30
Figura 3: Estrutura química da BTL.	32
Figura 4: Eletrodos convencionais de a) ouro, b) mercúrio e c) a base de carbono.	33
Figura 5: Eletrodos modificados com o processo de adsorção (A) SAM e (B) LbL.	35
Figura 6: Ancoragem de grupos funcionais na superfície do eletrodo.	36
Figura 7: Representação do método de modificação drop coating.	37
Figura 8: Preparação de um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado.	38
Figura 9: Representação dos métodos de síntese top down e bottom up.	39
Figura 10: Estabilização de nanopartículas a) eletrostática, b) estérea e c) eletroestérea.	40
Figura 11: Nanopartículas bimetálicas do tipo a) core-shell, b) core partial-shell e c) liga.	42
Figura 12: Voltamogramas cíclicos sucessivos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (A) sem e (B) com a etapa de pré-concentração. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$	51
Figura 13: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (A) de 2,0 até 5,0 e (B) de 6,0 até 10,0. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. pH ($n = 3$).	52
Figura 14: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre (A) a) GCE, b) AuNPs-CTS/GCE e c) AgNPs-CTS/GCE; (B) a) GCE e b) CuNPs-CTS/GCE; (C) a) GCE e b) PtNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$	53
Figura 15: Resposta de corrente para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o GCE e sobre os CMEs construídos com nanopartículas monometálicas ($n = 3$).	54
Figura 16: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre a) GCE; b) AuAgBMNPs-CTS/GCE e c) AgAuBMNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Comparação de resposta de corrente para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com GCE e CMEs usando nanopartículas bimetálicas ($n = 3$).	55
Figura 17: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre AgAuBMNPs-CTS/GCE com diferentes proporções (Ag: Au): a) 1:9;	

b) 3:7; c) 5:5; d) 7:3 e e) 9:1. $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, $t_{acc} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. proporção ($n = 3$). 55

Figura 18: Imagens de TEM e histogramas para AgNPs-CTS (A e B), para AuNPs-CTS (C e D) e para AgAuBMNPs-CTS (E e F). Imagens de TEM para AgAuBMNPs-CTS ampliadas (G e H). 56

Figura 19: (A) Espectros UV-vis para a) AgNPs-CTS, b) AuNPs-CTS e c) AgAuBMNPs-CTS. (B) Espectro de EDS para as AgAuBMNPs-CTS. 58

Figura 20: Imagens de SEM-FEG para (A) AgNPs-CTS/GCE, (B) AuNPs-CTS/GCE e (C e D) AgAuBMNPs-CTS/GCE com diferentes ampliações. 59

Figura 21: (A) Gráficos de Nyquist para a) GCE; b) CTS/GCE; c) AgNPs-CTS/GCE; d) AuNPs-CTS/GCE e e) AgAuBMNPs-CTS/GCE em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Ampliação dos gráficos de Nyquist para a) GCE; b) CTS/GCE; c) AgNPs-CTS/GCE; d) AuNPs-CTS/GCE e e) AgAuBMNPs-CTS/GCE. 60

Figura 22: (A) Voltamogramas cíclicos para a ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão a) B-R, b) citrato e c) fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, $t_{acc} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. solução tampão ($n = 3$). 61

Figura 23: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH a) 1,5; b) 1,75 e c) 2,0. (B) pH a) 2,25; b) 2,5; c) 2,75 e d) 3,0. (C) Gráfico $-i$ vs. pH. (D) Gráfico E vs. pH ($n = 3$). (E) Voltamogramas cíclicos na ausência de ORZ sobre o a) GCE e b) AgAuBMNPs-CTS/GCE e na presença de ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre c) GCE e d) AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). (F) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o a) GCE, b) AgAuBMNPs-CTS/GCE, c) AuNPs-CTS/GCE e d) AgNPs-CTS/GCE. $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, $t_{acc} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$ 62

Figura 24: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com E_{acc} (A) de $+0,10$ até $-0,10 \text{ V}$ e (B) de $-0,10$ até $-0,40 \text{ V}$. $t_{acc} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. E_{acc} ($n = 3$). 64

Figura 25: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com t_{acc} (A) de 20 até 100 s e (B) de 100 até 180 s. $E_{acc} = -0,10 \text{ V}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. t_{acc} ($n = 3$). 65

Figura 26: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) em diferentes velocidades de varredura a) branco; b) 10,0; c) 20,0; d) 30,0; e) 40,0; f) 50,0; g) 60,0; h) 70,0; i) 80,0; j) 90,0 e k) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico E_{pr} vs. v . (C) Gráfico E_{pr} vs. $\log v$. (D) Gráfico i vs. $v^{1/2}$. (E) Gráfico $\log i$ vs. $\log v$. $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, $t_{acc} = 100 \text{ s}$ 67

Figura 27: Reação de redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE. 68

Figura 28: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) 100,0 mV s^{-1} . (B) Voltamogramas de pulso diferencial para ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) 100,0 mV s^{-1} . (C) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) 100,0 mV s^{-1} . (D) Gráfico de barras para as diferentes técnicas eletroanalíticas em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) 100,0 mV s^{-1} usando ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$ ($n = 3$)..... 69

Figura 29: (A) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) variando o ΔE_s na faixa de 1,0 até 10,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. ΔE_s . $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 50,0 \text{ Hz}$ 70

Figura 30: (A) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) variando a na faixa de 20,0 até 100,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. a . $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $f = 50,0 \text{ Hz}$ 70

Figura 31: (A) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) variando f na faixa de 10,0 até 100,0 Hz. (B) Gráfico $-i$ vs. f . $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$ 71

Figura 32: (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE a) branco; b) 0,1; c) 0,2; d) 0,3; e) 0,4; f) 0,5; g) 0,6; h) 0,7; i) 0,8; j) 0,9; k) 1,0; l) 2,0; m) 3,0; n) 4,0; o) 5,0; p) 6,0; q) 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: ampliação dos voltamogramas de onda quadrada (a – k). $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 40,0 \text{ Hz}$. (B) Curva de calibração média ($n = 8$) para ORZ na faixa de 0,1 até 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: ampliação da curva de calibração média na faixa de 0,1 até 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 72

Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada para a) eletrólito de suporte, b) amostra de suco de uva com ORZ, (c-h) adições sucessivas de 50,0 μL de solução padrão de ORZ 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato 1,0 mol L^{-1} (pH 2,0). $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 40,0 \text{ Hz}$. (B) Curva de adição de padrão média ($n = 8$). 74

Figura 34: (A) Cromatograma da ORZ. (B e C) Fragmentograma da ORZ. 75

Figura 35: Voltamogramas cíclicos sucessivos para BTL 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0) (A) sem e (B) com a etapa de pré-concentração. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$ 76

Figura 36: Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH (A) de 2 até 6 e (B) de 7 até 10. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. pH ($n = 3$). 77

Figura 37: Voltamogramas ciclos para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre (A) a) GCE e b) AuNPs-PVP/GCE; (B) a) GCE e b) CoNPs-PVP/GCE; (C) a) GCE e b) AgNPs-PVP/GCE; (D) a) GCE e b) PtNPs-PVP/GCE; (E) a) GCE e b) CuNPs-PVP/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$ 78

Figura 38: Resposta de corrente para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 sobre a) GCE; b) AuNPs-PVP/GCE; c) CoNPs-PVP/GCE; d) AgNPs-PVP/GCE; e) PtNPs-PVP/GCE; f) CuNPs-PVP/GCE ($n = 3$). 79

Figura 39: Voltamogramas ciclos para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre a) GCE e b) CoAgBMNPs-PVP/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$ 80

Figura 40: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre CoAgBMNPs-PVP/GCE com diferentes proporções (Co:Ag): a) 1:9; b) 3:7; c) 5:5; d) 7:3 e e) 9:1. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. proporção ($n = 3$). 81

Figura 41: Imagens de TEM e histogramas para CoNPs-PVP (A e B), para AgNPs-PVP (C e D) e para CoAgBMNPs-PVP (E, F e G). 82

Figura 42: Espectros UV-vis para (A) a) $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e b) CoNPs-PVP; (B) a) AgNPs-PVP e b) CoAgBMNPs-PVP. 84

Figura 43: Espectro de EDS para as CoAgBMNPs-PVP. 84

Figura 44: Imagens de SEM-FEG para (A) CoNPs-PVP/GCE; (B) AgNPs-PVP e (C) CoAgBMNPs-PVP/GCE. 85

Figura 45: (A) Gráficos de Nyquist para a) GCE; b) PVP/GCE; c) CoNPs-PVP/GCE; d) AgNPs-PVP/GCE e e) CoAgBMNPs-PVP/GCE em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Ampliação dos gráficos de Nyquist para a) GCE; b) PVP/GCE; c) CoNPs-PVP/GCE; d) AgNPs-PVP/GCE e e) CoAgBMNPs-PVP/GCE. 86

Figura 46: (A) Voltamogramas cíclicos para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão a) B-R, b) fosfato e c) citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. solução tampão ($n = 3$). 86

Figura 47: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH a) 2,0; b) 3,0; c) 4,0; d) 5,0; e) 6,0 e f) 7,0. (B) pH a) 8,0; b) 9,0 e c) 10,0. (C) Gráfico $-i$ vs. pH e E vs. pH ($n = 3$). (D) Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 sobre a) GCE; b)

CoNPs-PVP/GCE; c) AgNPs-PVP/GCE e d) CoAgBMNPs-PVP/GCE. $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$ 88

Figura 48: (A) Gráfico $-i$ vs E_{acc} . (B) Gráfico $-i$ vs t_{acc} . ($n = 3$)..... 89

Figura 49: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com diferentes velocidades de varredura: a) 10,0; b) 20,0; c) 30,0; d) 40,0; e) 50,0; f) 60,0; g) 70,0; h) 80,0; i) 90,0 e j) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $\log i$ vs $\log v$. (C) Gráfico E_{pr} vs $\log v$. $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$ 90

Figura 50: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de pulso diferencial para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (D) Gráfico de barras para as diferentes técnicas eletroanalíticas em diferentes velocidades (a) 50,0; b) 75,0 e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$ usando BTL $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE. $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$ ($n = 3$). 91

Figura 51: (A) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando o ΔE_s na faixa de 1,0 até 10,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. ΔE_s . $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 50,0 \text{ Hz}$ 92

Figura 52: (A) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando a a na faixa de 10,0 até 100,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. a. $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $f = 50,0 \text{ Hz}$ 93

Figura 53: (A) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando a f na faixa de 10,0 até 100,0 Hz. (B) Gráfico $-i$ vs. f. $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$ 93

Figura 54: (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE a) branco; b) 0,1; c) 0,2; d) 0,3; e) 0,4; f) 0,5; g) 0,6; h) 0,7; i) 0,8; j) 0,9; k) 1,0; l) 1,1; m) 1,2; n) 1,3; o) 1,4; p) 1,5; q) 1,6; r) 1,7; s) 1,8; t) 1,9 e u) $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração média ($n = 8$) para BTL na faixa de 0,1 até $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. (C) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE a) branco; b) 0,1; c) 0,2; d) 0,3; e) 0,4; f) 0,5; g) 0,6; h) 0,7; i) 0,8; j) 0,9 e k) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. (D) Curva de calibração média ($n = 8$) para BTL na faixa de 0,1 até $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 40,0 \text{ Hz}$ 94

Figura 55: Voltamogramas de onda quadrada para a) eletrólito de suporte, b) amostra de mel com BTL, (c-g) adições sucessivas de $50,0 \mu\text{L}$ de solução padrão de BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre

o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 40,0 \text{ Hz}$. (B) Curva de adição de padrão média ($n = 8$).
..... 97

Figura 56: Voltamogramas de onda quadrada para a) eletrólito de suporte, b) amostra de geleia de maçã com BTL, (c-g) adições sucessivas de $50,0 \mu\text{L}$ de solução padrão de BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $E_{acc} = -0,15 \text{ V}$, $t_{acc} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 40,0 \text{ Hz}$. (B) Curva de adição de padrão média ($n = 8$).
..... 97

Figura 57: (A) Espectros UV-vis para a) branco, b) amostra de mel, c) amostra de mel fortificada, d-h) mel fortificado mais BTL $10,0$; $20,0$; $30,0$; $40,0$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Espectros corrigidos.
..... 98

Figura 58: (A) Espectros UV-vis para a) branco, b) amostra de geleia de maçã, c) amostra de geleia de maçã fortificada, d-h) geleia de maçã fortificada mais BTL $10,0$; $20,0$; $30,0$; $40,0$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Espectros corrigidos.
..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Trabalhos que determinam dinitroanilinas por meio de técnicas eletroanalíticas.....	28
Tabela 2: Trabalhos utilizando CMEs com nanopartículas bimetálicas para detecção de diferentes compostos.....	42
Tabela 3: Dados obtidos a partir da curva de calibração para a ORZ.....	72
Tabela 4: Estudo de interferentes na presença da ORZ.....	73
Tabela 5: Dados estatísticos para a determinação de ORZ em suco de uva.....	75
Tabela 6: Dados obtidos a partir da curva de calibração para a BTL.....	95
Tabela 7: Estudo de interferentes na presença da BTL.....	96
Tabela 8: Determinação de BTL em amostras de mel e de geleia de maçã por SWV usando o CoAgBMNPs-PVP/GCE e por UV-vis.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE_s – incremento de potencial;

a – amplitude de pulso;

AgAuBMNPs-CTS – nanopartículas bimetálicas de prata e ouro estabilizadas em quitosana;

AgAuBMNPs-CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas bimetálicas de prata e ouro estabilizadas em quitosana;

AgNPs-CTS – nanopartículas de prata estabilizadas em quitosana;

AgNPs-CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de prata estabilizadas em quitosana;

AgNPs-PVP – nanopartículas de prata estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

AgNPs-PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de prata estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

AuAgBMNPs-CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas bimetálicas de ouro e prata estabilizadas em quitosana;

AuNPs-CTS – nanopartículas de ouro estabilizadas em quitosana;

AuNPs-CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em quitosana;

AuNPs-PVP – nanopartículas de ouro estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

AuNPs-PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

BMNPs – nanopartículas bimetálicas, do inglês *bimetallic nanoparticles*;

B-R – Britton-Robinson;

BTL – butralina, do inglês *butralin*;

CMEs – eletrodo quimicamente modificado, do inglês *chemically modified electrode*;

CoNPs-CTS – nanopartículas de cobalto estabilizadas em quitosana;

CoNPs-PVP – nanopartículas de cobalto estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

CoNPs-PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de cobalto estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

CoAgBMNPs-PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas bimetálicas de cobalto e prata estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

CPE – eletrodo de pasta de carbono, do inglês *carbon paste electrode*;

CTS – quitosana, do inglês *chitosan*;

CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com quitosana;

CuNPs-CTS – nanopartículas de cobre estabilizadas em quitosana;

CuNPs-CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de cobre estabilizadas em quitosana;

CuNPs-PVP – nanopartículas de cobre estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

CuNPs-PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de cobre estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

CV – voltametria cíclica, do inglês *cyclic voltammetry*;

DPV – voltametria de pulso diferencial, do inglês *differential pulse voltammetry*;

E_{acc} – potencial de acúmulo;

EDs – desregulador endócrino do inglês, *endocrine disruptor*;

EDS – espectroscopia de raios X por dispersão em energia, do inglês *energy-dispersive X-ray spectroscopy*;

EIS – espectroscopia de impedância eletroquímica, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*;

E_{pr} – potencial de redução;

f – frequência;

GCE – eletrodo de carbono vítreo, do inglês *glassy carbon electrode*;

LC-MS/MS – cromatografia líquida com espectrômetro de massas, do inglês *liquid chromatography with mass spectrometry*;

LOD – limite de detecção, do inglês *limit of detection*;

LOQ – limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*;

ORZ – orizalina, do inglês *oryzalin*;

PtNPs-CTS – nanopartículas de platina estabilizadas em quitosana;

PtNPs-CTS/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de platina estabilizadas em quitosana;

PtNPs-PVP – nanopartículas de platina estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

PtNPs-PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com nanopartículas de platina estabilizadas em poli(vinilpirrolidona);

PVP – poli(vinilpirrolidona), do inglês *polyvinylpyrrolidone*;

PVP/GCE – eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado com poli(vinilpirrolidona).

RSD – desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*;

SAM – monocamadas altamente organizadas, do inglês *self-assembled monolayer*;

SEM-FEG – microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo, do inglês *scanning electron microscopy with field emission gun*;

SWV – voltametria de onda quadrada, do inglês *square-wave voltammetry*;

t_{acc} – tempo de acúmulo;

TEM – microscopia eletrônica de transmissão, do inglês *transmission electron microscopy*.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
1.1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	25
1.1.1. Pesticidas	26
1.1.1.1. <i>Dinitroanilinas</i>	26
1.1.1.1.1. Orizalina.....	29
1.1.1.1.2. Butralina.....	30
1.2. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	32
1.2.1. Processos de modificação de eletrodos	33
1.2.1.1. <i>Adsorção</i>	33
1.2.1.2. <i>Ligação covalente</i>	35
1.2.1.3. <i>Filmes poliméricos</i>	36
1.2.1.4. <i>Compósitos</i>	37
1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	38
1.3.1. Síntese de nanopartículas	39
1.3.2. Nanopartículas bimetálicas	40
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	44
2.1. OBJETIVO GERAL.....	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	45
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	45
3.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MONOMETÁLICAS.....	45
3.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS	46
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	46
3.5. PREPARAÇÃO DOS CMES.....	47
3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS CMES.....	47
3.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	47
3.8. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	48
3.9. MÉTODOS COMPARATIVOS	48
3.9.1. Cromatografia líquida	48
3.9.2. Espectroscopia UV-vis	49
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

4.1. RESULTADOS COM A ORZ	50
4.1.1. Comportamento eletroquímico da ORZ sobre o GCE	50
4.1.2. Avaliação do uso de CME a base de nanopartículas monometálicas frente a detecção de ORZ.....	52
4.1.3. Comportamento eletroquímico da ORZ sobre os CMEs com nanopartículas bimetálicas	54
4.1.4. Caracterização das AgAuBMNPs-CTS	56
4.1.5. Caracterização do AgAuBMNPs-CTS/GCE	58
4.1.6. Estudos de eletrólito de suporte e pH para a redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE	60
4.1.7. Efeito do potencial e do tempo de acúmulo na redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE	63
4.1.8. Influência da velocidade de varredura na redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE	65
4.1.9. Seleção da técnica eletroanalítica para a determinação da ORZ.....	68
4.1.9.1. Otimização dos parâmetros da SWV para a determinação da ORZ.....	69
4.1.10. Curva de calibração para a ORZ	71
4.1.11. Estudo de interferentes na determinação da ORZ	73
4.1.12. Determinação de ORZ em suco de uva usando o AgAuBMNPs-CTS/GCE	73
4.1.12.1. Método comparativo para a determinação da ORZ	74
4.2. RESULTADOS COM A BTL.....	76
4.2.1. Comportamento eletroquímico da BTL sobre o GCE	76
4.2.2. Avaliação do uso de CME a base de nanopartículas monometálicas frente a detecção de BTL.....	78
4.2.3. Comportamento eletroquímico da BTL sobre os CMEs com nanopartículas bimetálicas	79
4.2.4. Caracterização das CoAgBMNPs-PVP.....	81
4.2.5. Caracterização do CoAgBMNPs-PVP/GCE	84
4.2.6. Estudos de eletrólito de suporte e pH na redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE.....	86
4.2.7. Efeito do potencial e tempo de acúmulo na redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE	88
4.2.8. Influência da velocidade de varredura na redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE	89
4.2.9. Seleção da técnica eletroanalítica para a determinação da BTL.....	90
4.2.9.1. Otimização dos parâmetros da SWV para a determinação da BTL	91

4.2.10. Curva de calibração para a BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE	93
4.2.11. Estudo de interferentes na determinação da BTL	95
4.2.12. Determinação de BTL em mel e geleia de maçã usando o CoAgBMNPs-PVP/GCE.....	96
<i>4.2.12.1. Método comparativo para a determinação da BTL</i>	<i>97</i>
CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS	101

APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Há grande interesse científico em um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente que podem afetar a saúde, crescimento e a reprodução dos seres humanos. Essas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos. Elas podem causar danos a algum órgão endócrino, alterar sua função ou interagir com algum receptor hormonal. Existem várias substâncias que são consideradas como desreguladores endócrinos, mas os pesticidas se destacam por fazerem parte de uma classe de compostos orgânicos que são largamente utilizados no mundo para satisfazer a demanda mundial de alimentos.

A necessidade do aumento da produção mundial de alimentos para a população em rápido crescimento é bem reconhecida. No entanto, é difícil imaginar a produção de alimentos sem a presença de produtos químicos sintéticos, como os pesticidas por exemplo. Cerca de um terço da produção agrícola depende de pesticidas para evitar perdas no rendimento das culturas, porém os resíduos gerados podem causar poluição ambiental e envenenar tanto os seres humanos quanto outros animais.

Nos últimos anos, os métodos mais empregados para detectar e quantificar os desreguladores endócrinos são os cromatográficos e eletroquímicos. Recentemente, os métodos eletroanalíticos vêm sendo utilizados para o desenvolvimento de novas alternativas, principalmente por apresentarem vantagens como: baixo custo da instrumentação, baixos limites de detecção e quantificação, portabilidade dos equipamentos, alta frequência analítica e simplicidade no preparo das amostras. Além do mais, o uso de eletrodos quimicamente modificados, quando aliado a estes métodos, pode proporcionar aumento da sensibilidade e/ou da seletividade das metodologias. Assim, a procura por novos materiais e por diferentes arquiteturas para a construção de dispositivos capazes de detectar os desreguladores endócrinos é de grande interesse científico e tecnológico, o que justifica a proposta desta pesquisa. Este trabalho consiste em sintetizar nanopartículas bimetálicas para a construção de eletrodos mais sensíveis, de fácil preparação e que forneçam respostas reprodutíveis para a determinação de desreguladores endócrinos. Dentre os desreguladores endócrinos, foram escolhidas as dinitroanilinas para desenvolver esta tese. As dinitroanilinas são amplamente usadas na agricultura moderna como herbicidas, constituindo-se, portanto, como substâncias com potencial para serem desreguladores endócrinos.

Para fins de apresentação, esta tese foi dividida em 6 capítulos: o primeiro capítulo apresenta uma fundamentação teórica e uma revisão bibliográfica sobre os temas abordados no estudo. No segundo capítulo são apresentados os objetivos (geral e específicos) desta pesquisa.

No terceiro capítulo são descritos os procedimentos experimentais empregados durante o trabalho. O quarto capítulo apresenta os resultados e discussão acerca dos experimentos realizados. Por fim, no quinto e sexto capítulos são descritas as considerações finais e as referências bibliográficas, respectivamente.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Há várias definições de desreguladores endócrinos (EDs – do inglês, *endocrine disruptor*), porém todas incluem o conceito de desregulação ou interrupção do sistema endócrino. O sistema endócrino é constituído por um conjunto de glândulas que produzem os hormônios, permitindo a coordenação de funções de dezenas de diferentes tipos de células em organismos multicelulares. Este sistema possui numerosos tipos de estimulação e retroação em cascata, de forma que os diferentes parâmetros fisiológicos (como glicemia, lipedema, equilíbrio hidro-mineral, etc.) e funções fisiológicas (como desenvolvimento, crescimento, reprodução, etc.) permaneçam em um intervalo adequado para a boa saúde de todo o organismo e para a sobrevivência da espécie. Junto com o sistema nervoso, o endócrino coordena todas as funções do corpo (COMBARNOUS, 2017; FERREIRA, 2013; AL-ANSARI *et al.*, 2010).

Diversos compostos químicos são considerados EDs como, por exemplo, pesticidas, substâncias produzidas por plantas, fungos e cianobactérias, fármacos, metais pesados, ftalatos, alquilfenóis, hormônios naturais e sintéticos, poluentes orgânicos persistentes e outros. Há três classes de EDs: estrogênios esteroides naturais e sintéticos (estrogênios), substâncias sintéticas usadas em produtos industrializados (xenoestrogênios) e substâncias originadas de plantas (fitoestrogênios).

Os estrogênios são reguladores chave das mudanças fisiológicas associadas com a reprodução em ambos os sexos, além de regular outros processos fisiológicos importantes como, por exemplo, a função imunológica e a homeostase mineral (PINTO, ESTÊVÃO e POWER, 2014). Entre os estrogênios naturais encontram-se o 17β -estradiol, estrona e estriol e entre os sintéticos, o 17α -etinilestradiol.

Os fitoestrogênios são compostos vegetais presentes em altas concentrações na soja, trevo, alfafa e outros legumes. Podem induzir efeitos estrogênicos por apresentarem semelhanças estruturais com os estrogênios, ou, em alguns casos, antiestrogênicos. São aplicados na medicina como agente de reposição hormonal (KUSTER *et al.*, 2009).

Os xenoestrogênios são substâncias químicas sintéticas, utilizadas nos produtos industrializados, que podem interagir com o sistema endócrino, causando alterações indesejáveis no mesmo. Nesta classe estão os pesticidas, que fazem parte dos produtos industrializados mais usados no mundo e que contém diversas substâncias classificadas como EDs (BILLA e DEZOTTI, 2007).

1.1.1. Pesticidas

Os pesticidas são substâncias, ou misturas de substâncias, destinadas a controlar, prevenir, destruir, repelir ou atrair qualquer organismo biológico considerado como uma praga. O termo praga inclui insetos, camundongos e outros animais, ervas daninhas e fungos, entre outros. Os pesticidas são geralmente substâncias químicas, embora possam ser às vezes agentes biológicos, como vírus ou bactérias. A palavra "pesticida" é freqüentemente usada como sinônimo de produtos fitofarmacêuticos, que são utilizados principalmente na agricultura para manter as culturas saudáveis e evitar que sejam destruídas como consequência de doenças e infestações (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018). Os produtos para proteção de plantas foram inicialmente aplicados às culturas de cereais. Em seguida, começaram a ser utilizados no setor agrícola, incluindo culturas hortícolas, ornamentais e vegetais. A parte ativa de um produto fitofarmacêutico, conhecido como ingrediente ativo, geralmente é o único componente da formulação listada no rótulo sendo descrito pelo fabricante como líquido ou sólido (KARASALI e MARAGOU, 2016).

Os rendimentos agrícolas dependem fortemente das medidas de proteção das culturas. Grandes ganhos de produtividade podem ser alcançados na agricultura com o uso de pesticidas. Na verdade, eles são necessários para atender a demanda mundial de alimentos, e não há outras alternativas que possam ser usadas em grande escala. Os pesticidas ajudam agricultores e produtores a produzir alimentos de boa qualidade a preços razoáveis (KARASALI e MARAGOU, 2016). No entanto, os pesticidas também têm impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente. Os seres humanos são expostos a pesticidas por diferentes rotas, como inalação, ingestão e contato dérmico, o que pode resultar em problemas de saúde agudos ou crônicos. Além disso, a contaminação ambiental de pesticidas provoca a intoxicação de espécies não-alvo e a perturbação dos ecossistemas. Por estas razões, as autoridades reguladoras estabeleceram regulamentos para autorização, uso adequado e disposição dos pesticidas (WESTLUND e YARGEAU, 2017). Há vários compostos que são usados como pesticidas, porém as dinitroanilinas se destacam porque já detiveram 10% das vendas totais de pesticidas nos Estados Unidos da América (ZIMDAHL, 2019).

1.1.1.1. *Dinitroanilinas*

As dinitroanilinas, em particular as derivadas da 2,6-dinitroanilina (Fig. 1), são amplamente usados na prática agrícola como herbicidas, ou seja, um pesticida que é aplicado no controle de ervas daninhas. Como regra, esses herbicidas contêm substituintes na posição 4

do anel benzênico (R_3). Além disso, o grupo amino na posição 1 também possui grupos substituintes (R_1 e R_2). Um deslocamento da densidade eletrônica para os átomos de oxigênio dos grupos nitro produz duas regiões com um potencial eletrostático negativo pronunciado. No entanto, a orientação dos grupos nitro em relação ao anel benzênico, que aparece devido à rotação em relação às correspondentes ligações C-N, varia (NYPORKO *et al.*, 2009). A principal propriedade que determina que esses compostos possam ser usados como herbicidas é a atividade antimitótica (OZHEREDOV *et al.*, 2009). Esta propriedade é determinada pela capacidade das dinitroanilinas de se ligar de maneira altamente específica à tubulina, o principal componente estrutural dos microtúbulos, o que resulta na sua despolimerização (BARANAUSKIENE e MATULIS, 2017).

Devido às suas propriedades, as dinitroanilinas foram utilizadas em todo o mundo. Porém, pouca atenção foi dada ao aspecto toxicológico e as implicações de seu uso. Segundo o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), o valor máximo permitido de dinitroanilinas em águas para o consumo humano é de $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (CONAMA, 2008). A produção e grande uso das dinitroanilinas introduziram substâncias possivelmente tóxicas no ecossistema que se acumulam em concentrações cada vez maiores no meio ambiente e na cadeia alimentar, o que prejudica várias espécies, inclusive a humana (TONG, GUO e LIU, 2010). Estes compostos não são irritantes para os olhos mas ao contato com a pele podem causar irritações leves à moderadas. Testes em ratos e cães não produziram quaisquer efeitos adversos; entretanto, a exposição de longo prazo em cães causou hepatotoxicidade e efeitos esplênicos (GUPTA, 2018). Algumas dinitroanilinas também podem afetar o sistema endócrino, o que leva a problemas no desenvolvimento do corpo humano e sua reprodução. Há relatos, por exemplo, de tumores de tireóide envolvendo estes compostos (GUPTA, 2018). Por estes motivos, faz-se necessário o desenvolvimento de um método analítico simples, rápido e sensível para determiná-las.

Atualmente, várias técnicas analíticas foram desenvolvidas para a determinação de dinitroanilinas como, por exemplo: cromatografia gasosa (CHIANG e HUANG, 2008), cromatografia líquida de alta eficiência (YAZDI *et al.*, 2009) e eletroforese capilar (GUO *et al.*, 2006). A vantagem destas técnicas é a possibilidade de determinar várias espécies químicas simultaneamente com alta sensibilidade e seletividade. Na maioria dos casos, uma etapa de derivatização é utilizada para se obter uma análise confiável por estas técnicas. No entanto, estes processos de derivatização não são simples e às vezes requerem o manuseio de produtos químicos perigosos. Outro problema envolvendo este tipo de análise é o alto custo dos equipamentos e o alto tempo de análise. Devido a estas desvantagens, as técnicas

eletroanalíticas tem sido cada vez mais utilizadas como alternativa para determinar as dinitroanilinas.

Na literatura, há poucos trabalhos que relatam a determinação de dinitroanilinas aplicando estas técnicas eletroanalíticas (Tabela 1). A maioria utiliza o eletrodo de gota pendente de mercúrio onde alcançam limites de detecção na faixa nanomolar. Porém, este eletrodo tem sido cada vez menos usado porque há a possibilidade de ocorrer um acidente envolvendo este eletrodo e liberar vapores de mercúrio que são prejudiciais à saúde. Assim, outros eletrodos têm sido fabricados para substituí-lo (DE LIMA *et al.*, 2016; SMARZEWSKA *et al.*, 2017). Dentre todas as dinitroanilinas apresentadas na Tabela 1, a orizalina e a butralina se destacam pois, além de serem consideradas com potencial para atuarem como desreguladores endócrinos, são aplicadas em diversas lavouras do mundo e há poucos trabalhos na literatura que as determinam por técnicas eletroanalíticas.

Figura 1: Estrutura química básica das dinitroanilinas.

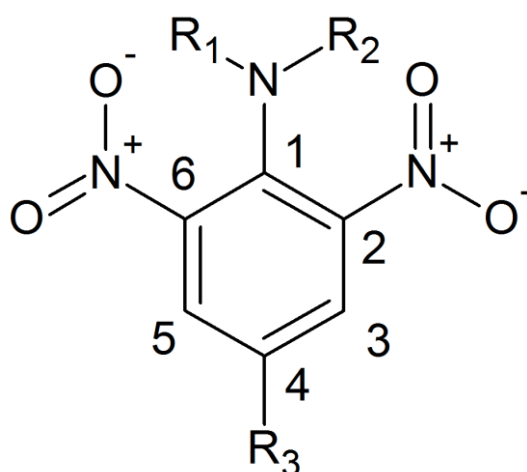


Tabela 1: Trabalhos que determinam dinitroanilinas por meio de técnicas eletroanalíticas.

Eletrodo de trabalho	Dinitroanilina	Técnica	Limite de detecção (nmol L ⁻¹)	Referência
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Nitralina	Voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial	15,0	(THRIVENI <i>et al.</i> ; 2007)
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Nitralina	Voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial	0,09	(ARRANZ <i>et al.</i> ; 1997)
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Orizalina	Voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial	24,7	(THRIVENI <i>et al.</i> ; 2007)

Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Butralina	Voltametria de pulso diferencial	60,0	(SHEEDHAR e REDDY, 2002)
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Isopropalina	Voltametria de pulso diferencial	15,0	(SHEEDHAR e REDDY, 2002)
Carbono vítreo	Profluralina	Voltametria de onda quadrada	26,0	(SMARZEWSKA <i>et al.</i> , 2017)
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Pendimetalina	Voltametria de onda quadrada	19,2	(GALLI, DE SOUZA e MACHADO, 2011)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de prata	Pendimetalina	Voltametria de onda quadrada	36,0	(DE LIMA <i>et al.</i> , 2016)
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Etalfluralina	Voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial	1,1	(THRIVENI <i>et al.</i> ; 2009)
Eletrodo de gota pendente de mercúrio	Metalpropalina	Voltametria de redissolução adsortiva de pulso diferencial	18,7	(THRIVENI <i>et al.</i> ; 2009)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com quitosana	Trifluralina	Voltametria de pulso diferencial	74,5	(MELO <i>et al.</i> ; 2008)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Trifluralina	Voltametria de pulso diferencial	2,0	(WEN <i>et al.</i> ; 2008)

1.1.1.1.1. Orizalina

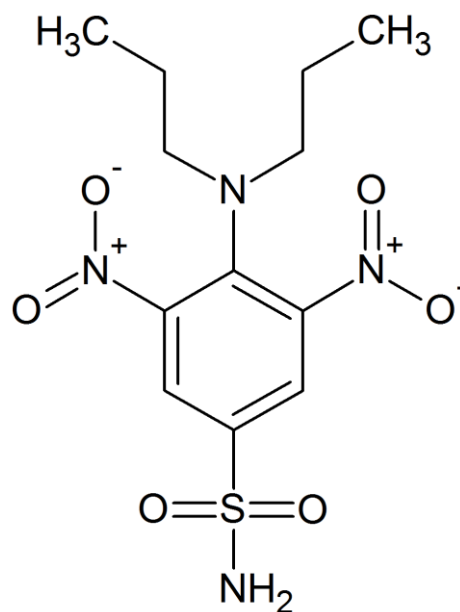
A orizalina (ORZ – do inglês, *oryzalin*) ou 4-dipropilamino-3,5-dinitrobenzenosulfonamida (Fig. 2) é um herbicida aplicado na superfície das plantas antes da germinação das ervas daninhas. A ação deste pesticida é baseada em sua atividade antimetabólica pela ligação das dinitroanilinas às tubulinas. A ORZ é classificada como carcinogênico do grupo C e está associada a compostos com ação de desregulação endócrina, pois está relacionada com uma alta incidência de tumores de pele e das glândulas tireóide e mamária. Os resíduos de ORZ podem penetrar nos tecidos das plantas e permanecer na polpa e no suco da fruta (HALL *et al.*, 2005). Existem muitos tipos de formulação de ORZ, incluindo grânulos dispersíveis em água, líquido concentrado, concentrado emulsionável, pó granuloso molhável e líquido. Este herbicida tem sido amplamente aplicado em culturas de uva devido ao seu baixo custo e alta eficiência no controle de ervas daninhas (LIANG *et al.*, 2019).

A uva é uma das frutas mais populares e amplamente produzidas no mundo. Elas podem ser consumidas de várias maneiras: frescas, secas como passas, sucos ou vinho. Além de ser boa fonte de manganês, vitaminas C e K, esta fruta também contém uma variedade diversa de antioxidantes potentes na forma de polifenóis, o que é útil para diminuir o risco de

ocorrência de coágulos sanguíneos, doenças cardíacas, colesterol e pressão arterial altos (VENKITASAMY *et al.*, 2019).

Embora a ORZ seja amplamente utilizada em todo o mundo, há poucas pesquisas sobre a determinação de resíduos de ORZ. Existe um único trabalho na literatura que relata a determinação de ORZ utilizando técnicas eletroanalíticas, porém com o uso do eletrodo gotejante de mercúrio (THRIVENI *et al.*; 2007). Este eletrodo tem sido banido em diversos países devido a preocupações ambientais e regulamentos de segurança, já que o mercúrio é considerado tóxico. Deste modo, novos eletrodos que oferecem uma performance parecida ou até melhor estão sendo desenvolvidos para substituir os eletrodos de mercúrio. O limite de detecção alcançado com este eletrodo foi de $24,7 \text{ nmol L}^{-1}$. Assim, o desenvolvimento de um método analítico simples e sensível para a ORZ em produtos derivados da uva é de grande importância.

Figura 2: Estrutura química da ORZ.



1.1.1.1.2. Butralina

A butralina (BTL – do inglês, *butralin*) ou *N*-sec-butil-4-terc-butil-2,6-dinitroaniline (Fig. 3) é um herbicida usado como agente de proteção para produtos agrícolas como cereais, frutas, nozes, legumes e outros. Seu produto comercial está disponível como um concentrado emulsificado. Sua ação é a mesma da ORZ e das outras dinitroanilinas, ou seja, se ligando à tubulina. A BTL pode causar distúrbios endocrinológicos ou imunológicos (POHANISH, 2017). Como pode ser usado em várias lavouras, há a possibilidade deste herbicida contaminar os pólenes das plantas, ser levado pelas abelhas até a colmeia e, conseqüentemente, contaminar

o mel fabricado por elas. Outra possibilidade é a de que a BTL fique retida nos frutos e contamine seu produto final como, por exemplo, geleias. Tanto o mel quanto as geleias são classificadas como uma mercadoria que contém alta quantidade de açúcar e baixa de água. Essa característica de ambos alimentos representa um desafio na determinação de pesticidas (DEL CASTILLO *et al.*, 2019).

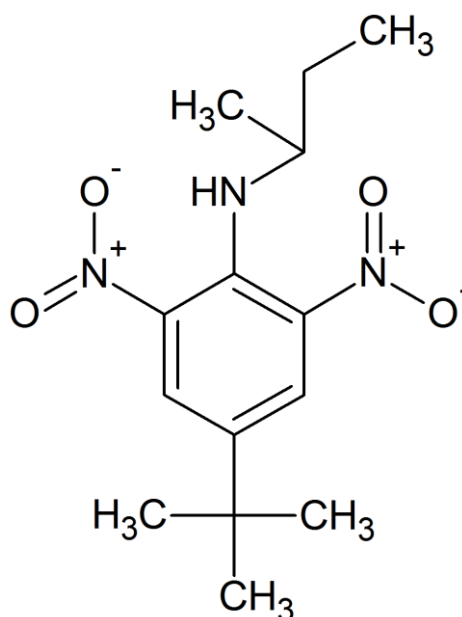
O mel é uma substância popular, doce e altamente nutricional produzida pela atividade de forrageamento das abelhas, coletando o néctar de uma infinidade de plantas com flores. As abelhas secretam uma substância específica que converte o néctar em mel antes de armazenar em favos de mel para sua maturação. Sua composição é caracterizada pelo tipo de planta onde as abelhas coletam seu néctar, condições climáticas, fatores ambientais e práticas de criação de abelhas (MEO *et al.*, 2017). Os principais constituintes do mel são os carboidratos (açúcares) que representam quase 95% do seu peso, dos quais contém 75% de monossacarídeos (frutose e glicose), bem como pequenas quantidades de dissacarídeos (sacarose) e 10 – 15% de outros tipos de açúcares (oligosacarídeos e tetrassacarídeos). Além dos açúcares, quantidades mínimas de ácidos orgânicos, proteínas e componentes minerais também existem no mel. Devido à presença de ácidos orgânicos (0,57%) e aminoácidos livres (0,05 – 0,1%) no mel, esse produto alimentício tende a ser levemente ácido (PITA-CALVO *et al.*, 2017).

Já as geleias de frutas são um alimento preparado pela fervura da polpa das frutas com açúcar, pectina, ácido e outros ingredientes (por exemplo, conservantes, substâncias corantes e aromatizantes) até atingir uma boa consistência espessa e um teor final de água de 32 a 34%. Esse processo é usado para preservar a fruta para consumo durante a entressafra.

Como ambos os alimentos são amplamente consumidos em todo o planeta, é de extrema importância o monitoramento de resíduos de pesticidas, como a BTL, nos mesmos para evitar que haja intoxicação e cause danos à saúde humana.

Assim como a ORZ, há apenas um trabalho na literatura que determina a BTL usando técnicas eletroanalíticas (SHEEDHAR e REDDY, 2002). Este trabalho também aplica o eletrodo de mercúrio para a determinação de BTL, onde conseguiram um limite de detecção de $60,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Como dito anteriormente, devido à toxicidade do mercúrio, esse tipo de eletrodo não é mais usado pelos pesquisadores. Então, os eletrodos quimicamente modificados são uma boa alternativa para substituí-los, uma vez que podem exibir uma performance parecida ou melhor que os eletrodos de mercúrio.

Figura 3: Estrutura química da BTL.



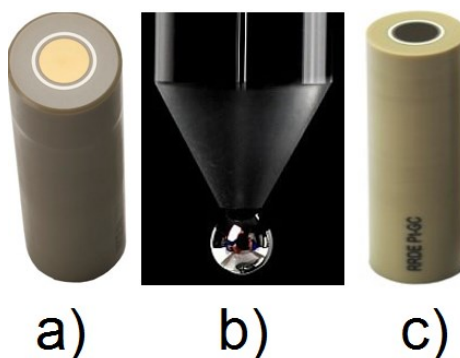
1.2. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Nos últimos anos, os sensores eletroquímicos desempenharam um papel fundamental na proteção do meio ambiente e da saúde humana pois podem ser usados como uma plataforma de monitoramento *on-site* capaz de detectar uma vasta gama de compostos como metais, produtos farmacêuticos, agroquímicos e drogas ilícitas (MACIEL *et al.*, 2019). Além disso, outras características são atribuídas a esses sensores como sensibilidade e seletividade inerentes a espécies eletroativas, boa precisão, resposta rápida, fácil manuseio e baixo custo (JANEGITZ *et al.*, 2011). No geral, os sensores eletroquímicos pertencem a uma subclasse de sensores químicos que fazem o uso de um eletrodo como elemento de transdução, dispositivo que converte a resposta química em um sinal que pode ser detectado por instrumentos elétricos, sendo os eletrodos convencionais de ouro, mercúrio e carbono alguns exemplos de transdutores (Fig. 4).

Recentemente, a modificação química na superfície destes eletrodos ganhou considerável atenção no meio científico, devido ao fato de que estes eletrodos modificados exibem propriedades únicas e aprimoradas que beneficiam a detecção eletroquímica em comparação aos eletrodos convencionais (ŠVANCARA *et al.*, 2009). Esses eletrodos são chamados de eletrodos quimicamente modificados (CMEs – do inglês, *chemically modified electrode*). Essa nomenclatura foi inicialmente utilizada na eletroquímica por Murray e colaboradores, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, devidamente imobilizadas em sua superfície (MURRAY, 1980). De acordo com a IUPAC, um CME é um

eletrodo feito de material condutor ou semicondutor revestido com um filme de um modificador químico que pode ser monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico que tem como objetivo facilitar a transferência de carga entre o eletrodo e a espécie química de interesse, melhorar a capacidade de detecção da espécie química de interesse, melhorar a geração de sinais eletroquímicos e suas características (perfil do sinal e separação de sinais) e aumentar a sensibilidade e a seletividade do eletrodo (DURST *et al.*, 1997; SAJID, BAIG e ALHOOSHANI *et al.*, 2019). Para eletrodos heterogêneos, como compósitos sólidos ou misturas pastosas, a modificação não precisa formar um filme já que suas características químicas são alteradas tanto no corpo quanto na superfície do eletrodo. O principal propósito de se construir novos CMEs é substituir os eletrodos a base de mercúrio, que podem ser perigosos caso haja um acidente onde há liberação de vapores de mercúrio, e os eletrodos sólidos, por serem pouco seletivos e sensíveis (PEDROSA *et al.*, 2004; VASANTHI *et al.*, 2017).

Figura 4: Eletrodos convencionais de a) ouro, b) mercúrio e c) a base de carbono.



1.2.1. Processos de modificação de eletrodos

Os processos clássicos de modificação de eletrodos sólidos homogêneos são: adsorção ou quimissorção, ligação covalente e filmes poliméricos. Para eletrodos sólidos heterogêneos, como o eletrodo de pasta de carbono por exemplo, a simples adição do modificador à pasta durante a preparação do eletrodo é a forma mais comum de se modificá-lo. A escolha do processo de modificação é essencial para a aplicabilidade do eletrodo modificado.

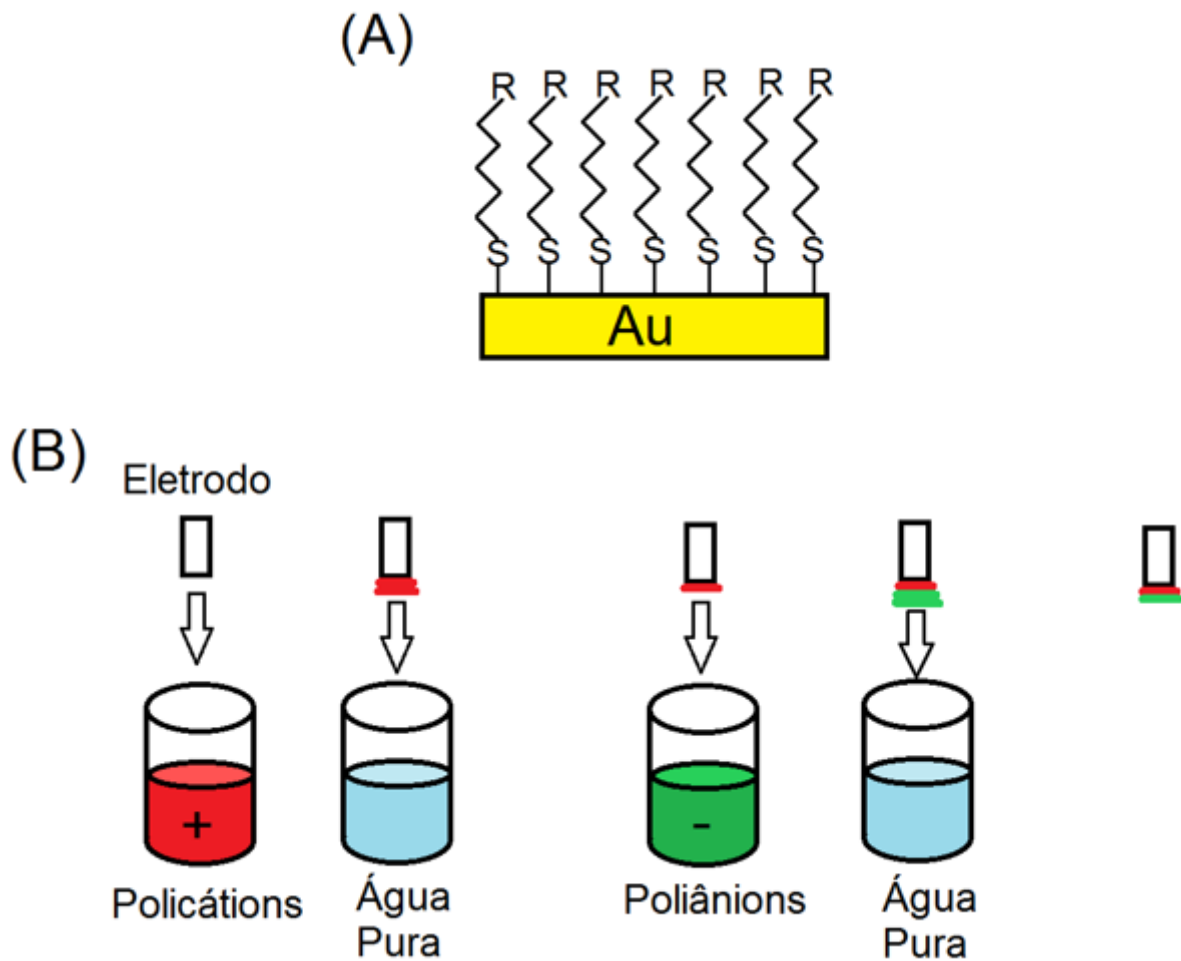
1.2.1.1. Adsorção

O agente modificador é dissolvido em um solvente apropriado, em seguida o eletrodo é imerso nesta solução. Pode também envolver a deposição desta solução, com a ajuda de uma

micropipeta, sobre a superfície do eletrodo seguida da evaporação do solvente. São formadas, então, monocamadas na superfície do eletrodo. Isto acontece devido às interações químicas e/ou físicas entre a superfície do eletrodo e a solução modificadora. Um exemplo bem conhecido é a monocamada auto organizada de tióis, chamada de SAM (do inglês, *self-assembled monolayer*), adsorvida quimicamente em um eletrodo de ouro (Fig. 5A). Interações intermoleculares de van der Waals contribuem para a formação da monocamada, mas é a quimissorção que tem a maior contribuição energética para a SAM (ALKIRE *et al.*, 2009). Como não há alteração de grupos funcionais, este método é classificado como adsorção, mesmo que haja a formação de uma ligação covalente entre o enxofre e o ouro.

Múltiplas camadas altamente organizadas de polieletrólitos podem ser obtidas usando a técnica LbL (do inglês, *Layer-by-Layer*), onde cada camada subsequente é imobilizada por sorção devido a carga oposta do eletrólito antecedente (Fig. 5B). Entre cada etapa de formação da próxima camada, o eletrodo é lavado com água pura para retirar o excesso de polieletrólito que não ficou imobilizado na superfície. As forças que retêm o filme na superfície do eletrodo consistem em interações de van der Waals. Essas forças são muito menores do que aquelas que resultam na formação de ligações químicas. Assim, as camadas múltiplas podem não ser estáveis por longos períodos de tempo ou em ambientes agressivos.

Figura 5: Eletrodos modificados com o processo de adsorção (A) SAM e (B) LbL.

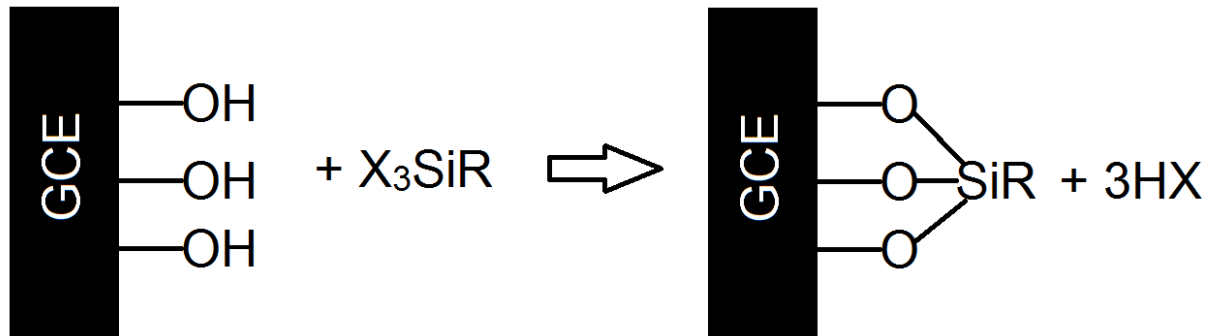


1.2.1.2. *Ligação covalente*

Neste método há alteração de grupos funcionais, já que o modificador tem que ser ligado covalentemente à superfície do eletrodo, acarretando tal alteração. Dependendo do substrato, escolhe-se o grupo funcional para tal finalidade. Reações de silanização e óxidos presentes no substrato podem ser usados para fazer a modificação. Eletrodos metálicos oxidados em meio alcalino apresentam uma fina camada de óxido muito reativa em relação aos silanos (ALKIRE *et al.*, 2009), que podem atuar como um tipo de ponte para imobilizar um grupo funcional específico (Fig. 6). A superfície de eletrodos a base de carbono também pode ser modificada por este método devido à presença de grupos funcionais como álcoois, ácidos carboxílicos, cetonas e anidridos. Dessa forma, a modificação deste tipo de substrato é baseada na manipulação de tais grupos funcionais frente a compostos como aminas, organosilanos, cloreto de tionilas, etc. As monocamadas assim formadas são quimicamente e mecanicamente mais estáveis que a SAM. No entanto, são mais difíceis de formar, pois é necessário um controle

mais rigoroso das condições experimentais como a natureza do solvente, o teor de água, o tempo e a temperatura de reação. Outra desvantagem é a limitação de formar monocamada, o que pode restringir a quantidade de espécies na superfície do eletrodo (HAENSCH, HOEPPENER e SCHUBERT, 2010).

Figura 6: Ancoragem de grupos funcionais na superfície do eletrodo.



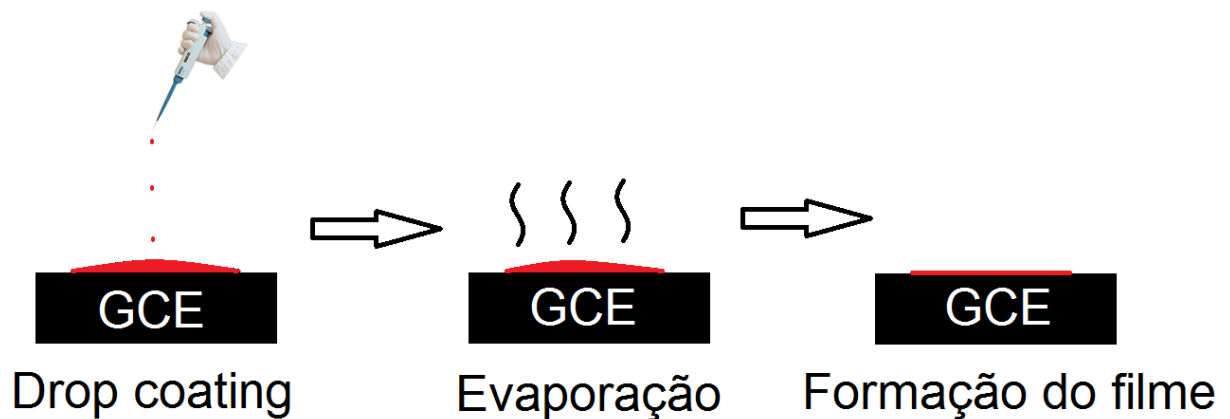
1.2.1.3. Filmes poliméricos

Filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e ao analito são usados como recobrimento da superfície do eletrodo. Quatro classes de filmes poliméricos podem ser utilizados para esta finalidade: (1) filmes condutores, que são muito empregados devido à sua característica de aumentar a velocidade de transferência de elétrons; (2) os filmes de troca iônica, nos quais o componente redox ativo é um contra íon de um filme poli-iônico como o Náfon ou polivinilpiridina; (3) os filmes não condutores, os quais possuem uma característica permeseletiva sendo muito usados em biossensores para imobilizar biocomponentes e mediadores e, por fim, (4) os filmes de membranas compostas, que apresentam características de se combinar efetivamente com mais de um filme polimérico (ALKIRE *et al.*, 2009). O método mais simples para preparar um CME a base de polímero é o revestimento com uma gota de um pequeno volume de polímero dissolvido em um solvente, este método de modificação é conhecido como *drop coating* (Fig. 7). Com o tempo, o solvente evapora, deixando o polímero adsorvido na superfície do eletrodo. Como os polímeros podem ser empregados na síntese de nanopartículas metálicas, como agentes estabilizadores, há a possibilidade de formar um filme polimérico contendo essas nanopartículas.

A eletropolimerização também pode ser aplicada para formar um filme polimérico. Esta consiste em imergir o eletrodo em uma solução contendo o monômero (por exemplo pirrol, tiofeno, fenol, anilina) e um potencial adequado (catódico ou anódico) é aplicado para a formação do filme polimérico na superfície do eletrodo. Também há a possibilidade de se

utilizar fotopolímeros para imobilizar enzimas, onde uma solução contendo o fotopolímero e a enzima é gotejada na superfície do eletrodo e, em seguida, uma radiação ultravioleta é incidida para formar o filme polimérico contendo a enzima (SASSOLAS, BLUM e LECA-BOUVIER, 2012).

Figura 7: Representação do método de modificação *drop coating*.

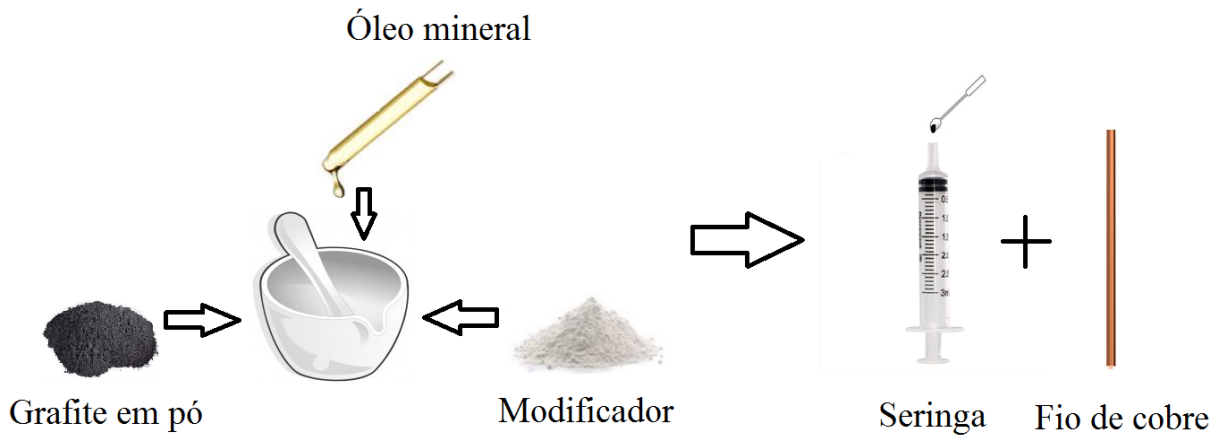


1.2.1.4. Compósitos

Consiste basicamente na mistura do agente modificador diretamente com o substrato. Neste caso, muitos materiais como argila, resina epóxi, polímeros, entre outros, podem ser utilizados. Modificações em eletrodos a base de carbono em pó, como por exemplo o de pasta de carbono (CPE – do inglês, *carbon paste electrode*), podem ser modificados desta maneira (SOUZA, 1997; PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002). A preparação do CPE além de simples é barata, pois podem ser usados materiais de fácil obtenção. Basicamente um CPE modificado consiste de grafite em pó (ou outros materiais de carbono), um agente aglutinante, o modificador, um corpo para o eletrodo (seringa de teflon, por exemplo) e um fio de cobre para fazer o contato elétrico (Fig. 8). Muitos eletrodos a base de compósitos de nanotubos de carbono são preparados desta forma (ALKIRE *et al.*, 2009). Como agente aglutinante, geralmente é utilizado um líquido orgânico (por exemplo, óleo mineral) que deve ser quimicamente e eletroquimicamente inerte, com baixa volatilidade, imiscível com a solução do analito e deve preencher os interstícios entre as partículas de grafite. Essa simplicidade e suavidade das condições do processo de modificação são provavelmente responsáveis pela popularidade dos CPEs. Porém, precisa-se construir vários CPEs para se realizar um estudo científico, uma vez que a cada medida se necessita retirar parte da pasta de carbono para renovar

a superfície do CPE. Outra desvantagem é o tempo de fabricação destes eletrodos, que é em média de 30 a 40 minutos (ŠVANCARA *et al.*, 2001).

Figura 8: Preparação de um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado.



1.3. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Uma classe de material que pode ser aplicada na modificação da superfície de eletrodos são as nanopartículas metálicas. As nanopartículas são partículas ultrafinas no tamanho nanométrico. “Nano” é um prefixo que denota “ 10^{-9} ”, ou seja, um bilionésimo. A definição de nanopartículas difere dependendo dos materiais, campos e aplicações em questão. De modo geral, são consideradas como nanopartículas as que possuem um tamanho entre 1,0 – 1000,0 nm, onde as propriedades físicas dos próprios materiais sólidos mudam drasticamente (YOKOYAMA *et al.*, 2008). Por exemplo, uma barra de ouro possui uma coloração amarela e não exibe propriedades magnéticas, já as nanopartículas de ouro (2-3 nm) apresentam uma coloração avermelhada e possuem propriedades magnéticas (RODUNER, 2006). De fato, as nanopartículas exibem propriedades elétricas, eletrônicas, mecânicas e térmicas exclusivas. Elas podem apresentar uma gama de propriedades como a alta área de superfície em relação ao volume, transferência de carga rápida, magnetismo e efeitos quânticos (BAIG, SAJID e SALEH, 2019). A pesquisa envolvendo as nanopartículas é, atualmente, de intenso interesse científico por causa da sua ampla gama de aplicações nas áreas biomédicas, ópticas e eletrônicas (TAYLOR *et al.*, 2013; HEWAKURUPPU *et al.*, 2013).

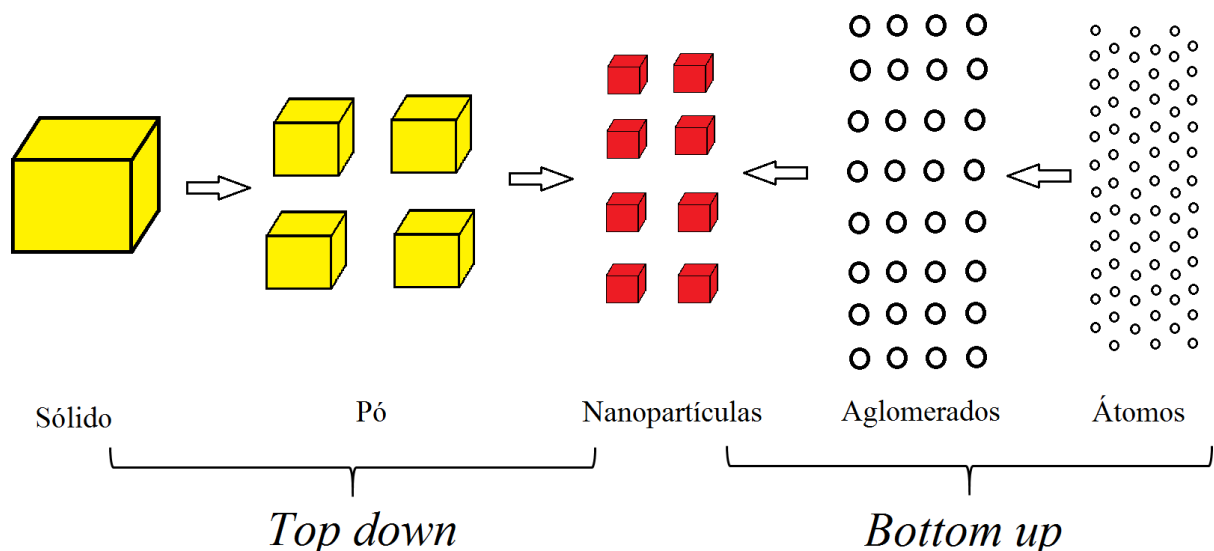
Para o desenvolvimento de CMEs, as nanopartículas metálicas oferecem algumas vantagens como: o aumento da área eletroativa, da atividade catalítica e da biocompatibilidade e o melhoramento da condutividade do sistema (CAMPBELL e COMPTON, 2010; YIN e QIN,

2013). São essas características que fazem com que as nanopartículas metálicas sejam ideais para a construção de CMEs na eletroanalítica (YU *et al.*, 2011).

1.3.1. Síntese de nanopartículas

Há, basicamente, dois métodos para a obtenção de nanopartículas metálicas (Fig. 9): o *top down* (físico) e o *bottom up* (químico) (ZAHMAKIRAN e ÖZKAR, 2011). O *top down* emprega ferramentas litográficas, como a litografia por feixe de elétrons ou litografia por raios-X, para padronizar a superfície do substrato “quebrando” as partículas maiores até ficarem na escala nanométrica. O *bottom up* explora as interações entre as moléculas ou átomos para juntá-los e formar estruturas na escala nanométrica em solução. Neste método, reações químicas são empregadas junto a precursores para formar nanopartículas a partir de átomos ou moléculas, o que permite um maior controle sobre as características das nanopartículas. Em virtude do controle, simplicidade e eficácia, os métodos químicos são mais usados. A redução de um cátion metálico na presença de um estabilizador é um exemplo de um método químico (SHIPWAY, KATZ e WILLNER, 2000). São os estabilizadores que controlam a forma e o tamanho das nanopartículas, podendo também funcionalizá-las (THOMAS, IPE e SUDEEP, 2002).

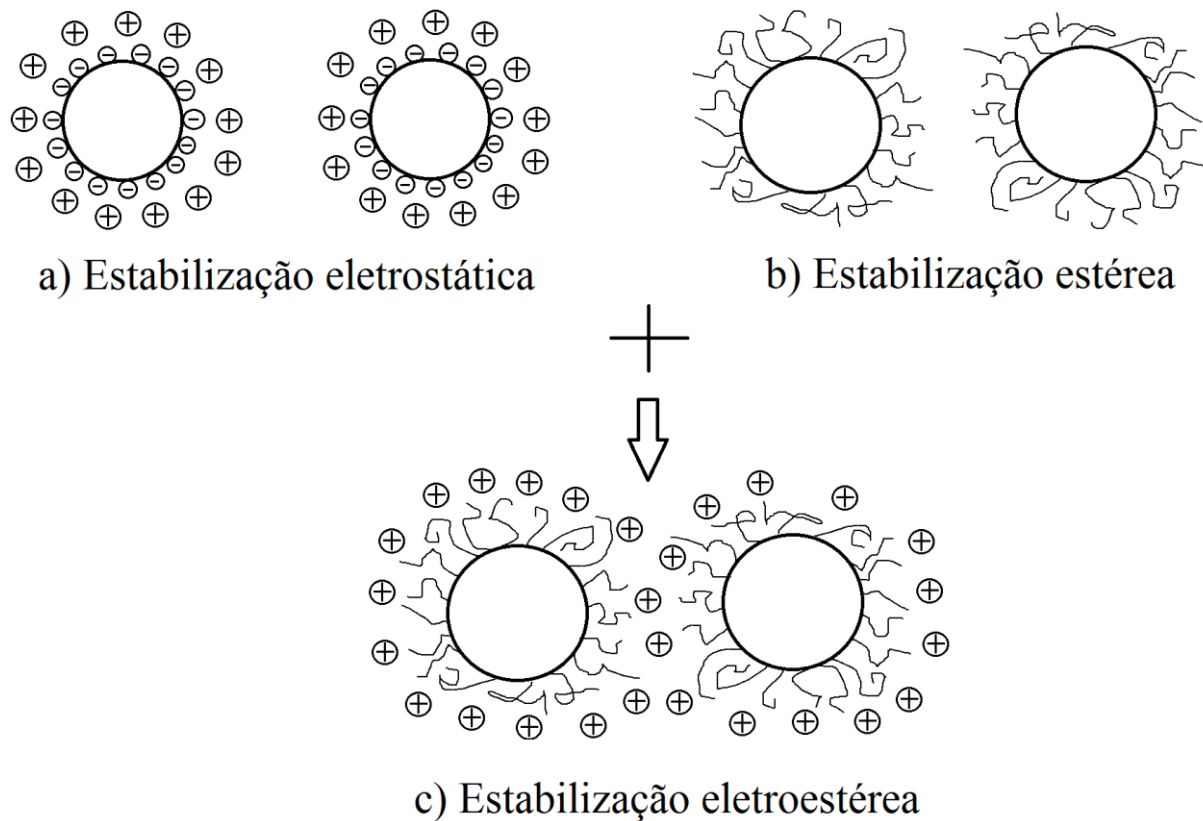
Figura 9: Representação dos métodos de síntese *top down* e *bottom up*.



Para estabilizar as nanopartículas metálicas, recorre-se a alterações que as impeçam de se aproximarem uma das outras o suficiente para não agregarem. Basicamente há dois tipos de estabilização: a repulsão eletrostática (estabilização eletrostática) e o impedimento estérico (estabilização estérica) (HANG *et al.*, 2009). Para a estabilização eletrostática (Figura 10a), usa-

se um composto com carga (positiva ou negativa) que geralmente fica adsorvido sobre a superfície da nanopartícula metálica, conferindo-lhes, portanto, potencial eletrostático. Essa carga impede que as nanopartículas se aproximem o suficiente para que o processo de agregação se inicie. Já na estabilização por impedimento estérico (Figura 10b), as nanopartículas são revestidas superficialmente com uma camada de polímero, proteína ou dendrímero. Dessa forma, cria-se uma barreira mecânica que impede a aproximação. É possível, também, juntar as duas estabilizações para originar a estabilização eletroestérea (Figura 10c). Surfactantes iônicos são geralmente usados para se obter esse tipo de estabilização já que possuem uma parte polar, que pode gerar uma dupla camada elétrica, e uma parte lipofílica, que pode gerar uma repulsão estérea (FRITZ *et al.*, 2002; SEHLLEIER *et al.*, 2014).

Figura 10: Estabilização de nanopartículas a) eletrostática, b) estérea e c) eletroestérea.



1.3.2. Nanopartículas bimetálicas

Nanopartículas bimetálicas (BMNPs – do inglês, *bimetallic nanoparticles*) são formadas por dois metais diferentes. A adição do segundo metal proporciona novas propriedades que não são observadas nas nanopartículas monometálicas e o surgimento do efeito sinérgico. Por estes motivos, a construção de CMEs com BMNPs está atraindo a atenção

de pesquisadores (SHARMA *et al.*, 2019). A preparação de nanopartículas bimetálicas em fase líquida pode ser classificada em quatro métodos: redução simultânea de íons metálicos, decomposição de complexos bimetálicos, redução sucessiva de íons metálicos e preparação eletroquímica a partir de dois eletrodos metálicos (YONEZAWA, 2004). A redução simultânea e a sucessiva de íons metálicos são os métodos mais simples e tem como objetivo a obtenção de nanopartículas do tipo *core-shell*. Ambos produzem nanopartículas metálicas com valência zero. Na redução simultânea os dois metais são reduzidos ao mesmo tempo com um agente redutor. Já na redução sucessiva, um metal é reduzido primeiro e, em seguida, um segundo metal é reduzido na superfície da primeira (SHARMA *et al.*, 2019).

Core-shell é uma das estruturas que as nanopartículas bimetálicas podem exibir, há também o *core partial-shell* e liga. A Fig. 11 mostra o aspecto visual de cada estrutura. “*Core*” significa núcleo e “*shell*” significa casca, então uma nanopartícula bimetálica deste tipo é composta por um metal que é o núcleo e por outro metal que é a casca que recobre totalmente o núcleo. É comum utilizar a nomenclatura X@Y para denotar este tipo de nanopartícula, onde X é o núcleo e o Y é a casca. Nas BMNPs com a estrutura do tipo *core partial-shell*, a casca não recobre todo o núcleo, deixando partes deste exposto. Já nas ligas não há um padrão, sendo nanopartículas compostas de dois metais distribuídas de forma aleatória (YOKOYAMA *et al.*, 2008; ZHANG e YAN, 2013).

Na Tabela 2 foram apresentados alguns trabalhos que utilizaram BMNPs estabilizadas em diferentes materiais, bem como sua aplicação como modificadores de eletrodos para determinação eletroanalítica de diversas espécies químicas. Como pode ser observado na Tabela 2, os CMEs com BMNPs podem aplicados na determinação de compostos inorgânicos e orgânicos. Porém, há um tipo de compostos que foi pouco explorado: os desreguladores endócrinos da classe das dinitroanilinas.

Figura 11: Nanopartículas bimetálicas do tipo a) *core-shell*, b) *core partial-shell* e c) liga.

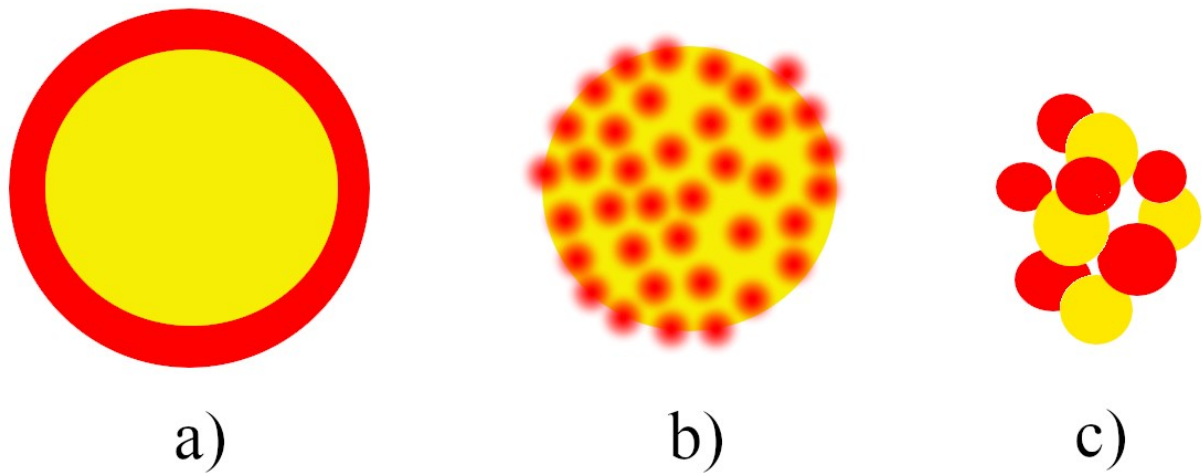


Tabela 2: Trabalhos utilizando CMEs com nanopartículas bimetálicas para detecção de diferentes compostos.

CME	Analito	Técnica	Limite de detecção (nmol L ⁻¹)	Referência
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas bimetálicas de Au e Ag estabilizadas em óxido de ferro reduzido dopado com nitrogênio	Daunomicina (droga anticâncer)	Voltametria de pulso diferencial	5,30	(KONG <i>et al.</i> , 2019)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas bimetálicas de Au e Ag estabilizadas em cisteína e nafion	Hg ²⁺	Voltametria de pulso diferencial	0,005	(SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2019)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas bimetálicas de Ni e Pd estabilizadas em óxido de grafeno reduzido	Glucose	Amperometria	30,0	(NAEIM <i>et al.</i> , 2018)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas bimetálicas de Pd e Ag estabilizadas em óxido de grafeno reduzido	Etilefrina (antihipertensivo)	Voltametria de pulso diferencial	139,0	(REDDY <i>et al.</i> , 2018)
Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas bimetálicas de Pd e Ag estabilizadas com extrato de cogumelo	Ácido úrico	Voltametria de pulso diferencial	5,5	(MALLIKARJUNA <i>et al.</i> , 2018)
Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas bimetálicas de Au e Cu suportadas em zeólitas P	Hidrazina	Amperometria	43,0	(AMIRIPOUR, AZIZI e GHASEMI, 2018)

Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas bimetálicas de Au e Pd estabilizadas em nanofolhas de carbono	Bisfenol A	Voltametria de pulso diferencial	8,0	(SU <i>et al.</i> , 2017)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de Ni e Pd e poliacrilamida	Glutamato	Amperometria	52,0	(YU, MA e WU, 2015)
Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas bimetálicas de Au e Pt e nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Aflatoxina B ₁ (micotoxina)	Voltametria de pulso diferencial	0,03	(WANG <i>et al.</i> , 2014)

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos métodos eletroanalíticos com eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas bimetálicas para a determinação de dinitroanilinas com potencial para serem desreguladores endócrinos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas mono e bimetálicas com Ag, Au, Co, Cu e Pt;
- Preparar eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas mono e bimetálicas;
- Caracterizar tanto as nanopartículas mono e bimetálicas sintetizadas quanto os eletrodos quimicamente modificados construídos;
- Avaliar o aumento de sensibilidade dos eletrodos quimicamente modificados em relação aos eletrodos sem modificação;
- Otimizar os parâmetros experimentais (pH, eletrólito suporte, síntese das nanopartículas bimetálicas), de modo a se obter a máxima resposta eletroanalítica;
- Obter as curvas de calibração para a ORZ e a BTL;
- Determinar parâmetros analíticos como faixa linear e limites de detecção e quantificação;
- Estudar a precisão da metodologia proposta através de ensaios de repetibilidade intradia e interdia;
- Quantificar as concentrações de ORZ e de BTL em amostras de alimentos;
- Avaliar o efeito de matriz sobre a resposta eletroquímica da ORZ e da BTL nas amostras analisadas;
- Expressar a exatidão da metodologia eletroanalítica através de testes de adição e recuperação e pela comparação dos resultados com os obtidos por um método comparativo.

CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes usados são da marca Sigma-Aldrich e foram obtidos comercialmente. Soluções contendo ORZ ou BTL $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-os em etanol e estocadas sob refrigeração de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Soluções com concentrações menores foram obtidas por simples diluição das mesmas. As soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura. Para os estudos de eletrólito suporte foram utilizadas as seguintes soluções tampões: Britton-Robinson (B-R), fosfato e citrato. Para a obtenção destas soluções tampões foram usados os seguintes reagentes: ácido acético (CH_3COOH), ácido bórico (H_3BO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) e citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Para ajustar o pH das soluções, foram utilizadas soluções de HCl ou NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para a síntese das diferentes nanopartículas, foram usadas AgNO_3 (nitrato de prata), $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ácido tetracloro áurico tetra hidratado), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobalto heptahidratado), $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado) e H_2PtCl_6 (ácido hexacloroplatínico) como fontes de seus respectivos metais. Como estabilizante das nanopartículas metálicas, foram utilizadas a quitosana (CTS), dissolvida em ácido acético 1,0 %, e a poli(vinilpirrolidona) (PVP), dissolvida em água. Para reduzir os metais na presença da PVP, empregou-se o tetraidreto de boro e sódio (NaBH_4). Soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em KCl foram feitas com o propósito de caracterizar o eletrodo eletroquimicamente.

3.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MONOMETÁLICAS

As nanopartículas monometálicas foram obtidas usando a CTS ou a PVP como estabilizante e soluções aquosas contendo o metal de interesse. Usando a CTS como estabilizante, empregou-se o seguinte procedimento: em 5,0 mL de CTS 0,25 % foram adicionados 5,0 μL da solução aquosa contendo o metal de interesse na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em seguida esta solução ficou sob agitação durante 8 h e sob aquecimento ($80 \text{ }^\circ\text{C}$). A solução que inicialmente era incolor passou a exibir uma outra coloração, indicando que houve a formação das nanopartículas.

Com a PVP como estabilizante, utilizou-se o seguinte procedimento: em 5,0 mL de PVP 0,25 % foram adicionados 5,0 μL da solução aquosa contendo o metal de interesse na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em seguida esta solução ficou sob agitação durante 2 h em

temperatura ambiente (≈ 25 °C). Depois deste tempo, foram adicionados à solução 200 μL de NaBH_4 20,0 mmol L^{-1} recentemente preparada sob agitação constante. A solução que era inicialmente incolor passou a exibir uma outra coloração, indicando que houve a formação das nanopartículas.

As nanopartículas sintetizadas desta forma foram as de Ag, Au, Co, Cu e Pt.

3.3. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS

Empregou-se o método da redução sucessiva de íons metálicos para a obtenção das BMNPs, onde reduziu-se primeiro o metal que serviria como núcleo (*core*) e depois o metal que serviria como casca (*shell*) na mesma solução.

CTS: em 5,0 mL de CTS 0,25 % foram adicionados 3,0 μL da solução aquosa contendo o metal que serviria como núcleo na concentração de 0,1 mol L^{-1} e em seguida esta solução ficou sob agitação durante 8 h e sob aquecimento (80 °C). Após a mudança da coloração da solução, adicionou-se 7,0 μL da solução aquosa contendo o metal que serviria como casca na concentração de 0,1 mol L^{-1} sob agitação constante. Depois de 2 h, observou-se outra mudança na coloração da solução, indicando que o segundo metal também foi reduzido.

PVP: em 5,0 mL de PVP 0,25 % foram adicionados 5,0 μL da solução aquosa contendo o metal de interesse na concentração de 0,1 mol L^{-1} e em seguida esta solução ficou sob agitação durante 1 h em temperatura ambiente (≈ 25 °C). Depois deste tempo, foram adicionados à solução 200 μL de NaBH_4 20,0 mmol L^{-1} recentemente preparada sob agitação constante. Após 30 min da mudança da coloração da solução, adicionou-se 5,0 μL da solução aquosa contendo o metal que serviria como casca na concentração de 0,1 mol L^{-1} sob agitação constante. Esta solução mudou de coloração novamente e deixou-se agitando mais 2 h para assegurar que todo o segundo metal foi reduzido.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Para a caracterização das nanopartículas mono e bimetálicas, foram feitas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM – do inglês, *transmission electron microscopy*), espectros UV-vis e de raio X por dispersão em energia (EDS – do inglês, *energy-dispersive X-ray spectroscopy*). As imagens de TEM e EDS foram adquiridas com o auxílio do microscópio JEM-2100 (JEOL, Japão) operando em 100 kV. A distribuição e tamanho das NPs foi estimado usando o *software* ImageJ. A análise de TEM e de EDS foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC). Os espectros UV-vis foram obtidos com o auxílio do

espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Japão) e uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

3.5. PREPARAÇÃO DOS CMES

Para a fabricação dos CMES, um eletrodo de carbono vítreo (GCE – do inglês, *glassy carbon electrode*) foi primeiramente polido com alumina (0,03 μm) e lavado com água destilada. Em seguida, gotejou-se 3,0 μL da solução modificadora contendo nanopartículas mono ou bimetálicas na superfície do GCE (*drop coating*). Em seguida, o mesmo foi deixado em uma estufa com temperatura de 40 °C por 10 min a fim de evaporar todo o solvente e formar um filme na superfície do GCE.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS CMES

A morfologia da superfície dos CMES foi analisada através de imagens de microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (SEM-FEG – do inglês, *scanning electron microscopy with field emission gun*) com o auxílio do microscópio JSM-6701F (JEOL, Japão). A análise de SEM-FEG foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC).

Para a caracterização eletroquímica dos eletrodos, estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS – do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) foram realizados. As medidas foram feitas na presença de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 0,5 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . Os gráficos de Nyquist foram obtidos na faixa de frequência de 50.000 Hz até 0,01 Hz. Foi usado o potenciostato/galvanostato PalmSens³ (Palm Instruments BV, Holanda) acoplado a um microcomputador com o *software* PSTrace versão 4.6 para a aquisição dos dados.

3.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras de suco de uva comercial foram obtidas de uma loja local (Florianópolis, SC). Então 1,0 mL da amostra foi adicionada a uma célula eletroquímica contendo 9,0 mL do eletrólito de suporte. Nenhum pré-tratamento foi necessário para analisá-las. Para as amostras fortificadas, foram adicionadas quantidades conhecidas do padrão de ORZ no suco de uva. O método da adição de padrão foi empregado para determinar a ORZ nessas amostras.

Amostras comerciais de mel e geleia de maçã foram adquiridas em uma loja local (Florianópolis, SC). A preparação das amostras foi baseada no procedimento descrito no

trabalho de TSIAFOULIS e NANOS com algumas modificações (TSIAFOULIS e NANOS, 2010). Ambas as amostras foram preparadas da seguinte forma: 4,00 g de amostra do alimento foram diluídos com 1,60 mL de tampão B-R pH 2,0 e 0,40 mL de acetona. A mistura foi agitada até completamente homogeneização e foram adicionados mais 8,00 mL de acetona para precipitar o açúcar. A solução foi agitada por 30 minutos. Em seguida, foram coletados 5,00 mL da fase tampão-acetona. Para as amostras fortificadas, o procedimento foi o mesmo com uma alteração: foram adicionadas quantidades de solução estoque de BTL no alimento antes da adição de 1,60 mL de tampão B-R pH 2,0 e 0,40 mL de acetona. Para a análise, 1,0 mL da solução coletada foi adicionado à célula voltamétrica e o método da adição de padrão foi usado para determinar a concentração de BTL nessas amostras.

3.8. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas voltamétricas foram realizadas usando uma célula eletroquímica de 10,0 mL com três eletrodos: um GCE limpo ou modificado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) como eletrodo de referência e um fio de platina como contra eletrodo. Antes de cada experimento, foi borbulhado N₂ por 10 min para a retirada do oxigênio dissolvido no eletrólito de suporte. A faixa de potencial para registrar os voltamogramas cíclicos foi de 0,0 a -1,0 V. Os voltamogramas de onda quadrada com seus parâmetros otimizados foram registrados na mesma faixa de potencial. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (≈ 25 °C) sob atmosfera de nitrogênio. Foi usado o potenciostato/galvanostato PGSTAT 101 (AUTOLAB, Holanda) acoplado a um microcomputador com o *software* NOVA versão 1.10 para aquisição dos dados.

3.9. MÉTODOS COMPARATIVOS

A cromatografia líquida e a espectroscopia UV-vis foram aplicadas para confirmar a confiabilidade dos dados obtidos com os eletrodos quimicamente modificados.

3.9.1. Cromatografia líquida

A cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas (LC-MS/MS – do inglês, *liquid chromatography with mass spectrometry*) foi utilizada para determinar o teor de ORZ em amostras de suco de uva. A separação cromatográfica foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária, desgaseificador online, autoamostrador e compartimento de colunas

termostatzado. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo de modelo Q Trap 3200 com ionização por eletrospray (ESI) por intermédio da fonte Turbo V Ion Spray (Applied Biosystems MDS/Sciex, Concord, Canada). Para análise e aquisição de dados o *software* Analyst 1.6.2 foi utilizado. A separação foi realizada em uma coluna Synergi Polar-RP de dimensões $150 \times 2 \mu\text{m}$; $4 \mu\text{m}$ (Phenomenex, California, Estados Unidos) sob fase móvel gradiente a um fluxo de $250 \mu\text{L min}^{-1}$, composta por 0,1% ácido fórmico em água (A) e 95% acetonitrila (B) nas seguintes proporções: 0-3 min, 30% de B; 4-12 min, 95% de B. Entre corridas foi considerada a realização de pré-condicionamentos de 5 min nas condições iniciais da composição da fase móvel. A coluna foi mantida a uma temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume de injeção foi de $5,0 \mu\text{L}$. Todas as análises foram realizadas no modo negativo de ionização com o espectrômetro operando na resolução unit. Nitrogênio foi utilizado como gás secante, de colisão e nebulização. Os parâmetros de operação e seus valores foram: voltagem do capilar de -4500 V ; *curtain gas* 20 psi; temperatura $450 \text{ }^\circ\text{C}$; gás 1 e gás 2 a 45 psi e vazão média para o gás que promove a dissociação ativada por colisão. O método de monitoramento de múltiplas reações foi escolhido para a detecção. As transições de massa carga (m/z) de confirmação e quantificação foram $345 > 46$ ($Q1 > Q3$ m/z) e $345 > 78$ m/z , respectivamente. E as energias DP, EP, CEP, CE e CXP foram $-55, -1,5, -22, -80, -4 \text{ V}$ e $-55, -1,5, -22, -64, 0 \text{ V}$, respectivamente para as transições de confirmação e quantificação.

3.9.2. Espectroscopia UV-vis

A espectroscopia UV-vis foi aplicada para determinar o teor de BTL em amostras de mel e de geleia de maçã. As análises foram feitas na faixa de comprimento de onda de 350 até 700 nm. A absorbância máxima para a BTL foi em 434 nm. Os espectros de UV-vis foram obtidos com um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Japan) utilizando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta parte do trabalho está dividida em duas seções: a primeira refere-se ao CME aplicado na determinação de ORZ em amostras de suco de uva e a segunda refere-se ao CME empregado na determinação de BTL em amostras de mel e de geleia de maçã.

4.1. RESULTADOS COM A ORZ

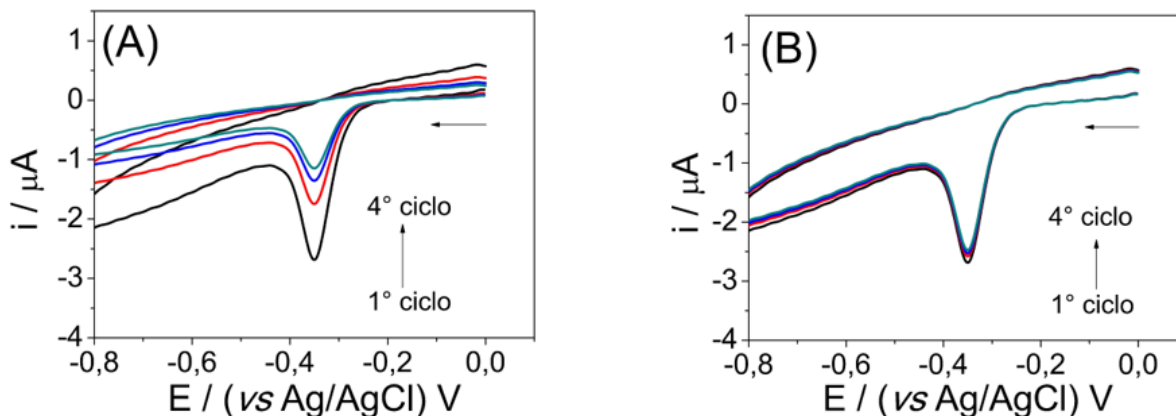
Publicado em *J. Electroanal. Chem.*, 855, 113484, 2019.

Resultados como a escolha das nanopartículas metálicas, caracterização destas e do CME, estudos voltamétricos e aplicação do CME na determinação de ORZ serão discutidos nas próximas seções.

4.1.1. Comportamento eletroquímico da ORZ sobre o GCE

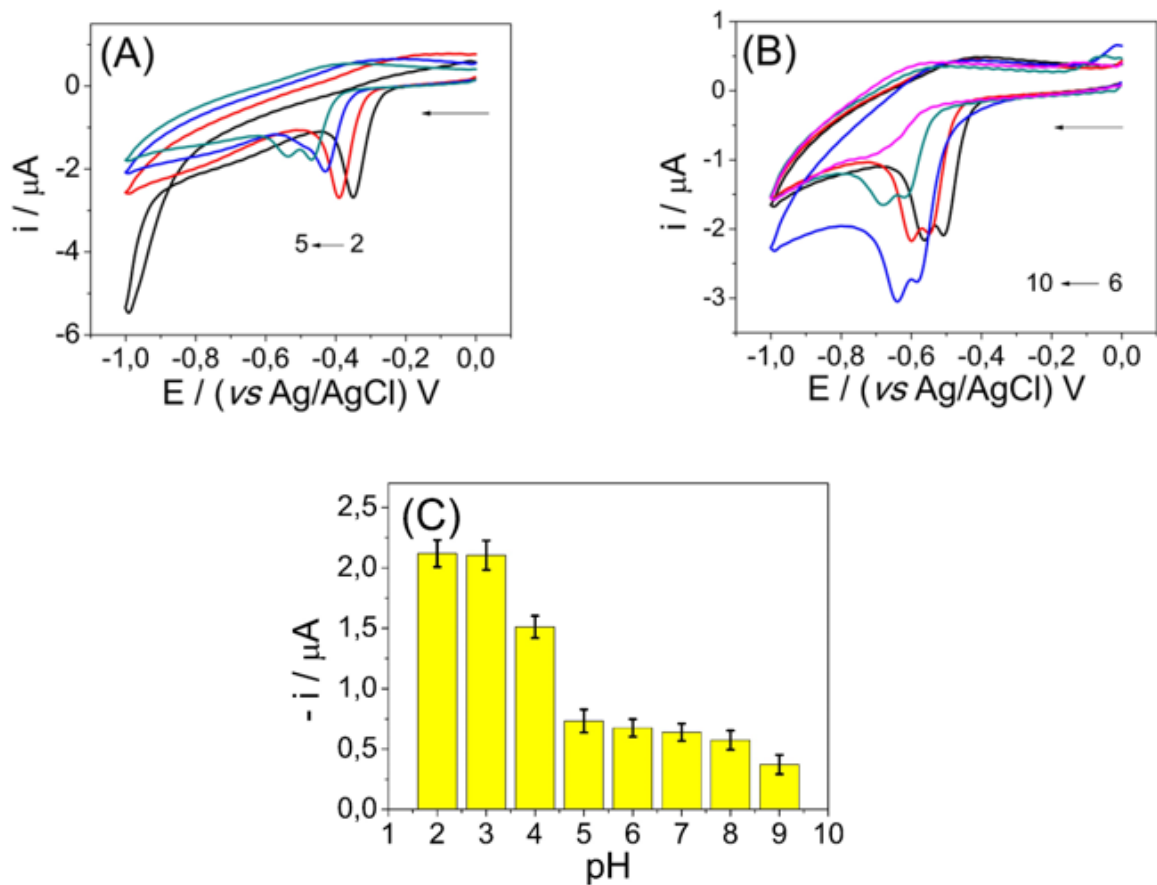
Primeiramente, utilizou-se a voltametria cíclica (CV – do inglês, *cyclic voltammetry*) com o GCE limpo em solução tampão B-R 1,0 mol L⁻¹ (pH 2,0) para ter conhecimento do comportamento eletroquímico da ORZ. Na faixa de potencial empregada, notou-se que a ORZ exibiu um pico de redução na ida, referente a redução dos grupos nitro em sua estrutura, e nenhum pico de oxidação na volta, caracterizando um processo de redução irreversível (MARKEN, NEUDECK e BOND, 2010). No entanto, percebeu-se que a resposta de corrente da ORZ diminuía à medida que se realizavam ciclos sucessivos (Fig. 12A). Pode-se atribuir esse fato à possível adsorção da ORZ ou dos produtos da redução da ORZ na superfície do eletrodo. Então aplicou-se uma etapa de pré-concentração com um potencial de acúmulo (E_{acc}) = -0,1 V durante um tempo de acúmulo (t_{acc}) = 180 s antes de cada medida. Com isso, a resposta de corrente da ORZ ficou praticamente inalterada com os ciclos consecutivos (Fig. 12B). A etapa de pré-concentração permite que a mesma quantidade de ORZ esteja na superfície do eletrodo antes da medida voltamétrica, o que resulta em voltamogramas mais reprodutíveis quando se realiza ciclos sucessivos.

Figura 12: Voltamogramas cíclicos sucessivos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (A) sem e (B) com a etapa de pré-concentração. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.



Em seguida, variou-se o pH do eletrólito de suporte de 2,0 até 10,0 (Fig. 13). Em pH 2,0 e 3,0 há somente um pico de redução da ORZ, de pH 4,0 até 9,0 observou-se o aparecimento de um segundo pico de redução e em pH 10,0 já não se observa mais o pico de redução da ORZ (Fig. 13A e 13B). Isto pode ser explicado porque em meio fortemente ácido ($\text{pH} \leq 3,0$), o grupo amina da ORZ está protonado, o que resulta na diminuição da densidade eletrônica dos grupos nitro e faz com que ambos tenham praticamente o mesmo ângulo diedro em relação ao anel benzênico, fazendo com que eles estejam em um ambiente químico semelhante e sejam reduzidos simultaneamente (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996). Nos valores de pH de 4,0 até 9,0, cada grupo nitro da ORZ tem uma vizinhança química um pouco diferente, visto que a amina não está mais protonada, o que gera o aparecimento do segundo pico de redução em um potencial próximo ao do primeiro, causando uma mudança no mecanismo de redução (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996; WEN *et al.*, 2008; SMARZEWSKA *et al.*, 2017). O desaparecimento do sinal da ORZ em pH 10,0 se deve ao fato da ORZ ter um valor de $\text{pK}_a = 9,4$ (TOMLIN, 1997), fazendo com que nitrogênio do grupo sulfonamida fique com uma carga negativa, o que gera uma repulsão eletrostática entre a superfície do eletrodo (potencial de acúmulo e faixa de potencial negativa empregada na CV) e a ORZ. Assim, menos moléculas de ORZ conseguem chegar na superfície do eletrodo e sofrer redução. Pelo gráfico $-i$ vs. pH (Fig. 13C), conclui-se que a maior resposta de corrente é obtida em $\text{pH} = 2,0$, já que nesse pH ambos os grupos nitro são reduzidos simultaneamente. Portanto, os próximos testes de comparação das nanopartículas mono e bimetálicas foram realizadas em solução tampão B-R ($\text{pH} = 2,0$).

Figura 13: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (A) de 2,0 até 5,0 e (B) de 6,0 até 10,0. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. pH ($n = 3$).



4.1.2. Avaliação do uso de CME a base de nanopartículas monometálicas frente a detecção de ORZ

A fim de sintetizar nanopartículas monometálicas estáveis, optou-se por utilizar a CTS já que esta serve tanto como agente estabilizante quanto agente redutor e também porque pode facilitar a transferência de elétrons devido a sua natureza hidrofílica (BATRA e PUNDIR, 2013). Foram feitas 5 sínteses de nanopartículas monometálicas com a CTS para a detecção da ORZ: nanopartículas de ouro (AuNPs-CTS), de prata (AgNPs-CTS), de cobalto (CoNPs-CTS), de cobre (CuNPs-CTS) e de platina (PtNPs-CTS). O ouro, a platina e o cobre foram escolhidos para este estudo pois são excelentes condutores elétricos, o que poderia aumentar a sensibilidade do CME frente a redução da ORZ (JIA *et al.*, 2016). A prata foi escolhida pois há vários relatos na literatura que este metal catalisa a reação de redução de grupo nitro (DE LIMA *et al.*, 2016). O cobalto foi escolhido porque suas nanopartículas são magnéticas, o que também poderia resultar em um aumento da sensibilidade do CME (WANG *et al.*, 2011). A dispersão

com as CoNPs-CTS ficou estável por 2 horas e com as AgNPs-CTS ficou estável por 4 dias, depois desse tempo também se observou a precipitação das mesmas. As dispersões restantes (AuNPs-CTS, CuNPs-CTS e PtNPs-CTS) ficaram estáveis por 5 meses, onde notou-se a precipitação das nanopartículas e uma mudança no perfil voltamétrico da ORZ.

Com as dispersões contendo as nanopartículas monometálicas, construiu-se os seguintes CMEs: AuNPs-CTS/GCE, AgNPs-CTS/GCE, CuNPs-CTS/GCE e PtNPs-CTS/GCE. A Fig. 14 apresenta os voltamogramas cíclicos comparando cada CME e o GCE. Os CMEs AuNPs-CTS/GCE e AgNPs-CTS/GCE (Fig. 14A) conseguiram detectar o pico de redução da ORZ, enquanto que CuNPs-CTS/GCE (Fig. 14B) e PtNPs-CTS/GCE (Fig. 14C) não. Provavelmente houve a formação de nanopartículas pequenas e de formato esférico na síntese envolvendo a prata e o ouro, enquanto que a síntese com os outros metais pode ter formado nanopartículas grandes e de formato diferente do esférico, o que dificulta a detecção da ORZ. Com os CMEs que são capazes de detectar a ORZ, comparou-se a resposta de corrente e observou-se que, da forma que foi amostrado, não houve uma diferença significativa (Fig. 15).

Figura 14: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre (A) a) GCE, b) AuNPs-CTS/GCE e c) AgNPs-CTS/GCE; (B) a) GCE e b) CuNPs-CTS/GCE; (C) a) GCE e b) PtNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.

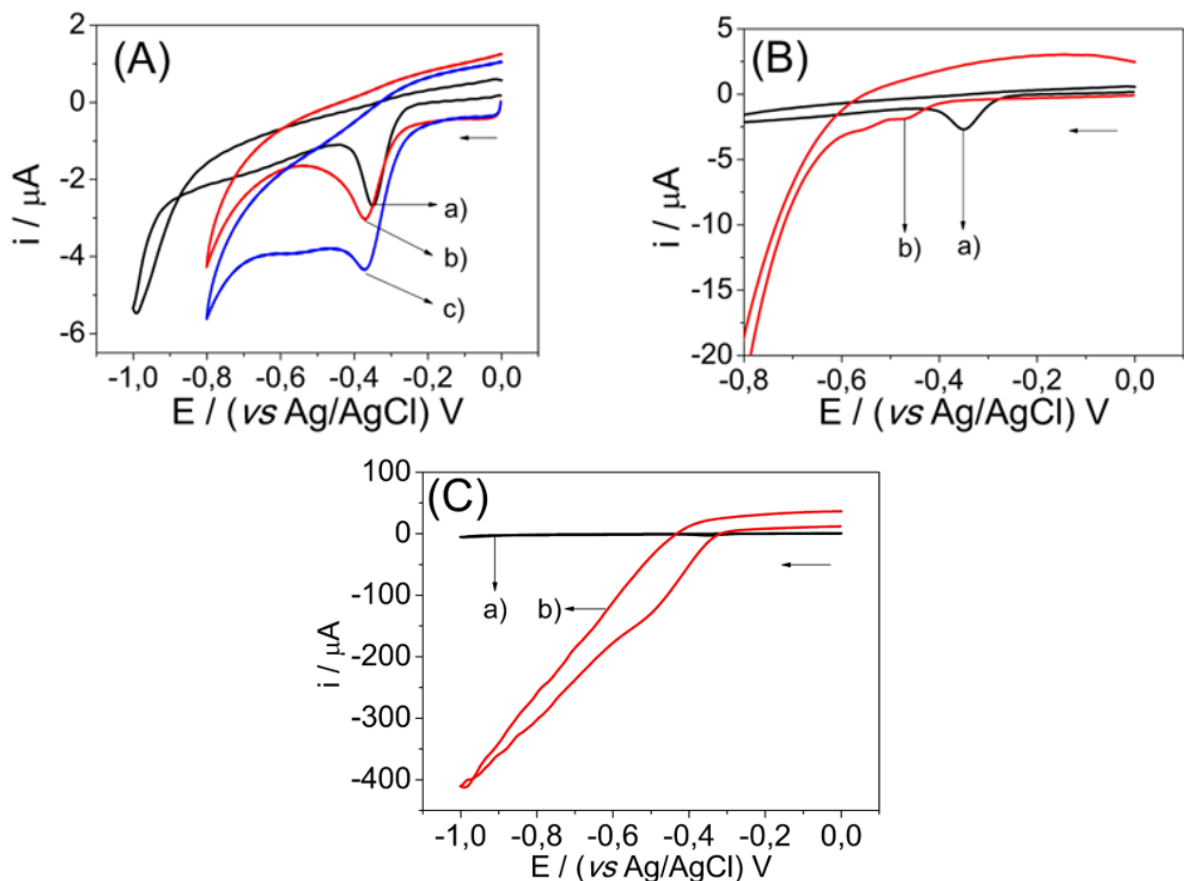
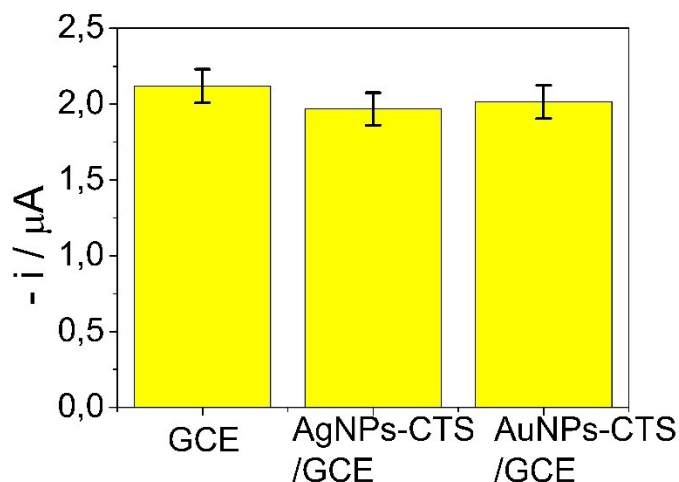


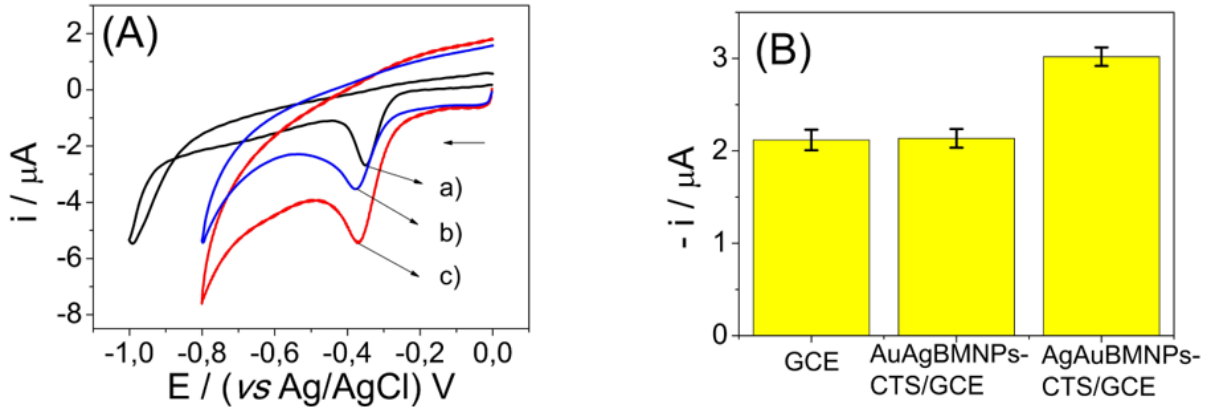
Figura 15: Resposta de corrente para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o GCE e sobre os CMEs construídos com nanopartículas monometálicas ($n = 3$).



4.1.3. Comportamento eletroquímico da ORZ sobre os CMEs com nanopartículas bimetálicas

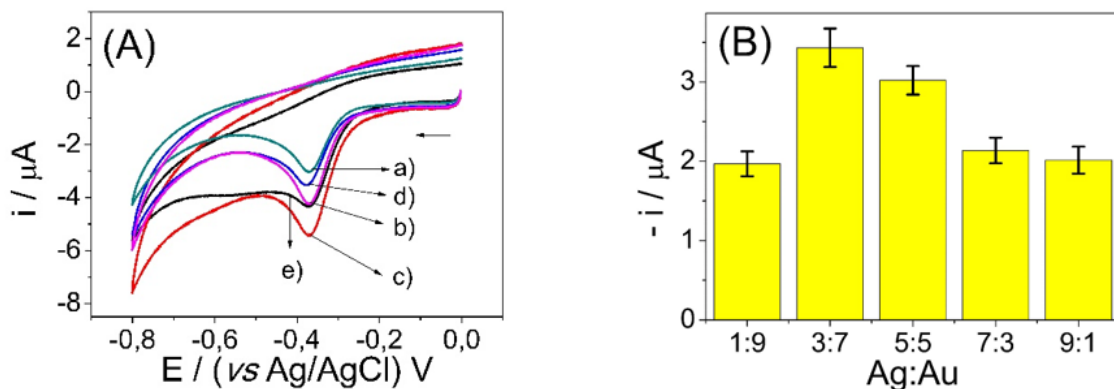
Tendo em vista que nenhum CME com nanopartículas monometálicas se mostrou promissor, começou-se os estudos com as nanopartículas bimetálicas de prata e ouro estabilizadas em quitosana (AgAuBMNPs-CTS). Esses metais foram selecionados por conseguirem detectar a ORZ. Assim, dois CMEs foram construídos: AgAuBMNPs-CTS/GCE e AuAgBMNPs-CTS/GCE. A única diferença entre essas nanopartículas bimetálicas é a ordem de redução dos metais. No caso do AgAuBMNPs-CTS/GCE são os íons Ag^+ que são reduzidos primeiro para Ag^0 e depois os íons Au^{3+} são reduzidos para Au^0 . Já no caso do AuAgBMNPs-CTS/GCE é ao contrário, os íons Au^{3+} são reduzidos para Au^0 primeiro e depois os íons Ag^+ são reduzidos para Ag^0 . Inicialmente, utilizou-se ambos os metais na mesma proporção (5:5) e os resultados estão representados na Fig. 16. O AuAgBMNPs-CTS/GCE exibiu quase a mesma resposta de corrente que o GCE, enquanto que o AgAuBMNPs-CTS/GCE aumentou a resposta de $2,11 \mu\text{A}$ para $3,02 \mu\text{A}$. Provavelmente as AuNPs conseguiram recobrir as AgNPs, resultando em uma nanopartícula bimetálica do tipo *core-shell* ou *core partial-shell*, enquanto que as AgNPs não conseguiram recobrir as AuNPs, resultando em uma nanopartícula bimetálica do tipo *liga*. Assim, decidiu-se otimizar a síntese das AgAuBMNPs-CTS para construir um CME mais sensível.

Figura 16: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre a) GCE; b) AuAgBMNPs-CTS/GCE e c) AgAuBMNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Comparação de resposta de corrente para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com GCE e CMEs usando nanopartículas bimetálicas ($n = 3$).



Variou-se a proporção de Ag:Au da seguinte maneira: 1:9; 3:7; 5:5; 7:3 e 9:1. A Fig. 17 revela que o melhor perfil e resposta de corrente são obtidos quando se utiliza a proporção 3:7 de Ag:Au. Provavelmente nesta proporção houve a formação de nanopartículas bimetálicas pequenas do tipo *core-shell* ou *core partial-shell*, o que proporcionou este aumento do sinal da redução da ORZ. Já nas outras proporções, podem ter sido sintetizadas nanopartículas de tamanho maior ou do tipo liga, o que não aumentou muito o sinal de redução da ORZ. Com isso, as AgAuBMNPs-CTS na proporção Ag:Au 3:7 foram escolhidas para serem caracterizadas e utilizadas nos próximos estudos.

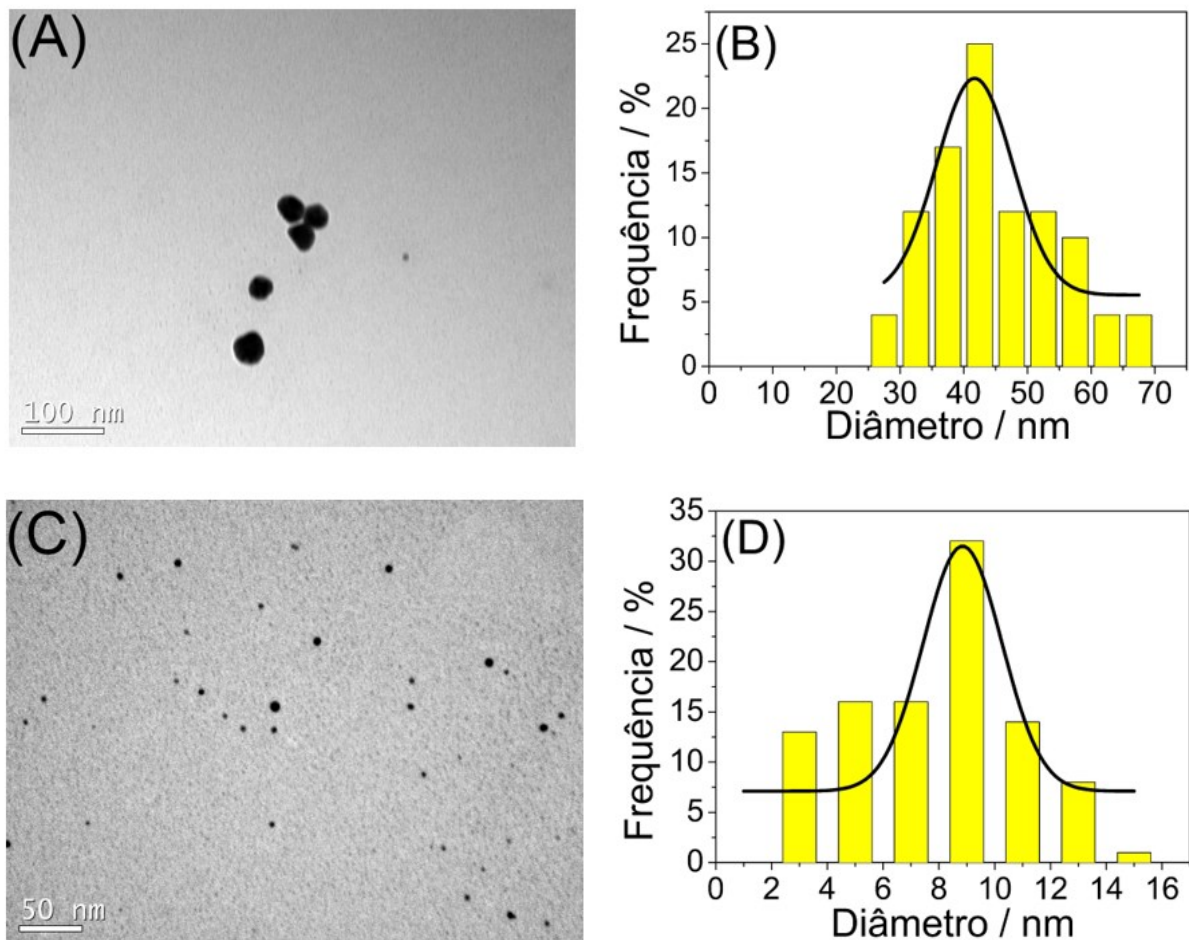
Figura 17: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre AgAuBMNPs-CTS/GCE com diferentes proporções (Ag:Au): a) 1:9; b) 3:7; c) 5:5; d) 7:3 e e) 9:1. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. proporção ($n = 3$).

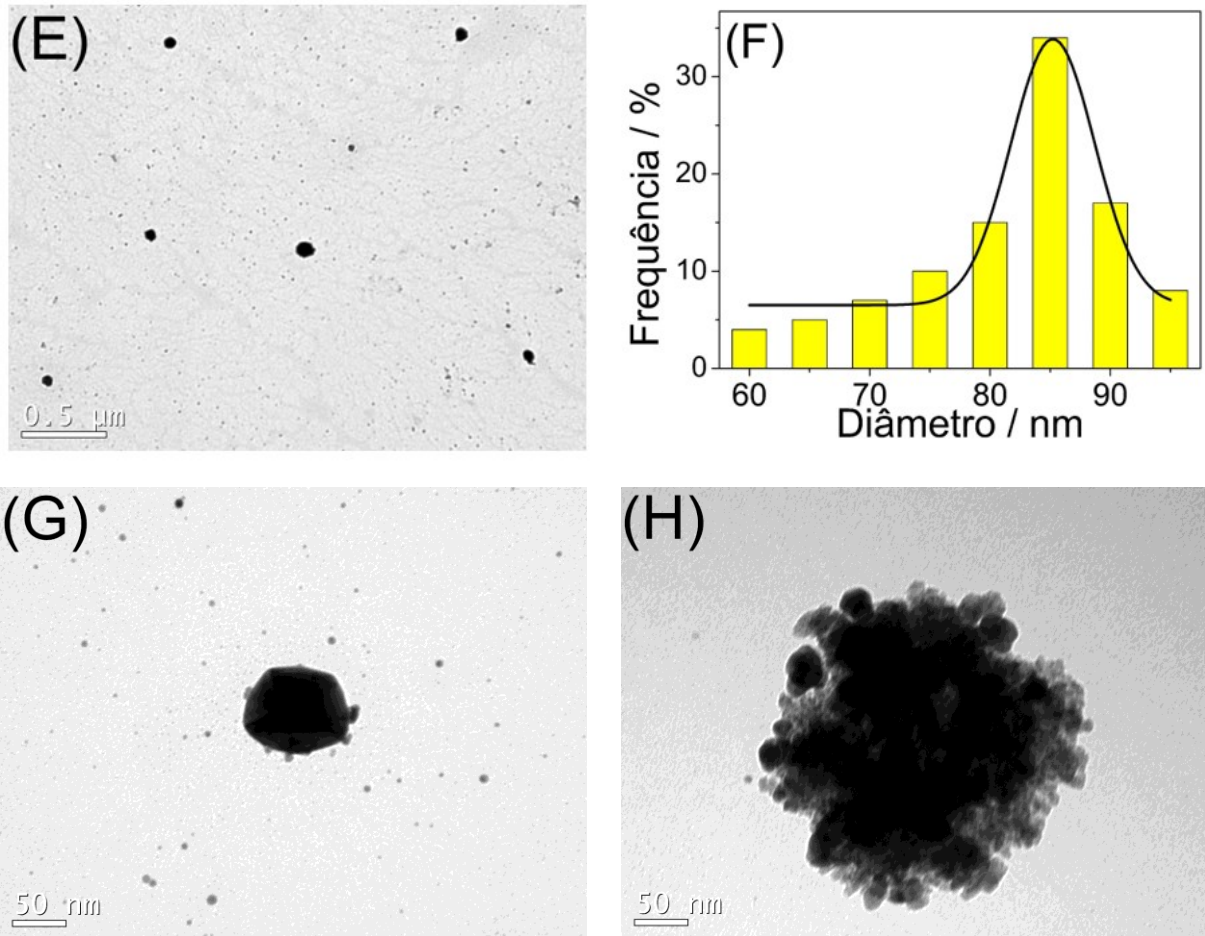


4.1.4. Caracterização das AgAuBMNPs-CTS

Empregou-se a TEM, a espectroscopia UV-vis e a EDS para caracterizar as nanopartículas obtidas. A Fig. 18 mostra as imagens de TEM para as nanopartículas mono e bimetalicas de Ag e Au estabilizadas em CTS e seus respectivos histogramas. Pode-se observar que ambas as nanopartículas monometálicas exibem um formato esférico (Fig. 18A e 18C) e que o valor de diâmetro médio das AgNPs-CTS e AuNPs-CTS é 42,0 nm e 9,0 nm respectivamente (Fig. 18B e 18D). Enquanto que as AgAuBMNPs-CTS possuem um diâmetro médio de 85,0 nm e estão mais dispersas que as nanopartículas monometálicas porque a cobertura extra das AuNPs-CTS nas AgNPs-CTS consegue evitar a agregação das mesmas (Fig. 18E e 18F). As Fig. 18G e 18H mostram as AgNPs-CTS parcialmente cobertas pelas AuNPs-CTS, o que caracteriza a formação das nanopartículas do tipo *core-partial shell* (YOKOYAMA *et al.*, 2008; ZHANG e YAN, 2013).

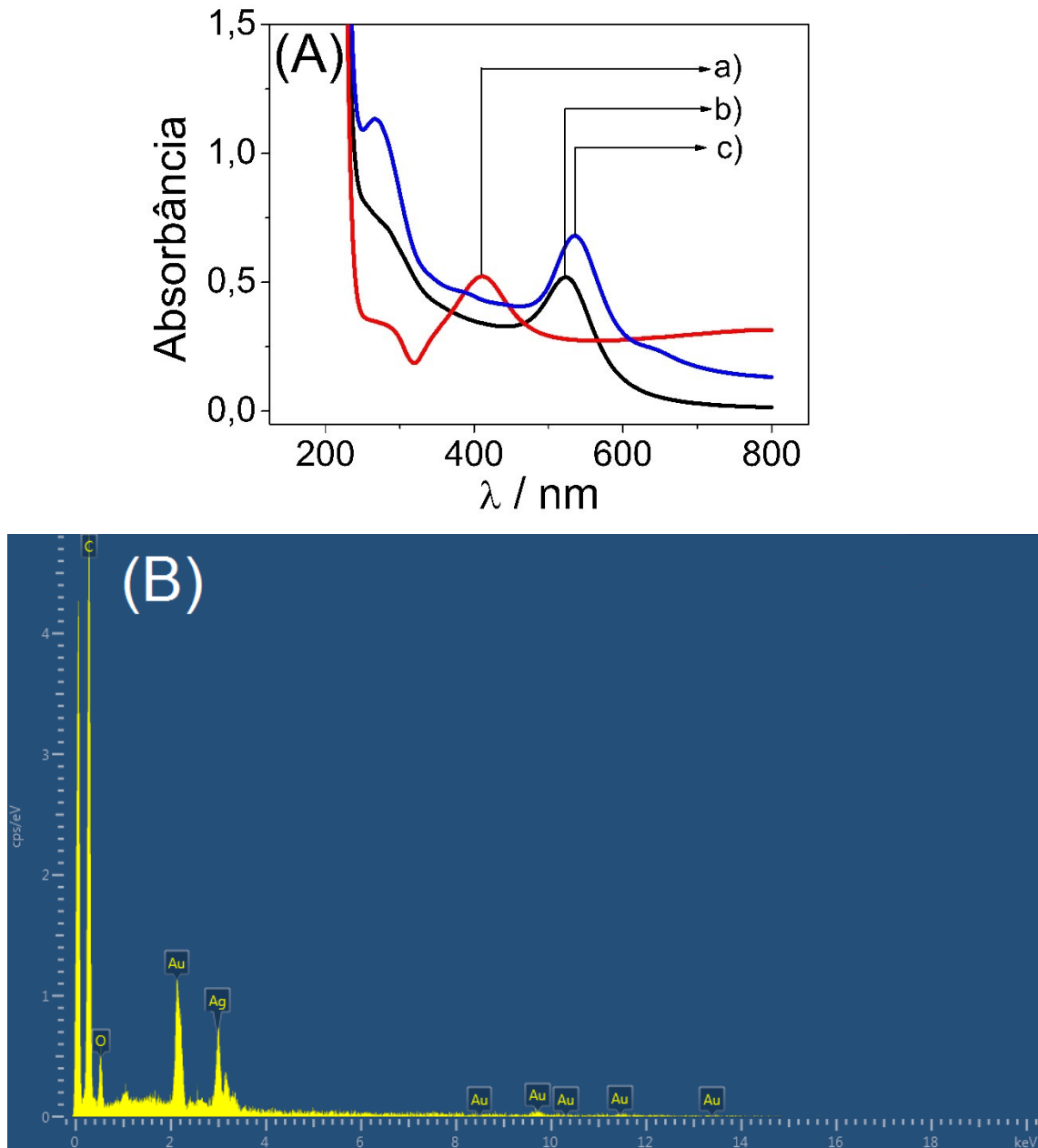
Figura 18: Imagens de TEM e histogramas para AgNPs-CTS (A e B), para AuNPs-CTS (C e D) e para AgAuBMNPs-CTS (E e F). Imagens de TEM para AgAuBMNPs-CTS ampliadas (G e H).





Os espectros UV-vis para as nanopartículas mono e bimetalicas estão representados na Fig. 19A. As AgNPs-CTS e AuNPs-CTS exibiram uma banda de absorvância em 411 nm (Fig. 19A-a) e 523 nm (Fig. 19A-b) respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores que sintetizaram nanopartículas de prata e de ouro (GOVINDARAJU *et al.*, 2008; KUMARI, JACOB e PHILIP, 2015; MURUGAVELU e KARTHIKEYAN, 2014). Para as AgAuBMNPs-CTS, o máximo de absorvância está localizado em 535 nm (Figura 19A-c), esse deslocamento batocrômico, comparado com as AuNPs-CTS, pode ser atribuído à formação das nanopartículas do tipo *core-partial shell*. A ausência de quase todo o espectro das AgNPs-CTS sugere que a estrutura das nanopartículas bimetalicas formadas devem ter Ag⁰ como núcleo e Au⁰ como cobertura parcial (RADZIUK *et al.*, 2010). A Fig. 19B apresenta o espectro de EDS para as AgAuBMNPs-CTS a fim de confirmar a presença de ambos os metais. Como pode ser visto, os picos característicos da prata e do ouro estão presentes em 2,98 keV e 2,12 keV respectivamente. Juntando os resultados obtidos pelo TEM, UV-vis e EDS, pode-se afirmar que houve a formação das AgAuBMNPs-CTS do tipo *core-partial shell*.

Figura 19: (A) Espectros UV-vis para a) AgNPs-CTS, b) AuNPs-CTS e c) AgAuBMNPs-CTS. (B) Espectro de EDS para as AgAuBMNPs-CTS.

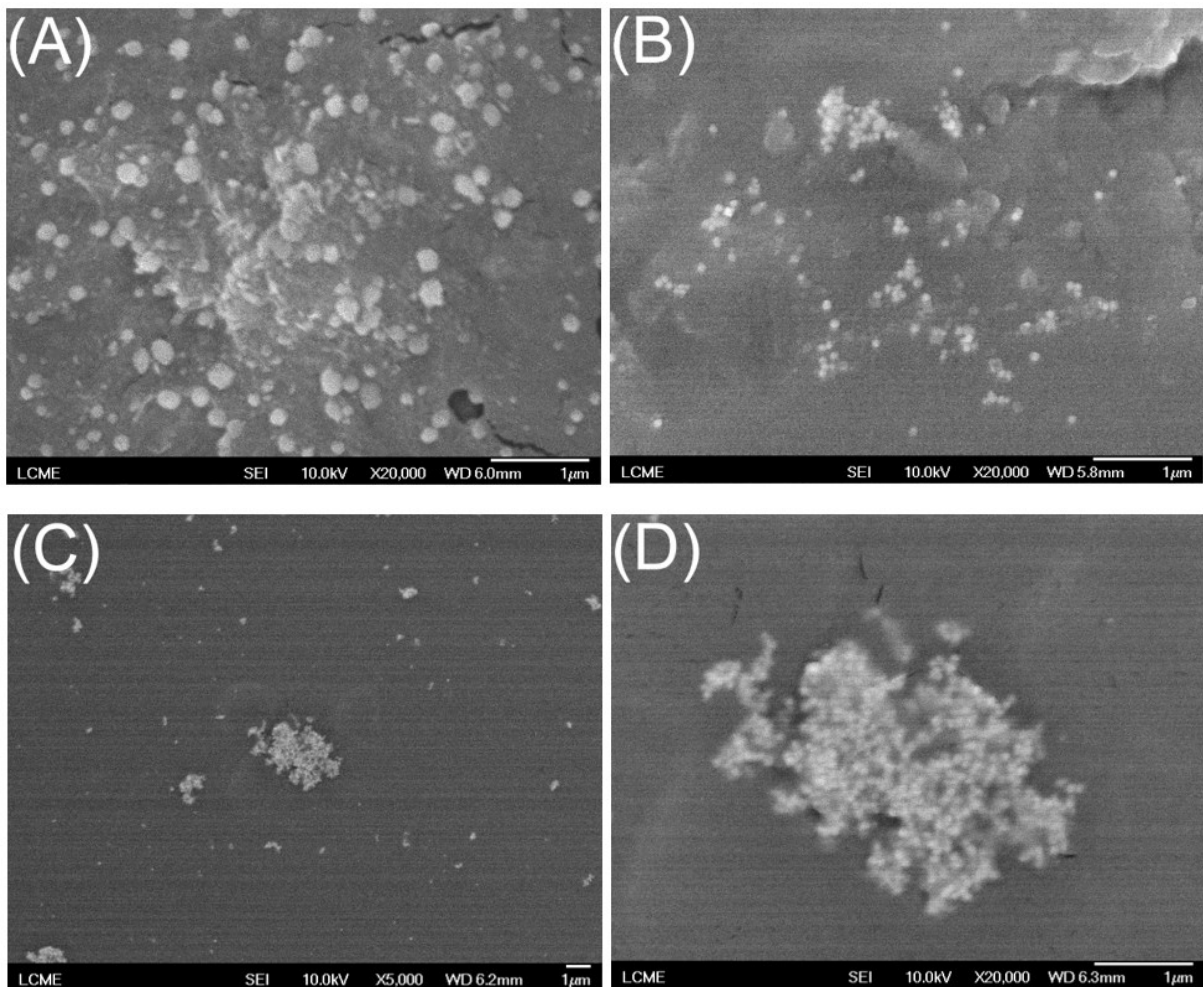


4.1.5. Caracterização do AgAuBMNPs-CTS/GCE

Para caracterizar a morfologia da superfície dos CMEs, usou-se o SEM-FEG. As imagens de SEM-FEG estão apresentadas na Fig. 20. Como nas imagens de TEM, as AuNPs (Fig. 20A) e AgNPs (Fig. 20B) também apresentam um formato esférico, porém pouco dispersas. Já na Fig. 20C e 20D, pode-se observar as AuNPs-CTS recobrando quase totalmente as AgNPs-CTS e que estas estão menos dispersas. Durante a síntese, os AuNPs-CTS cresceram

sobre as AgNPs-CTS para formar as Ag-AuBMNPs-CTS. O ouro elementar foi mantido nas proximidades da superfície das AgNPs-CTS para que, então, nucleassem e crescessem em nanopartículas e, eventualmente, cobrissem parcialmente as AgNPs-CTS. Esses resultados estão de acordo com os obtidos pelas análises de TEM, UV-vis e EDS e confirmam que a estrutura de *core-partial shell* das AgAuBMNPs-CTS permaneceu na superfície do GCE.

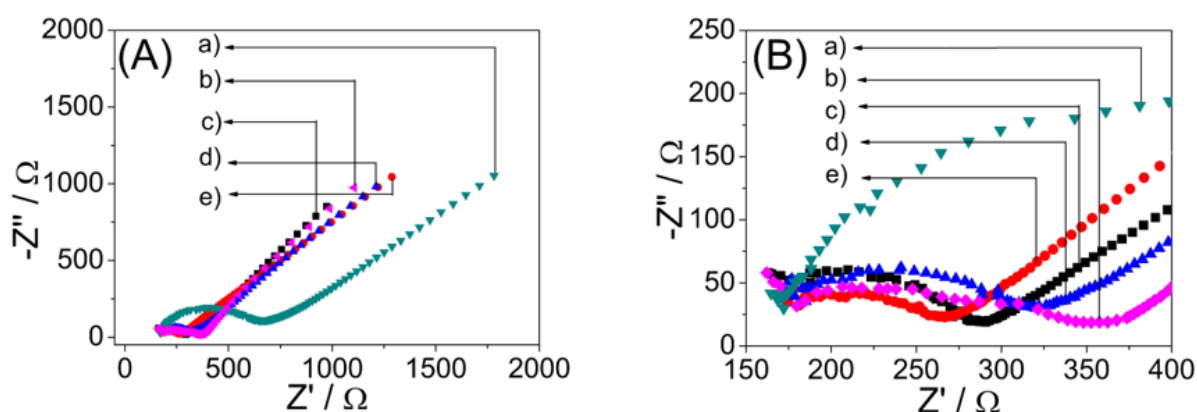
Figura 20: Imagens de SEM-FEG para (A) AgNPs-CTS/GCE, (B) AuNPs-CTS/GCE e (C e D) AgAuBMNPs-CTS/GCE com diferentes ampliações.



Para a caracterização eletroquímica do CME, utilizou-se a EIS. Essa técnica é útil para comparar a resistência a transferência de carga (R_{ct}) de uma reação redox sobre a superfície de eletrodos convencionais ou modificados. O diâmetro do semicírculo formado revela o valor de R_{ct} . A Fig. 21A mostra os gráficos de Nyquist para a) GCE, b) CTS/GCE c) AgNPs-CTS/GCE, d) AuNPs-CTS/GCE e e) AgAuBMNPs-CTS/GCE em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ 0,5 mmol L⁻¹ como sonda redox. Ampliando esses gráficos na região de altas frequências (Fig. 21B), observa-se que GCE e CTS/GCE apresentam valores de R_{ct} de

506,8 e 172,9 Ω respectivamente. Essa diminuição de R_{ct} modificando o eletrodo com apenas CTS era esperado tendo em vista que esta facilita a transferência de elétrons devido a sua natureza hidrofílica (BATRA e PUNDIR, 2013). As R_{ct} obtidas para AgNPs-CTS/GCE, AuNPs-CTS/GCE e AgAuBMNPs-CTS/GCE foram 112,0, 141,5 e 82,7 Ω respectivamente. O AgAuBMNPs-CTS/GCE exibiu o menor R_{ct} , o que pode estar relacionado com o efeito sinérgico entre AgNPs-CTS e AuNPs-CTS. Esse decaimento no valor de R_{ct} revela que as AgAuBMNPs-CTS facilitam a transferência de carga, o que torna o AgAuBMNPs-CTS/GCE promissor para eletroanálise. Esses resultados também confirmam a presença das AgAuBMNPs-CTS do tipo *core-partial shell* na superfície do eletrodo.

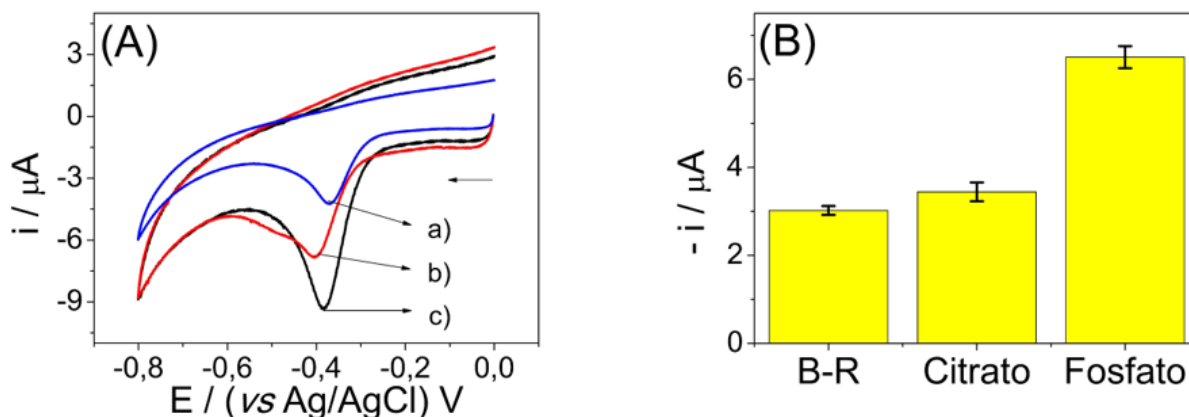
Figura 21: (A) Gráficos de Nyquist para a) GCE; b) CTS/GCE; c) AgNPs-CTS/GCE; d) AuNPs-CTS/GCE e e) AgAuBMNPs-CTS/GCE em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ 0,5 mmol L⁻¹. (B) Ampliação dos gráficos de Nyquist para a) GCE; b) CTS/GCE; c) AgNPs-CTS/GCE; d) AuNPs-CTS/GCE e e) AgAuBMNPs-CTS/GCE.



4.1.6. Estudos de eletrólito de suporte e pH para a redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE

Como a ORZ apresenta uma ótima resposta de corrente em meio ácido, fez-se estudos com soluções tampões que operam nesta faixa de pH como eletrólito de suporte. Foram eles: tampão B-R, tampão fosfato e tampão citrato todos na concentração de 1,0 mol L⁻¹. A Fig. 22 mostra os voltamogramas cíclicos para a ORZ 30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nesses três tampões em pH = 2,0. Percebe-se que o melhor perfil voltamétrico (Fig. 22A-c) e melhor resposta de corrente são obtidos em solução tampão fosfato (Fig. 22B). Provavelmente, o tampão fosfato diminui a espessura da dupla camada elétrica deste eletrodo, aumentando a velocidade de difusão o que resulta em um aumento no sinal de redução da ORZ. Assim, escolheu-se o tampão fosfato como eletrólito de suporte para as próximas análises.

Figura 22: (A) Voltamogramas cíclicos para a ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão a) B-R, b) citrato e c) fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $\nu = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. solução tampão ($n = 3$).



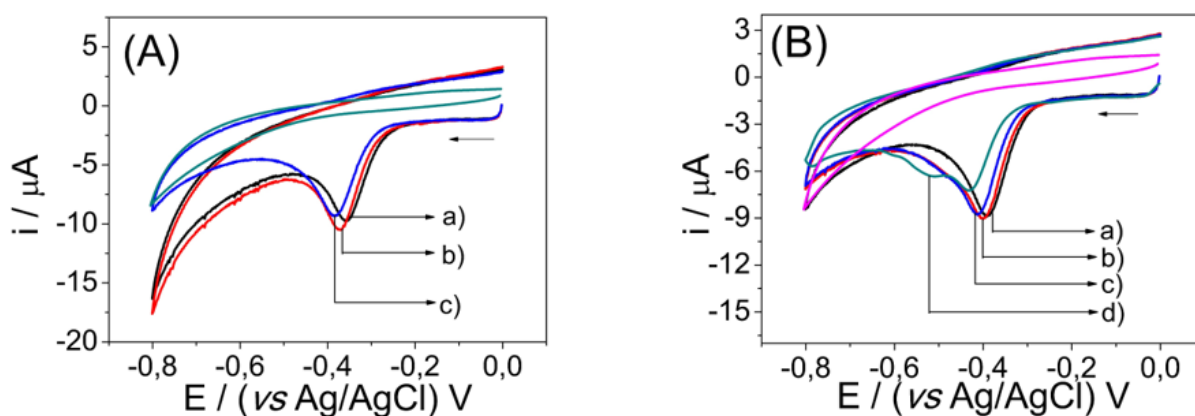
Em seguida, variou-se o pH do tampão fosfato na faixa entre 1,5 até 3,0. A Fig. 23A e 23B apresentam os voltamogramas cíclicos deste estudo. Observa-se que de pH 1,50 até 2,75 há apenas um pico de redução referente à redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE, já em $\text{pH} \geq 3,0$ ocorre o aparecimento do segundo pico. Esses resultados são semelhantes aos que foram discutidos usando GCE em tampão B-R. A explicação para o aparecimento do segundo pico da ORZ em tampão fosfato é a mesma que em tampão B-R. Em meio fortemente ácido ($\text{pH} < 3,0$), o grupo amina está protonado, o que resulta na diminuição da densidade eletrônica dos grupos nitro e faz com que ambos tenham praticamente o mesmo ângulo diedro em relação ao anel benzênico, fazendo com que eles estejam em um ambiente químico parecido e sejam reduzidos simultaneamente (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996). Em $\text{pH} \geq 3,0$, cada grupo nitro da ORZ tem uma vizinhança química um pouco diferente, gerando o aparecimento do segundo pico de redução em potencial próximo ao do primeiro e causando uma mudança no mecanismo de redução (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996; WEN *et al.*, 2008; SMARZEWSKA *et al.*, 2017).

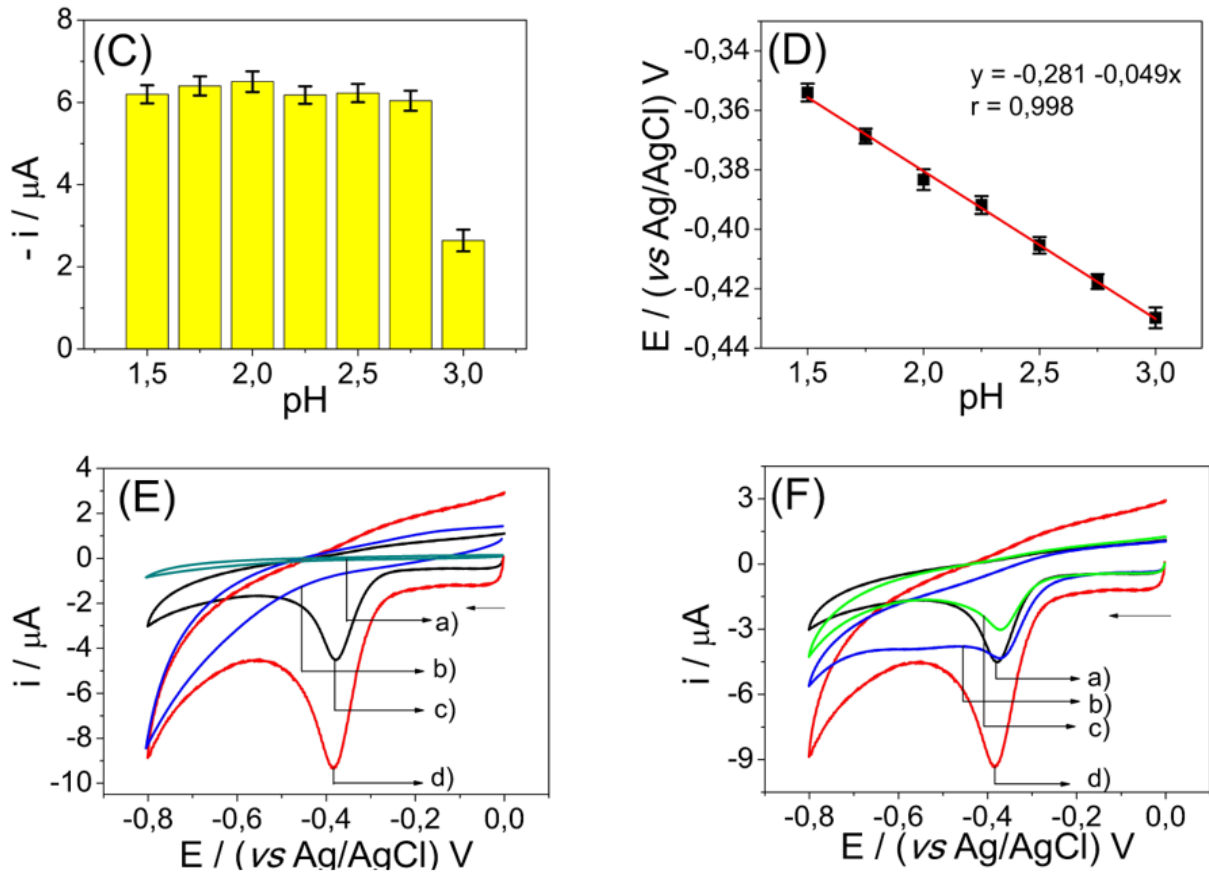
A Fig. 23C revela que a maior resposta de corrente é obtida em $\text{pH} = 2,0$, sendo que a resposta de corrente não difere muito na faixa de 1,50 até 2,75. Há uma queda de corrente em $\text{pH} \geq 3,0$ devido ao aparecimento do segundo pico. Também pode-se observar que o potencial de redução de pico (E_{pr}) da ORZ varia com o pH (Fig. 23D), isso é um indício de que a reação de redução da ORZ tem prótons e elétrons envolvidos (BARD e FALKNER, 2001). A equação linear obtida pelo gráfico E_{pr} vs. pH é $E \text{ (V)} = -0,281 - 0,049\text{pH}$ ($r = 0,998$). Usando o coeficiente angular da equação de Nernst ($dE_{\text{p}}/d\text{pH} = 0,0592 \text{ m/n}$, onde “m” é o número estequiométrico de prótons e “n” o de elétrons), a razão m/n calculada foi de aproximadamente

1 (0,049/0,0592 = 0,83). Isso significa que há a transferência do mesmo número de mols de prótons e de elétrons na reação de redução da ORZ.

Comparando a performance do GCE (Fig. 23E-a) e do AgAuBMNPs-CTS/GCE (Fig. 23E-b) na ausência de ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato pH = 2,0 percebe-se que ambos não exibem nenhum sinal. Na presença de ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, o GCE apresenta uma resposta de corrente de $i = -3,52 \mu\text{A}$, enquanto que o AgAuBMNPs-CTS/GCE exibe uma resposta de corrente de $i = -6,50 \mu\text{A}$. Comparou-se também os CMEs com somente as AuNPs-CTS (Fig. 23F-c) e AgNPs-CTS (Fig. 23F-d), onde o AuNPs-CTS/GCE registrou uma resposta de corrente para a ORZ de $i = -1,97 \mu\text{A}$ e para o AgNPs-CTS/GCE de $i = -2,01 \mu\text{A}$. O efeito sinérgico pode ser o responsável para o AgAuBMNPs-CTS/GCE possuir a maior resposta de corrente, ou seja, a propriedade catalítica da prata aliada com a alta condutividade do ouro podem ter ajudado para ter essa maior resposta de corrente (SHI, DIAO e MU, 2014). Assim, o tampão fosfato em pH 2,0 foi escolhido como eletrólito de suporte para os próximos experimentos.

Figura 23: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ pH a) 1,5; b) 1,75 e c) 2,0. (B) pH a) 2,25; b) 2,5; c) 2,75 e d) 3,0. (C) Gráfico $-i$ vs. pH. (D) Gráfico E vs. pH ($n = 3$). (E) Voltamogramas cíclicos na ausência de ORZ sobre o a) GCE e b) AgAuBMNPs-CTS/GCE e na presença de ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre c) GCE e d) AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). (F) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o a) GCE, b) AgAuBMNPs-CTS/GCE, c) AuNPs-CTS/GCE e d) AgNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.

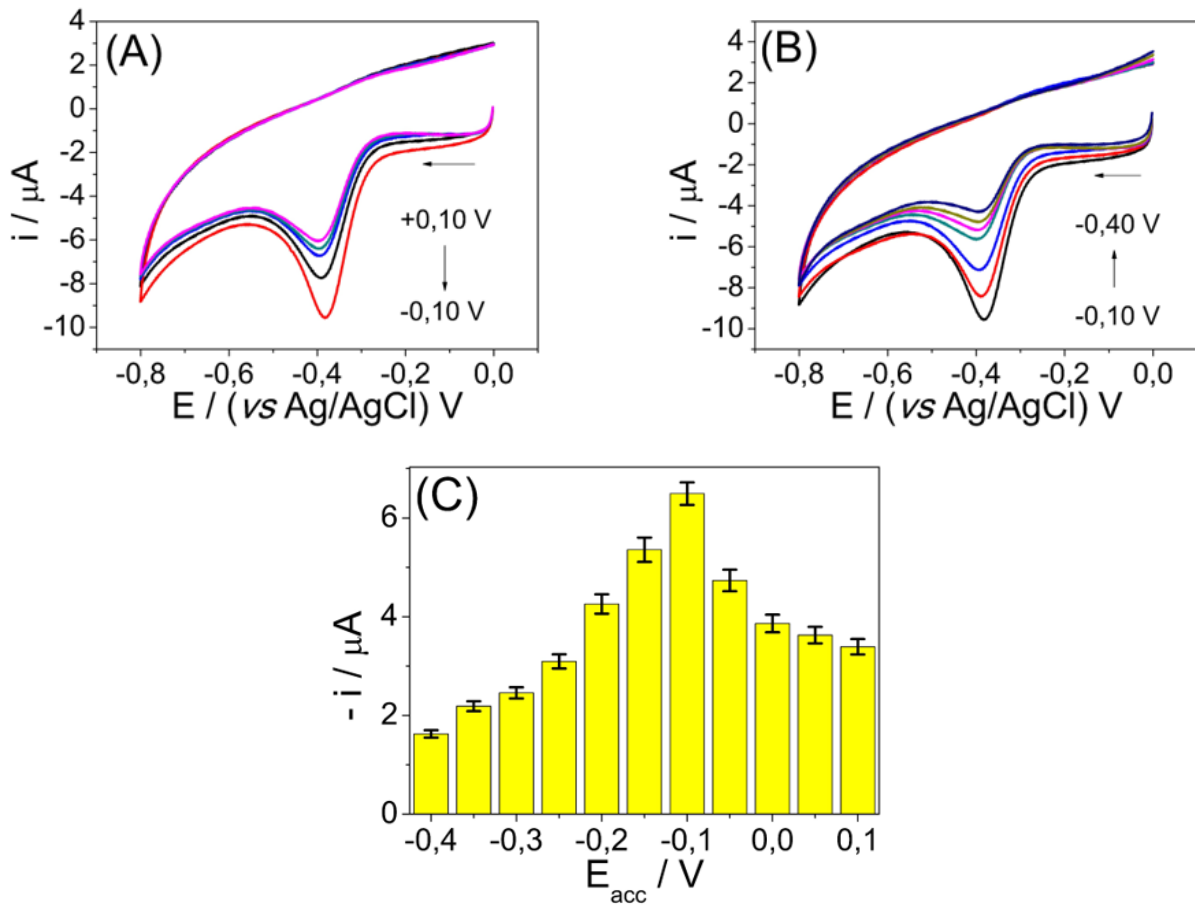




4.1.7. Efeito do potencial e do tempo de acúmulo na redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE

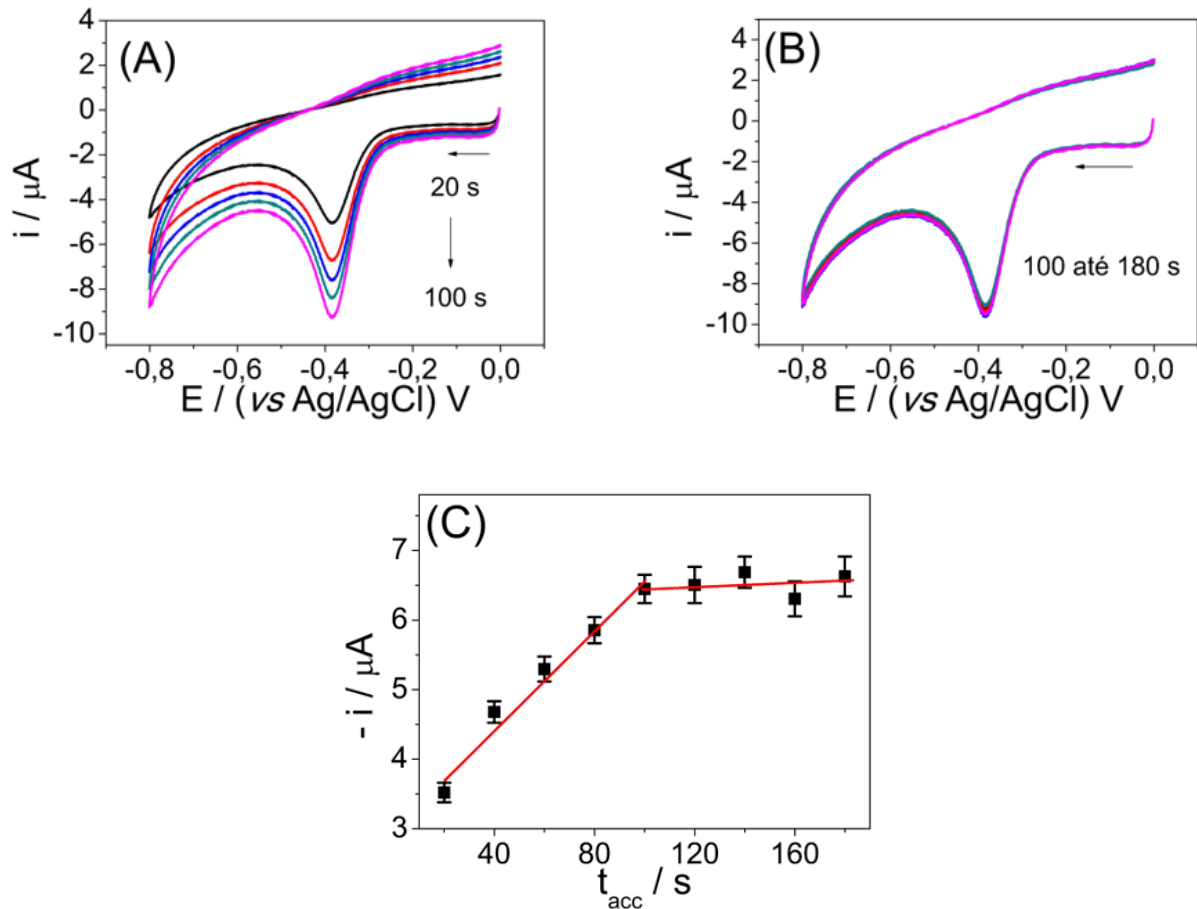
Com o intuito de se realizar uma análise rápida e sensível, variou-se o potencial e tempo de acúmulo. Primeiro fixou-se $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$ e variou-se o E_{acc} na faixa de +0,10 até -0,40 V. A Fig. 24A mostra que em valores positivos de E_{acc} a resposta de corrente é baixa, a explicação para esse comportamento é que há uma repulsão eletrostática entre a superfície do eletrodo e a ORZ, já que a ORZ está protonada em pH 2,0 (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996). Em valores mais negativos que -0,10 V (Fig. 24B) há uma queda na resposta de corrente devido ao fato da ORZ estar sendo reduzida nestes potenciais de acúmulo. Por estas razões, o valor de -0,10 V foi fixado para E_{acc} .

Figura 24: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com E_{acc} (A) de $+0,10$ até $-0,10 \text{ V}$ e (B) de $-0,10$ até $-0,40 \text{ V}$. $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $\nu = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. E_{acc} ($n = 3$).



Com E_{acc} fixado em $-0,10 \text{ V}$, variou-se t_{acc} de 20 até 180 s. A Fig. 25 revela que a resposta de corrente aumenta até o $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, podendo-se afirmar que a rápida adsorção da ORZ na superfície do AgAuBMNPs-CTS/GCE é responsável por este comportamento. Para tempos maiores que 100 s não há um aumento significativo na resposta de corrente, indicando que se atingiu o limite da quantidade de ORZ que pode ser acumulada na superfície do eletrodo, ou seja, entrou em equilíbrio. Então 100 s foi fixado como t_{acc} para os próximos experimentos.

Figura 25: Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com t_{acc} (A) de 20 até 100 s e (B) de 100 até 180 s. $E_{\text{acc}} = -0,10 \text{ V}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Gráfico $-i$ vs. t_{acc} ($n = 3$).



4.1.8. Influência da velocidade de varredura na redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE

Para entender melhor a reação de redução da ORZ na superfície do CME, a velocidade de varredura foi variada de 10 até 100 mV s^{-1} . Nas Figuras 26A e 26B pode ser observado que o potencial de pico de redução (E_{pr}) desloca para valores mais negativos à medida que a velocidade aumenta, o que é característico de processos irreversíveis (NICHOLSON e SHAIN, 1964). O gráfico E_{pr} vs. $\log v$ (Fig. 26C) mostra que há uma relação linear entre o potencial de pico de redução e o logaritmo da velocidade de varredura. A equação linear é $E_{\text{pc}} = -0,453 - 0,065 \log v$ ($r = 0,999$). De acordo com a equação de Laviron (LAVIRON, 1974), para uma reação eletroquímica irreversível, o coeficiente angular desta equação é $2,303RT/\alpha nF$. Onde α é o coeficiente de transferência de elétron; n é o número de mols de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação; e R , T e F são constantes ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$, $F = 96485 \text{ C mol}^{-1}$). O valor calculado de αn foi de 0,91 ($0,0592/0,065$). Para uma reação

irreversível, assume-se o valor de 0,5 para α (BARD e FAULKNER, 2001), assim encontrou-se o valor de 2,0 para n . Esse valor de n também foi encontrado para outras dinitroanilinas (KOUTOCEK e OPRAVILOVÁ, 1996; GALLI, DE SOUZA e MACHADO, 2011). A Fig. 26D mostra que a resposta de corrente da ORZ varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade, o que indica que a etapa determinante da reação de redução da ORZ é a difusão. Para confirmar, o gráfico $\log i$ vs. $\log v$ foi construído (Fig. 26E). Se o coeficiente angular deste gráfico for 0,5, a reação é controlada pela difusão, e se for 1,0, é pela adsorção (NICHOLSON e SHAIN, 1964). O coeficiente angular encontrado foi de 0,661, o que confirma que a reação de redução da ORZ é controlada pela difusão, mas com uma pequena contribuição da adsorção.

Com esse conjunto de dados, propôs-se uma reação de redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE (Fig. 27). A redução eletroquímica de mononitrocompostos aromáticos apresenta dois picos em meio ácido e apenas um em meio alcalino (HAMMERICH, 2015). Em meio ácido, o primeiro pico é referente à redução do grupo nitro (Ar-NO₂) para hidroxilamina (Ar-NHOH). Esta reação envolve quatro prótons e quatro elétrons divididos em duas etapas. A primeira, que é a mais lenta, é a protonação do grupo nitro seguida da transferência de um elétron para formar o radical Ar-NO₂H• (ZUMAN *et al.*, 1992). Esta reação é responsável pelo pico observado nos experimentos voltamétricos. A segunda etapa, que é a mais rápida, envolve a adição de três prótons e três elétrons para, então, gerar a hidroxilamina. O segundo pico observado em meio ácido é a redução da hidroxilamina para amina (Ar-NH₂) envolvendo dois prótons e dois elétrons. Este pico só é visto em potenciais muito negativos. No caso de dinitrocompostos (O₂N-Ar-NO₂), como a ORZ, o processo de redução é parecido com o dos mononitrocompostos, porém nem todos os produtos são observados (HAMMERICH, 2015). Além do mais, o primeiro pico pode se dividir em dois dependendo do ambiente químico que rodeia os grupos nitro. A ORZ em pH 2,0 apresenta um ambiente químico similar para ambos os grupos nitros, o que resulta no aparecimento de somente um pico. Portanto, pode-se afirmar que ambos os grupos nitro estão sendo reduzidos simultaneamente em um processo que envolve um próton e um elétron para cada grupo nitro. Assim, dois prótons e dois elétrons participam da redução da ORZ formando o radical •HO₂N-Ar-NO₂H•.

Figura 26: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) em diferentes velocidades de varredura a) branco; b) 10,0; c) 20,0; d) 30,0; e) 40,0; f) 50,0; g) 60,0; h) 70,0; i) 80,0; j) 90,0 e k) 100,0 mV s^{-1} . (B) Gráfico E_{pr} vs. v . (C) Gráfico E_{pr} vs. $\log v$. (D) Gráfico i vs. $v^{1/2}$. (E) Gráfico $\log i$ vs. $\log v$. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$.

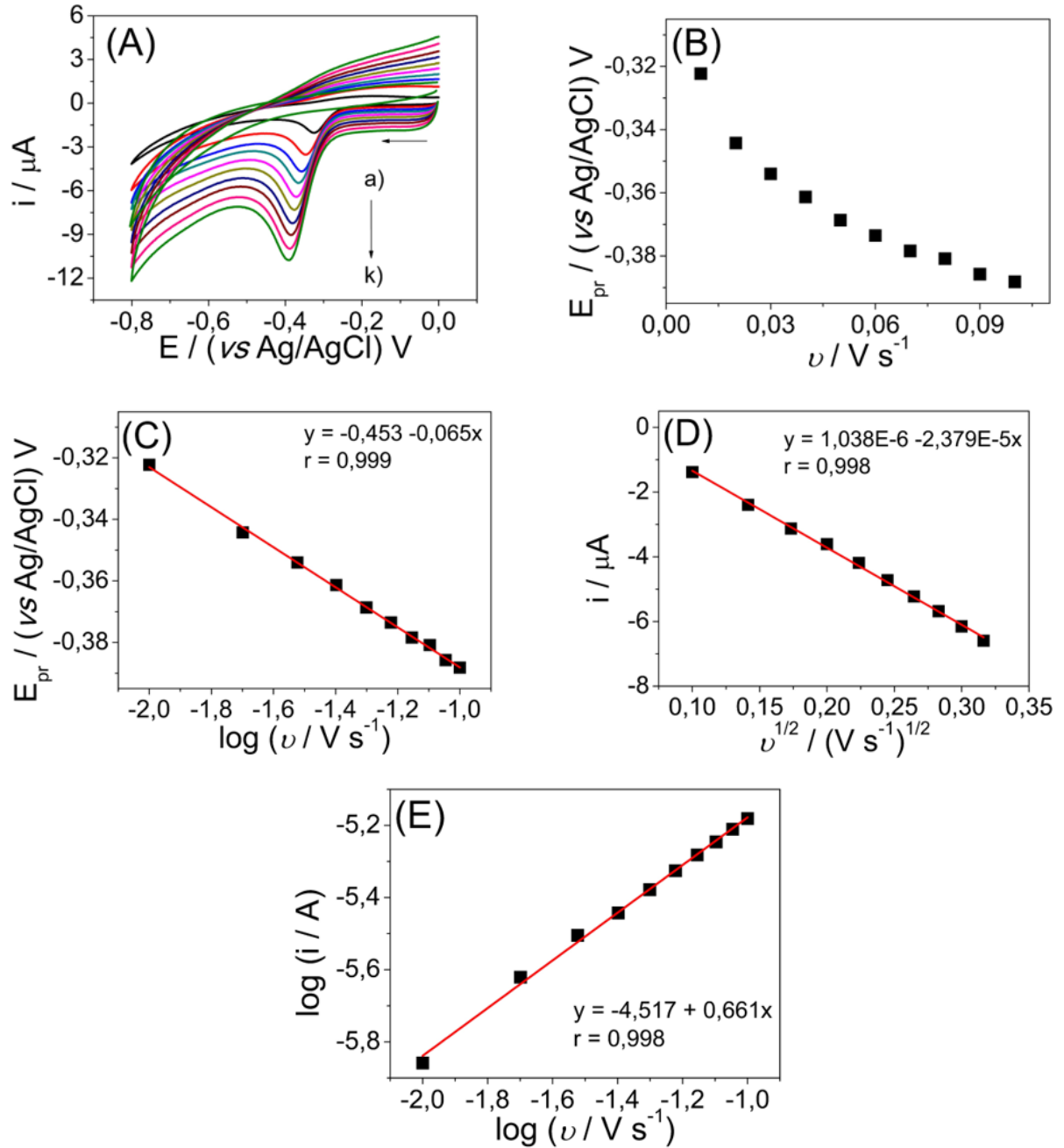
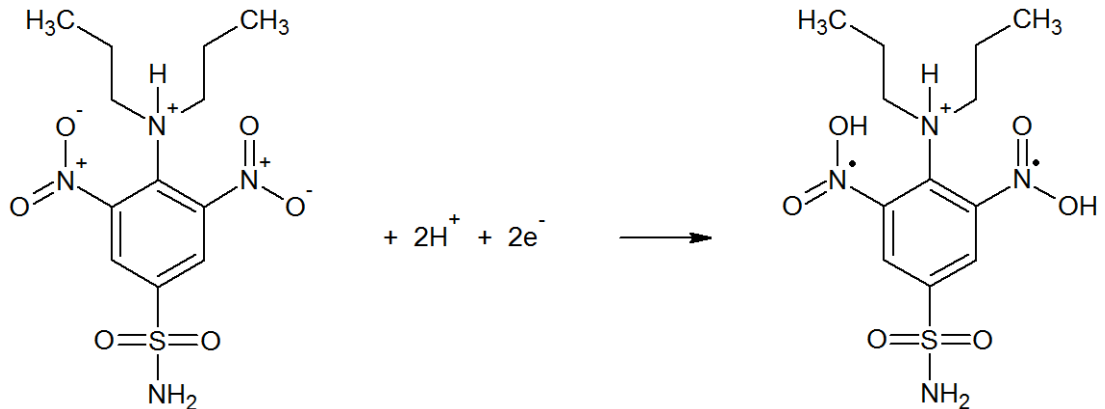


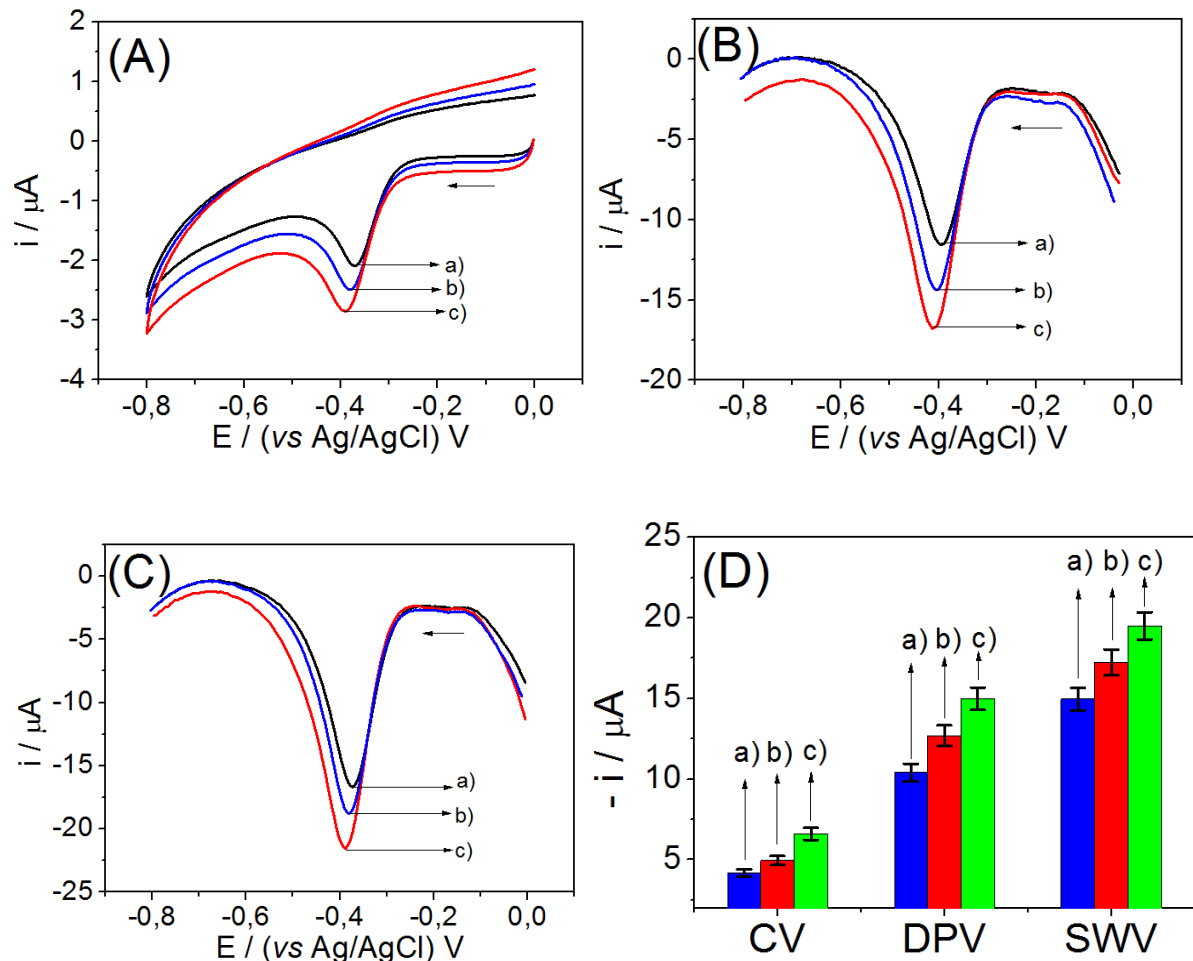
Figura 27: Reação de redução da ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE.



4.1.9. Seleção da técnica eletroanalítica para a determinação da ORZ

A fim de se obter uma metodologia sensível e rápida, foram testadas as seguintes técnicas eletroanalíticas em diferentes velocidades: voltametria cíclica (CV – do inglês, *cyclic voltammetry*), voltametria de pulso diferencial (DPV – do inglês, *differential pulse voltammetry*) e a voltametria de onda quadrada (SWV – do inglês, *square wave voltammetry*). A Fig. 28 mostra um gráfico de barras para as técnicas em diferentes velocidades. Nota-se que a SWV é a melhor técnica para a análise em qualquer das velocidades testadas porque proporciona a maior resposta de corrente. Provavelmente, como o pulso aplicado na SWV é diferente que na DPV, há uma perturbação maior na dupla camada elétrica do eletrodo, o que causa um aumento no sinal de redução da ORZ (BARD e FALKNER, 2001). Portanto, foi escolhida a SWV como técnica eletroanalítica para construir a curva de calibração e realizar a determinação da ORZ em amostras reais.

Figura 28: (A) Voltamogramas cíclicos para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de pulso diferencial para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (D) Gráfico de barras para as diferentes técnicas eletroanalíticas em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$ usando ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$ ($n = 3$).



4.1.9.1. Otimização dos parâmetros da SWV para a determinação da ORZ

Com a técnica escolhida, otimizou-se seus parâmetros para conseguir uma melhor resposta de corrente e um bom perfil voltamétrico. Os parâmetros otimizados foram: incremento de potencial (ΔE_s), amplitude de pulso (a) e frequência (f). O ΔE_s foi variado na faixa de $1,0$ até $10,0 \text{ mV}$ (Fig. 29), onde foi escolhido o valor de $4,0 \text{ mV}$ porque acima deste valor o voltamograma fica menos resoluto. A a foi variada na faixa de $20,0$ até $100,0 \text{ mV}$ (Fig. 30), percebeu-se que para valores maiores que $50,0 \text{ mV}$ a resposta de corrente permaneceu quase constante e o voltamograma apresenta um perfil alargado. A f foi variada na faixa de $10,0$ até $100,0 \text{ Hz}$ (Fig. 31), onde obteve-se um bom perfil voltamétrico em $40,0 \text{ Hz}$, acima deste o

pico de redução da ORZ se torna cada vez mais alargado. Assim, os valores de $\Delta E_s = 4,0$ mV, $a = 50,0$ mV e $f = 40,0$ Hz foram escolhidos para realizar a análise com a SWV. Pode-se observar que à medida que o ΔE_s ou a f aumenta, o E_{pr} desloca para valores mais negativos, evidenciando um processo irreversível (AOKI e OSTERYOUNG, 1980).

Figura 29: (A) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando o ΔE_s na faixa de 1,0 até 10,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. ΔE_s . $E_{acc} = -0,1$ V, $t_{acc} = 100$ s, $a = 50,0$ mV, $f = 50,0$ Hz.

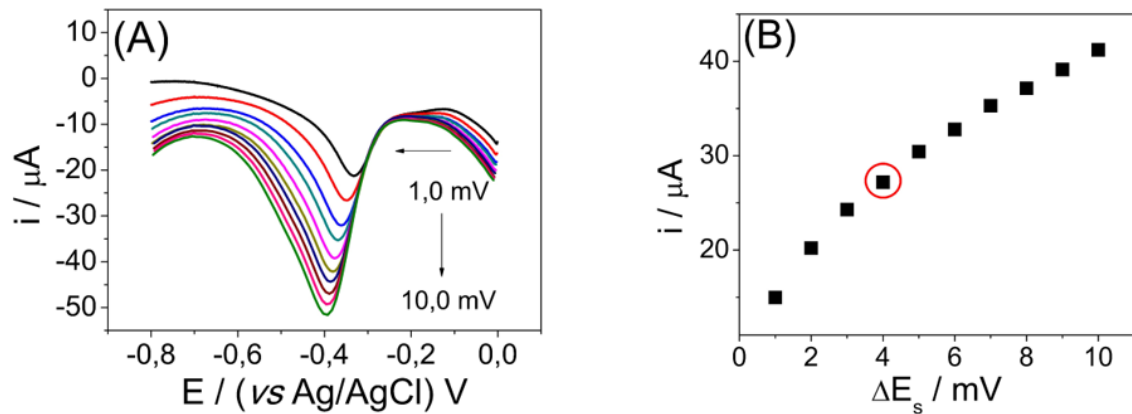


Figura 30: (A) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando a a na faixa de 20,0 até 100,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. a . $E_{acc} = -0,1$ V, $t_{acc} = 100$ s, $\Delta E_s = 4,0$ mV, $f = 50,0$ Hz.

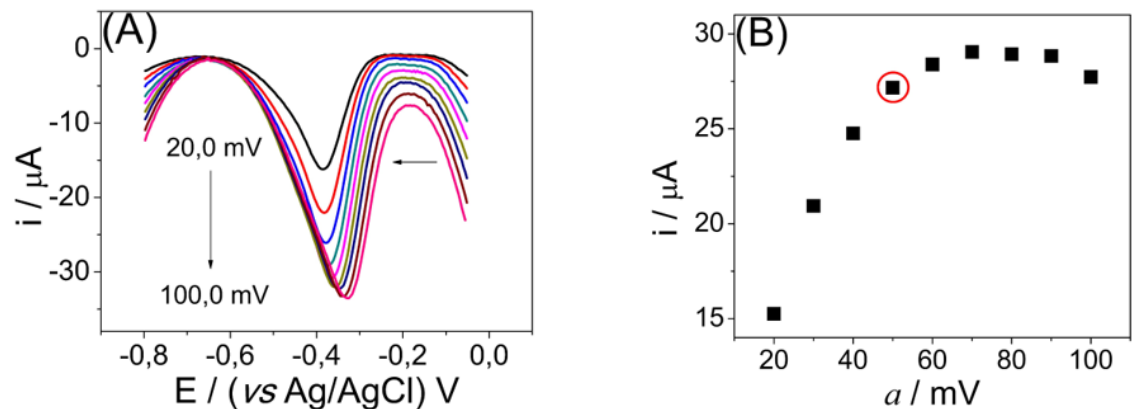
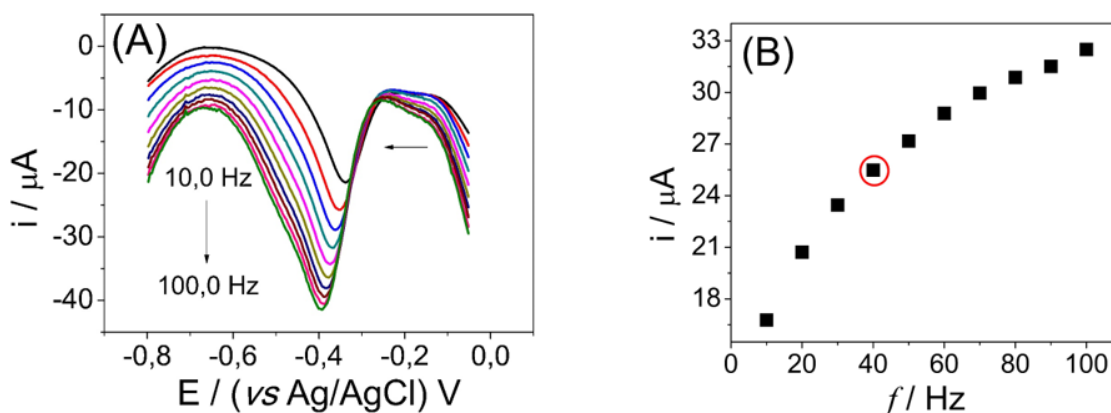


Figura 31: (A) Voltamogramas de onda quadrada para ORZ $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando a f na faixa de 10,0 até 100,0 Hz. (B) Gráfico $-i$ vs. f . $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$.



4.1.10. Curva de calibração para a ORZ

Para poder determinar a ORZ, primeiramente se construiu uma curva de calibração a fim de extrair dados sobre a sensibilidade do CME, obter o limite de detecção (LOD – do inglês, *limit of detection*), o limite de quantificação (LOQ – do inglês, *limit of quantification*) e a faixa de concentração onde não há perda da linearidade entre resposta de corrente e concentração de ORZ. Empregando a SWV com seus parâmetros otimizados, construiu-se a curva de calibração para a ORZ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE dentro da faixa de $0,1 - 7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Fig. 32A apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos, evidenciando que a resposta de corrente aumenta linearmente com a concentração de ORZ (Fig. 32B). A curva de calibração média construída ($n = 8$) apresenta a seguinte equação linear: $-i/\mu\text{A} = 0,12 + 3,91[\text{ORZ}]/\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,999$).

O LOD, que é a menor concentração do analito que pode ser detectada sem ser confundido com as variações do sinal de fundo (branco), foi calculado usando a Eq. 1. (RIBANI *et al.*, 2004). Onde “ σ ” representa o valor do desvio padrão do coeficiente linear e “ s ” representa o valor do coeficiente angular da curva de calibração. Calculou-se um LOD de 30 nmol L^{-1} . O LOQ, que é a menor concentração que pode ser quantificada em um procedimento experimental, foi calculado aplicando a Eq. 2 (RIBANI *et al.*, 2004). Encontrou-se um valor de LOQ igual a 100 nmol L^{-1} , bem próximo do primeiro ponto da curva de calibração.

A repetibilidade da corrente proveniente do método usando o AgAuBMNPs-CTS/GCE foi testada de duas formas: intra-dia, usando 8 soluções diferentes preparadas no mesmo dia com concentração $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e inter-dia, onde durante 8 dias usando diferentes soluções de ORZ preparadas cada dia foram testadas na mesma concentração de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os desvios padrões relativos ($n = 8$) foram de 3,85 % e 4,19 % para intra-dia e inter-dia respectivamente. A Tabela 3 resume estes resultados e os obtidos a partir da curva de calibração.

$$\text{LOD} = 3,0 (\sigma/s) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{LOQ} = 10 (\sigma/s) \quad \text{Eq. (2)}$$

Figura 32: (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato 1,0 mol L⁻¹ (pH 2,0) sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE a) branco; b) 0,1; c) 0,2; d) 0,3; e) 0,4; f) 0,5; g) 0,6; h) 0,7; i) 0,8; j) 0,9; k) 1,0; l) 2,0; m) 3,0; n) 4,0; o) 5,0; p) 6,0; q) 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: ampliação dos voltamogramas de onda quadrada (a – k). $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{ s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 40,0 \text{ Hz}$. (B) Curva de calibração média ($n = 8$) para ORZ na faixa de 0,1 até 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: ampliação da curva de calibração média na faixa de 0,1 até 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

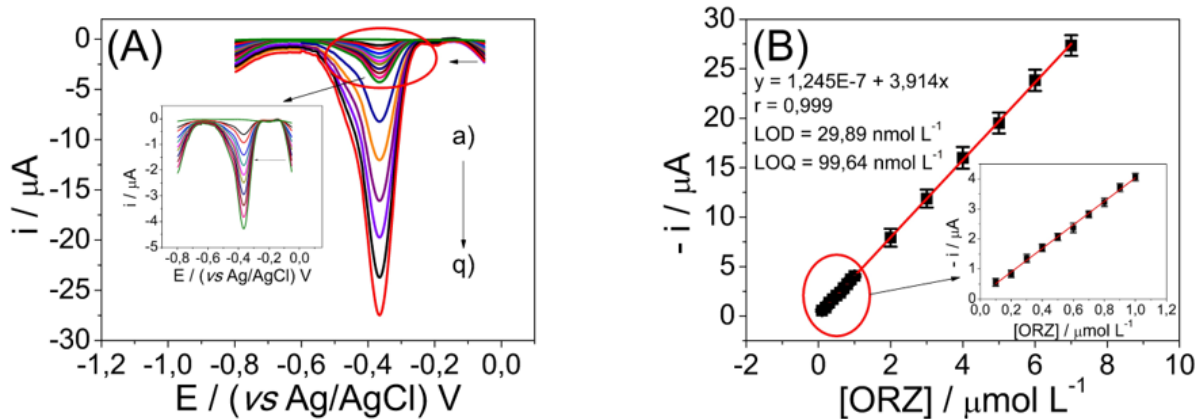


Tabela 3: Dados obtidos a partir da curva de calibração para a ORZ.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico / V	-0,365
Faixa linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,1 – 7,0
Coefficiente de correlação (r)	0,999
Coefficiente angular / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	3,91
Desvio do coeficiente angular / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	0,01
Coefficiente linear / μA	0,12
Desvio do coeficiente linear / μA	0,04
LOD / nmol L^{-1}	30
LOQ / nmol L^{-1}	100
Repetibilidade de i (intra-dia) / % ^{a,b}	3,85
Repetibilidade de i (inter-dia) / % ^{a,b}	4,19

^a Desvio padrão relativo.

^b $n = 8$.

4.1.11. Estudo de interferentes na determinação da ORZ

Foram testados possíveis interferentes na determinação da ORZ. Íons de metais pesados redutíveis e nitrocompostos com concentração dez vezes maior que a ORZ foram selecionados para este estudo. Para ORZ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , 2-nitrofenol, 3-nitrofenol, 4-nitrofenol e outros pesticidas eletroativos (pendimetalina, butralina, profluralina e paration) não alteraram significativamente a resposta de corrente e o E_{pr} nas mesmas condições. A resposta de corrente da redução da ORZ na presença dos interferentes variaram entre $-4,19$ a $+5,42\%$. A Tabela 4 resume os resultados obtidos, com os quais pode-se afirmar que o AgAuBMNPs-CTS/GCE consegue distinguir a ORZ na presença de potenciais interferentes mais concentrados.

Tabela 4: Estudo de interferentes na presença da ORZ.

Espécies	Corrente de pico (μA)	%i	Potencial de pico (V)
ORZ ^a	4,06	-	-0,365
Pb^{2+} , ^b	3,91	-3,69	-0,351
Cd^{2+}	3,98	-1,97	-0,347
Co^{2+}	4,02	-0,98	-0,363
Ni^{2+}	3,89	-4,19	-0,365
Zn^{2+}	3,95	-2,71	-0,342
2-nitrofenol	4,18	+2,96	-0,369
3-nitrofenol	4,20	+3,45	-0,373
4-nitrofenol	4,17	+2,71	-0,378
Paration	4,25	+4,68	-0,382
Pendimetalina	4,28	+5,42	-0,373
Butralina	4,27	+5,17	-0,378
Profluralina	4,28	+5,42	-0,384

^a ORZ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $1,0 \text{mol L}^{-1}$ (pH 2,0).

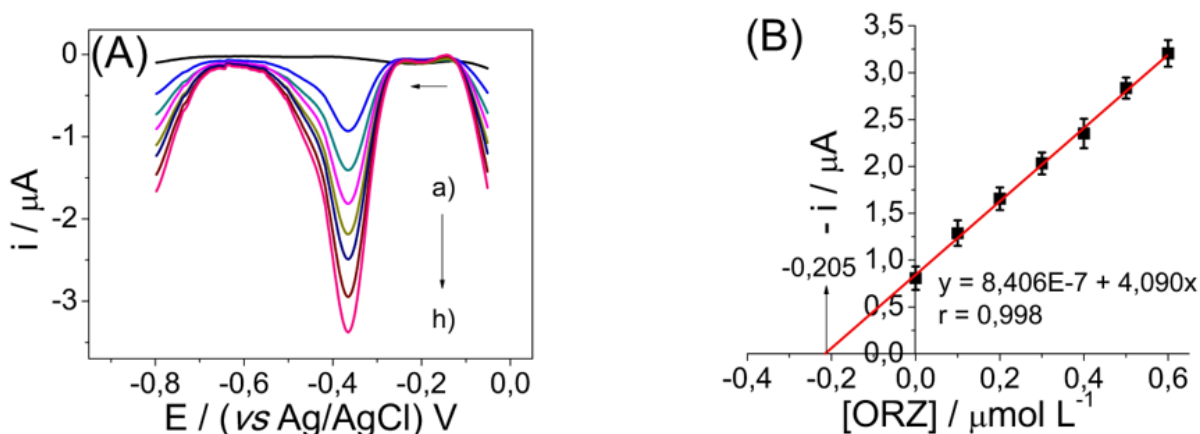
^b Concentração de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os possíveis interferentes em tampão fosfato $1,0 \text{mol L}^{-1}$ (pH 2,0).

4.1.12. Determinação de ORZ em suco de uva usando o AgAuBMNPs-CTS/GCE

Como relatado anteriormente, a ORZ pode penetrar nos tecidos da uva e ficar retido na polpa e no suco desta fruta. Assim, preparou-se amostras de suco de uva fortificadas com ORZ $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Posteriormente, adicionou-se $1,0 \text{mL}$ desta amostra em $9,0 \text{mL}$ de eletrólito de suporte, onde a concentração de ORZ na célula eletroquímica fique em $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para construir a curva de adição de padrão, foi feito o branco do eletrólito de suporte, em seguida a adição da amostra, e finalmente adições sucessivas de $50,0 \mu\text{L}$ de solução padrão de ORZ $20,0$

$\mu\text{mol L}^{-1}$. Esta curva foi repetida 8 vezes ($n = 8$). A Fig. 33 mostra os resultados obtidos para a análise de suco de uva usando o método de adição de padrão. O gráfico da Fig. 33B apresentou a seguinte equação linear: $-i/\mu\text{A} = 0,84 + 4,09[\text{ORZ}]/\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,998$). Comparando os coeficientes angular desta reta ($4,09 \mu\text{A L mol}^{-1}$) com o da curva de calibração ($3,91 \mu\text{A L mol}^{-1}$), percebe-se que são bem próximos, indicando que não há interferente dos componentes da matriz.

Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada para a) eletrólito de suporte, b) amostra de suco de uva com ORZ, (c-h) adições sucessivas de $50,0 \mu\text{L}$ de solução padrão de ORZ $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o AgAuBMNPs-CTS/GCE em solução tampão fosfato $1,0 \text{mol L}^{-1}$ (pH 2,0). $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{V}$, $t_{\text{acc}} = 100 \text{s}$, $\Delta E_s = 4,0 \text{mV}$, $a = 50,0 \text{mV}$, $f = 40,0 \text{Hz}$. (B) Curva de adição de padrão média ($n = 8$).



4.1.12.1. Método comparativo para a determinação da ORZ

Empregou-se o LC-MS/MS como método comparativo para a determinação de ORZ em suco de uva. O cromatograma da ORZ mostra que há um sinal em 9,64 min (Fig. 34A) referente aos fragmentos de razão massa carga (m/z) 345, 78 e 46 (Fig. 34B e 34C). Esses fragmentos foram usados porque possuem as maiores intensidades e também para confirmar que o composto analisado é, de fato, a ORZ. A razão m/z de 345 pode ser atribuída ao fragmento $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^- [\text{M} - \text{H}]^-$, 78 ao fragmento NSO_2^- e 46 ao fragmento NO_2^- . As determinações foram feitas 5 vezes na amostra de suco de uva. A Tabela 5 mostra que os valores obtidos por ambas as técnicas são bastante próximos ao valor considerado verdadeiro. Para avaliar a exatidão utilizou-se o teste t . Para comparar a precisão empregou-se o teste F , que compara a variância dos dois métodos. O tratamento estatístico aplicado aos resultados obtidos demonstra a confiabilidade dos dados fornecidos por ambas as técnicas, ou seja, não houve diferença quanto à exatidão e à precisão de ambos os métodos já que o $t_{\text{calculado}}$ é menor que o $t_{\text{crítico}}$ e o

$F_{\text{calculado}}$ também é menor que o $F_{\text{crítico}}$. Assim, pode-se concluir que o Ag-AuBMNPs-CTS/GCE é uma boa alternativa para detectar e determinar ORZ.

Figura 34: (A) Cromatograma da ORZ. (B e C) Fragmentograma da ORZ.

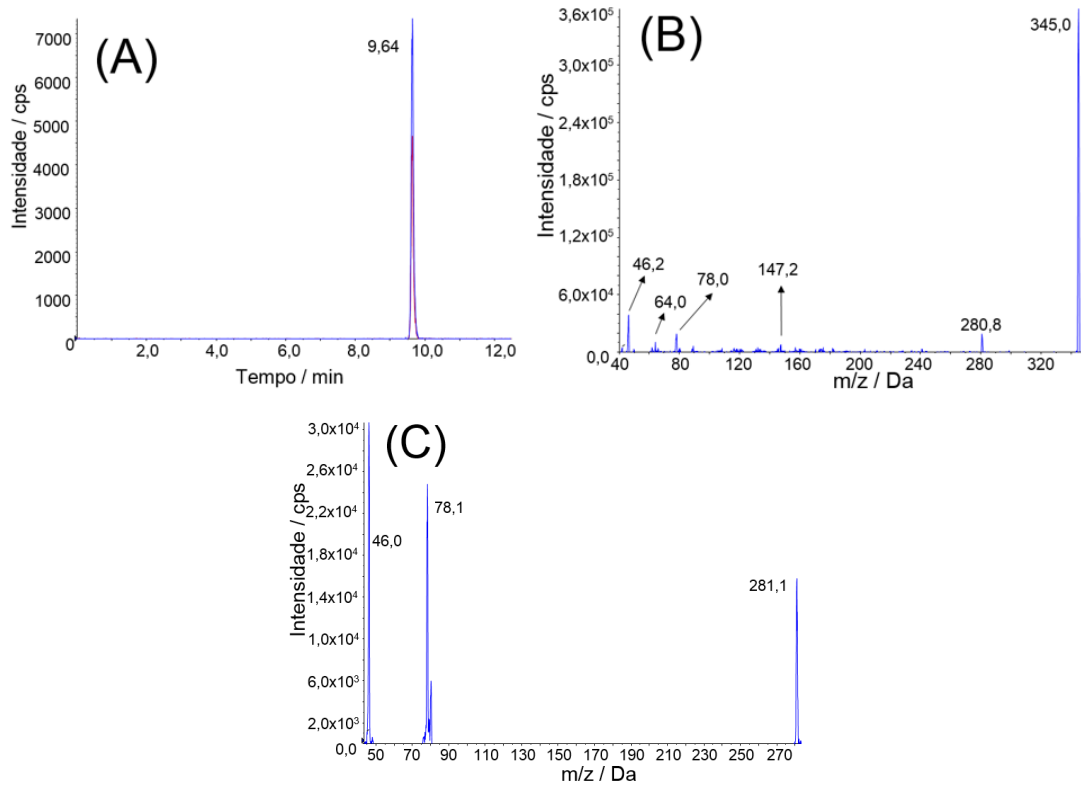


Tabela 5: Dados estatísticos para a determinação de ORZ em suco de uva.

Técnica	LC-MS/MS	Ag-AuBMNPs-CTS/GCE
Valor verdadeiro ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,00	2,00
Valor encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	1,97	2,05
RSD / % ^b	2,59	2,52
Er ₁ / % ^c	-1,50	2,50
Er ₂ / % ^d	-	4,06
$t_{\text{calculado}}$ ^e	0,03	0,05
$F_{\text{calculado}}$ ^f	-	5,77

^a n = 5.

^b Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*.

^c Er₁ = erro relativo entre LC-MS/MS ou Ag-AuBMNPs-CTS/GCE e o valor verdadeiro.

^d Er₂ = erro relativo entre Ag-AuBMNPs-CTS/GCE e LC-MS/MS.

^e $t_{\text{crítico}} = 2,78$.

^f $F_{\text{crítico}} = 6,39$.

4.2. RESULTADOS COM A BTL

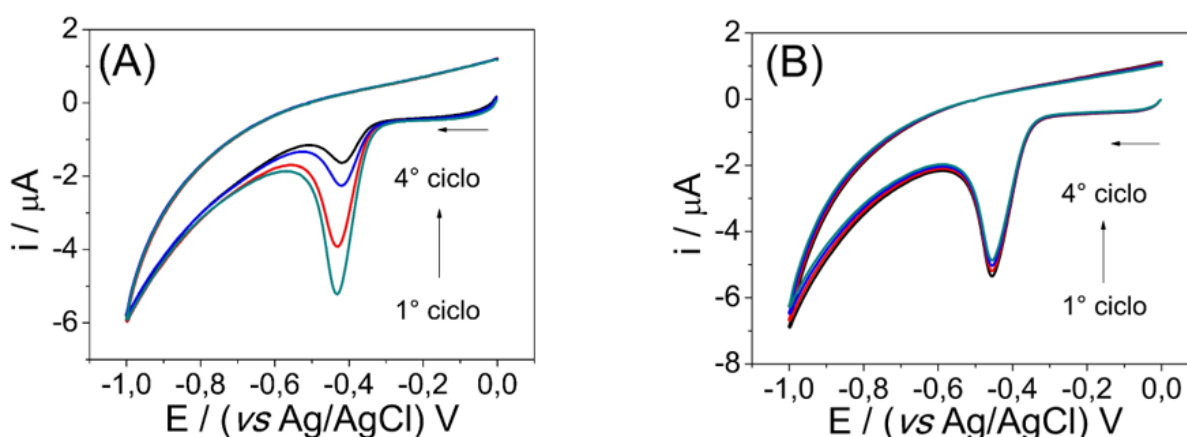
Publicado em *Food Chem.*, 343, 128419, 2021.

Como visto na seção 4.1.11., a BTL não é detectada pelo AgAuBMNPs-CTS/GCE, portanto construiu-se outro CME que tenha a capacidade de detectá-la e determiná-la em amostras de alimentos. Os resultados a seguir são referentes a esse novo CME.

4.2.1. Comportamento eletroquímico da BTL sobre o GCE

Do mesmo modo que a ORZ, iniciou-se os estudos com a BTL utilizando o GCE limpo em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) para obter informações do seu comportamento eletroquímico. Os voltamogramas cíclicos apresentados na Fig. 35 mostram um pico em $-0,458 \text{ V}$, na varredura de ida, referente à redução dos grupos nitro presentes na BTL. A ausência de um pico de oxidação na varredura de volta evidencia um processo irreversível. Assim como a ORZ, a resposta de corrente da redução da BTL também diminui à medida que ciclos consecutivos são realizados. Pode-se atribuir esse comportamento à adsorção da BTL na superfície do eletrodo. Para manter a resposta de corrente inalterada, foi aplicada uma etapa de pré-concentração antes de cada medida voltamétrica. Esta etapa consistiu de um t_{acc} de 180 s e de um E_{acc} de $-0,15 \text{ V}$.

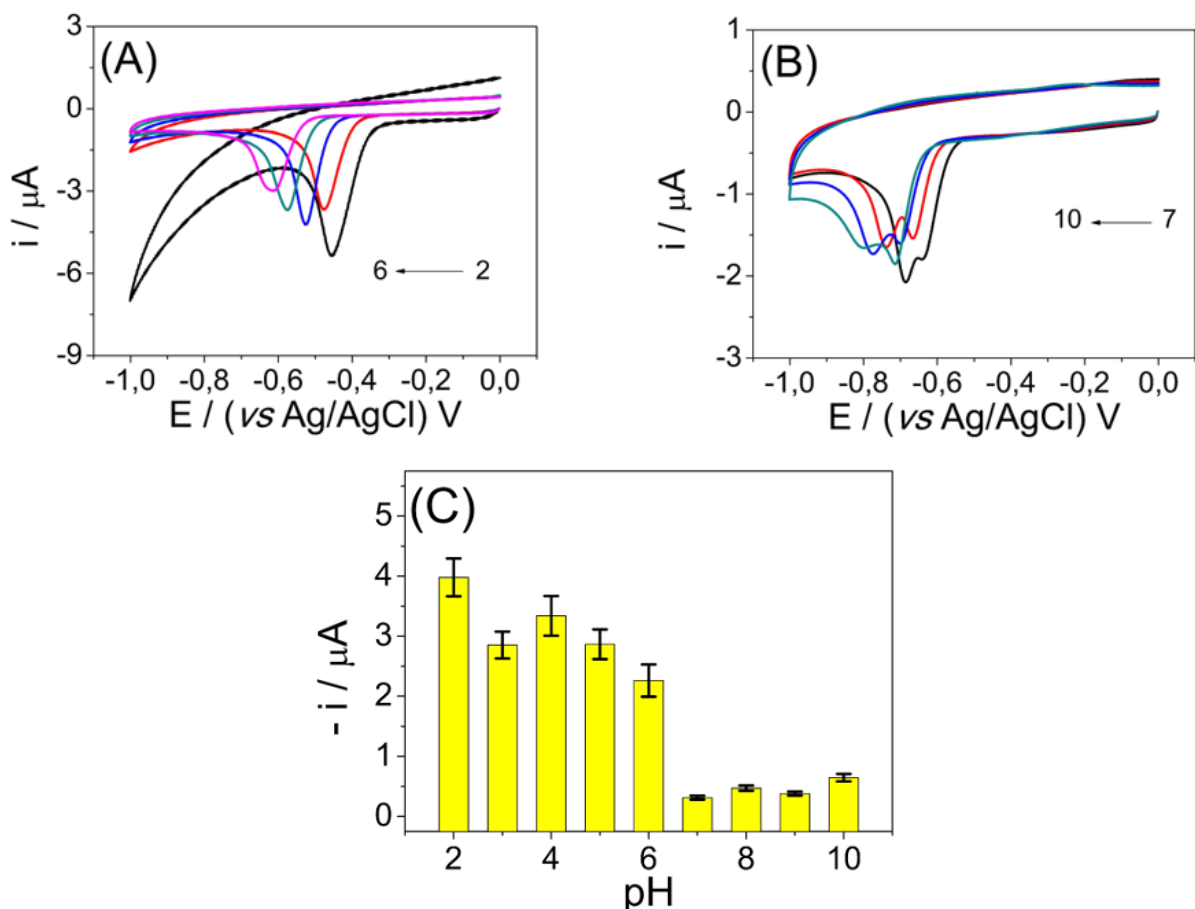
Figura 35: Voltamogramas cíclicos sucessivos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) (A) sem e (B) com a etapa de pré-concentração. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.



Posteriormente, variou-se o pH do eletrólito de suporte na faixa entre 2,0 e 10,0. A Fig. 36 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos. Pode-se observar a presença de apenas um pico de redução da BTL nos valores de pH de 2,0 até 6,0 (Fig. 36A), acima destes valores há o aparecimento do segundo pico de redução (Fig. 36B). Estes resultados com a BTL são similares

aos da ORZ já que ambos possuem uma estrutura química semelhante, o que difere é o E_{pr} de cada espécie. Como a BTL possui um grupo doador de elétrons (terc-butil) na posição 4 do anel benzênico, o que aumenta a densidade eletrônica nos grupos nitros, ao invés de um grupo retirador de elétrons (como a sulfonamida presente na ORZ na mesma posição), isso faz com que o E_{pr} da BTL seja mais negativo que a ORZ (SHEERDHAR e REDDY, 2002). Ao se observar os voltamogramas cíclicos, percebe-se que o aparecimento do segundo pico de redução da BTL ocorre entre pH 6,0 e 7,0, o que sugere que o ambiente químico da BTL neste pH difere do ambiente químico nos pH 2,0 até 5,0. A maior resposta de corrente para a redução da BTL obtida foi em pH 2,0, onde ambos os grupos nitro são reduzidos quase que simultaneamente, e em pH maior que 6,0 há uma queda na resposta de corrente porque o pico de redução se divide em dois, um para cada grupo nitro. Assim, optou-se por utilizar o tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ em pH 2,0 para realizar os experimentos de comparação entre os novos CMEs construídos.

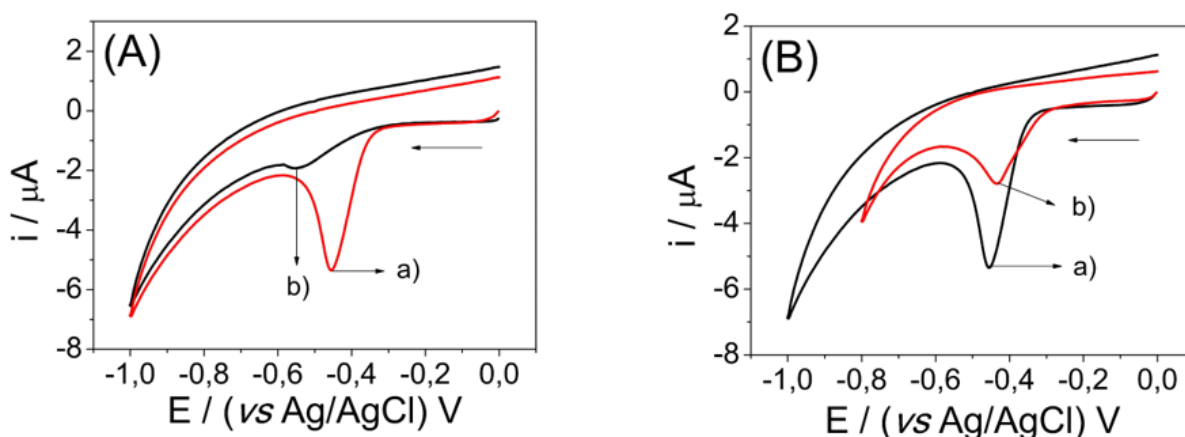
Figura 36: Voltamogramas cíclicos para BTL 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o GCE em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ em diferentes pH (A) de 2 até 6 e (B) de 7 até 10. $E_{acc} = -0,15$ V, $t_{acc} = 180$ s, $v = 100,0$ mV s⁻¹. (C) Gráfico $-i$ vs. pH ($n = 3$).



4.2.2. Avaliação do uso de CME a base de nanopartículas monometálicas frente a detecção de BTL

Para a síntese das nanopartículas monometálicas, utilizou-se a PVP como agente estabilizante e NaBH_4 como agente redutor. Optou-se pelo uso da PVP porque este polímero pode estabilizar várias nanopartículas metálicas devido ao grupo carbonila em sua estrutura, que interage com os íons metálicos, e por formar filmes finos (BAI *et al.*, 2008). Realizou-se 5 sínteses de nanopartículas monometálicas: prata (AgNPs-PVP), platina (PtNPs-PVP), ouro (AuNPs-PVP), cobre (CuNPs-PVP) e cobalto (CoNPs-PVP). Todas as nanopartículas permaneceram estáveis por mais de 1 mês, onde observou-se a precipitação das mesmas e uma mudança no perfil voltamétrico da BTL. A Fig. 37 compara os voltamogramas cíclicos obtidos com os diferentes CMEs construídos frente à redução da BTL. Todos os CMEs, com exceção do AuNPs-PVP/GCE (Fig. 37A), exibiram um pico de redução para a BTL, porém apenas o CoNPs-PVP/GCE e o AgNPs-PVP/GCE apresentaram um E_{pr} menos negativo que o obtido com o GCE, ou seja, catalisaram a reação de redução da BTL (Fig. 37B e 37C). O E_{pr} da BTL sobre o GCE foi de $-0,458$ V e sobre o CoNPs-PVP/GCE e o AgNPs-PVP/GCE foram de $-0,437$ e de $-0,421$ V respectivamente. Os outros CMEs construídos mostraram um pico de redução em potenciais mais negativos que $-0,458$ V, significando que estes CMEs dificultam a redução da BTL (Fig. 37D e 37E). Nenhum CME com as nanopartículas monometálicas exibiu uma resposta de corrente superior ao do GCE (Fig. 38). Portanto, optou-se por realizar sínteses de nanopartículas bimetálicas com o Co e com a Ag, já que ambos catalisaram a reação de redução da BTL.

Figura 37: Voltamogramas ciclos para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre (A) a) GCE e b) AuNPs-PVP/GCE; (B) a) GCE e b) CoNPs-PVP/GCE; (C) a) GCE e b) AgNPs-PVP/GCE; (D) a) GCE e b) PtNPs-PVP/GCE; (E) a) GCE e b) CuNPs-PVP/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,15$ V, $t_{\text{acc}} = 180$ s, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.



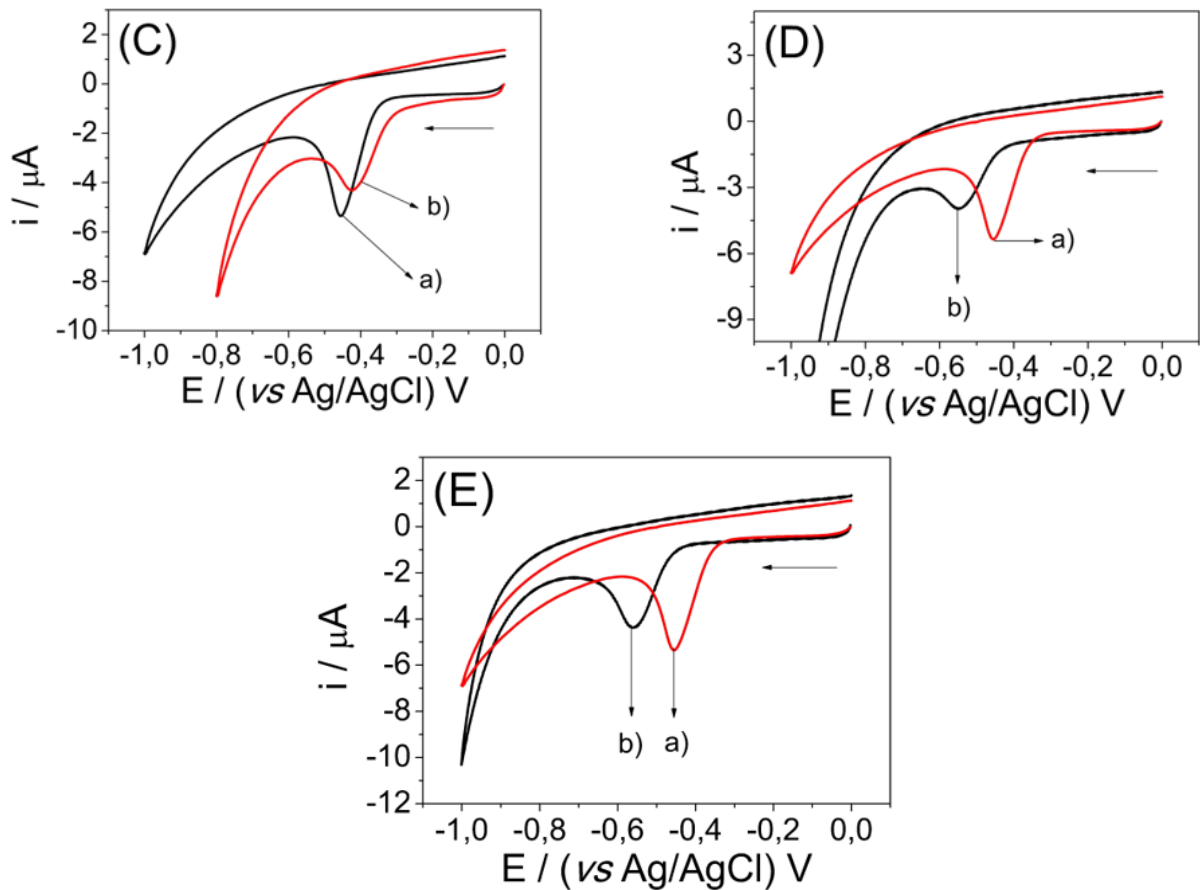
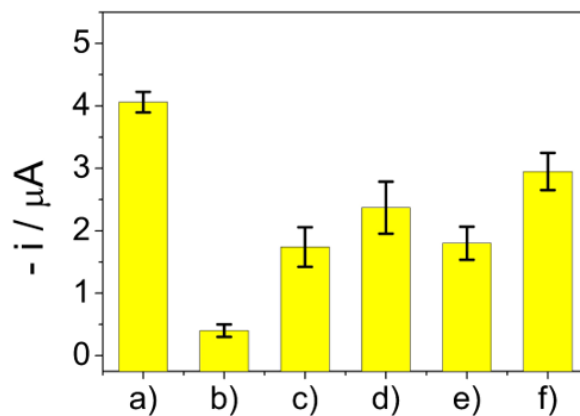


Figura 38: Resposta de corrente para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 sobre a) GCE; b) AuNPs-PVP/GCE; c) CoNPs-PVP/GCE; d) AgNPs-PVP/GCE; e) PtNPs-PVP/GCE; f) CuNPs-PVP/GCE ($n = 3$).

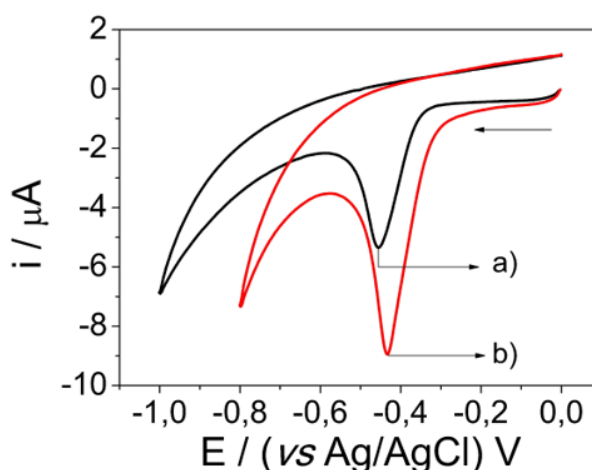


4.2.3. Comportamento eletroquímico da BTL sobre os CMEs com nanopartículas bimetálicas

Duas sínteses de nanopartículas bimetálicas foram realizadas: a primeira reduziu-se os íons Co^{2+} na presença de PVP, em seguida, reduziu-se íons Ag^+ . Na segunda síntese a ordem foi invertida, primeiramente reduziu-se os íons Ag^+ para, então, reduzir os íons Co^{2+} . Das duas

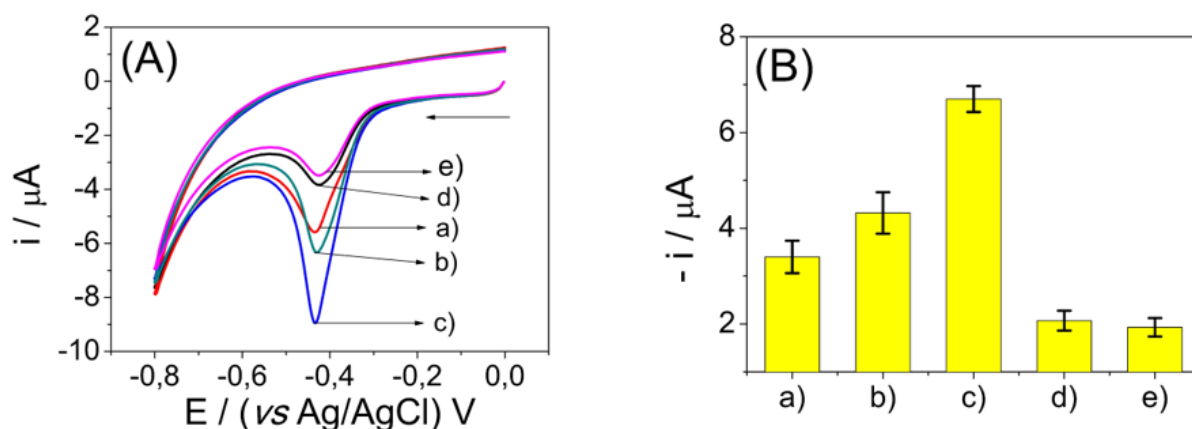
sínteses, somente a primeira formou nanopartículas estáveis por mais de 1 mês. Na segunda síntese, observou-se a precipitação das nanopartículas bimetálicas após 3 horas. Provavelmente as AgNPs conseguiram recobrir as CoNPs, o que aumentou a sua estabilidade. Portanto, o CME construído foi com as nanopartículas bimetálicas de cobalto e prata estabilizadas em poli(vinilpirrolidona) (CoAgBMNPs-PVP/GCE) na proporção 5:5 de Co:Ag. A Fig. 39 compara os voltamogramas cíclicos obtidos da redução da BTL sobre o GCE e sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE nas mesmas condições. A resposta de corrente da redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE ($-6,70 \mu\text{A}$) é maior que a sobre o GCE ($-4,06 \mu\text{A}$) e com o E_{pr} menos negativo ($-0,434 \text{ V}$), indicando que este CME é promissor para a determinação da BTL.

Figura 39: Voltamogramas ciclos para a BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre a) GCE e b) CoAgBMNPs-PVP/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.



Em seguida, variou-se a proporção Co:Ag a fim de conseguir uma melhor resposta de corrente frente a redução da BTL. A Fig. 40 revela que a melhor proporção é a de 5:5, já que esta fornece um ótimo perfil voltamétrico e a maior resposta de corrente. Provavelmente, isto se deve ao fato de que nesta proporção ocorreu a formação de nanopartículas bimetálicas pequenas do tipo *core-shell* ou *core partial-shell*, enquanto que nas outras proporções houve a formação de nanopartículas do tipo liga ou com tamanho maior. Assim, as próximas etapas do trabalho foram a caracterização das CoAgBMNPs-PVP na proporção 5:5 de Co:Ag e a caracterização do CME construído com estas nanopartículas bimetálicas (CoAgBMNPs-PVP/GCE).

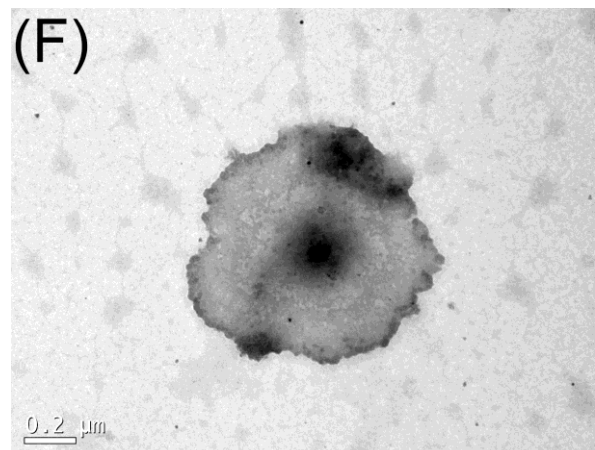
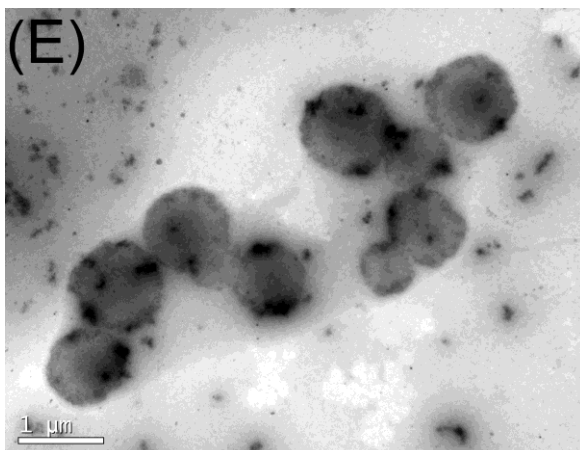
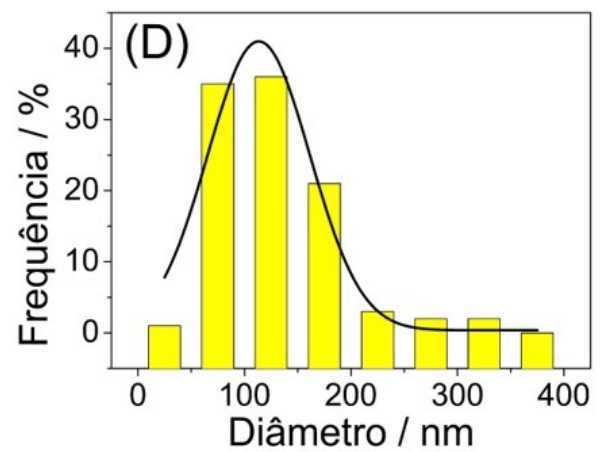
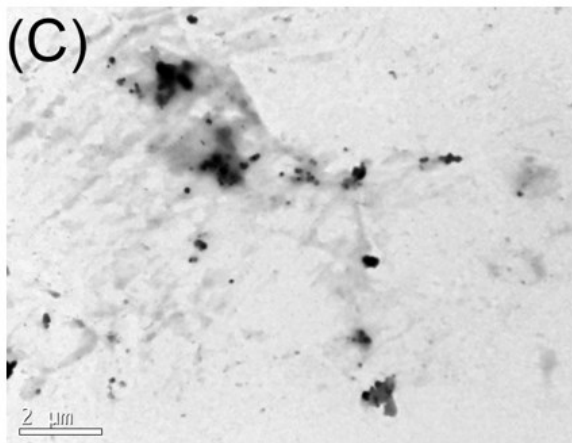
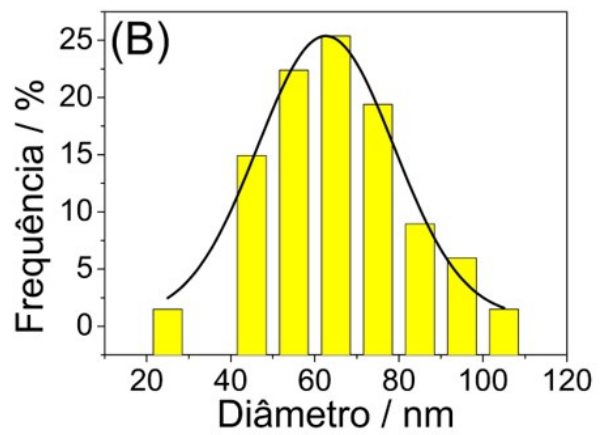
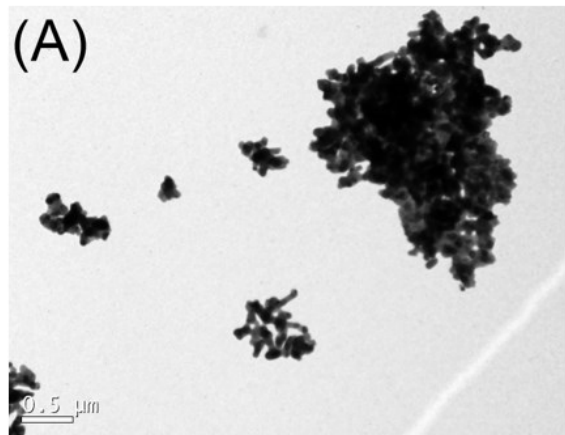
Figura 40: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre CoAgBMNPs-PVP/GCE com diferentes proporções (Co:Ag): a) 1:9; b) 3:7; c) 5:5; d) 7:3 e e) 9:1. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $v = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Gráfico $-i$ vs. proporção ($n = 3$).

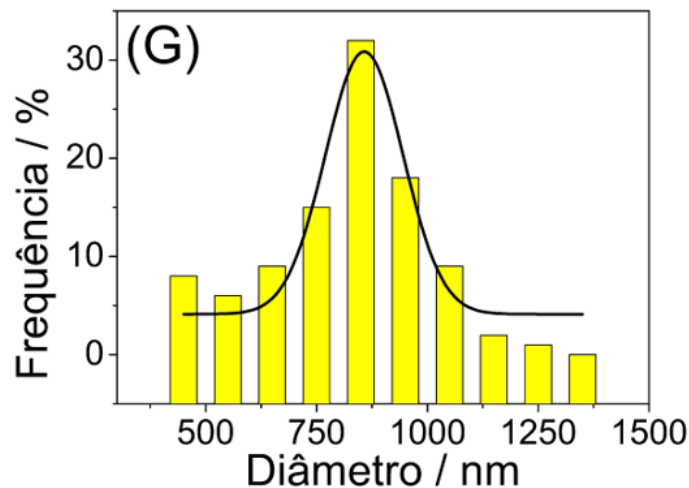


4.2.4. Caracterização das CoAgBMNPs-PVP

A fim de caracterizar morfologicamente as nanopartículas mono e bimetálicas, empregou-se o TEM. As CoNPs-PVP e as AgNPs-PVP (Fig. 41A e 41C) apresentaram um formato quase-esférico, porém apenas as CoNPs-PVP formaram agregados. Os diâmetros médios calculados foram de 63,0 nm para as CoNPs-PVP (Fig. 41B) e de 113,4 nm para as AgNPs-PVP (Fig. 41 D). A Fig. 41E revela que as CoAgBMNPs-PVP também possuem um formato quase-esférico com o cobalto no meio (*core*) e a prata por fora (*shell*). Estas nanopartículas bimetálicas exibiram um diâmetro médio de 859,0 nm Fig. 41G. Ao analisar com mais cuidado a imagem de TEM das CoAgBMNPs-PVP (Fig. 41 F), percebe-se que há uma camada entre o núcleo (Co) e a cobertura (Ag) que pode ser atribuída à adsorção do estabilizante (PVP) na superfície das nanopartículas de cobalto. Isso pode ser responsável pela junção entre os metais Co e Ag e, conseqüentemente, a formação das CoAgBMNPs-PVP. O grande aumento do diâmetro médio também pode ser atribuído a este fenômeno.

Figura 41: Imagens de TEM e histogramas para CoNPs-PVP (A e B), para AgNPs-PVP (C e D) e para CoAgBMNPs-PVP (E, F e G).





As propriedades ópticas das CoNPs-PVP, AgNPs-PVP e CoAgBMNPs-PVP foram estudadas por espectroscopia UV-vis (Fig. 42). A Fig. 42A representa os espectros para $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fig. 41A-a), que foi o sal precursor das nanopartículas de cobalto, e para as CoNPs-PVP (Fig. 41A-b). $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ exibe uma banda de absorção em 511 nm e um ombro em 469 nm, os quais desaparecem quando é adicionado NaBH_4 para sintetizar as CoNPs-PVP. Essa observação indica a redução dos íons Co^{2+} para seu estado metálico Co^0 . As AgNPs-PVP (Fig. 42B-a) apresentam uma banda bem definida em 396 nm que é similar aos dados encontrados na literatura para nanopartículas de prata (DA SILVA *et al.*, 2018). O espectro de absorção das CoAgBMNPs-PVP (Fig. 42B-b) revelam um deslocamento batocrômico (431 nm) e um aumento na largura da banda em comparação com as AgNPs-PVP. Essas observações sugerem que não há uma quantidade significativa de nanopartículas de prata puras na amostra. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato das nanopartículas de prata estarem envolvendo as de cobalto (GARCIA-TORRES, VALLÉS e GÓMEZ, 2010). Com o intuito de comprovar a presença de ambos os metais, realizou-se o EDS das nanopartículas. Como pode ser observado na Fig. 43, o espectro de EDS para as CoAgBMNPs-PVP revela os picos característicos para o cobalto (0,7; 7,0 e 7,6 keV) e para a prata (3,0 keV).

Figura 42: Espectros UV-vis para (A) a) $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e b) CoNPs-PVP; (B) a) AgNPs-PVP e b) CoAgBMNPs-PVP.

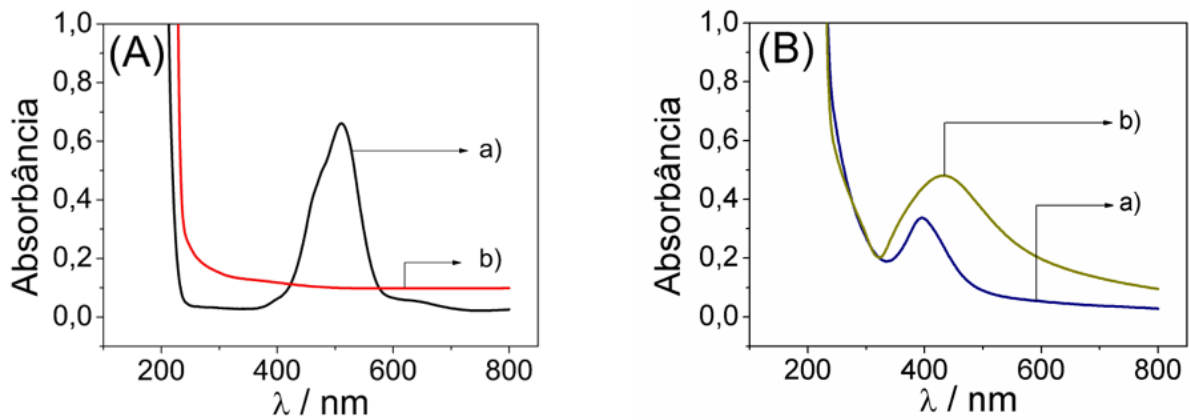
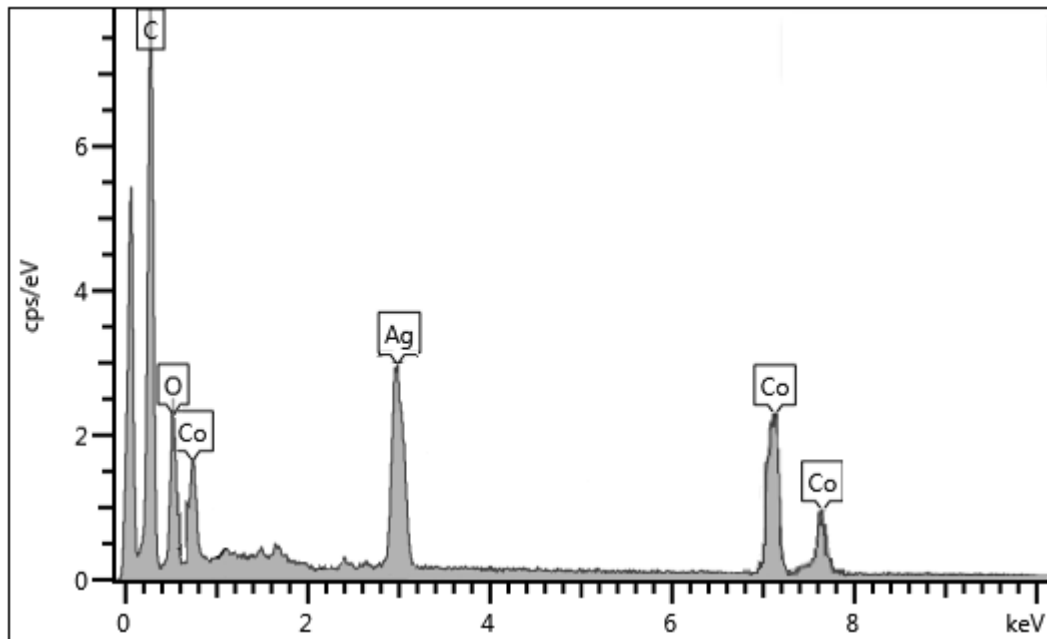


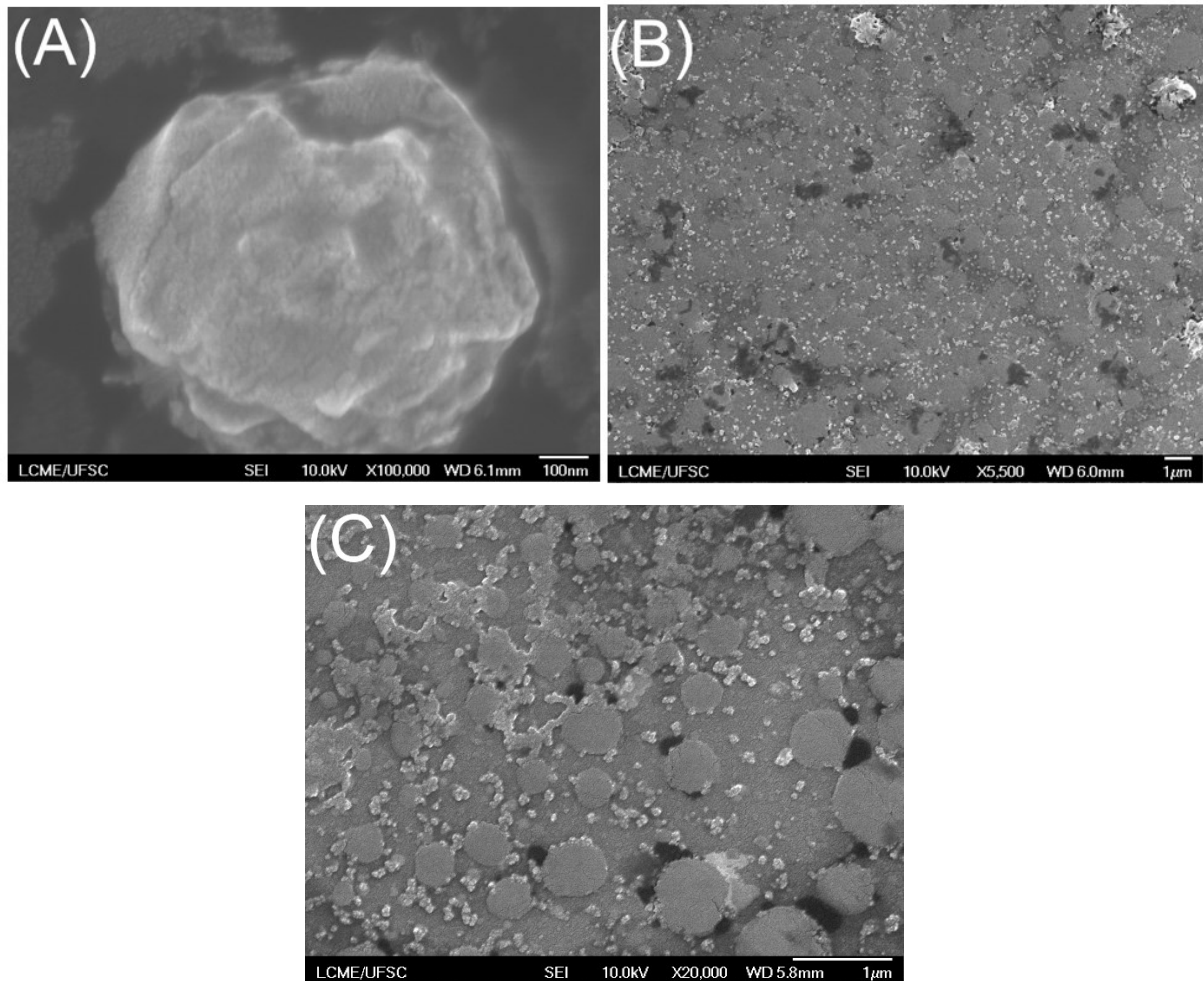
Figura 43: Espectro de EDS para as CoAgBMNPs-PVP.



4.2.5. Caracterização do CoAgBMNPs-PVP/GCE

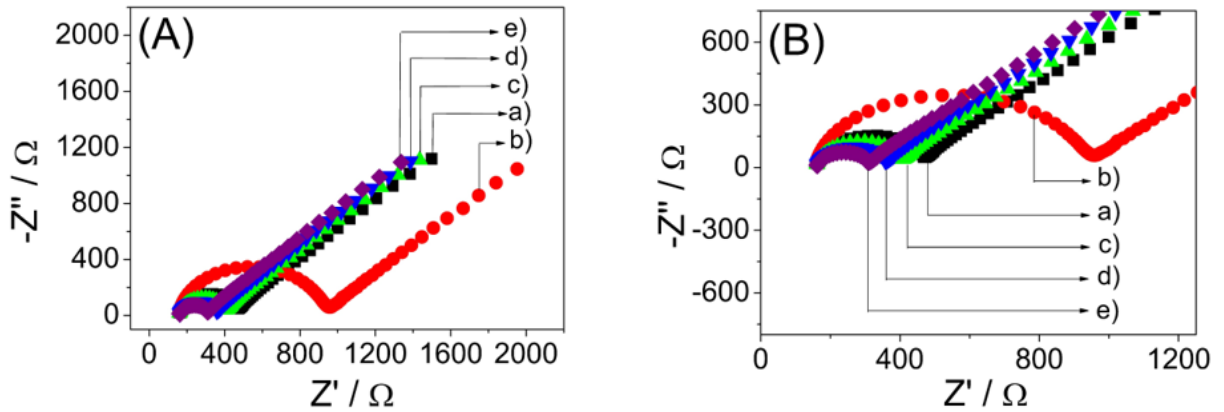
Para caracterizar morfológicamente a superfície do CME, utilizou-se a SEM-FEG. A imagem de SEM-FEG das CoNPs-PVP mostra que elas também se agregam na superfície do GCE (Fig. 44A). A Fig. 44B exibe as AgNPs-PVP dispersas na superfície do GCE. Observa-se na Fig. 44C que as CoAgBMNPs-PVP preservam o seu formato quase-esférico na superfície do GCE. Pode-se notar também que há uma camada de PVP entre os dois metais. Esses resultados estão de acordo com os obtidos com as análises de TEM, UV-vis e EDS e confirmam a presença de cobalto e prata na superfície do GCE.

Figura 44: Imagens de SEM-FEG para (A) CoNPs-PVP/GCE; (B) AgNPs-PVP e (C) CoAgBMNPs-PVP/GCE.



Em seguida, caracterizou-se o CME eletroquimicamente com a EIS, que é uma técnica adequada para investigar o processo de transferência de carga na superfície do eletrodo. Como dito anteriormente, o semicírculo do gráfico de Nyquist corresponde ao processo de transferência de elétrons e seu diâmetro é igual à R_{ct} . Como mostra a Fig. 45, o GCE limpo apresentou um R_{ct} de 305,93 Ω e o eletrodo modificado somente com PVP (PVP/GCE) um R_{ct} de 799,10 Ω , indicando que a PVP formou uma “barreira” na superfície do GCE que bloqueia a transferência de carga entre a solução e o eletrodo. Isso ocorre porque a PVP não é um polímero condutor. Quando o GCE é modificado com CoNPs-PVP ou AgNPs-PVP, a R_{ct} diminui para 244,74 e 195,79 Ω respectivamente. A menor R_{ct} foi adquirida com o CoAgBMNPs-PVP/GCE (146,85 Ω). Essa diminuição no valor de R_{ct} se deve à alta condutividade e o efeito sinérgico entre os metais cobalto e prata.

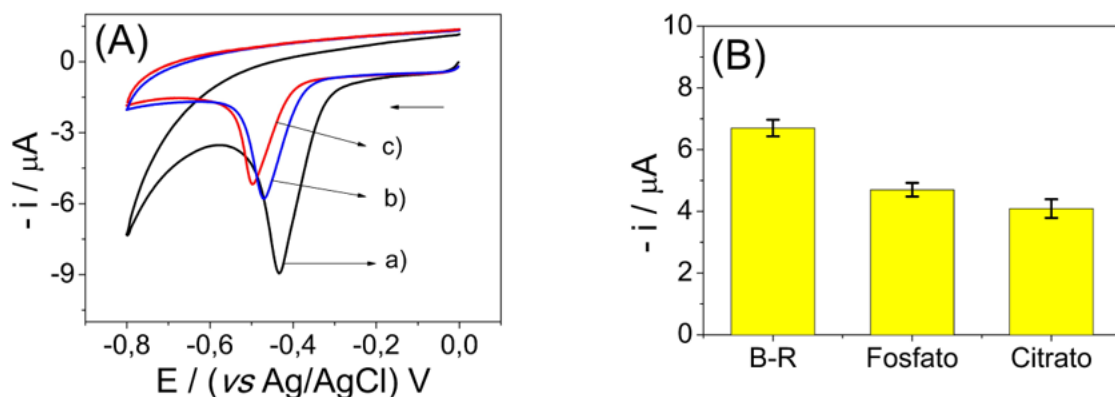
Figura 45: (A) Gráficos de Nyquist para a) GCE; b) PVP/GCE; c) CoNPs-PVP/GCE; d) AgNPs-PVP/GCE e e) CoAgBMNPs-PVP/GCE em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ 0,5 mmol L⁻¹. (B) Ampliação dos gráficos de Nyquist para a) GCE; b) PVP/GCE; c) CoNPs-PVP/GCE; d) AgNPs-PVP/GCE e e) CoAgBMNPs-PVP/GCE.



4.2.6. Estudos de eletrólito de suporte e pH na redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE

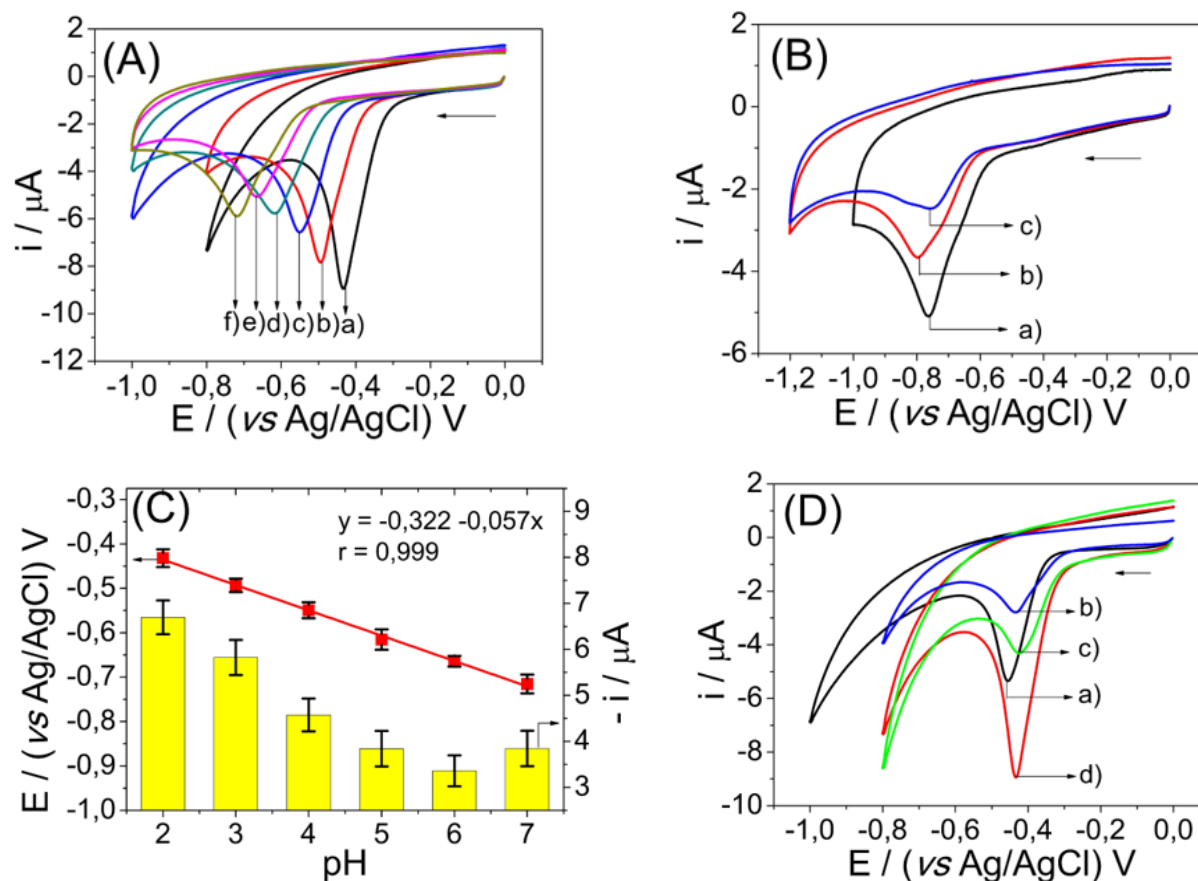
Comparou-se a resposta de corrente para a redução da BTL 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes soluções tampão na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e em pH 2,0. Os voltamogramas estão apresentados na Fig. 46A e revelam que o melhor eletrólito de suporte é o tampão B-R (Fig. 46B), pois este apresenta a maior resposta de corrente e o E_{pr} menos negativo. Provavelmente, o tampão B-R diminuiu a espessura dupla camada elétrica deste eletrodo, aumentando a velocidade de difusão o que resulta em um aumento da resposta de corrente da redução da BTL. Portanto, escolheu-se o tampão B-R como eletrólito de suporte para os próximos estudos.

Figura 46: (A) Voltamogramas cíclicos para a BTL 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão a) B-R, b) fosfato e c) citrato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0). $E_{acc} = -0,15$ V, $t_{acc} = 180$ s, $v = 100,0$ mV s⁻¹. (B) Gráfico $-i$ vs. solução tampão ($n = 3$).



Posteriormente, o efeito do pH do tampão B-R no processo de redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE foi investigado. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes valores de pH (2,0 – 10,0) a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Como pode ser observado na Fig. 47A, a BTL apresenta um pico de redução bem definido na faixa de pH de 2,0 até 6,0 referente à redução simultânea de ambos os grupos nitro presentes em sua estrutura. Nesses valores de pH, como mencionado anteriormente, o ambiente químico dos grupos nitro é muito parecido, fazendo com que ambos sofram redução em potenciais muito próximos. Em valores de pH maiores que 7,0 (Fig. 47B), observou-se que a largura do pico de redução aumenta e a resposta de corrente diminui, o que não é desejável para determinações eletroanalíticas porque isto causa perda de seletividade e sensibilidade. O gráfico E_{pr} vs pH (Fig. 47 C) revela que o valor de E_{pr} desloca negativamente e de forma linear com o aumento do pH do eletrólito de suporte, o que implica que o processo eletroquímico se realiza com transferência de prótons e elétrons (SALEHZADEH *et al.*, 2016). A equação da reta desse gráfico é $E_{pr} \text{ (V)} = -0,322 - 0,057\text{pH}$. Usando o coeficiente angular da equação de Nernst ($dE_p/d\text{pH} = 0,0592m/n$, onde “m” é o número de mols de prótons e “n” o número de mols de elétrons), a razão m/n calculada foi de aproximadamente 1,0 ($0,057/0,0592 = 0,96$), significando que o mesmo número de prótons e elétrons estão envolvidos na reação de redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE. A maior resposta de corrente foi obtida em pH 2,0 (Fig. 47C), em valores maiores que 2,0 há a diminuição da resposta de corrente porque o pico sofre alargamento até se dividir em dois. Por fim, comparou-se a performance do GCE, CoNPs-PVP/GCE, AgNPs-PVP/GCE e CoAgBMNPs-PVP/GCE frente a redução da BTL (Fig. 47D) e percebe-se pelos voltamogramas cíclicos que o CoAgBMNPs-PVP/GCE exibe a maior resposta de corrente. A propriedade catalítica das nanopartículas de prata frente à redução de grupo nitro aliado com o magnetismo das nanopartículas de cobalto podem ter influenciado para o aumento do sinal de redução da BTL sobre o CME.

Figura 47: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH a) 2,0; b) 3,0; c) 4,0; d) 5,0; e) 6,0 e f) 7,0. (B) pH a) 8,0; b) 9,0 e c) 10,0. (C) Gráfico $-i$ vs. pH e E vs. pH ($n = 3$). (D) Voltamogramas cíclicos para BTL $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,0 sobre a) GCE; b) CoNPs-PVP/GCE; c) AgNPs-PVP/GCE e d) CoAgBMNPs-PVP/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 180 \text{ s}$, $\nu = 100,0 \text{ mV s}^{-1}$.

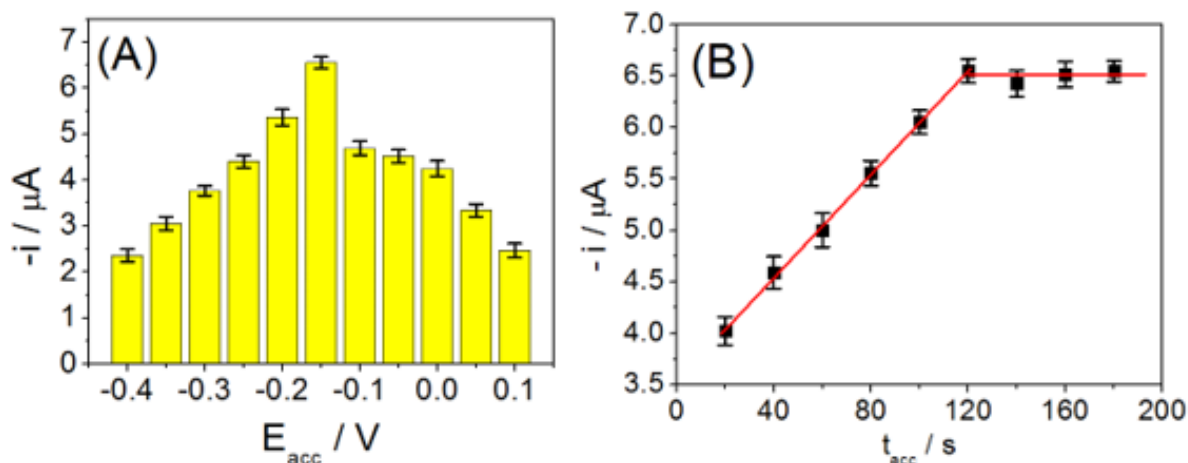


4.2.7. Efeito do potencial e tempo de acúmulo na redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE

Com o eletrólito e pH otimizados, a próxima etapa foi otimizar os parâmetros da etapa de pré-concentração: E_{acc} e t_{acc} . Fixou-se primeiramente o t_{acc} em 180 s e variou-se o E_{acc} na faixa de +0,10 até -0,40 V. A Fig. 48A revela que em E_{acc} positivos a resposta de corrente é baixa. Como a BTL, assim como outras dinitroanilinas, está protonada em pH 2,0, há uma repulsão eletrostática entre a BTL e o eletrodo (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996). Em valores mais negativos que -0,15 V há uma queda na resposta de corrente devido ao fato da BTL estar sendo reduzida nestes potenciais de acúmulo. Por estas razões, o valor de -0,15 V foi fixado para E_{acc} . Com o E_{acc} fixado em -0,15 V, variou-se o t_{acc} de 20 até 180 s (Fig. 48A). O gráfico $-i$ vs t_{acc} mostra que há um aumento de resposta de corrente em função do aumento do tempo de acúmulo. O aumento do sinal está diretamente relacionado com o tempo de contato da superfície do eletrodo com as moléculas de BTL em solução, ou seja, quanto maior o tempo

de acúmulo, maior será a quantidade de BTL adsorvida na superfície do eletrodo. Contudo, o aumento da resposta de corrente foi observado até 120 s, onde se atingiu um estágio estacionário entre adsorção e dessorção das moléculas de BTL, obtendo uma condição de equilíbrio na superfície do eletrodo. Assim, o uso de tempos maiores que 120 s se tornou desnecessário.

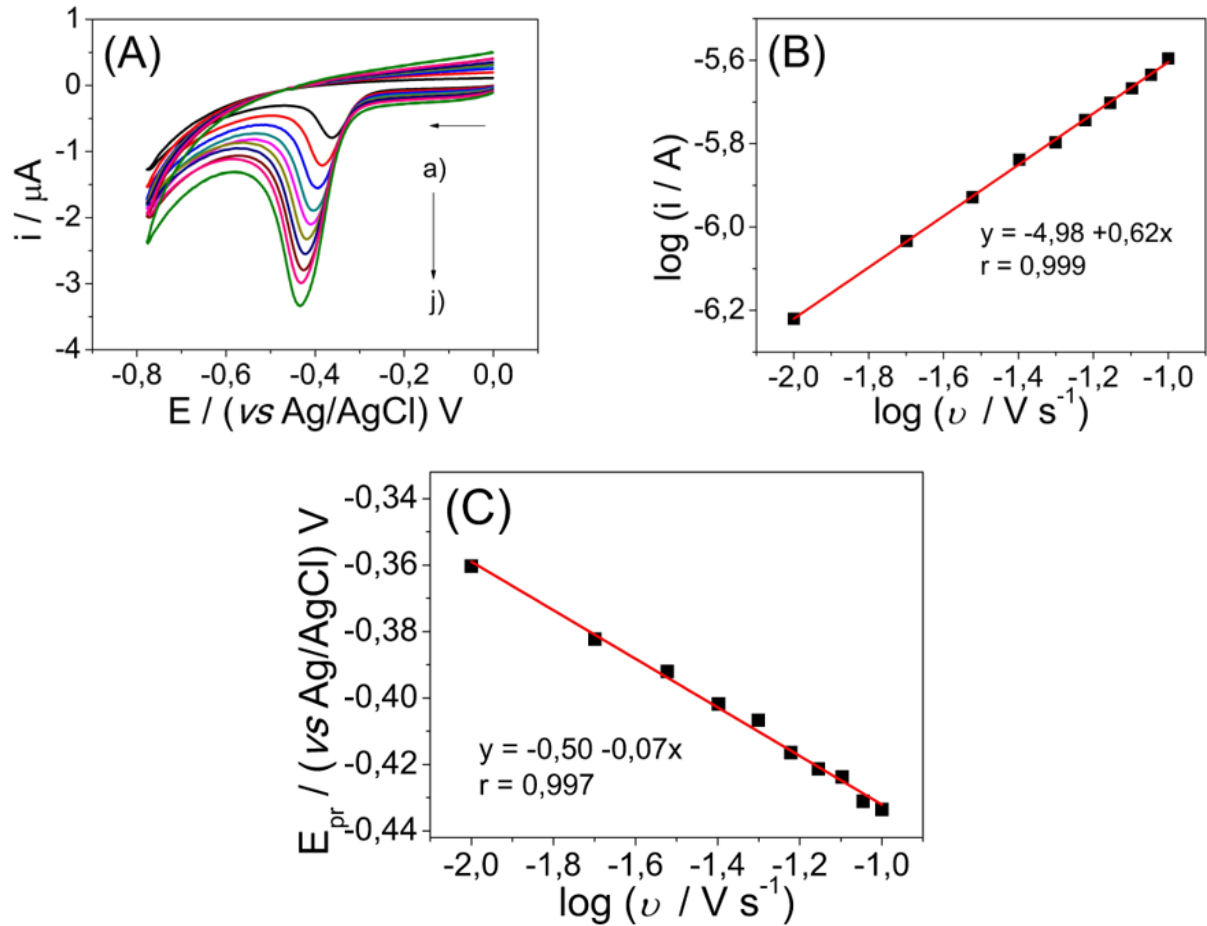
Figura 48: (A) Gráfico $-i$ vs E_{acc} . (B) Gráfico $-i$ vs t_{acc} . ($n = 3$).



4.2.8. Influência da velocidade de varredura na redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE

O efeito da velocidade de varredura na redução da BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi investigado na faixa de $10,0$ até $100,0 \text{ mV s}^{-1}$ (Fig. 49). Como pode ser visto na Fig. 49A, o E_{pr} se desloca para valores mais negativos à medida que a velocidade aumenta, o que é característico de processos irreversíveis. O gráfico $\log i$ vs $\log v$ (Fig. 49 B) apresenta um coeficiente angular de $0,62$, indicando que a reação de redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE é controlada por difusão com uma pequena contribuição da adsorção (NICHOLSON e SHAIN, 1964). O gráfico E_{pr} vs $\log v$, representado na Fig. 49C, exibe um coeficiente angular de $0,07$, o que revela que $\alpha n = 0,85$. Para $\alpha = 0,5$, $n \approx 2,0$, onde “ n ” é número de mols de elétrons envolvidos na reação de redução da BTL e “ α ” é o coeficiente de transferência de elétrons (LAVIRON, 1974). Esses resultados sugerem que ambos os grupos nitro são reduzidos simultaneamente envolvendo 2 prótons e 2 elétrons, formando o radical $\bullet\text{HO}_2\text{N-Ar-NO}_2\text{H}^\bullet$, como descrito na seção 4.1.8. e em trabalhos na literatura envolvendo redução de dinitroanilinas (KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996; GALLI, DE SOUZA e MACHADO, 2011).

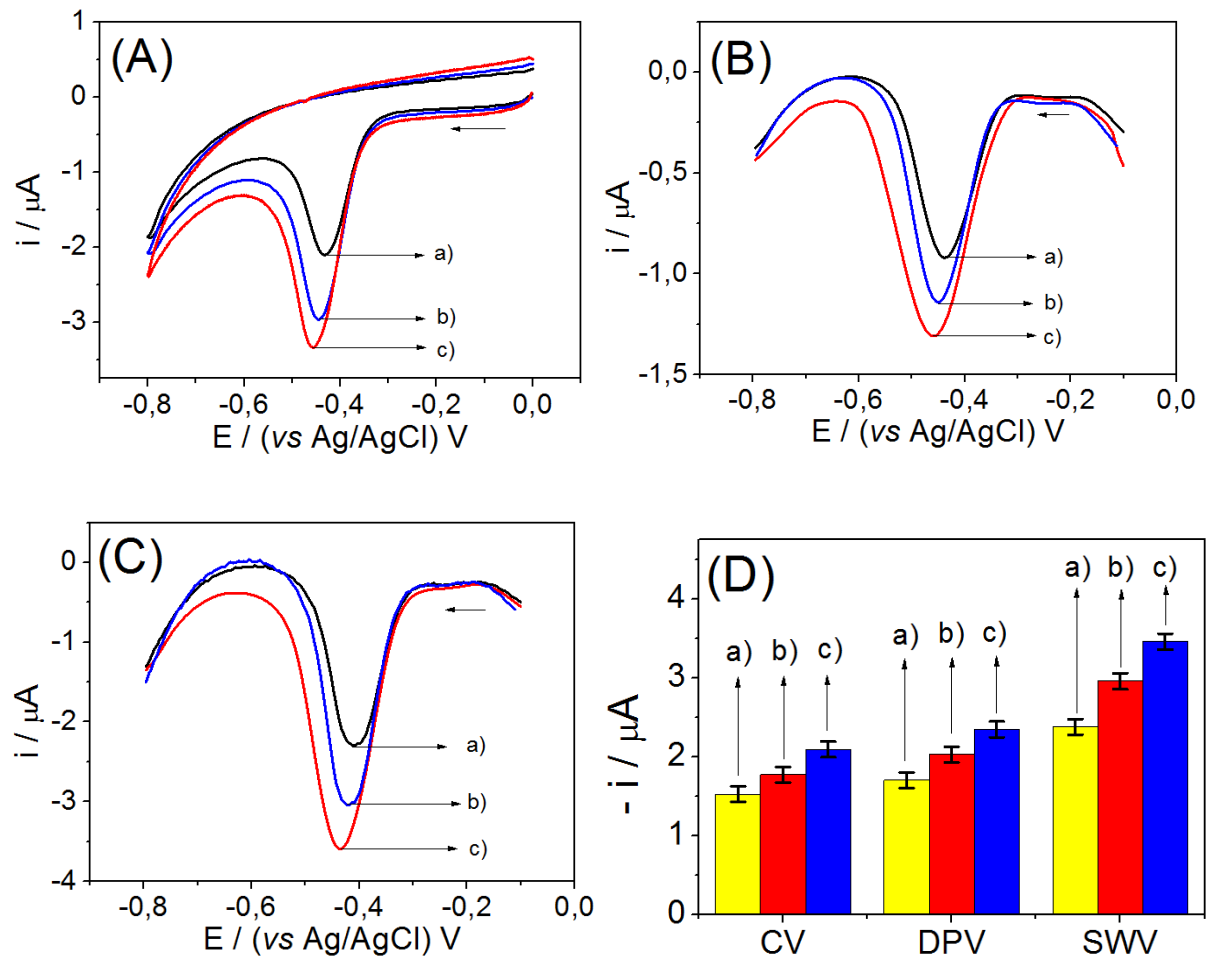
Figura 49: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) com diferentes velocidades de varredura: a) 10,0; b) 20,0; c) 30,0; d) 40,0; e) 50,0; f) 60,0; g) 70,0; h) 80,0; i) 90,0 e j) 100,0 mV s^{-1} . (B) Gráfico $\log i$ vs $\log v$. (C) Gráfico E_{pr} vs $\log v$. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$.



4.2.9. Seleção da técnica eletroanalítica para a determinação da BTL

As técnicas eletroanalíticas CV, DPV, e SWV foram testadas em diferentes velocidades de varredura para ter conhecimento da mais adequada para a determinação da BTL. O gráfico representado na Fig. 50 revela que a SWV exibe as maiores respostas de corrente nas velocidades testadas. Provavelmente, como o pulso aplicado na SWV é diferente do que na DPV, há uma perturbação maior na dupla camada elétrica do eletrodo, o que causa um aumento no sinal de redução da BTL (BARD e FALKNER, 2001). Assim, a SWV foi escolhida como técnica eletroanalítica para a construção da curva de calibração e realização da determinação da BTL em amostras reais.

Figura 50: (A) Voltamogramas cíclicos para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Voltamogramas de pulso diferencial para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (C) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$. (D) Gráfico de barras para as diferentes técnicas eletroanalíticas em diferentes velocidades (a) $50,0$; b) $75,0$ e c) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$ usando BTL $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE. $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$ ($n = 3$).



4.2.9.1. Otimização dos parâmetros da SWV para a determinação da BTL

A fim de se obter uma boa resposta de corrente junto a um bom perfil voltamétrico, otimizou-se os parâmetros da SWV: ΔE_s , a e f . Primeiramente fixou a e f em $5,0 \text{ mV}$ e $50,0 \text{ Hz}$, respectivamente, e variou-se ΔE_s de $1,0$ até $10,0 \text{ mV}$ (Fig. 51). A otimização do ΔE_s pode melhorar significativamente a sensibilidade. Teoricamente, uma maior resposta de corrente é obtida aplicando-se um valor alto de ΔE_s . Contudo, ao se utilizar CMEs, deve-se avaliar não somente a resposta de corrente, mas também o perfil voltamétrico. Percebe-se que à medida que o valor de ΔE_s aumenta, a largura do pico aumenta e o E_{pr} é deslocado para valores mais negativos, o que é característico de processos irreversíveis (AOKI e OSTERYOUNG, 1980).

Escolheu-se o valor de 5,0 mV para ΔE_s por apresentar uma boa resposta de corrente e o pico não ficar alargado. Em seguida, fixou-se ΔE_s e f em 5,0 mV e 50,0 Hz e variou-se a de 10,0 até 100,0 mV (Fig. 52). Para sistemas totalmente irreversíveis, o aumento da a pode deslocar os valores de potenciais de pico e pode provocar um aumento da resposta de corrente. Assim, a análise do intervalo da linearidade da resposta de corrente com a amplitude é muito importante para aplicações analíticas. Observa-se que a resposta de corrente aumenta até o valor de 50,0 mV e depois não há uma variação significativa e que a largura do pico aumenta à medida que se aumenta a , por estes motivos escolheu-se o valor de 50,0 mV para a . Por fim, com ΔE_s e a fixados em 5,0 e 50,0 mV, respectivamente, variou-se f de 10,0 até 100,0 Hz (Fig. 53). A f é uma das variáveis mais importantes da SWV. Quando se mantém constante a concentração da espécie química de interesse, é a f que determina a intensidade do sinal e, conseqüentemente, a sensibilidade. Os resultados deste último estudo revelam que há um aumento de resposta de corrente quando se aumenta a f , porém há também o alargamento do pico. Escolheu-se o valor de 40,0 Hz por aliar uma boa resposta de corrente com um bom perfil voltamétrico.

Figura 51: (A) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando o ΔE_s na faixa de 1,0 até 10,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. ΔE_s . $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$, $a = 50,0 \text{ mV}$, $f = 50,0 \text{ Hz}$.

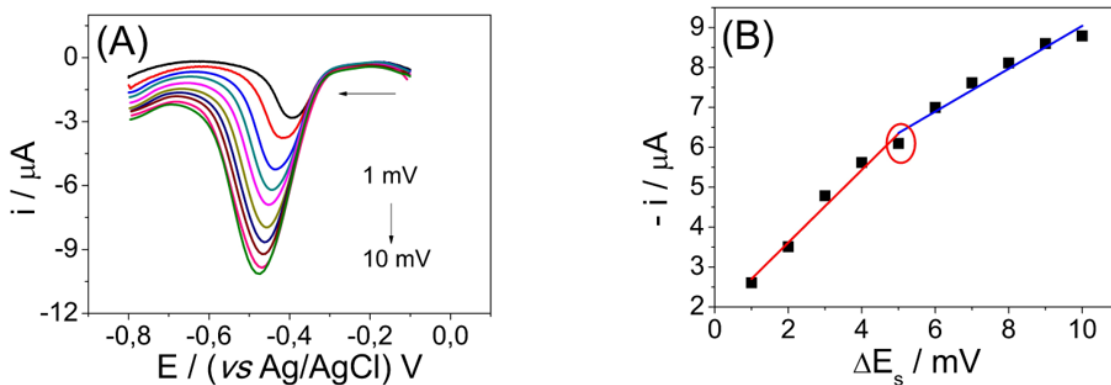


Figura 52: (A) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando a na faixa de 10,0 até 100,0 mV. (B) Gráfico $-i$ vs. a . $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $f = 50,0 \text{ Hz}$.

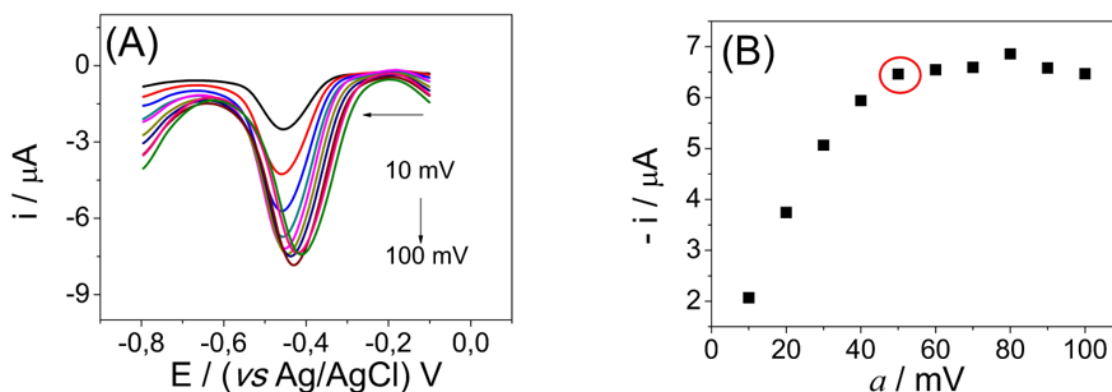
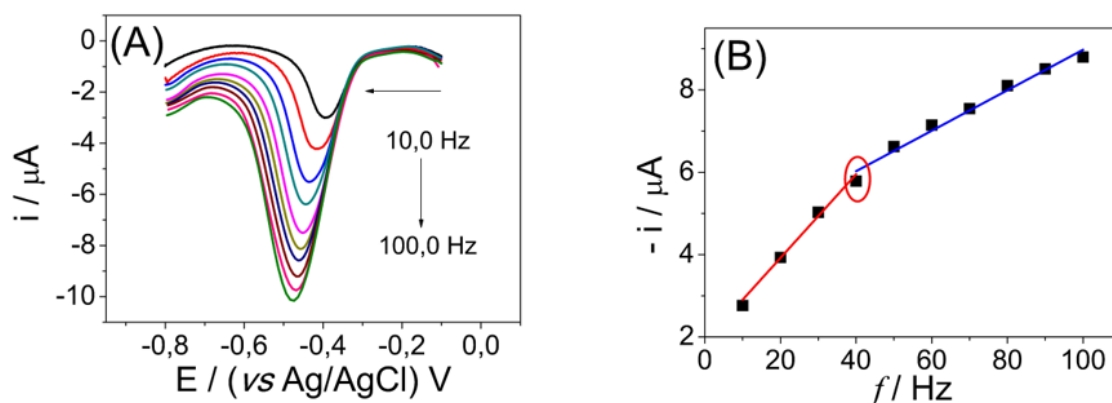


Figura 53: (A) Voltamogramas de onda quadrada para BTL $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) variando f na faixa de 10,0 até 100,0 Hz. (B) Gráfico $-i$ vs. f . $E_{\text{acc}} = -0,15 \text{ V}$, $t_{\text{acc}} = 120 \text{ s}$, $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$, $a = 50,0 \text{ mV}$.

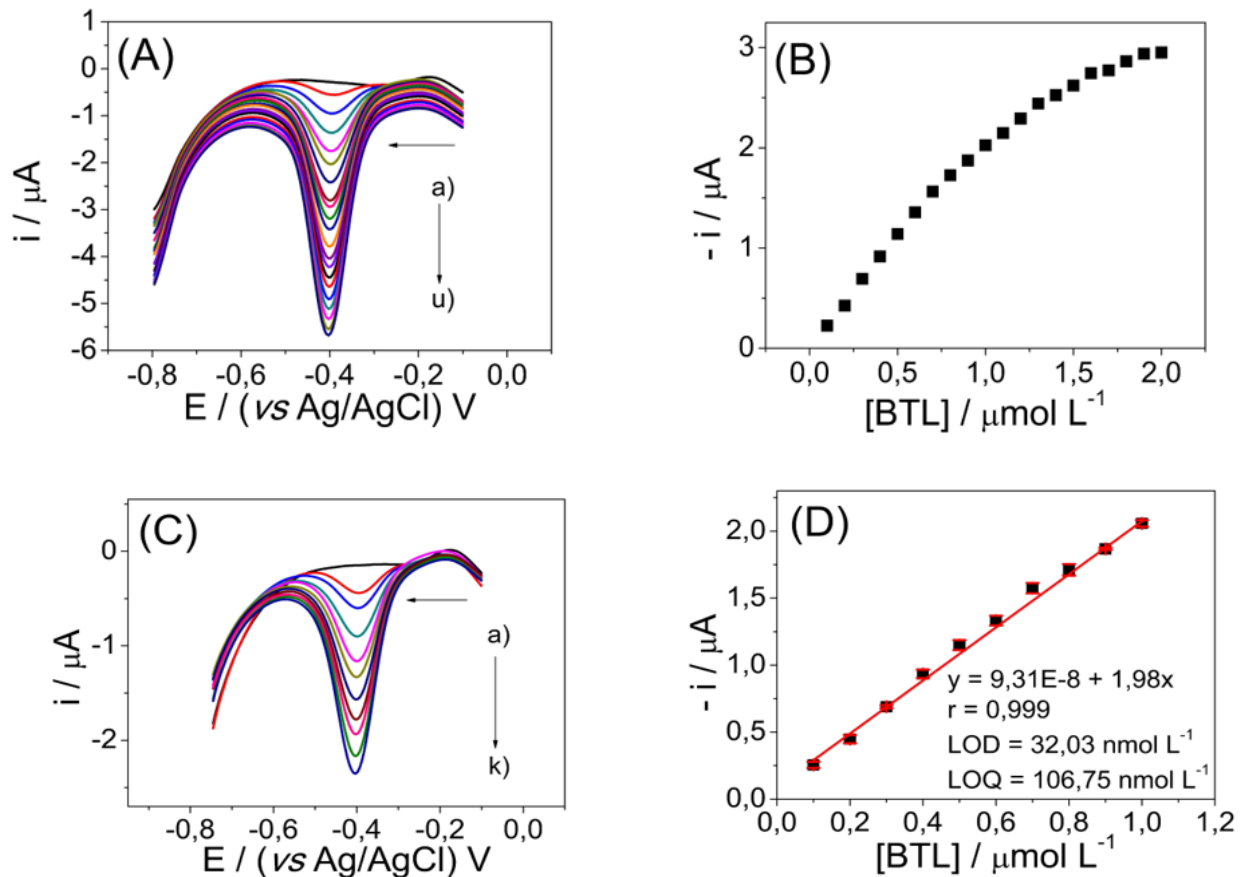


4.2.10. Curva de calibração para a BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE

Os voltamogramas de onda quadradas para a curva de calibração obtidos nas condições otimizadas para a redução da BTL sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE depois de adições sucessivas da solução padrão de BTL estão apresentados na Fig. 54A. Um pico de redução pode ser observado em $-0,403 \text{ V}$ que aumenta com a concentração de BTL. No entanto, o aumento é proporcional na faixa de $0,1$ até $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, acima desta concentração a superfície do CME fica saturada (Fig. 54B). Assim, usou-se a faixa linear de $0,1$ até $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para construir a curva de calibração (Fig. 54C e 54D). A curva de calibração média ($n = 8$) exibe a seguinte equação: $-i/\mu\text{A} = 0,09 + 1,98[\text{BTL}]/\mu\text{mol L}^{-1}$. O LOD e o LOQ calculados foram de 32 e 107 nmol L^{-1} , respectivamente. Esses valores foram calculados usando os parâmetros da curva da

calibração (RIBANI *et al.*, 2004; KURBANOGLU, USLU e OZKAN, 2018), como foi explicado mais detalhadamente na seção 4.1.10.

Figura 54: (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE a) branco; b) 0,1; c) 0,2; d) 0,3; e) 0,4; f) 0,5; g) 0,6; h) 0,7; i) 0,8; j) 0,9; k) 1,0; l) 1,1; m) 1,2; n) 1,3; o) 1,4; p) 1,5; q) 1,6; r) 1,7; s) 1,8; t) 1,9 e u) 2,0 μmol L⁻¹. (B) Curva de calibração média (n = 8) para BTL na faixa de 0,1 até 2,0 μmol L⁻¹. (C) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE a) branco; b) 0,1; c) 0,2; d) 0,3; e) 0,4; f) 0,5; g) 0,6; h) 0,7; i) 0,8; j) 0,9 e k) 1,0 μmol L⁻¹. (D) Curva de calibração média (n = 8) para BTL na faixa de 0,1 até 1,0 μmol L⁻¹. E_{acc} = -0,15 V, t_{acc} = 120 s, ΔE_s = 5,0 mV, a = 50,0 mV, f = 40,0 Hz.



A repetibilidade da resposta de corrente provida pelo novo CME foi testada aplicando dois métodos: intra-dia, usando oito soluções diferentes preparados no mesmo dia na concentração de 0,5 μmol L⁻¹, e inter-dia, onde durante oito dias foram usadas oito diferentes soluções de BTL 0,5 μmol L⁻¹, preparadas uma a cada dia. O RSD calculado foi de 3,23% e 3,49% respectivamente. Esses resultados mostram que este eletrodo possui boa repetibilidade. A Tabela 6 resume esses e outros parâmetros analíticos.

Tabela 6: Dados obtidos a partir da curva de calibração para a BTL.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico / V	-0,403
Faixa linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,1 – 1,0
Coefficiente de correlação (r)	0,999
Coefficiente angular / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	1,98
Desvio do coeficiente angular / $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	0,03
Coefficiente linear / μA	0,09
Desvio do coeficiente linear / μA	0,02
LOD / nmol L^{-1}	32
LOQ / nmol L^{-1}	107
Repetibilidade de i (intra-dia) / % ^{a,b}	3,23
Repetibilidade de i (inter-dia) / % ^{a,b}	3,49

^a Desvio padrão relativo.

^b n = 8.

4.2.11. Estudo de interferentes na determinação da BTL

O efeito de íons metálicos e de outros nitrocompostos foram investigados sobre a resposta de corrente da BTL usando o novo CME. A variação da corrente devido à presença do composto potencialmente interferente foi calculada por comparação das medidas de corrente da redução da BTL na presença e na ausência do interferente. Os estudos demonstraram que os compostos investigados não apresentaram interferência significativa na determinação de BTL numa razão molar de 1:10 (BTL: interferente), conduzindo a alterações no sinal analítico entre -3,9 a +5,8%. Portanto, o CoAgBMNPs-PVP/GCE pode ser utilizado para a determinação de BTL na presença desses compostos com seletividade adequada. Os resultados deste estudo estão reportados na Tabela 7.

Tabela 7: Estudo de interferentes na presença da BTL.

Espécies	Corrente de pico (μA)	%i	Potencial de pico (V)
BTL ^a	2,06	-	-0,403
Cd ²⁺ , ^b	1,99	-3,4	-0,398
Co ²⁺	2,01	-2,4	-0,399
Ni ²⁺	2,02	-2,0	-0,396
Pb ²⁺	1,98	-3,9	-0,402
Zn ²⁺	2,06	0	-0,403
2-nitrofenol	2,15	+4,4	-0,409
3-nitrofenol	2,12	+2,9	-0,401
4-nitrofenol	2,13	+3,4	-0,402
Paration	2,15	+4,4	-0,404
Pendimetalina	2,18	+5,8	-0,403
Orizalina	2,10	+1,9	-0,401
Profluralina	2,18	+5,8	-0,402

^a BTL 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0).

^b Concentração de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os possíveis interferentes em tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0).

4.2.12. Determinação de BTL em mel e geleia de maçã usando o CoAgBMNPs-PVP/GCE

A aplicabilidade do método proposto foi investigada determinando BTL em amostras de mel e de geleia de maçã, uma vez que há a possibilidade de encontrar BTL nessas amostras. Portanto, preparou-se várias amostras fortificadas contendo uma quantidade de BTL conhecida para que, na célula eletroquímica, esta estivesse dentro da curva de calibração. Assim, fortificou-se amostras de mel e de geleia de maçã com BTL 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada uma. Posteriormente, adicionou-se 1,0 mL da amostra em 9,0 mL de eletrólito de suporte, onde a concentração de BTL na célula eletroquímica fique em 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método da adição de padrão foi empregado para determinar BTL nas amostras por SWV usando o novo CME. A Fig. 55A e 56A mostra os voltamogramas de onda quadrada para a amostra de mel e de geleia de maçã respectivamente. Percebe-se que o sinal da BTL na amostra de mel é mais alargado que na amostra de geleia de maçã devido aos componentes presentes nesses alimentos. Mesmo assim, não há interferência de matriz em ambas as amostras já que o coeficiente angular das curvas de adição de padrão para o mel (2,03 $\mu\text{A L mol}^{-1}$) e para a geleia de maçã (2,01 $\mu\text{A L mol}^{-1}$) são similares com o da curva de calibração (1,98 $\mu\text{A L mol}^{-1}$).

Figura 55: Voltamogramas de onda quadrada para a) eletrólito de suporte, b) amostra de mel com BTL, (c-g) adições sucessivas de 50,0 μL de solução padrão de BTL 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0). $E_{\text{acc}} = -0,15$ V, $t_{\text{acc}} = 120$ s, $\Delta E_s = 5,0$ mV, $a = 50,0$ mV, $f = 40,0$ Hz. (B) Curva de adição de padrão média (n = 8).

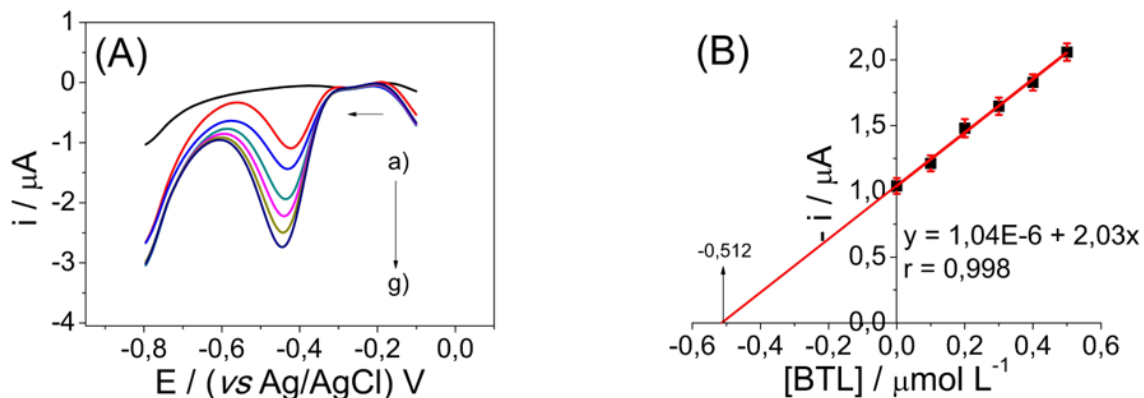
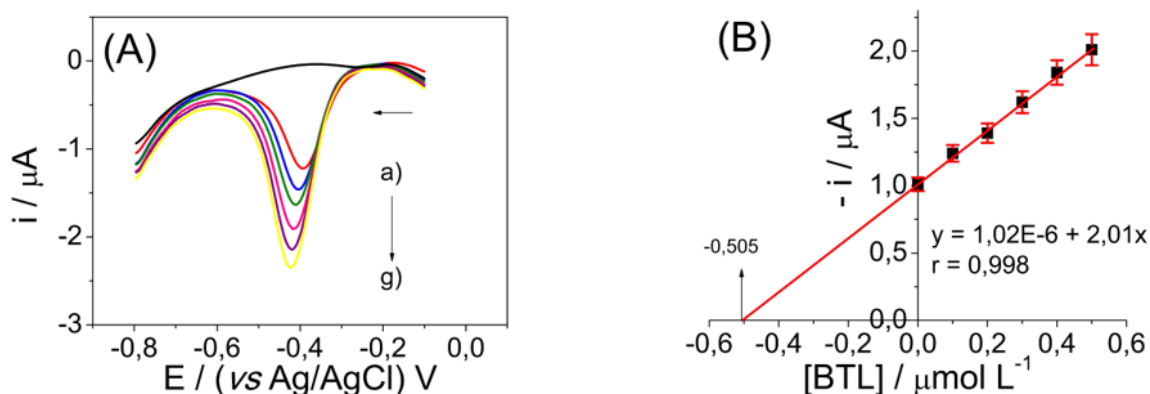


Figura 56: Voltamogramas de onda quadrada para a) eletrólito de suporte, b) amostra de geleia de maçã com BTL, (c-g) adições sucessivas de 50,0 μL de solução padrão de BTL 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o CoAgBMNPs-PVP/GCE em solução tampão B-R 0,1 mol L^{-1} (pH 2,0). $E_{\text{acc}} = -0,15$ V, $t_{\text{acc}} = 120$ s, $\Delta E_s = 5,0$ mV, $a = 50,0$ mV, $f = 40,0$ Hz. (B) Curva de adição de padrão média (n = 8).



4.2.12.1. Método comparativo para a determinação da BTL

A espectroscopia UV-vis foi utilizada como método comparativo para validar os dados obtidos com o método voltamétrico. Os espectros UV-vis para a amostra de mel estão representados na Fig. 57, percebe-se que o mel sem a BTL apresenta um espectro que interfere no sinal da BTL, que apresentou um λ_{max} em 434 nm (Fig. 57A) ao qual pode ser atribuída a transição eletrônica de transferência de carga do grupo amina para os grupos nitro. Portanto, subtraiu-se o espectro da amostra de mel dos demais, o que resultou em espectros mais resolvidos (Fig. 57B). O mesmo foi feito na amostra de geleia de maçã (Fig. 58). Com isso, aplicou-se os testes estatísticos t e F , os resultados estão reportados na Tabela 8. Observa-se

que os resultados obtidos por ambos os métodos estão muito próximos. Os valores de RSD são menores que 4,00 % e os testes estatísticos revelaram que não diferença significativa entre a precisão (teste *F*) e exatidão (teste *t*) entre os métodos utilizados. Estes resultados provam que o método desenvolvido com o CoAgBMNPs-PVP/GCE pode ser usado para determinar BTL com alta precisão, exatidão e sensibilidade.

Figura 57: (A) Espectros UV-vis para a) branco, b) amostra de mel, c) amostra de mel fortificada, d-h) mel fortificado mais BTL 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Espectros corrigidos.

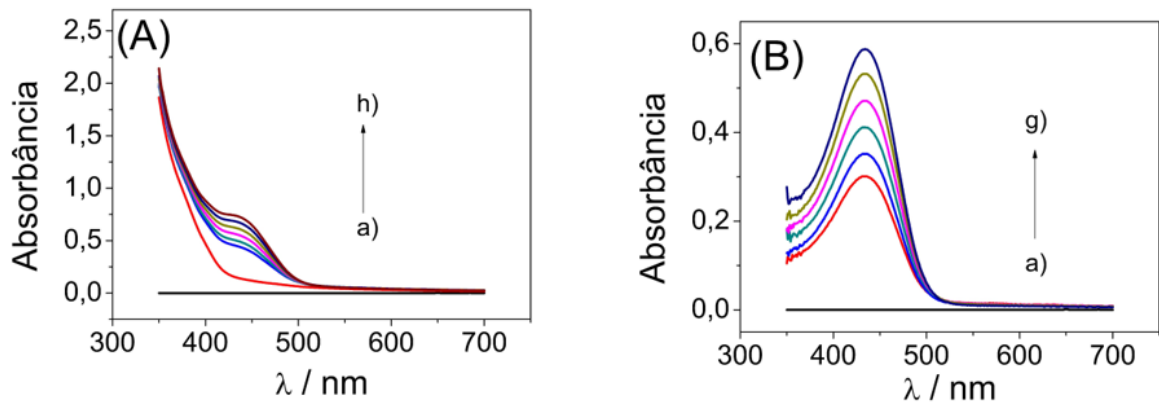


Figura 58: (A) Espectros UV-vis para a) branco, b) amostra de geleia de maçã, c) amostra de geleia de maçã fortificada, d-h) geleia de maçã fortificada mais BTL 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Espectros corrigidos.

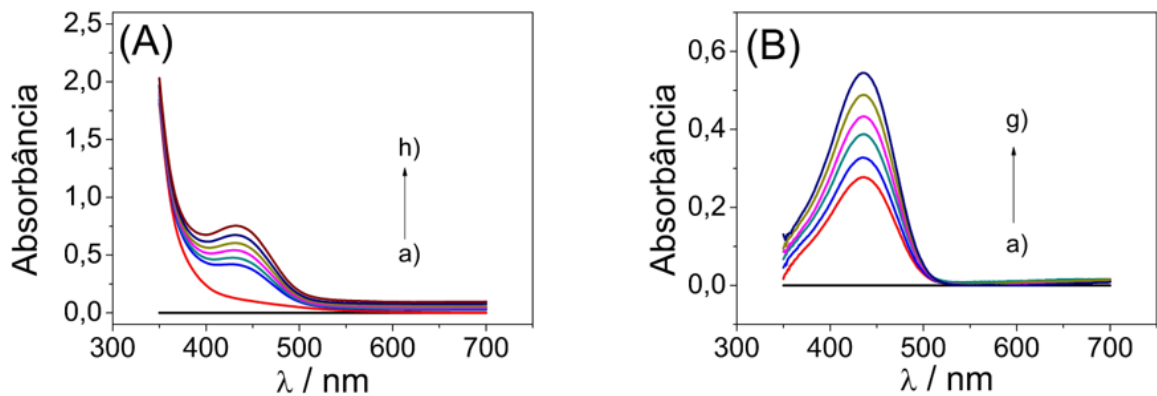


Tabela 8: Determinação de BTL em amostras de mel e de geleia de maçã por SWV usando o CoAgBMNPs-PVP/GCE e por UV-vis.

Amostra	Mel		Geleia de maçã	
Valor verdadeiro ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5,00		5,00	
Técnica	SWV	UV-vis	SWV	UV-vis
Valor encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	5,12	5,06	5,05	5,07
RSD% ^b	2,81	2,29	3,06	2,47
E_{r1} ^c	2,40	1,20	1,00	1,40
E_{r2} ^d	1,18	-	-0,39	-
$t_{\text{calculado}}$ ^e	1,99	1,51	1,07	1,60
$F_{\text{calculado}}$ ^f	1,54		1,53	

^a $n = 8$.

^bDesvio padrão relativo.

^cErro relativo entre UV-vis ou CoAgBMNPs-PVP/GCE e o valor verdadeiro

^dErro relativo entre CoAgBMNPs-PVP/GCE e UV-vis.

^e $t_{\text{crítico}} = 2,36$.

^f $F_{\text{crítico}} = 3,44$.

CAPÍTULO 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, dois novos métodos analíticos baseados em eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas bimetalicas foram desenvolvidos e aplicados na determinação eletroanalítica de desreguladores endócrinos da classe das dinitroanilinas. O primeiro método proposto foi baseado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas bimetalicas de prata e ouro estabilizadas em quitosana (AgAuBMNPs-CTS/GCE) e foi empregado na determinação de orizalina (ORZ). O segundo, por sua vez, consistiu na preparação de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de cobalto e prata estabilizadas em poli(vinilpirrolidona) (CoAgBMNPs-PVP/GCE) e foi aplicado na quantificação de butralina (BTL). Técnicas microscópicas, espectroscópicas e voltamétricas de caracterização comprovaram a eficiência nas modificações, bem como o excelente desempenho dos detectores para serem utilizados em determinações eletroanalíticas.

Em ambos os métodos, os sensores AgAuBMNPs-CTS e CoAgBMNPs-PVP proporcionaram um aumento da sensibilidade na determinação de ORZ e BTL, respectivamente, em comparação ao método com os substratos sem modificação. Os valores obtidos para LOD e LOQ são na escala nanomolar. Quando aplicados na determinação de desreguladores endócrinos em matrizes complexas, os novos métodos forneceram respostas precisas, exatas e exibiram boa estabilidade dos eletrodos quimicamente modificados ao longo das aplicações. A presença de íons metálicos e outros pesticidas com composição parecida não afetou o sinal de redução da ORZ e BTL, o que revelou a boa seletividade proporcionada pelas modificações que bloqueiam o acesso dos interferentes devido a sua carga ou tamanho, sendo permeável apenas à espécie química de interesse. Ao fazer os testes estatísticos (t e F), percebeu-se que não há diferença significativa na precisão e exatidão entre os métodos propostos e os métodos comparativos.

Por fim, enfatiza-se que os eletrodos quimicamente modificados construídos são os primeiros que não são de mercúrio aplicados na determinação eletroanalítica de ORZ e BTL. Portanto, são alternativas viáveis para esta função, já que apresentam desempenhos parecidos com o de mercúrio. Além do mais, estes eletrodos podem ser utilizados como sensores amperométricos em sistemas de fluxo, uma vez que revelaram uma boa seletividade para ambas dinitroanilinas.

CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS

- AL-ANSARI, A. M.; SALEEM, A.; KIMPE, L. E.; SHERRY, J. P.; MCMASTER, M. E.; TRUDEAU, V. L.; BLAIS, J. M. Bioaccumulation of the pharmaceutical 17α -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada. **Environmental Pollution**, 158, 2566-2571, 2010.
- ALKIRE, R. C.; KOLB, D. M.; LIPKOWSKI, J.; ROSS, P. N. Advances in electrochemical sciences and engineering. **Chemically modified electrodes**, v. 11. Wiley-VCH, 2009.
- AMIRIPOUR, F.; AZIZI, S. N.; GHASEMI, S. Gold-copper bimetallic nanoparticles supported on nano P zeolite modified carbon paste electrode as an efficient electrocatalyst and sensitive sensor for determination of hydrazine. **Biosensors and Bioelectronics**, 107, 111-117, 2018.
- AOKI, K.; OSTERYOUNG, J. Theory of differential pulse polarography at expanding or stationary planar electrodes for quasi-reversible or totally irreversible reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 110, 19-36, 1980.
- ARRANZ, A.; DE BETONO, S. F.; MOREDA, J. M.; ARRANZ, J. F. Study of the electro-adsorptive behaviour of the herbicide nitralin by means of voltammetric techniques. **Talanta**, 45, 417-424, 1997.
- BAI, J.; LI, Y.; LI, M.; WANG, S.; ZHANG, C.; YANG, Q. Electrospinning method for the preparation of silver chloride nanoparticles in PVP nanofiber. **Applied Surface Science**, 254, 4520-4523, 2008.
- BAIG, N.; SAJID, M.; SALEH, T. A. Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications. **Trends in Analytical Chemistry**, 111, 47-61, 2019.
- BARANAUSKIENE, L.; MATULIS, D. Herbicide oryzalin inhibits human carbonic anhydrases *in vitro*. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 31, 1-5, 2017.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Kinetics of electrode reactions. *In*: BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. (Eds.). **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2nd ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 87-132, 2001.
- BATRA, B.; PUNDIR, C. S. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 47, 496-501, 2013.
- BILLA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, 30, 651-666, 2007.
- CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an update review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 396, 241-259, 2010.
- CHIANG, J. S.; HUANG, S. D. Simultaneous derivatization and extraction of anilines in wastewater with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric detection. **Talanta**, 75, 70-75, 2008.

COMBARNOUS, Y. Endocrine disruptor compounds (EDCs) and agriculture: the case of pesticides. **Comptes Rendus Biologies**, 340, 406-409, 2017.

CONAMA, RESOLUÇÃO nº 396, de 3 de abril de 2008, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA; “Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências”; publicada no Diário Oficial da União nº 66, em 7 de abril de 2008, Seção 1, páginas 64-68.

DA SILVA, R. L. C. G.; DA SILVA, H. F. O.; GASPAROTTO, L. H. S.; CASELI, L. How the interaction of PVP-stabilized Ag nanoparticles with models of cellular membranes at the air-water interface is modulated by monolayer composition. **Journal of Colloids and Interface Science**, 512, 792-800, 2018.

DE LIMA, C. A.; SANTANA, E. R.; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI A. Silver nanoparticle-modified electrode for the determination of nitro compound-containing pesticides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 408, 2595–2606, 2016.

DEL CASTILLO, M. L. R.; RODRÍGUEZ-VALENCIANO, M.; FLORES, G.; BLANCH, G. P. New method based on solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry to determine pesticides in strawberry jam. **LWT – Food Science and Technology**, 99, 283-290, 2019.

DURST, R. A.; BÄUMER, A. J.; MURRAY, R. W.; BUCK, R. P.; ANDRIEUX, C. P. Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. **Pure and Applied Chemistry**, 69, 1317-1323, 1997.

FERREIRA, A. P. Desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgotos: Complicações ao meio ambiente. **Acta Scientiarum – Technology**, 35, 307-316, 2013.

FRITZ, G.; SCHÄDLER, V.; WILLENBACHER, N.; WAGNER, N. J. Electrosteric stabilization of colloidal dispersions. **Langmuir**, 18, 6381-6390, 2002.

GALLI, A.; DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Pendimethalin determination in natural water, baby food and river sediment samples using electroanalytical methods. **Microchemical Journal**, 98, 135-143, 2011.

GARCIA-TORRES, J.; VALLÉS, E.; GÓMEZ, E. Synthesis and characterization of Co@Ag core-shell nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, 12, 2189-2199, 2010.

GOVINDARAJU, K.; BASHA, S. K.; KUMAR, V. G.; SINGARAVELU, G. Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. **Journal of Materials Science**, 43, 5115-5122, 2008.

GUO, X. F.; LV, J.; ZHANG, W. D.; WANG, Q. J.; HE, P. G.; FANG, Y. Z. Separation and determination of nitroaniline isomers by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Talanta**, 69, 121–125, 2006.

GUPTA, P. K. Toxicity of Herbicides. In: GUPTA, R. C. (Eds). **Veterinary Toxicology**, Oxford, Academic Press, 3th ed., 553-567, 2018.

HAENSCH, C.; HOEPPENER, S.; SCHUBERT, U. S. Chemical modification of self-assembled silane based monolayers by surface reactions. **Chemical Society Reviews**, 39, 2323-2334, 2010.

HALL, L. C.; ROGERS, J. M.; DENISON, M. S.; JOHNSON, M. L. Identification of the herbicide surflan and its active ingredient oryzalin, a dinitrosulfonamide, as xenoestrogens. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 48, 201–208, 2005.

HAMMERICH, O. Reduction of nitro compounds and related substrates. *In*: HAMMERICH, O.; SPEISER, B. (Eds.). **Organic Electrochemistry: Revised and Expanded**, 5th ed., Florida: CRC Press, 1149-1200, 2015.

HANG, J.; SHI, L.; FENG, X.; XIAO, L. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. **Powder Technology**, 192, 166-170, 2009.

HEWAKURUPPU, Y. L.; DOMBROSVSKY, L. A.; CHEN, C.; TIMCHENKO, V.; JIANG, X.; BAEK, S.; TAYLOR, R. A. Plasmonic “pump-probe” method to study semi-transparent nanofluids. **Applied Optics**, 52, 6041-6050, 2013.

JANEGITZ, C.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; SOUZA, S. P. N.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FATIBELLO-FILHO, O. Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 660, 209-216, 2011.

JIA, H.; CHANG, G.; LEI, M.; HE, H.; LIU, X.; SHU, H.; XIA, T.; SU, J.; HE, Y. Platinum nanoparticles decorated dendrite-like gold nanostructure on glassy carbon electrodes for enhancing electrocatalysis performance to glucose oxidation. **Applied Surface Science**, 384, 58-64, 2016.

KARASALI, H.; MARAGOU, N. Pesticides and Herbicides: Types of Pesticide. **Reference Module in Food Science**, from Encyclopaedia of Food and Health, Elsevier, 319-325, 2016.

KONG, F. -Y.; YAO, L.; LI, R. -F.; LI, H. -Y.; WANG, Z. -X.; LV, W. -X.; WANG, W. Synthesis of nitrogen-doped reduced graphene oxide loading with Au-Ag bimetallic nanoparticles for electrochemical detection of daunorubicin. **Journal of Alloys and Compound**, 797, 413-420, 2019.

KOTOUCEK, M.; OPRAVILOVÁ, M. Voltammetric behaviour of some nitropesticides at the mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, 329, 73-81, 1996.

KUMARI, M. M.; JACOB, J.; PHILIP, D. Green synthesis and applications of Au–Ag bimetallic nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A**, 137, 185-192, 2015.

KURBANOGLU, S.; USLU, B.; OZKAN, S. A. Validation of analytical methods for the assessment of hazards in foods. *In*: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. -M. (Eds). **Food Safety and Preservation: Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health**, 1st ed., Oxford: Academic Press, 59-90, 2018.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; ALDA, M. J. L.; NETO, F. R. A.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, 35, 997-1003, 2009.

LAVIRON, E. Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 52, 355-393, 1974.

LIANG, Y.; WEI, L.; YANG, C.; DIAO, X.; HU, J. Dissipation and residue behaviour of oryzalin in grape ecosystem using RRLC-QqQ-MS/MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 99, 199-208, 2019.

MACIEL, J. V.; DURIGON, A. M. M.; SOUZA, M. M.; QUADRADO, R. F. N.; FAJARDO, A. R.; DIAS, D. Polysaccharides derived from natural sources applied to the development of chemically modified electrodes for environmental applications: a review. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, 22, e00062, 2019.

MALLIKARJUNA, K.; REDDY, Y. V. M.; SRAVANI, B.; MADHAVI, G.; KIM, H.; AGARWAL, S.; GUPTA, V. K. Simple synthesis of biogenic Pd-Ag bimetallic nanostructures for an ultra-sensitive electrochemical sensor for sensitive determination of uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 822, 163-170, 2018.

MARKEN, F.; NEUDECK, A.; BOND, A. M. Cyclic voltammetry. *In*: SCHOLZ, F.; BOND, A. M.; COMPTON, R. G.; FIEDLER, D. A.; INZELT, G.; KAHLERT, H.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; LOHSE, H.; LOVRIĆ, M.; MARKEN, F.; NEUDECK, A.; RETTER, U.; STOJEK, Z. (Eds.). **Electroanalytical Methods**, 2nd ed., Berlin: Springer, 57-106, 2010.

MELO, A. M. S.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C. Adsorption studies of trifluralin on chitosan and its voltammetric determination on a modified chitosan glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 19, 704-710, 2008.

MEO, S. A.; AL-ASIRI, S. A.; MAHESAR, A. L.; ANSARI, M. J. Role of honey in modern medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 24, 975-978, 2017.

MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. **Accounts of Chemical Research**, 13, 135-141, 1980.

MURUGAVELU, M.; KARTHIKEYAN, B. Study of Ag-Pd bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for detection of L-cysteine. **Superlattices and Microstructures**, 75, 916-926, 2014.

NAEIM, H.; KHEIRI, F.; SIROUSAZAR, M.; AFGHAN, A. Ionic liquid/reduced graphene oxide/nickel-palladium nanoparticle hybrid synthesized for non-enzymatic electrochemical glucose sensing. **Electrochimica Acta**, 282, 137-146, 2018.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography - single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetics systems. **Analytical Chemistry**, 36, 706-723, 1964.

NYPORKO, A. Y.; YEMETS, A. I.; BRYTSUN, V. N.; LOZINSKY, M. O.; BLUME, Y. B. Structural and Biological Characterization of the Tubulin Interaction with Dinitroanilines. **Cytology and Genetics**, 43, 267-282, 2009.

OZHEREDOV, S. P.; YEMETS, A. I.; BRYTSUN, V. M.; OZHEREDOVA, I. P.; LOZYNSKY, M. O.; BLUME, Y. B. Screening of New 2,4- and 2,6-Dinitroaniline Derivates for Phytotoxicity and Antimitotic Activity. **Cytology and Genetics**, 43, 297-304, 2009.

PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Is the boron-doped diamond electrode a suitable substitute for mercury in pesticide analyses? A comparative study of 4-nitrophenol quantification in pure and natural waters. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 573, 11-18, 2004.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 25, 1012-1021, 2002.

PINTO, P.; ESTÊVÃO, M.; POWER, D. Effects of estrogens and estrogenic disrupting compounds on fish mineralized tissues. **Marine Drugs**, 12, 4474-4494, 2014.

PITA-CALVO, C.; GUERRA-RODRÍGUEZ, M. E.; VÁZQUEZ, M. Analytical methods used in the quality control of honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65, 690-703, 2017.

POHANISH, R. P. *In: Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 7th ed., Oxford: William Andrew, 336-580, 2017.

RADZIUK, D. V.; ZHANG, W.; SHCHUKIN, D.; MÖHWALD, H. Ultrasonic alloying of preformed gold and silver nanoparticles. **Small**, 6, 545-553, 2010.

REDDY, Y. V. M.; SRAVANI, B.; FERNADES, D. M.; MADHURI, C.; SARMA, L. S.; MADHAVI, G. Facile one pot synthesis of bimetallic Pd-Ag/reduced graphene oxide nanocomposite as an electrochemical sensor for sensitive detection of antihypertensive drug. **Colloids and Surfaces A**, 546, 293-300, 2018.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 771-780, 2004.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, 35, 583-592, 2006.

SAJID, M.; BAIG, N.; ALHOOSHANI, K. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine: challenges and opportunities. **Trends in Analytical Chemistry**, 118, 368-385, 2019.

SALEHZADEH, H.; EBRAHIMI, M.; NEMATOLLAHI, D.; SALARIAN, A. A. Electrochemical study of fenitrothion and bifenoxy and their simultaneous determination using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 767, 188-194, 2016.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science and Technology**, 71, 188-201, 2018.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, 30, 489-511, 2012.

SEHLEIER, Y. H.; ABDALI, A.; SCHNURRE, S. M.; WIGGERS, H.; SCHULZ, C. Surface functionalization of microwave plasma-synthesized silica nanoparticles for enhancing the stability of dispersions. **Journal of Nanoparticle Research**, 16, 2557, 2014.

SHARMA, G.; KUMAR, A.; SHARMA, S.; NAUSHAD, M.; DWIVEDI, R. P.; ALOTHMAN, Z. A.; MOLA, G. T. Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. **Journal of King Saud University – Science**, 31, 257-269, 2019.

SHI, Q.; DIAO, G.; MU, S. The electrocatalytic oxidation of glucose on the bimetallic Au-Ag particles-modified reduced graphene oxide electrodes in alkaline solutions. **Electrochimica Acta**, 133, 335-346, 2014.

SHIPWAY, A. N.; KATZ, E.; WILLNER, I. Nanoparticles arrays on surfaces of electronic, optical, and sensor applications. **ChemPhysChem**, 1, 18-52, 2000.

SIDDIQUI, S.; NAFADY, A.; EL-SAGHER, H. M.; AL-SAEEDI, S. I.; ALSALME, A. M.; TALPUR, F. N.; SHERAZI, S. T. H.; KALHORO, M. S.; SHAH, M. R.; SHAIKH, T.; ARAIN, M.; BHARGAVA, S. K. Sub-ppt level voltammetric sensor for Hg²⁺ detection based on nafion stabilized l-cysteine-capped Au@Ag core-shell nanoparticles. **Journal of Solid States Electrochemistry**, 23, 2073-2083, 2019.

SMARZWSKA, S.; JASINSKA, A.; CIESIELSKI, W.; GUZIEJEWSKI, D. First electroanalytical studies of profluralin with square wave voltammetry using glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, 29, 244-248, 2017.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, 20, 191-195, 1997.

SREEDHAR, M.; REDDY, S. J. Electrochemical reduction and differential pulse polarographic determination of butralin and isopropalin in environment samples at a mercury electrode. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 75, 2155-2159, 2002.

SU, B.; SHAO, H.; LI, N.; CHEN, X.; CAI, Z.; CHEN, X. A sensitive bisphenol A voltammetric sensor relying on AuPd nanoparticles/graphene composites modified glassy carbon electrode. **Talanta**, 166, 126-132, 2017.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J. Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 31, 311-345, 2001.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALSHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, 21, 7-28, 2009.

TAYLOR, R.; COULOMBE, S.; OTANICAR, T.; PHELAN, P.; GUNAWAN, A.; LV, W.; ROSENGARTEN, G.; PRASHER, R.; TYAGI, H. Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. **Journal of Applied Physics**, 113, 011301, 2013.

THRIVENI, T.; KUMAR, J. R.; LEE, J. Y.; SREEDAR, N. Y. Study of the voltammetric behaviour of the ethalfluralin and methalpropalin and its determination in environmental matrices at hanging mercury drop electrode. **Environmental Monitoring and Assessment**, 151, 9-18, 2009.

THRIVENI, T.; KUMAR, J. R.; SUJATHA, D.; SREEDAR, N. Y. Voltammetric determination of the herbicides nitratin and oryzalin in agricultural formulations, vegetables and grape juice samples. **Food Chemistry**, 104, 1304-1309, 2007.

THOMAS, K. G.; IPE, B. I.; SUDEEP, P. K. Photochemistry of cromophere-funcionalized gold nanoparticles. **Pure and Applied Chemistry**, 74, 1731-1738, 2002.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual - World Compendium**, 11th ed., British Crop Protection Council, Surrey, England 1997.

TONG, C.; GUO, Y.; LIU, W. Simultaneous determination of five nitroaniline and dinitroaniline isomers in wastewaters by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chemosphere**, 81, 430-435, 2010.

TSIAFOULIS, C. G.; NANOS, C. G. Determination of azinphos-methyl and parathion-methyl in honey by stripping voltammetry. **Electrochimica Acta**, 56, 566-574, 2010.

VASANTHI, S.; DEVENDIRAN, M.; NARAYANAN, S. S. A mercury free electrode for anodic stripping voltammetric determination of Pb (II) ions using poly zincon film modified electrode. **Applied Surface Science**, 422, 138-146, 2017.

VENKITASAMY, C.; ZHAO, L.; ZHANG, R.; PAN, Z. Grapes. *In*: PAN, Z.; ZHANG, R.; ZICARI, S. (Eds.). **Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products**, 1st ed., Oxford: Academic Press, 133-163, 2019.

WANG, L.; CLAVERO, C.; HUBA, Z.; CARROLL, K. J.; CARPENTER, E. E.; GU, D.; LUKASZEW, R. A. Plasmonics and Enhanced Magneto-Optics in Core-Shell Co-Ag Nanoparticles. **Nano Letters**, 11, 1237-1240, 2011.

WANG, Z.; LI, J.; XU, L.; FENG, Y.; LU, X. Electrochemical sensor for determination of aflatoxin B₁ based on multiwalled carbon nanotubes-supported Au/Pt bimetallic nanoparticles. **Journal of Solid States Electrochemistry**, 18, 2487-2496, 2014.

WEN, X.; FEI, J.; CHEN, X.; YI, L.; GE, F.; HUANG, M. Electrochemical analysis of trifluralin using a nanostructuring electrode with multi-walled carbon nanotubes. **Environmental Pollution**, 156, 1015-1020, 2008.

WESTLUND, P.; YARGEAU, V. Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. **Science of the Total Environment**, 607, 744-751, 2017.

YAZDI, A. S.; MOFAZZELI, F.; ES'HAGHI, Z. Determination of 3-nitroaniline in water samples by directly suspended droplet three-phase liquid-phase microextraction using 18-crown-6 ether and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1216, 5086-5091, 2009.

YIN, T.; QIN, W. Applications of nanomaterials in potentiometric sensors. **Trends in Analytical Chemistry**, 51, 79-86, 2013.

YOKOYAMA, T.; MASUDA, H.; SUZUKI, M.; EHARA, K.; NOGI, K.; FUJI, M.; FUKUI, T.; SUZUKI, H.; TATAMI, J. Basic properties and measuring methods of nanoparticles. *In*: HOSOKAWA, M.; NAITO, M.; NOGI, K.; YOKOYAMA, T. (Eds). **Nanoparticle Technology Handbook**, Amsterdam: Elsevier, 1st ed., 3-48, 2008.

YONEZAWA, T. Well-dispersed Bimetallic Nanoparticles. *In*: WASEDA, Y.; MURAMATSU, A. (Eds). **Morphology Control of Materials and Nanoparticles**, Berlin: Springer, Volume 64, 85-112, 2004.

YU, A. M.; ZHANG, X.; ZHANG, H. L.; HAN, D. Y.; KNIGHT, A. R. Preparation and electrochemical properties of gold nanoparticles containing carbon nanotubes-polyelectrolyte multilayer thin films. **Electrochimica Acta**, 56, 9015-9019, 2011.

YU, H.; MA, Z.; WU, Z. Immobilization of Ni-Pd/core-shell nanoparticles through thermal polymerization of acrylamide on glassy carbon electrode for highly stable and sensitive glutamate detection. **Analytica Chimica Acta**, 896, 137-142, 2015.

ZAHMAKIRAN, M.; ÖZKAR, S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. **Nanoscale**, 3, 3462-3481, 2011.

ZIMDAHL, R. L. Properties and uses of herbicides. *In*: ZIMDAHL, R. L. (Eds). **Fundamentals of Weed Science**, Amsterdam: Elsevier, 5th ed., 463-499, 2019.

ZHANG, B.; YAN, N. Towards rational design of nanoparticle catalysis in ionic liquids. **Catalysts**, 3, 543-562, 2013.

ZUMAN, P.; FIJALEK, Z.; DUMANOVIC, D.; SUZNJEVIC, D. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, part I: general mechanistic aspects. **Electroanalysis**, 4, 783-794, 1992.