



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

Antonio Gomes dos Santos Neto

**Estudos Teóricos e Experimentais Aplicados à Detecção Eletroquímica de Baicaleína
em Eletrodos de Ouro e de Carbono**

Florianópolis – SC
2026

Antonio Gomes dos Santos Neto

**Estudos Teóricos e Experimentais Aplicados à Detecção Eletroquímica de Baicaleína
em Eletrodos de Ouro e de Carbono**

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Doutor em
Química

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Cristiane Luisa Jost

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Florianópolis – SC

2026

Gomes dos Santos Neto, Antonio
Estudos Teóricos e Experimentais Aplicados à Detecção
Eletroquímica de Baicaleína em Eletrodos de Ouro e de
Carbono / Antonio Gomes dos Santos Neto ; orientadora,
Dra. Cristiane Luisa Jost , coorientador, Dr. Alexandre
Luis Parize, 2026.
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Química. 2. baicaleína. 3. GE. 4. GCE. 5. DFT. I.
Luisa Jost , Dra. Cristiane. II. Luis Parize, Dr.
Alexandre. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

ANTONIO GOMES DOS SANTOS NETO

Estudos Teóricos e Experimentais Aplicados à Detecção Eletroquímica de Baicaleína em Eletrodos de Ouro e de Carbono

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 18 de dezembro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Andressa Galli
Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

Profa. Dra. Larissa Magalhães de Almeida Melo
Universidade Federal de Goiás (UFG)

Prof. Dr. Diogo Cherem Morelli
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título Doutor em Química pelo Programa de Pós-Graduação.



Documento assinado digitalmente

Adriana Passarella Gerola

Data: 10/03/2026 17:31:48-0300

CPF: ***.536.269-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Adriana Passarella Gerola
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química



Documento assinado digitalmente

Cristiane Luisa Jost

Data: 09/03/2026 17:50:01-0300

CPF: ***.093.820-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. Cristiane Luisa Jost
Orientadora

Florianópolis, 2026

*Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros
de gigantes - Isaac Newton*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por segurar minha mão em todos os momentos, por me conduzir e cuidar de mim em cada passo desta caminhada. Tudo o que sou e conquistei até aqui é fruto da Tua graça, misericórdia e da força que eu recebo todos os dias.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Cristiane Jost, pela confiança, orientação e incentivo ao longo do doutorado. Agradeço por todo o aprendizado, pelas trocas enriquecedoras e pela liberdade que me permitiu crescer como pesquisador, percebo hoje que sou mais capaz do que eu pensava ser! Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Luis Parize, por seu comprometimento e pelas contribuições valiosas ao desenvolvimento de trabalhos no doutorado. Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Suller, com quem construí uma amizade desde o mestrado, pelas colaborações e pelos diálogos científicos que muito contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. Aos Prof. Dr. Glaucio Nagurniak e Prof. Dr. Maurício Piotrowski, pelas investigações teóricas e pelas contribuições significativas ao avanço da tese.

À minha amiga inseparável desde 2014, Camila. Iniciamos juntos a graduação, a iniciação científica, moramos juntos, crescemos juntos. Mais que uma amiga, é uma irmã que a vida me deu. Gratidão por estar sempre ao meu lado em todas as fases. Ao meu amigo de longa data, José Antonio, com quem compartilho não só colaborações científicas, mas também uma amizade construída desde os tempos de mestrado.

Aos colegas do Laboratório ampere (UFSC) – Laboratório de Plataformas Eletroquímicas –, agradeço pela convivência, apoio e colaboração ao longo dessa etapa, em especial Fran e Kelline pelo suporte na tese e parcerias. Aos alunos que tive a honra de coorientar – Fabi, Luiz, Jean e Jhonathan–. Com vocês, aprendi algo essencial: ensinar é também um caminho de aprendizado contínuo.

À minha avó Esmarina, que me criou com tanto carinho, amor e dedicação, junto à minha mãe. À minha mãe, Maria das Dores, meu amor incondicional. Você é minha fonte de força e garra, te amo. Ao meu irmão, Kauan Máximus, minha razão de viver, “te amo mil milhões”, ao meu pai Ronald também agradeço, sempre confiou em mim e me deu forças. Aos meus avós Manoel e Augusta, pela base familiar que me proporcionaram e pelo carinho constante em minha vida. À minha tia/madrinha Izabel que desde sempre me motivou e contribuiu para eu estar onde estou, meu carinho é mais que especial pela senhora.

Ao Erick e Zenaide Putzel, que protagonizaram, junto de sua família, a minha família durante esse tempo. Sou extremamente grato por Deus colocar vocês no meu caminho. Os amo verdadeiramente.

Ao programa de pós graduação em química da Universidade federal de Santa Catarina, bem como todos os professores e servidores que não medem esforços para manter o programa com excelência. Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento dos trabalhos durante o doutorado.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para minha formação pessoal e profissional, obrigado!

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e a integração de métodos eletroanalíticos combinados a estudos teóricos para a detecção sensível de baicalina (BAI), um flavonoide bioativo amplamente estudado devido às suas potenciais propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. A determinação analítica de BAI em matrizes biológicas apresenta desafios relacionados à sua baixa concentração e à complexidade das amostras, tornando essencial o desenvolvimento de métodos sensíveis, seletivos, mas também simples e sustentáveis. Neste contexto, avaliou-se comparativamente o desempenho eletroanalítico de diferentes eletrodos: o eletrodo de carbono vítreo (GCE), o eletrodo de ouro (GE) e o eletrodo de ouro ativado eletroquimicamente com estrutura nanoporosa (NPGE). Destaca-se que os métodos propostos são eco-amigáveis, pois emprega eletrodos não modificados quimicamente, ou apenas submetidos à ativação eletroquímica, evitando assim etapas adicionais de modificação com reagentes potencialmente tóxicos. Inicialmente, o comportamento eletroquímico de BAI foi investigado experimentalmente por voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso difeencial (DPV). Os limites de detecção obtidos foram de 31,5 nmol L⁻¹ para o GCE e 68,1 nmol L⁻¹ para o GE, utilizando estratégias de curva de calibração externa e adição padrão, respectivamente, para superar efeitos como a saturação superficial. A comparação entre os eletrodos demonstrou que, embora ambos sejam adequados para a detecção de BAI, características intrínsecas das superfícies influenciam significativamente a sensibilidade e a reprodutibilidade. De forma complementar, foi realizada uma investigação teórica aprofundada, com base em cálculos de teoria do funcional da densidade (DFT), visando elucidar os processos de adsorção e interação do BAI com os diferentes substratos. Os resultados indicaram que, na fisissorção, a molécula tende a se adsorver paralelamente às superfícies de carbono e ouro, restringindo a área útil de interação eletroativa. Além disso, a presença de defeitos na superfície do GCE favorece uma quimissorção mais forte, podendo levar à dissociação de BAI e ao envenenamento da superfície. Na sequência, visando aprimorar a sensibilidade e seletividade do método, foi implementada a ativação eletroquímica do eletrodo de ouro, promovendo a formação de uma estrutura nanoporosa (NPGE) via anodização controlada, um processo simples e compatível com os princípios da química verde. A investigação teórica demonstrou que, nesse tipo de superfície, a BAI apresenta maior energia de adsorção, com a molécula penetrando nos poros e estabelecendo interações mais fortes. Experimentalmente, após a otimização das condições de pré-concentração (E deposição = -0,25 V; t deposição = 50 s), a voltametria de redissolução adsortiva (AdSV) possibilitou alcançar limites de detecção e quantificação de 15,0 nmol L⁻¹ e 45,0 nmol L⁻¹, respectivamente. O método apresentou excelente precisão, estabilidade e seletividade, com taxas de recuperação satisfatórias, variando de 93,4% a 106% em amostras de plasma humano e urina sintéticos, além de resistência a interferências comuns em matrizes complexas. A integração entre as investigações experimental e teórica permitiu compreender, em nível atomístico, os mecanismos de adsorção e os fatores que influenciam a eficiência analítica dos diferentes eletrodos avaliados. Os resultados evidenciam o potencial da ativação eletroquímica como uma estratégia eficaz e econômica para ampliação da sensibilidade em sensores eletroquímicos, além de destacar a importância da modelagem computacional para o planejamento e interpretação de métodos analíticos. Assim, este estudo fornece contribuições relevantes para o avanço das técnicas de detecção eletroquímica de flavonoides, como a BAI, com aplicações promissoras nas áreas biomédica, farmacêutica, e de monitoramento clínico.

Palavras-chave: baicaleína; eletrodo de carbono vítreo; ativação eletroquímica; nanoporos de ouro; teoria do funcional da densidade.

ABSTRACT

This work describes the development and integration of electroanalytical methods combined with advanced theoretical studies for the sensitive detection of baicalin (BAI), a bioactive flavonoid widely investigated due to its potential antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor properties. The analytical determination of BAI in biological matrices poses challenges related to its low concentration and the complexity of samples, making the development of sensitive, selective, yet simple and sustainable methods essential. In this context, the electroanalytical performance of different electrodes was comparatively evaluated: glassy carbon electrode (GCE), gold electrode (GE), and electrochemically activated nanoporous gold electrode (NPGE). The proposed methods are eco-friendly, as they employ unmodified electrodes or electrodes only subjected to electrochemical activation, thereby avoiding additional modification steps with potentially toxic reagents. Initially, the electrochemical behavior of BAI was experimentally investigated using cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. Detection limits of 31.5 nmol L^{-1} for GCE and 68.1 nmol L^{-1} for GE were obtained, using external calibration and standard addition strategies, respectively, to overcome effects such as surface saturation. Comparison between electrodes demonstrated that, although both are suitable for BAI detection, intrinsic surface characteristics significantly influence sensitivity and reproducibility. Complementarily, an in-depth theoretical investigation was conducted based on density functional theory (DFT) calculations to elucidate adsorption processes and interactions of BAI with different substrates. Results indicated that, under physisorption, the molecule tends to adsorb parallel to carbon and gold surfaces, restricting the effective electroactive area. Moreover, the presence of surface defects on GCE favors stronger chemisorption, potentially leading to BAI dissociation and surface poisoning. Subsequently, to enhance sensitivity and selectivity, electrochemical activation of the gold electrode was implemented, promoting the formation of a nanoporous structure (NPGE) via controlled anodization, a simple process aligned with green chemistry principles. Theoretical insights demonstrated that, on this type of surface, BAI exhibits higher adsorption energy, with the molecule penetrating into pores and establishing stronger interactions. Experimentally, after optimizing preconcentration conditions ($E_{\text{deposition}} = -0.25 \text{ V}$; $t_{\text{deposition}} = 50 \text{ s}$), adsorptive stripping voltammetry (AdSV) enabled detection and quantification limits of 15.0 nmol L^{-1} and 45.0 nmol L^{-1} , respectively. The method exhibited excellent precision, stability, and selectivity, with satisfactory recovery rates ranging from 93.4% to 106% in synthetic human plasma and urine samples, as well as resistance to common interferences in complex matrices. The integration of experimental and theoretical investigations provided atomistic-level understanding of adsorption mechanisms and factors influencing the analytical efficiency of the evaluated electrodes. The results highlight the potential of electrochemical activation as an effective and economical strategy for enhancing sensitivity in electrochemical sensors, and underscore the importance of computational modeling for the design and interpretation of analytical methods. Thus, this study provides relevant contributions to advancing electrochemical detection techniques of flavonoids, such as BAI, with promising applications in biomedical, pharmaceutical, and clinical monitoring fields.

Keywords: baicalein; glassy carbon electrode; electrochemical activation; nanoporous gold; Density Functional Theory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avanços na detecção eletroquímica: A) Materiais nanoestruturados. B) Eletrodos funcionalizados com biomoléculas. C) Eletrodos impressos e flexíveis e D) Integração com sistemas eletrônico.....	22
Figura 2 - Esquema de célula eletroquímica de três eletrodos conectada a potenciostato para análises voltamétricas e Esquema de uma célula eletroquímica trifásica utilizada em medições voltamétricas B) diagrama elétrico correspondente e exemplo de resposta voltamétrica (corrente I vs potencial E).....	23
Figura 3 - Eletrodos de trabalho: classificação por composição química.	25
Figura 4 - Faixa de potencial eletroquimicamente estável do carbono vítreo em soluções de H_2SO_4 , NaAc e NaOH, determinada por voltametria cíclica.	29
Figura 5 - Voltamogramas cíclicos do Au a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ em solução de (a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	31
Figura 6 - Representação esquemática das funções de potencial aplicadas e respostas em corrente obtidas para as técnicas voltamétricas LSV, CV, DPV e SWV.	34
Figura 7 - Esqueleto básico e sistema de numeração dos flavonoides.	36
Figura 8 - Esqueleto estrutural da baicaleína.	37
Figura 9 - Representação esquemática da molécula de BAI interagindo com diferentes substratos (PRG, ODG, MVG e Au(111)).	52
Figura 10 - Comparação estrutural e energética entre superfícies de carbono e ouro: vistas laterais de grafeno/grafite, energias de ligação (E_b) e energias de adsorção (E_{ad}) da BAI em grafeno, grafite (2 e 4 camadas) e Au(111).	53
Figura 11 - Construção dos modelos de ouro nanoporoso: fluxograma metodológico, testes para determinar número de camadas, exemplo de processo SA e representações dos substratos finais (A1S, SNP, MNP e LNP).	54
Figura 12 - Esquema da adsorção da BAI em diferentes substratos de ouro (A1S, SNP, MNP e LNP).	55
Figura 13 - CV para $12,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI utilizando A) GCE (linha vermelha) e B) GE (linha azul). A linha preta refere-se ao eletrólito suporte. Condições experimentais: eletrólito suporte BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0). Taxa de varredura: 50 mV s^{-1}	57

Figura 14 - Visões superior e lateral de A) BAI e sua função de localização eletrônica (ELF) com isossuperfície (iso) igual a 0,65, B) PRG e sua ELF (iso = 0,50), C) ODG e sua ELF (iso = 0,50), D) MVG e sua ELF (iso = 0,50) e E) A1S e sua ELF (iso = 0,15). Também é mostrada a energia de ligação (E_b) para cada sistema. Os átomos de H, C, O e Au são representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja claro, respectivamente, enquanto a isossuperfície da ELF é representada pela cor verde. 59

Figura 15 - Visões superior e lateral de algumas das conformações mais representativas: as configurações de menor energia e suas variações para A) BAI/PGR, C) BAI/ODG, E) BAI/MVG e G) BAI/A1S; e as configurações de maior energia B) BAI/PGR, D) BAI/ODG, F) BAI/MVG e H) BAI/A1S. Também são mostradas a energia total relativa (ΔE_{tot}) em relação à conformação de menor energia (0,000 eV) para cada conjunto e a Ead para cada configuração. Os átomos de H, C, O e Au são representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja claro, respectivamente. 60

Figura 16 - A) DPV do GCE na presença de BAI em diferentes valores de pH de 2,0 a 8,0; B) intensidade de corrente de pico e potencial de pico em função do valor de pH para o GCE; C) DPV do GE na presença de BAI em diferentes valores de pH de 2,0 a 8,0; D) intensidade de corrente de pico e potencial de pico em função do valor de pH para o GE; E) DPV utilizando tampões PB, BR e McIlvaine no GCE; F) DPV utilizando tampões PB, BR e McIlvaine no GE.....64

Figura 17 - A) CV do GCE em diferentes velocidades de varredura na presença de BAI. Inseto: relação linear entre I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura; B) relação linear entre $\log I$ e $\log V$ obtida para o GCE; C) CV do GE em diferentes velocidades de varredura na presença de BAI. Inseto: relação linear entre I_{pa} e a velocidade de varredura; D) relação linear entre $\log I$ e $\log V$ obtida para o GE.....67

Figura 18 - Relação linear entre E_p e $\log v$ obtida para o GE na presença de BAI. 69

Figura 19 - A) DPV para diferentes concentrações de BAI utilizando o GCE. B) Gráficos de calibração comparativos obtidos para o GCE usando o método de adição padrão e calibração externa. C) DPV para diferentes concentrações de BAI utilizando o GE. A linha preta refere-se ao eletrólito de suporte. D) Gráfico de calibração correspondente usando o GE e o método de adição padrão. Voltamogramas DP submetidos à correção de linha de base. 71

Figura 20 - Estudos de interferentes por DPV em $2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI no GE antes e após a adição de interferentes (1:5) A) Naringenina; B) Quercetina; C) Rutina; D) Ácido cítrico; E)

Ácido ascórbico; F) Zinco; G) Cobalto; H) Dopamina; I) Ácido úrico; e J) Ureia. PB 0,075 mol L ⁻¹ (pH 6,0) sob condições otimizadas.	75
Figura 21 - Estudos de interferentes por DPV em 2,2 µmol L ⁻¹ de BAI no GCE antes e após a adição de interferentes (1:5) A) Naringenina; B) Quercetina; C) Rutina; D) Ácido cítrico; E) Ácido ascórbico; F) Zinco; G) Cobalto; H) Dopamina; I) Ácido úrico; e J) Ureia. Tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 3,0) sob condições otimizadas.....	77
Figura 22 - Imagens de SEM de eletrodos de ouro anodizados a 2 V por diferentes tempos. As imagens de baixa ampliação estão à esquerda e as de alta ampliação à direita, correspondendo aos tempos de anodização de (A, B) 5 s, (C, D) 10 s, (E, F) 20 s, (G, H) 40 s e (I, J) 60 s.	83
Figura 23 - Imagens de AFM 3D do GE at A) 5, B) 10, C) 20, D) 40, and E) 60 s.....	85
Figura 24 - Espectros de XPS de alta resolução do eletrodo submetido a ativação de A) 0, B) 5, C) 10, D) 20, E) 40 e F) 60 s.	86
Figura 25 - A) CV do GE imerso em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , realizada a uma taxa de varredura de 0,01 V s ⁻¹ para tempos de ativação de 0 a 60 s; B) comparação entre GE não ativado e NPGE ativado por 10 s na presença de 20 µmol L ⁻¹ de BAI em tampão BR pH 7,0.	88
Figura 26 - A) Diagramas de Nyquist obtidos em solução contendo 0,5 mol L ⁻¹ de KCl e 5 mmol L ⁻¹ de Fe(CN) ₆ ³⁻ para GE e NPGE. B) Voltammogramas de pulso diferencial (DPV) variando o tempo de ativação de 0 a 60 s e C) a correspondente resposta de corrente de pico.	89
Figura 27 - Vistas lateral e superior de A) da molécula de BAI e dos substratos de ouro (A1S, SNP, MNP e LNP), e B) das respectivas superfícies de função de localização eletrônica (ELF): 0,65 para BAI e 0,15 para os substratos de ouro. Os átomos de H, C, O e Au estão representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja lavado, respectivamente, enquanto as superfícies ELF são mostradas em verde.	90
Figura 28 - Vistas lateral e superior de A) das configurações de menor energia para BAI/A1S, BAI/SNP, BAI/MNP e BAI/LNP; B) das respectivas superfícies da função de localização eletrônica (ELF) com isosuperfície de 0,25; e C) dos mapas de diferença de densidade de carga (isosuperfície = 0,0015). Os átomos de H, C, O e Au estão representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja, respectivamente. As superfícies ELF são mostradas em verde, enquanto as superfícies de diferença de densidade de carga aparecem em ciano e amarelo, indicando regiões de depleção e acúmulo de carga, respectivamente.	91

Figura 29 - n A) perfis de DPV para $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI em diferentes valores de pH e B) variação da corrente de pico anódico e do potencial de pico da BAI em resposta a alterações de pH de 2,0 a 8,0.	94
Figura 30 - A) CV conduzida em velocidades de varredura variando de 10 a 100 mV s^{-1} ; B) Relação entre corrente de pico (I_{pa}) e velocidade de varredura (v); C) Correlação entre corrente de pico (I_{pa}) e raiz quadrada da velocidade de varredura; D) Relação logarítmica entre corrente de pico (I_{pa}) e velocidade de varredura; E) Mecanismo sugerido para o processo de oxidação eletroquímica.	95
Figura 31 - Seleção do eletrólito de suporte para uma resposta de $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI: A) Análise por DPV utilizando os eletrólitos Britton-Robinson, McIlvaine, PBS e Citrato na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; B) Respostas de corrente comparativas entre os diferentes eletrólitos; C) Ajustes na concentração do eletrólito de suporte BR variando de 0,05 a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; D) Respostas de corrente correspondentes às diferentes concentrações do eletrólito de suporte BR.	96
Figura 32 - Otimização dos parâmetros experimentais: A) técnicas voltamétricas; B) corrente de pico obtida em cada técnica voltamétrica; C) taxa de varredura; D) t_{pulse} ; E) E_{pulse} ; F) $E_{(\text{deposition})}$; e G) $t_{(\text{deposition})}$ na presença de $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI.	98
Figura 33 - A) DPAdSV para BAI em uma concentração variando de $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $10,00 \mu\text{mol L}^{-1}$. B) A correspondente curva de calibração.	100
Figura 34 - A) Resposta DPAdSV para BAI no NPGE utilizando cinco eletrodos modificados diferentes; B) Resposta DPAdSV para BAI com cinco medições diferentes no mesmo eletrodo. Estudo de interferentes na proporção 1:5: C) Ácido Ascórbico; D) Ácido Cítrico; E) Cobalto; F) Dopamina; G) Naringenina; H) Glicose; I) Melatonina; J) Ureia; K) Ácido Úrico; L) Zinco.	102
Figura 35 - Recuperação de BAI fortificado por DPAdSV na presença de A) $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ em plasma sintético; B) I_{pa} versus concentração de BAI em plasma sintético; C) $0,55 \mu\text{mol L}^{-1}$ em plasma sintético; D) I_{pa} versus concentração de BAI em plasma sintético; E) $2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ em plasma sintético; F) I_{pa} versus concentração de BAI em plasma sintético; G) $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ em urina sintética; H) I_{pa} versus concentração de BAI em urina sintética; I) $0,55 \mu\text{mol L}^{-1}$ em urina sintética; J) I_{pa} versus concentração de BAI em urina sintética; K) $2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ em urina sintética; L) I_{pa} versus concentração de BAI em urina sintética.	105
Figura 36 - Aplicação do método AGREE para avaliação da verdeza (sustentabilidade ambiental).	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de reagentes utilizados, com as respectivas fórmulas químicas e fornecedores.	44
Tabela 2 - Propriedades de adsorção para as conformações de menor energia BAI/PRG, BAI/ODG, BAI/MVG e BAI/A1S: energia de adsorção (E_{ad}), energia de interação (E_{int}), energias de distorção ($E_{distBAI}$ e $E_{distsub}$), menores distâncias de ligação entre BAI e os substratos ($d_{min}(BAI-sub)$), desvio relativo para as distâncias médias de ligação (Δd_{av}^{BAI} e Δd_{av}^{sub}), cargas efetivas de Bader (q_{BAI} e q_{sub}) e momentos magnéticos totais (m_T)......	62
Tabela 3 - Desempenho analítico de diferentes métodos eletroanalíticos para a detecção de BAI.	73
Tabela 4 - Resposta comparativa a interferentes ($n = 3$) testada na presença de concentrações cinco vezes maiores de diferentes espécies potencialmente interferentes.....	79
Tabela 5 - Recuperação de BAI ($n = 3$) em amostras simuladas de soro e plasma obtida por voltametria e método comparativo.	80
Tabela 6 - Distribuição das espécies de ouro (%) de acordo com o tempo de ativação.	87
Tabela 7 - Propriedades relacionadas à adsorção para as conformações de menor energia BAI/A1S, BAI/SNP, BAI/MNP e BAI/LNP: energia de adsorção (E_{ad}), energia de interação (E_{int}), energias de distorção da molécula e do substrato ($E_{distBAI}$ and $E_{distsub}$), desvio relativo dos comprimentos médios de ligação (Δd_{avBAI} and Δd_{avsub}), cargas efetivas de Bader (q_{BAI} and q_{sub}), e momento magnético total (m_T).A decomposição da energia de adsorção mostra comportamentos distintos: em A1S e SNP, a energia de interação é maior que a E_{ad} , enquanto as distorções molecular e do substrato contribuem de forma negativa ou mínima. Já para MNP e LNP, a maior parte da energia de adsorção provém da interação, e as distorções moleculares e do substrato apresentam contribuição aditiva. Esses resultados indicam que superfícies nanoporo possuem maior reatividade e potencial para interações mais fortes com BAI.	92
Tabela 8 - Estudo de otimização para a detecção de BAI utilizando o NPGE.....	99
Tabela 9 - Resposta comparativa a interferentes ($n=3$) testada na presença de uma concentração 5 vezes maior de diferentes espécies potencialmente interferentes.....	104
Tabela 10 - dados do estudo de recuperação para a determinação de BAI ($n = 3$) em amostras sintéticas.	107

Tabela 11 - Desempenho analítico de diferentes métodos eletroanalíticos para a detecção de BAI.	109
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIMD - Dinâmica Molecular *Ab Initio* (do inglês *Ab Initio Molecular Dynamics*)
- Ag/AgCl - Eletrodo de Prata/Cloreto de Prata
- BDDE - Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (do inglês *Boron-Doped Diamond Electrode*)
- BR - Tampão Britton-Robinson
- CE - Contra-eletrodo (do inglês *Counter Electrode*)
- CV - Voltametria Cíclica (do inglês *Cyclic Voltammetry*)
- DFT - Teoria do Funcional da Densidade (do inglês *Density Functional Theory*)
- DPA_{SV} - Voltametria de Pulso Diferencial Adsorptiva (do inglês *Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry*)
- DPV - Voltametria de Pulso Diferencial (do inglês *Differential Pulse Voltammetry*)
- E_{ad} - Energia de Adsorção
- E_b - Energia de Ligação
- E_{dist} - Energia de Distorção
- E_{int} - Energia de Interação
- ELF - Função de Localização de Elétrons (do inglês *Electron Localization Function*)
- E_{vac} - Energia para Formar a Monovacância
- GCE - Eletrodo de Carbono Vítreo (do inglês *Glassy Carbon Electrode*)
- GE – Eletrodo de Ouro (do inglês *Gold Electrode*)
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*)
- LOD - Limite de Detecção (do inglês *Limit of Detection*)
- LOQ - Limite de Quantificação (do inglês *Limit of Quantification*)
- LSV - Voltametria de Varredura Linear (do inglês *Linear Sweep Voltammetry*)
- mT - Momento Magnético Total
- NPGE - Eletrodos de Ouro Nanoporoso (do inglês *Nanoporous gold electrode*)
- PG - Grafeno Puro (do inglês *Pure Graphene*)
- RE - Eletrodo de Referência (do inglês *Reference Electrode*)
- SWV - Voltametria de Onda Quadrada (do inglês *Square Wave Voltammetry*)
- VASP - Pacote de Simulação Ab Initio de Viena (do inglês *Vienna Ab Initio Simulation Package*)
- vdW - van der Waals

VG - Grafeno com Defeito de Vacância (do inglês *Vacancy-Defected Graphene*)

WE - Eletrodo de Trabalho (do inglês *Working Electrode*)

ΔE_{tot} - Energia Total Relativa

3.9.2 Plasma e urina sintética	50
3.10 Métodos Computacionais.....	51
3.10.1. Modelagem de GCE e GE não modificados	51
3.10.2. Modelagem de Eletrodos de Ouro Nanoporoso (NPGE)	53
4. CAPÍTULO 4 – Estudos eletroquímicos, teóricos e analíticos da baicaleína em eletrodos de carbono vítreo e ouro	56
4.1.Comportamento eletroquímico comparativo da baicaleína em eletrodos de carbono vítreo e ouro	56
4.2.Avaliação teórica de eletrodos à base de ouro e carbono.....	57
4.2.1 Analito e substratos	58
4.2.2 Interação analito-substrato: energia total relativa.....	59
4.2.3 Interação analito-substrato: propriedades de adsorção.....	61
4.3 Visão Experimental	63
4.3.1 Influência do sistema eletrolítico de suporte ao solvente.....	63
4.3.2 Influência da velocidade de varredura e dos processos eletroquímicos.....	66
4.3.3 Desenvolvimento do método eletroanalítico	70
4.3.4 Comparação com métodos eletroanalíticos	72
4.3.5 Repetibilidade e seletividade.....	74
4.3.6 Eletroanálise de amostras simuladas e comparação com método de referência .	79
5. CAPÍTULO 5 –Integração de estudos teóricos e experimentais em eletroquímica de ouro nanoporoso para melhoria do desempenho na detecção de baicaleína.....	81
5.1.Etapas de caracterização do processo de nanoestruturação	81
5.2.Caracterização eletroquímica da superfície e comportamento eletroquímico da BAI	87
5.3 Resultados teóricos para BAI e eletrodos à base de ouro	89
5.3.1 Caracterização da molécula de BAI e dos substratos de ouro.....	89
5.3.2 Interação BAI-substrato.....	91
5.4 Influência do valor de pH e da velocidade de varredura no comportamento eletroquímico da BAI	93
5.5 Influência do eletrólito suporte	96
5.6 Desenvolvimento do método eletroanalítico.....	97
5.7 Seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade.....	101
5.8 Determinação de BAI em amostras sintéticas.....	104
5.9 Métricas analíticas e comparação com a literatura.....	107
6. CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS	112

APRESENTAÇÃO

Nas últimas décadas, o interesse científico por compostos bioativos de origem natural tem crescido de forma significativa. Entre esses compostos, os flavonoides merecem destaque devido às diversas propriedades atribuídas a eles, como atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral[1]. Dentro desse grupo, a baicaleína (BAI) tem despertado atenção especial em função de seu potencial para aplicações nas áreas biomédica e farmacêutica[2]. Apesar disso, a determinação confiável desse flavonoide em matrizes biológicas ainda impõe desafios consideráveis, sobretudo quando se busca um procedimento que seja, ao mesmo tempo, sensível, seletivo e ambientalmente sustentável.

Diante desse cenário, esta tese apresenta uma contribuição ao desenvolvimento de estratégias eletroanalíticas voltadas à detecção de BAI, explorando diferentes superfícies de eletrodos: o de carbono vítreo (GCE), o de ouro (GE) e, como proposta inovadora, o de ouro ativado eletroquimicamente com estrutura nanoporosa (NPGE). O enfoque principal é a adoção de métodos sustentáveis, baseados em eletrodos não modificados ou submetidos apenas à ativação eletroquímica, evitando modificações químicas complexas e o uso de reagentes tóxicos. Complementarmente, a pesquisa integrou experimentos eletroquímicos e cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT), possibilitando compreender, em nível molecular, os mecanismos de adsorção e interação do analito com as diferentes superfícies.

A tese está organizada em cinco capítulos: o Capítulo 1 reúne a revisão de literatura sobre flavonoides, BAI, métodos analíticos de detecção e abordagens teóricas aplicadas ao estudo de sistemas moleculares; o Capítulo 2 apresenta os objetivos da pesquisa; o Capítulo 3 descreve a metodologia referentes aos procedimentos experimentais e computacionais utilizados nos capítulos 4 e 5; o Capítulo 4 concentra-se no estudo comparativo do comportamento eletroquímico e teórico da BAI nos eletrodos de carbono vítreo e ouro; e o Capítulo 5 é dedicado ao desenvolvimento e avaliação de um método inovador baseado no eletrodo de ouro nanoporoso (NPGE), integrando teoria e prática para a construção de um sensor mais sensível, seletivo e aplicável a matrizes clínicas. Por fim, são discutidas as conclusões gerais e as perspectivas futuras, ressaltando as contribuições desta pesquisa para o avanço do uso de sensores eletroquímicos na determinação de compostos bioativos de interesse biomédico.

1. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Avanços em Sensores Eletroquímicos para Compostos Bioativos

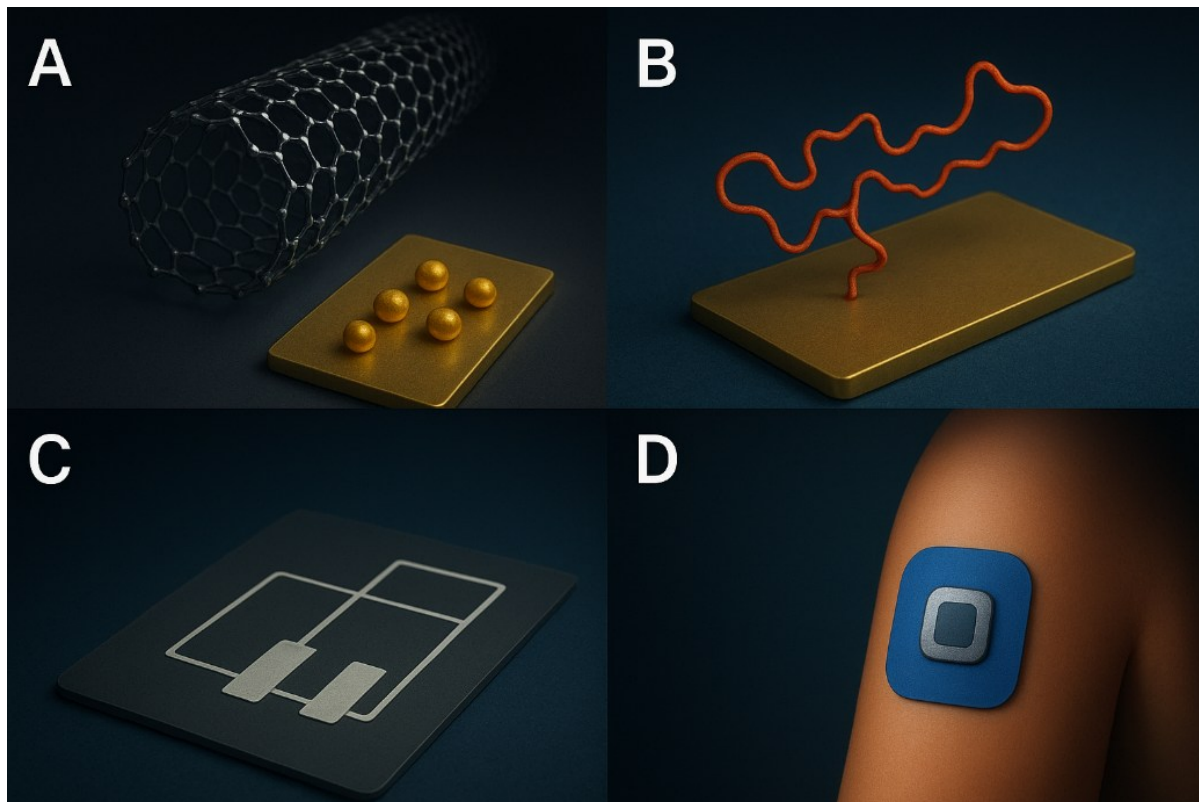
A detecção eletroquímica compreende técnicas que exploram a conversão de fenômenos químicos em sinais elétricos mensuráveis, permitindo a identificação e quantificação de compostos em diferentes matrizes[3][4]. Esse tipo de abordagem tem se destacado em áreas como química analítica, bioquímica e farmacologia, devido à sua sensibilidade e rapidez de processamento com possibilidade de monitoramento em tempo real de reações redox[5][6][7][8]. Nesse contexto, os sensores eletroquímicos vêm se consolidando como ferramentas promissoras para a determinação de compostos bioativos (figura 1), com destaque para flavonoides.

Nos últimos anos, diversos avanços contribuíram para o aprimoramento desses sensores. A incorporação de materiais nanoestruturados como pontos quânticos de carbono funcionalizados e nanopartículas de ouro ampliou a área ativa dos eletrodos e suas propriedades eletrocatalíticas, favorecendo reações redox mais eficientes e aumentando a sensibilidade na detecção de flavonoides[9][10][11]. Além disso, a funcionalização de eletrodos com biomoléculas, incluindo biopolímeros e moléculas receptoras imobilizadas, tem possibilitado o reconhecimento específico de bioativos mesmo em matrizes complexas, como fluidos biológicos[12][13].

Paralelamente, o desenvolvimento de eletrodos impressos e flexíveis tem favorecido a criação de sensores portáteis e de baixo custo, adequados para a determinação rápida de compostos bioativos[14][15]. Outro avanço significativo diz respeito à integração desses sensores com sistemas de aquisição de dados e microeletrônica, permitindo análises automatizadas e em tempo real e ampliando seu potencial de aplicação tanto em laboratórios quanto na indústria farmacêutica[16].

Esses desenvolvimentos reforçam a posição dos sensores eletroquímicos como ferramentas confiáveis para determinação de bioativos, possibilitando detecção em baixas concentrações e contribuindo para estudos farmacológicos, avaliação de alimentos funcionais e desenvolvimento de novas plataformas analíticas[17][18].

Figura 1 - Evoluções na detecção eletroquímica: A) Materiais nanoestruturados. B) Eletrodos funcionalizados com biomoléculas. C) Eletrodos impressos e flexíveis e D) Integração com sistemas eletrônico.



Fonte: Elaborado pelos autores.

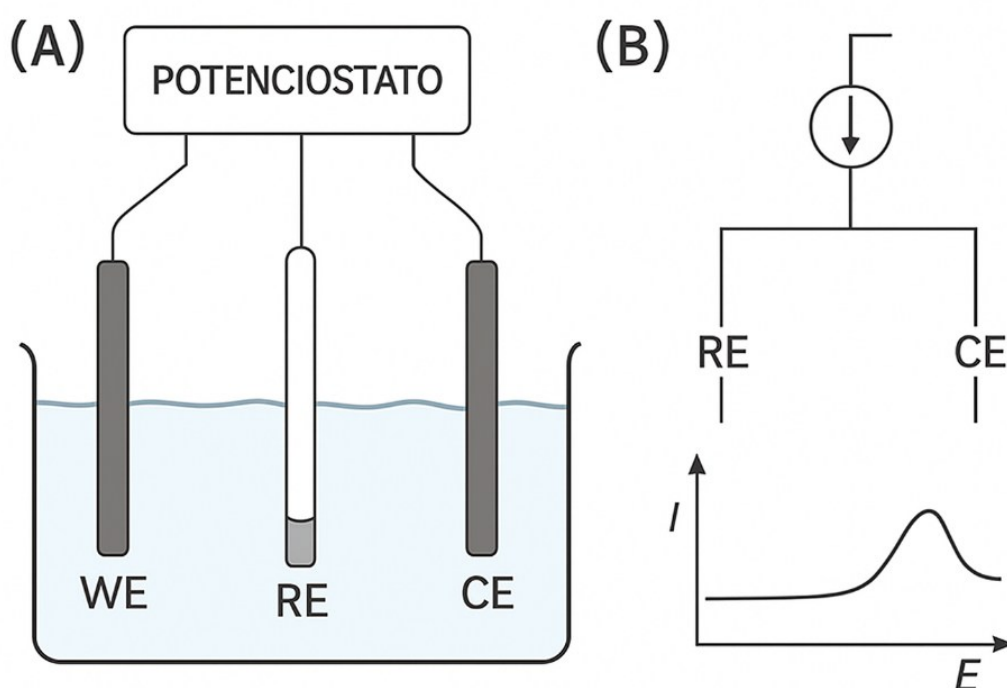
1.2. Princípios e Configuração de Sistemas Eletroanalíticos

As técnicas eletroquímicas vêm se destacando como estratégias analíticas modernas e eficazes, principalmente quando aplicadas à investigação de moléculas bioativas. Seu crescimento decorre da capacidade de fornecer dados em tempo real, com mínima intervenção na matriz analisada, além de permitir o monitoramento de sistemas complexos de forma direta e simplificada[19]. Esses métodos são particularmente atrativos por aliarem sensibilidade, seletividade e custo reduzido a vantagens como portabilidade, miniaturização e facilidade de automação[20].

Entre as abordagens mais utilizadas, destacam-se a voltametria e a amperometria. Ambas se baseiam na medição da corrente gerada por processos de oxidação e/ou redução de espécies eletroativas, os quais ocorrem na interface entre um eletrodo condutor e a solução que contém o analito. A intensidade dessa corrente fornece uma resposta analítica proporcional à concentração do composto de interesse[21][22][23].

A estrutura clássica de um sistema eletroanalítico envolve três eletrodos imersos em uma solução eletrolítica condutora: o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o contra-eletrodo. Esses componentes são conectados a um potenciostato, responsável pelo controle dos potenciais e pela medição da corrente gerada no sistema (Figura 2)[24].

Figura 2 - Esquema de célula eletroquímica de três eletrodos conectada a potenciostato para análises voltamétricas e Esquema de uma célula eletroquímica utilizada em medições voltamétricas B) diagrama elétrico correspondente e exemplo de resposta voltamétrica (corrente I vs potencial E).



Fonte: Adaptado da referência [25]

O eletrodo de trabalho é o local onde ocorrem as reações de interesse analítico. A escolha do material é crucial, pois influencia diretamente a sensibilidade e seletividade da análise. Dentre os mais utilizados estão os eletrodos de carbono vítreo, pasta de carbono, grafite, diamante dopado com boro (BDDE) e eletrodos impressos de carbono, além de opções metálicas como o ouro e a platina. O desempenho desses eletrodos pode ser significativamente aprimorado por modificações com nanomateriais ou agentes funcionais. O eletrodo de referência, por sua vez, deve manter um potencial estável e conhecido, independentemente das variações no sistema. O mais comum é o eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) em solução saturada de KCl , devido à sua reprodutibilidade e facilidade de uso. O contra-eletrodo,

também chamado de eletrodo auxiliar, serve para completar o circuito elétrico, permitindo o fluxo de corrente entre os demais eletrodos. Costuma ser fabricado com materiais inertes e de alta área superficial, como platina, garantindo eficiência mesmo em sistemas com correntes elevadas[26][27].

A solução que compõe o meio deve conter um eletrólito suporte em concentração significativamente maior que a do analito, a fim de assegurar a adequada condutividade elétrica, reduzir a resistência do meio e evitar o transporte de carga por migração iônica. Compostos como KCl, Na₂SO₄ ou KNO₃ são amplamente empregados, desde que apresentem alta solubilidade, estabilidade química e compatibilidade com o potencial de trabalho[26][27].

A montagem correta da célula eletroquímica e a escolha dos parâmetros operacionais, como faixa de potencial, velocidade de varredura, tempo de acumulação e agitação da solução, são determinantes para a qualidade das respostas obtidas. A otimização dessas variáveis contribui para alcançar limites de detecção mais baixos, ampliar a faixa linear de resposta e garantir maior seletividade frente a interferentes[26][27].

1.3. Eletrodo de trabalho

Nos sistemas eletroquímicos, o desempenho da análise depende fortemente do eletrodo de trabalho, que atua como a “janela” pela qual as reações podem ser observadas. É nessa interface que as espécies químicas sofrem oxidação ou redução, estabelecendo o elo entre o meio reacional e o circuito eletrônico externo. Dessa forma, a sensibilidade e a seletividade de um método estão diretamente relacionadas às propriedades intrínsecas do material que compõe o eletrodo e às condições em que a superfície é explorada[26][28].

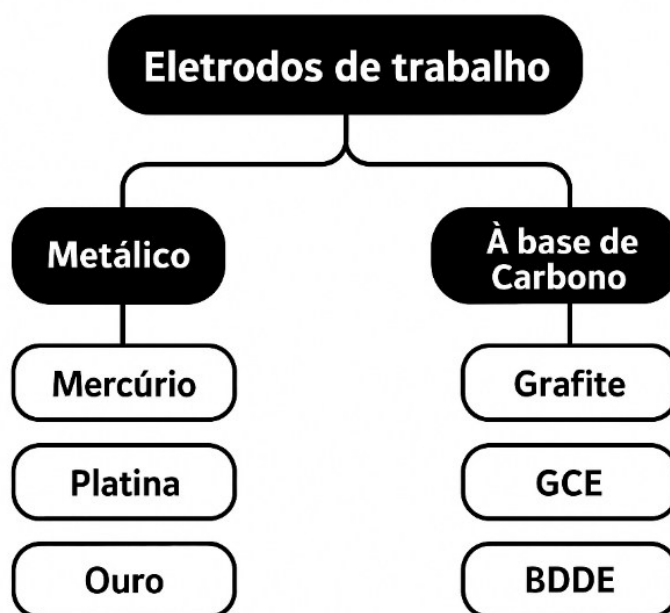
Diversos parâmetros físicos e químicos influenciam o comportamento eletroquímico. A estabilidade e a faixa de potenciais acessíveis, por exemplo, variam conforme a natureza do material utilizado: metais como irídio e paládio oferecem resistência à corrosão, enquanto diferentes formas de carbono (nanofibras, grafeno reduzido ou carbon black) apresentam ampla versatilidade e boa condução eletrônica. Além disso, características superficiais como rugosidade, porosidade e área de contato com o eletrólito podem favorecer ou restringir a ocorrência de processos de transferência de carga[29][30][31].

Outro aspecto relevante são os fatores externos ao material. Temperatura, força iônica da solução, composição do eletrólito e o valor do pH podem modificar não apenas a cinética de reação, mas também a intensidade das correntes de fundo e a estabilidade do sinal. Por isso, a

escolha do eletrodo não se restringe ao material de base: envolve também o ajuste de todo o ambiente experimental[26][27][32].

A figura 3 apresenta uma classificação geral dos eletrodos de trabalho segundo sua composição química, organizando-os em duas categorias principais: eletrodos metálicos e eletrodos à base de carbono. Entre os metálicos, destacam-se o mercúrio, a platina e o ouro, que possuem ampla aplicação em análises eletroquímicas devido à sua estabilidade e boa resposta eletroativa. Já entre os materiais à base de carbono, encontram-se diferentes formas, como o grafite, GCE e BDDE, reconhecidos por sua versatilidade, custo relativamente baixo e propriedades condutivas que os tornam altamente atrativos para diversas aplicações.

Figura 3 - Eletrodos de trabalho: classificação por composição química.



Fonte: Adaptado da referência [33]

Essa classificação fornece uma visão panorâmica sobre os tipos de eletrodos tradicionalmente empregados, funcionando como ponto de partida para compreender como o material de base influencia o desempenho eletroquímico.

1.3.1. Comparação e Aplicações de Diferentes Substratos que Compõe os Eletrodos

Os eletrodos sem modificação, também chamados de eletrodos não modificados, referem-se a materiais condutores utilizados em sua forma original, sem alterações químicas ou estruturais em suas superfícies. Essa abordagem representa uma solução direta e eficiente em eletroanálise, reunindo vantagens como simplicidade operacional, custo reduzido, facilidade de preparo e reprodutibilidade[34][35][36]. Ainda que os eletrodos modificados tenham ganhado protagonismo em aplicações altamente seletivas, os eletrodos sem modificação continuam sendo amplamente utilizados tanto em estudos fundamentais quanto em análises de rotina. Historicamente, sua importância foi consolidada com o desenvolvimento da polarografia por Jaroslav Heyrovský, técnica pioneira que utilizava eletrodo de gotejamento de mercúrio e que lançou as bases da voltametria moderna. A partir desse marco, diferentes materiais passaram a ser explorados com base em suas propriedades intrínsecas, levando à consolidação de uma variedade de eletrodos metálicos e de carbono. Entre os eletrodos metálicos, destacam-se o eletrodo gotejante de mercúrio, a platina e o ouro.

O eletrodo gotejante de mercúrio teve papel histórico central, especialmente nos primeiros desenvolvimentos da voltametria e da polarografia, uma vez que sua superfície renovável e o comportamento suave em processos redox permitiram a determinação precisa de íons metálicos tóxicos em soluções complexas, como na análise de ranitidina. Apesar disso, seu uso atual encontra-se fortemente restrito devido à toxicidade do mercúrio e aos impactos ambientais associados[33][36][37][38]. A platina é amplamente reconhecida como um dos materiais mais nobres e versáteis da eletroquímica, apresentando alta condutividade elétrica, excelente estabilidade eletroquímica e resistência à corrosão, características que a tornam ideal para aplicações envolvendo reações redox, eletrocatalise e células a combustível. Embora o custo elevado possa limitar seu uso, a robustez e a reprodutibilidade experimental justificam sua ampla aplicação em estudos fundamentais[33][39][40]. O GE, por sua vez, destaca-se pela estabilidade química e facilidade de funcionalização superficial, incluindo a capacidade de formar monocamadas auto-organizadas (SAMs) que permitem a imobilização de espécies específicas sobre sua superfície, característica explorada em sensores voltamométricos para detecção de flavonoides e compostos farmacológicos[33][41][42].

Dentre os eletrodos à base de carbono, sobressaem o BDDE, o GCE e o grafite. O BDDE representa uma das inovações tecnológicas mais relevantes, com sua estrutura altamente ordenada e dopagem com átomos de boro, proporcionando baixa corrente de fundo, ampla janela de potenciais e alta resistência à passivação, tornando-o adequado para análises em condições eletroquímicas severas, como na detecção de contaminantes emergentes em águas

residuais ou na análise de neurotransmissores e metabólitos em fluidos biológicos[33][43][44][45].

O GCE, obtido por pirólise de polímeros a altas temperaturas, apresenta excelente estabilidade mecânica, boa condutividade elétrica e baixo ruído capacitivo, além de permitir modificações químicas ou eletroquímicas que ampliam seu uso em sensores para metais pesados, antioxidantes naturais e pesticidas [20][33][35][41][46]. Já o grafite, uma das formas alotrópicas mais antigas e acessíveis do carbono, é empregado em eletrodos de barra ou de pasta (CPE), oferecendo baixo custo, boa condutividade e alta área superficial, embora sua estabilidade seja inferior à do BDDE ou do GCE; sua superfície, no entanto, pode ser facilmente modificada com diferentes materiais[33][47][48][49].

A comparação entre os eletrodos metálicos e de carbono evidencia a complementaridade entre esses materiais: enquanto os metálicos, como platina e ouro, oferecem elevada condutividade e continuam sendo referência em estudos fundamentais, os eletrodos de carbono destacam-se pela versatilidade, resistência à passivação e ampla gama de aplicações. A escolha do eletrodo ideal depende, portanto, das exigências analíticas específicas de cada método ou amostra. Nos próximos itens desta tese, serão abordados com maior profundidade o GCE e o GE de ouro, com ênfase em suas propriedades, estratégias e aplicações[33].

1.3.2. Eletrodo de Carbono Vítreo (GCE)

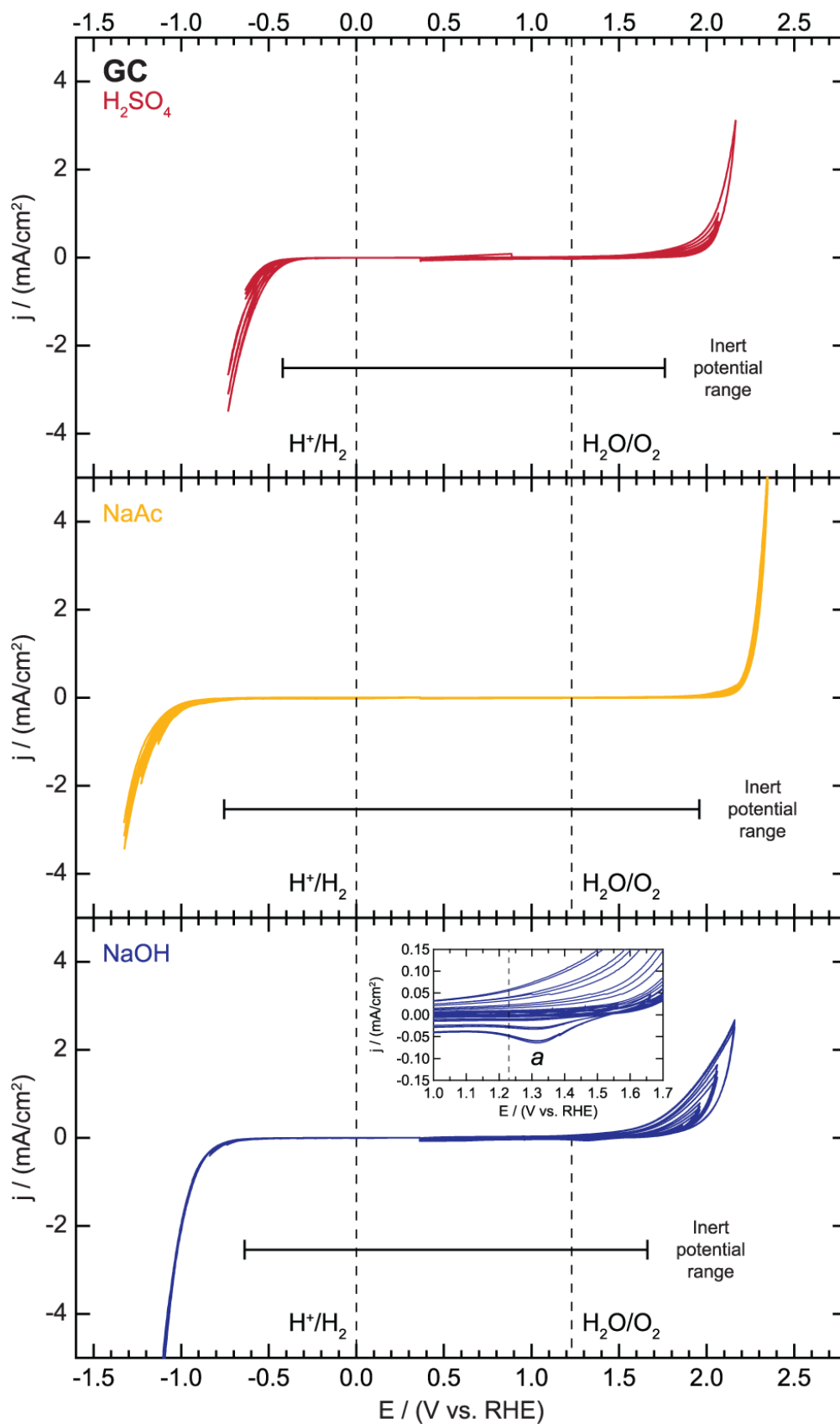
O GCE consolidou-se como uma das principais ferramentas da eletroquímica moderna devido à sua combinação de estabilidade, versatilidade e facilidade de uso. Embora seja largamente aplicado em pesquisas atuais, sua trajetória remonta à década de 1960, quando a indústria japonesa iniciou sua produção em escala, com destaque para a Tokai Electrode Manufacturing Co. Desde então, o material passou a ser referência internacional em análises eletroquímicas[50][51][52].

Do ponto de vista estrutural, o carbono vítreo apresenta uma organização singular. Trata-se de um carbono não grafitizável, que mantém uma rede tridimensional de átomos sp^2 interconectados, mas sem o arranjo cristalino típico do grafite. A ausência de domínios grafiticos extensos gera um comportamento isotrópico, ou seja, o material responde de maneira uniforme independentemente da orientação, o que constitui uma vantagem para medições eletroquímicas. Essa configuração desordenada também confere impermeabilidade a gases e líquidos, além de elevada dureza (4–5 Mohs) e notável resistência térmica, mesmo em temperaturas acima de 3000 °C[33][53][54].

A síntese do carbono vítreo envolve a pirólise de precursores poliméricos, como a poliacrilonitrila (PAN) ou a resina fenol-formaldeído, em condições de pressão e temperatura controladas. Durante o aquecimento, há liberação de espécies voláteis, resultando em uma matriz compacta de carbonos conjugados. A variação nos parâmetros de processamento origina diferentes tipos comerciais, como GC-10, GC-20 e GC-30, cada qual com pequenas diferenças em propriedades físico-químicas[55].

No campo eletroquímico, a faixa de estabilidade do GCE depende diretamente do eletrólito. Em soluções aquosas de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a janela de potencial inerte pode variar: cerca de $-0,4$ a $+1,8 \text{ V}$ vs. RHE em H_2SO_4 ; até $+1,9 \text{ V}$ em NaAc; e aproximadamente $-0,6$ a $+1,7 \text{ V}$ em NaOH. Em solventes orgânicos, como carbonato de propileno contendo KPF_6 , essa janela se expande significativamente, alcançando de $-3,2$ a $+3,6 \text{ V}$ vs. Fc/Fc^+ . Esse comportamento é ilustrado na figura 4, que mostra a resposta eletroquímica do material em diferentes meios [56][57][58][59].

Figura 4 - Faixa de potencial eletroquimicamente estável do carbono vítreo em soluções de H_2SO_4 , NaAc e NaOH, determinada por voltametria cíclica.



Fonte: Retirado da referência [56]

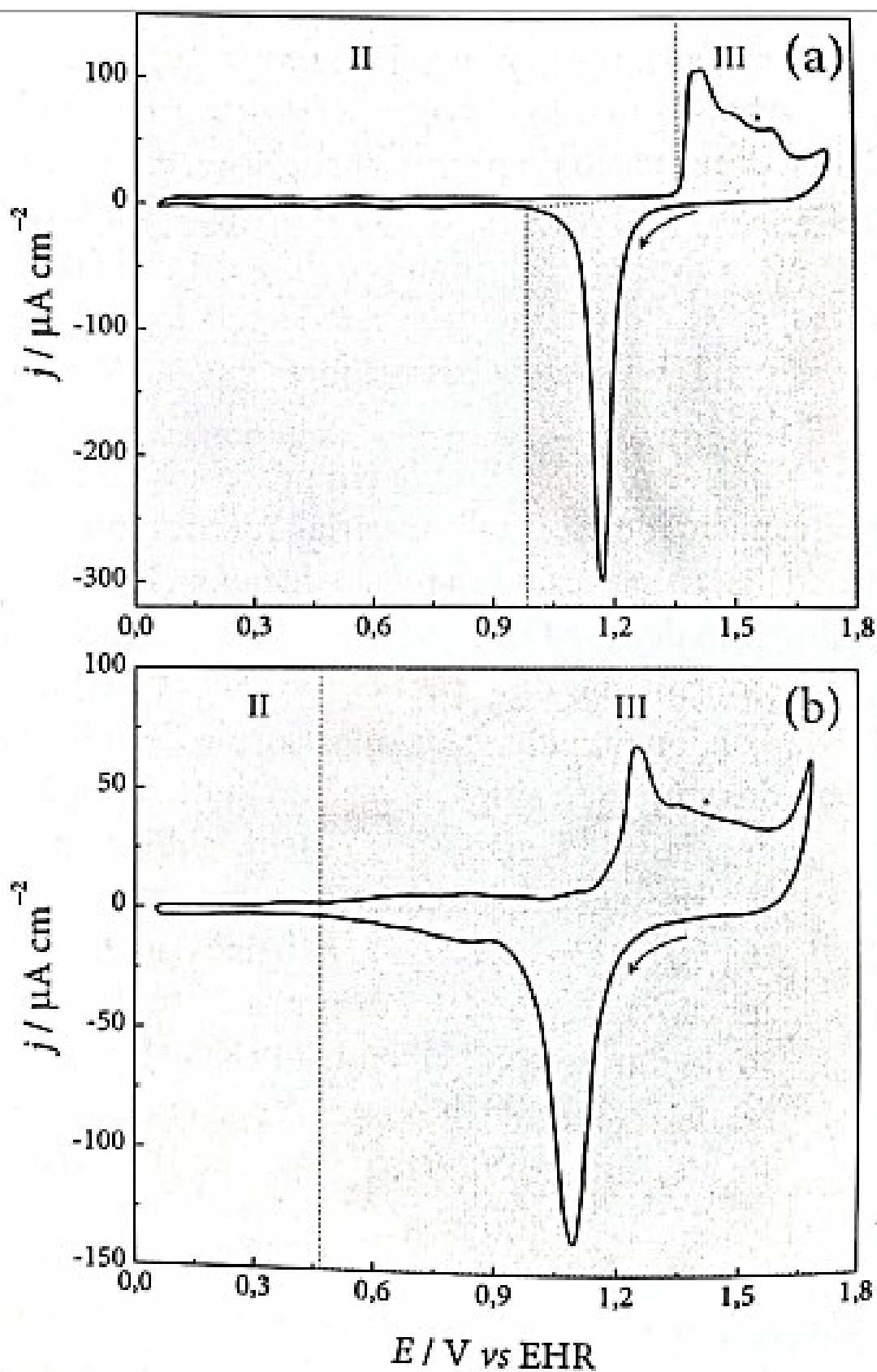
Essa amplitude torna o GCE adequado para estudar processos redox envolvendo espécies diversas, desde íons metálicos como Hg_2^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} até ânions como $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. A facilidade de renovação da superfície — por polimento mecânico ou tratamentos eletroquímicos — amplia sua durabilidade e assegura boa reprodutibilidade entre ensaios. Além disso, a possibilidade de fabricação em diferentes geometrias (discos, bastões, placas e até discos rotativos) favorece sua aplicação em múltiplas técnicas experimentais. Assim, a combinação de ampla janela de potencial, baixa reatividade, estabilidade térmica, impermeabilidade e facilidade de manuseio explica por que o carbono vítreo permanece como um dos eletrodos mais utilizados até hoje em investigações eletroquímicas[55][60].

1.3.3. Eletrodo de Ouro (GE)

O ouro é um dos materiais mais empregados em eletroquímica devido à sua elevada estabilidade química, boa condutividade elétrica e ampla janela de potenciais, tanto em meio ácido quanto alcalino. Entretanto, seu comportamento eletroquímico difere significativamente do observado para a platina (Pt), sobretudo porque a ligação Au–H apresenta energia muito baixa. Isso significa que o ouro praticamente não exibe processos de adsorção e dessorção de hidrogênio em sua superfície, diferentemente da Pt, onde tais etapas são claramente visíveis[33]. Essa característica torna o Au menos ativo para reações envolvendo hidrogênio, mas, por outro lado, o transforma em um excelente suporte inerte para estudos de adsorção e para a imobilização de materiais como nanopartículas e biomoléculas[61][62].

A figura 5 ilustra o comportamento eletroquímico do Au em soluções de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} (a) e NaOH 0,1 mol L^{-1} (b), em varreduras de 0,05 V s^{-1} , realizadas na ausência de oxigênio e outras espécies eletroativas. Os potenciais são referidos ao eletrodo reversível de hidrogênio (EHR). É importante destacar que, diferentemente do que ocorre na Pt, o valor de 0,0 V vs EHR não corresponde ao início da evolução de hidrogênio no Au, que ocorre apenas em torno de – 0,15 V.

Figura 5 - Voltamogramas cíclicos do Au a $0,05 \text{ V s}^{-1}$ em solução de (a) H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (b) NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Retirado da referência [33]

Nos voltamogramas, duas regiões principais podem ser observadas: a região II, correspondente à dupla camada elétrica, caracterizada por correntes capacitivas, e a região III, associada à formação e redução de óxidos de ouro. Na parte (a), referente ao meio ácido, percebe-se que a formação de óxidos se inicia acima de $\sim 1,3$ V, com múltiplos picos de corrente que refletem diferentes estágios de oxidação (AuO e, em condições mais severas, Au_2O_3). Já na parte (b), referente ao meio alcalino, observa-se um aumento mais pronunciado da corrente na região II, indicando a adsorção de OH^- em torno de 0,5 V. Além disso, a oxidação começa em potenciais menores, próximos a 1,1 V, e o desprendimento de oxigênio é evidente em potenciais acima de 1,6 V. Esse comportamento confirma que o Au possui uma ampla faixa de potenciais dominada por corrente capacitiva, o que o torna adequado como substrato para estudos de adsorção de espécies. Além disso, o processo contínuo de oxidação e redução pode alterar a rugosidade superficial, já que os átomos de Au apresentam alta mobilidade. Essa modificação estrutural influencia diretamente sua atividade catalítica e a estabilidade em diferentes aplicações[33][63].

1.3.4. Nanoporos de Ouro

Um avanço de interesse eletroquímico nos últimos anos é a chamada ativação eletroquímica do ouro. Esse processo, geralmente realizado por anodização seguida de redução, leva à formação de superfícies altamente nanoporosas. A presença de nanoporos aumenta de maneira significativa a área eletroquimicamente ativa e expõe um grande número de sítios catalíticos, favorecendo a cinética de transferência de elétrons. Em eletrodos de filmes de ouro modificados, como no caso do PDA@NPGF (filme de ouro nanoporo funcionalizado com polidopamina), observou-se desempenho excepcional na detecção de espécies em baixas concentrações, como peróxido de hidrogênio e dopamina[64]. De forma semelhante, a modificação direta de filmes de Au por processos de anodização–redução resultou em eletrodos nanoporosos estáveis, com menor resistência de transferência de carga e alta reprodutibilidade em ciclos sucessivos, o que os torna adequados até para a detecção de contaminantes emergentes, como a dicloro-benzoquinona[65].

Assim, o eletrodo de ouro, tradicionalmente considerado um material inerte em certas janelas de potencial, revela-se versátil quando submetido a processos de ativação eletroquímica. A geração de superfícies nanoporosas não apenas amplia sua sensibilidade analítica, mas também consolida o Au como uma plataforma robusta, moderna e promissora para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos avançados.

1.3.5. Avaliação Voltamétrica e Validação do Método Analítico

A voltametria ocupa posição central entre as ferramentas da eletroquímica contemporânea, sendo amplamente empregada na investigação e quantificação de espécies eletroativas em contextos clínicos, ambientais e industriais. Seu desenvolvimento foi potencializado pelos avanços em instrumentação e sistemas eletrônicos, que possibilitaram maior sensibilidade, rapidez e confiabilidade nas medições. Trata-se de uma técnica não destrutiva, capaz de fornecer respostas imediatas, com baixo consumo de amostra e elevada aplicabilidade prática, atributos que explicam sua adoção crescente em diferentes áreas da química analítica[66].

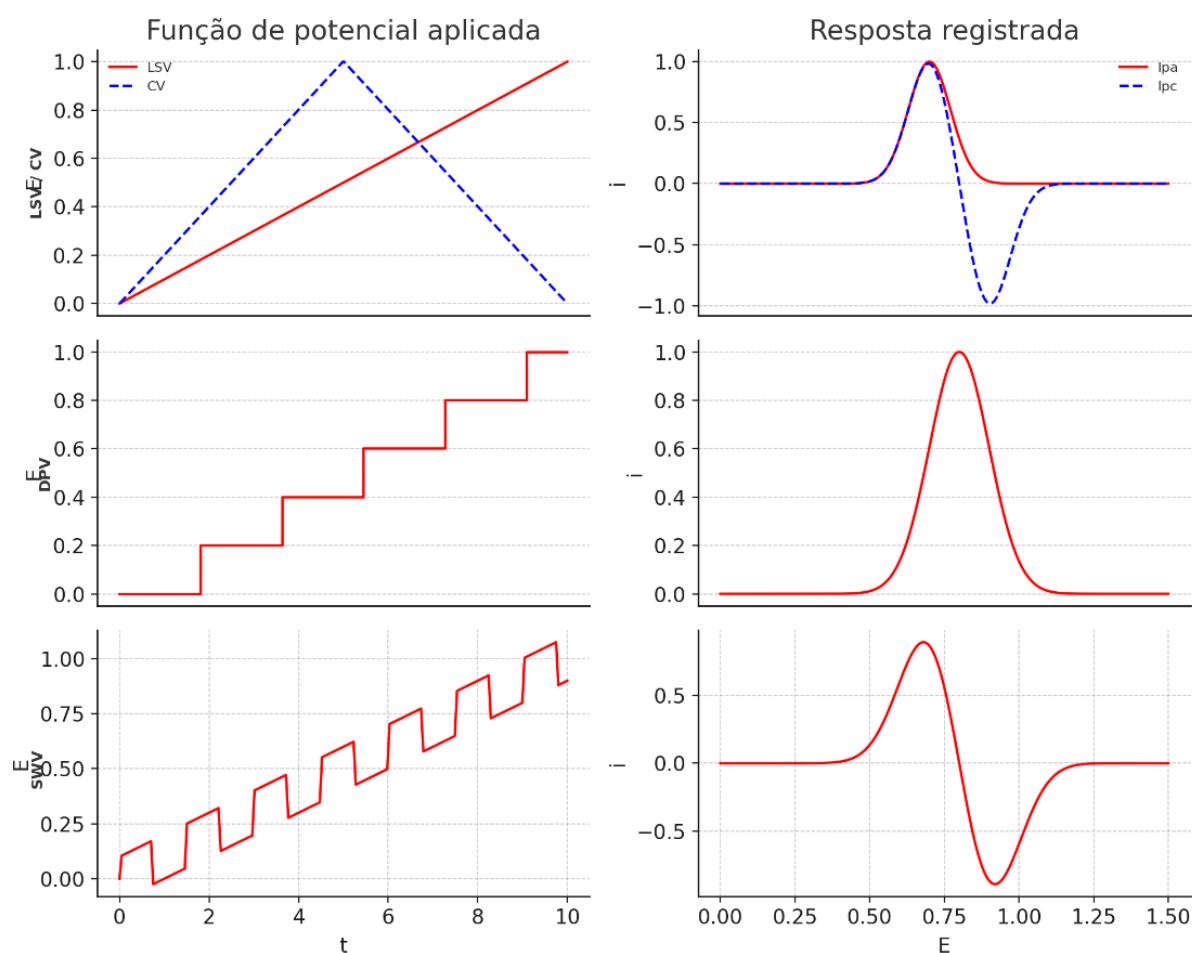
O funcionamento básico da voltametria consiste no registro da corrente resultante em um eletrodo de trabalho quando submetido a variações de potencial em relação a um eletrodo de referência. A manipulação controlada desse potencial determina a natureza redutora ou oxidante da superfície: potenciais negativos favorecem reações de redução, enquanto valores mais positivos impulsionam processos oxidativos. A resposta obtida, expressa na forma de curvas corrente-potencial, revela informações sobre processos redox, transferência eletrônica e mecanismos de reação envolvidos[26][27].

Entre os diferentes modos operacionais, destacam-se as técnicas de varredura linear, como a LSV e a CV. A CV, em particular, é amplamente utilizada em análises exploratórias, permitindo identificar potenciais formais, verificar a reversibilidade de reações, investigar processos químicos associados e estimar parâmetros cinéticos. Nessas metodologias, o potencial aplicado varia linearmente com o tempo segundo a equação $E = E_i + vt$. Em que E representa o potencial aplicado, E_i o potencial inicial e vt a velocidade de varredura. Essa relação conduz ao registro de voltamogramas característicos, úteis na caracterização qualitativa de sistemas eletroquímicos[26][67].

Já as técnicas pulsadas, como a DPV e a SWV, são reconhecidas pela elevada sensibilidade e aplicabilidade em determinações quantitativas. Esses métodos exploram a diferença na taxa de decaimento das correntes faradaica e capacitiva, de modo que a contribuição não faradaica seja minimizada e a resposta do analito seja enfatizada. Como consequência, obtêm-se picos mais definidos e proporcionais à concentração. A DPV é especialmente adequada para a detecção de espécies em concentrações muito baixas, enquanto a SWV alia rapidez e eficiência, muitas vezes superando em sensibilidade outras técnicas pulsadas[26][67].

A figura 6 apresenta, de forma esquemática, a aplicação do potencial no eletrodo (coluna da esquerda) e as respostas de corrente correspondentes (coluna da direita) para as técnicas LSV, CV, DPV e SWV. Observa-se que cada técnica é caracterizada, primeiramente, pela maneira como o potencial é controlado ao longo do tempo: na LSV, aplica-se uma varredura linear crescente; na CV, a varredura é triangular, permitindo ciclos de ida e volta; na DPV, pulsos diferenciais são sobrepostos a uma rampa de potencial; e na SWV, aplica-se uma onda quadrada acoplada a uma rampa. Essas diferentes funções de potencial resultam nas distintas respostas em corrente mostradas à direita, onde LSV e CV fornecem perfis exploratórios (com picos anódicos e catódicos), enquanto DPV e SWV evidenciam sinais mais agudos e sensíveis, adequados para quantificação. Assim, a figura ilustra claramente a relação direta entre o modo de aplicação do potencial e o tipo de informação obtida, contextualizando o papel de cada técnica voltamétrica[26][27][67].

Figura 6 - Representação esquemática das funções de potencial aplicadas e respostas em corrente obtidas para as técnicas voltamétricas LSV, CV, DPV e SWV.



Fonte: Elaborado pelos autores.

A escolha da técnica depende do objetivo analítico e das características da amostra. Enquanto CV e LSV são mais indicadas para estudos fundamentais de mecanismos e processos em eletrodos, DPV e SWV destacam-se em análises quantitativas, onde são requeridos baixos limites de detecção, seletividade e confiabilidade[68][69].

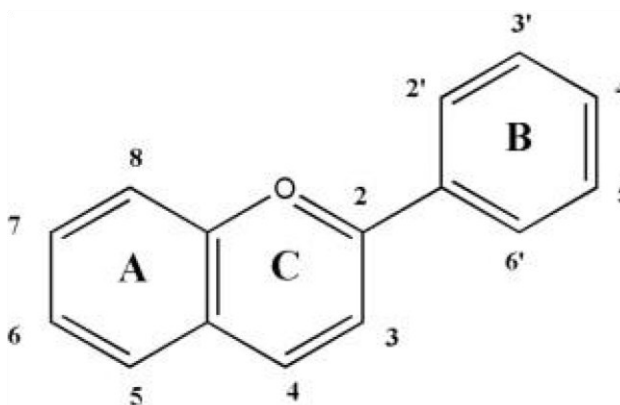
Para assegurar a validade dos resultados obtidos, torna-se indispensável a aplicação de critérios de validação analítica, os quais englobam diferentes parâmetros essenciais para avaliar a confiabilidade de um método. Entre eles, destacam-se a linearidade e a faixa de aplicação, que verificam a proporcionalidade entre concentração e resposta de corrente; LOD e LOQ, que estabelecem as menores concentrações detectáveis ou quantificáveis com segurança; a precisão, que avalia a repetibilidade e reprodutibilidade das medições; e a exatidão, responsável por determinar a proximidade dos valores obtidos em relação a padrões de referência. Além disso, a seletividade assegura que a resposta seja confiável mesmo na presença de interferentes, enquanto a robustez mede a capacidade do método de manter seu desempenho frente a pequenas variações experimentais.

A integração entre a seleção criteriosa da técnica voltamétrica e a aplicação de um processo de validação analítica robusto garante a obtenção de dados confiáveis e de alta relevância. Dessa forma, a determinação voltamétrica validada apresenta-se como uma abordagem versátil e poderosa, sendo aplicável tanto em estudos fundamentais de processos eletroquímicos quanto na quantificação precisa de espécies em amostras de interesse clínico, ambiental e industrial.

1.4. Flavonoides: Estrutura, Relevância e Desafios Analíticos

Os flavonoides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos nas plantas, atuando como metabólitos secundários essenciais para proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e estresse ambiental, além de influenciarem cor, sabor e aroma. Estima-se que existam mais de 9.000 flavonoides diferentes, todos compartilhando um esqueleto químico de 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos (A e B) ligados a um anel pirânico central (C), conforme ilustrado na figura 7[70][71][72].

Figura 7 - Esqueleto básico e sistema de numeração dos flavonoides.



Fonte: Retirado da referência [73]

As diferenças estruturais entre os flavonoides ocorrem principalmente na posição e tipo de substituições nos anéis A, B e C, determinando sua classificação em grupos como flavonóis, flavonas, flavanóis, isoflavonas, flavanonas e antocianinas. Eles podem existir na forma livre (agliconas) ou ligados a açúcares (heterosídeos), o que influencia suas propriedades químicas e biológicas. Nos vegetais, os flavonoides estão presentes em flores, frutos, folhas, caules e raízes, refletindo seu papel adaptativo e funcional[74].

Do ponto de vista bioquímico e farmacológico, os flavonoides apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras e antienvhecimento. Entre os exemplos mais estudados, destaca-se a quercetina, um flavonol conhecido por seu efeito antioxidante e proteção cardiovascular [72][74]; o kaempferol, também flavonol, que demonstrou propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas [75][76]; a apigenina, uma flavona, com efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios [77][78]; e a catequina, pertencente à classe dos flavanóis, associada à proteção contra estresse oxidativo e benefícios metabólicos [79][80]. Estes compostos contribuem para a proteção celular, redução de processos inflamatórios e prevenção de doenças crônicas.

Apesar de seu potencial terapêutico, a aplicação dos flavonoides enfrenta desafios analíticos, tais como a complexidade estrutural e a limitada biodisponibilidade decorrente da baixa solubilidade em água e do metabolismo hepático. Para superar essas limitações, estratégias de formulação, incluindo o uso de nanopartículas e a conjugação com outros compostos, têm sido exploradas para otimizar a absorção e aumentar a eficácia desses bioativos. Dentre os flavonoides estudados recentemente, a BAI, pertencente à classe das

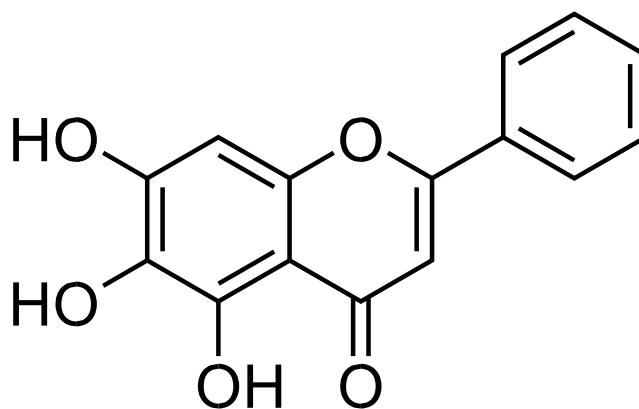
flavonas, tem recebido atenção especial. Pesquisas recentes investigam seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, bem como sua capacidade de inibir a replicação viral, incluindo estudos sobre sua ação contra o vírus da COVID-19[81].

1.5. Baicaleína: Propriedades e Importância Terapêutica

A BAI (BAI, 5,6,7-triidroxi flavona) é um flavonoide da classe das flavonas, presente principalmente nas raízes da planta *Scutellaria baicalensis* Georgi, conhecida como Huangqin na medicina tradicional chinesa. Esta planta tem sido utilizada há séculos para tratar inflamações, febres, infecções respiratórias e distúrbios gastrointestinais, destacando-se como um importante recurso fitoterápico na Ásia Oriental. Além de *S. baicalensis*, a BAI também pode ser encontrada em *Scutellaria lateriflora*, sendo uma das quatro principais flavonas do extrato vegetal, junto com baicalina, wogonoside e wogonin[82].

A estrutura química da BAI (Figura 8) é caracterizada por três grupos hidroxila nas posições C-5, C-6 e C-7 do anel A, o que contribui significativamente para suas propriedades antioxidantes e farmacológicas. O anel B aromático e o anel C pirânico completam o esqueleto flavonoide típico, conferindo estabilidade estrutural e potencial de interação com diversas moléculas biológicas.

Figura 8 - Esqueleto estrutural da BAI.



Fonte: Adaptado da referência [83]

Do ponto de vista físico-químico, a BAI possui fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ e peso molecular de 270,24 g/mol, características que influenciam sua difusão e permeabilidade em tecidos biológicos. Sua baixa solubilidade em água (0,153 mg/mL) e o pKa de 6,76 impactam diretamente sua absorção e biodisponibilidade, limitando a aplicação clínica direta e

demandando o desenvolvimento de estratégias farmacotécnicas, como nanopartículas ou sistemas de liberação controlada, para otimizar sua entrega e eficácia terapêutica[84][85].

A BAI exibe um amplo espectro de atividades farmacológicas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, cardiovasculares, neuroprotetores e antivirais. Como antioxidante, a BAI neutraliza radicais livres e protege tecidos contra danos oxidativos, modulando os sistemas de defesa celular. Seu efeito anti-inflamatório contribui para a regulação de respostas fisiológicas e prevenção de doenças crônicas, como artrite e doenças cardiovasculares. No contexto anticâncer, a BAI inibe a proliferação celular, induz apoptose, bloqueia o ciclo celular, reduz migração e invasão de células tumorais, além de apresentar efeitos anti-angiogênicos. Estudos indicam que a BAI possui seletividade para células tumorais, exibindo menor toxicidade para células normais, e pode potencializar o efeito de agentes quimioterápicos quando utilizada em combinação[86][87][88].

Além disso, a BAI tem se mostrado promissora em doenças infecciosas, incluindo a COVID-19. Pesquisas recentes demonstram que a BAI atua como inibidor da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do SARS-CoV-2, enzima essencial para a replicação viral. Ensaios in vitro indicam que concentrações superiores a 0,1 μM protegem células contra a infecção viral, enquanto estudos em modelos animais mostram redução da replicação viral e atenuação das lesões pulmonares[89][90][91][92][81][93][92].

Portanto, a BAI configura-se como um flavonoide de grande interesse farmacológico, combinando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, neuroprotetoras e antivirais, com aplicação potencial em doenças crônicas, infecciosas e na pesquisa de novas abordagens terapêuticas emergentes, incluindo o combate à COVID-19. O entendimento de sua estrutura química e propriedades físico-químicas é crucial para a exploração racional de sua atividade biológica e para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas eficazes.

1.6. Estratégias Analíticas para a Determinação de BAI

A determinação da BAI tem sido realizada por uma ampla variedade de técnicas analíticas, refletindo a complexidade das matrizes em que este flavonoide está presente. Entre os métodos mais empregados destacam-se a cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS)[92], cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)[94], espectrometria de fluorescência[95], espectroscopia de fluorescência[96] e espectrofotometria UV-vis[97]. Essas metodologias, embora robustas e sensíveis, frequentemente demandam preparo complexo das amostras, operação de

equipamentos sofisticados, alto custo e tempo de análise prolongado, além de gerarem resíduos químicos significativos.

Em contraste, os métodos eletroquímicos têm se mostrado promissores como alternativas rápidas, econômicas e sustentáveis para a quantificação da BAI. Técnicas como CV, SWV e DPV exploram a natureza eletroativa do composto, permitindo medições diretas, com mínimo pré-tratamento e baixa geração de resíduos[63][98]. Embora o comportamento eletroquímico da BAI em GE e de GCE não modificados ainda seja pouco explorado, essas plataformas simples oferecem detecção sensível e seletiva, demonstrando grande potencial para aplicações clínicas e farmacêuticas. Dessa forma, os métodos eletroquímicos complementam as técnicas cromatográficas e espectroscópicas, combinando agilidade, baixo custo e menor impacto ambiental com precisão analítica, consolidando-se como ferramentas relevantes para o monitoramento da BAI em contextos clínicos e farmacêuticos.

1.7. Química Teórica Aplicada à Eletroquímica Molecular

A química teórica tem desempenhado um papel crescente na compreensão de fenômenos eletroquímicos em nível molecular. Entre as diversas abordagens disponíveis, destacam-se os métodos baseados na DFT, amplamente utilizados para investigar propriedades eletrônicas, energias de adsorção e mecanismos de reação em superfícies condutoras. Associada à AIMD, a DFT permite explorar a superfície de energia potencial e prever a estabilidade de diferentes configurações adsorvidas em condições próximas às experimentais[20].

No contexto da eletroanálise, essas ferramentas computacionais têm se mostrado fundamentais para elucidar os modos de interação entre analitos e superfícies de eletrodos, oferecendo informações sobre orientação molecular, transferência de carga e efeitos estruturais locais. Isso é particularmente relevante em sensores químicos, nos quais o desempenho analítico está diretamente relacionado à natureza e intensidade das interações de adsorção. Aplicações recentes têm demonstrado a eficácia dessas abordagens para sistemas contendo flavonoides, como a BAI, moléculas ricas em grupos hidroxila e com potencial de formar interações π - π e ligações de hidrogênio com superfícies metálicas ou carbonáceas. O uso combinado de DFT e AIMD permite não apenas prever os modos de adsorção mais estáveis, mas também avaliar os efeitos de defeitos estruturais, porosidade e funcionalização da superfície sobre a reatividade do sistema[63][98].

Diante disso, os métodos da química teórica foram adotados no presente trabalho como ferramenta complementar à investigação eletroanalítica da BAI, fornecendo subsídios para a compreensão dos processos de adsorção e oxidação em diferentes materiais eletrodos.

2. CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar plataformas eletroquímicas baseadas em eletrodos não modificados e em eletrodos de ouro nanoporoso para a determinação de BAI em matrizes clínicas, integrando análises experimentais e teóricas para elucidar os mecanismos de interação e aprimorar o desempenho analítico.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Estudos com eletrodos não modificados (GCE e GE)

- Investigar o comportamento eletroquímico da baicaleína (BAI) em eletrodos de carbono vítreo (GCE) e ouro (GE) não modificados por voltametria cíclica;
- Analisar a influência de parâmetros experimentais (pH, eletrólito de suporte, concentração) e otimizar as técnicas voltamétricas (LSV, DPV e SWV) ;
- Investigar o mecanismo de oxidação da BAI nas diferentes plataformas e correlacionar os resultados experimentais com cálculos teóricos;
- Desenvolver modelos computacionais (DFT e AIMD) para compreender os modos de adsorção da BAI em superfícies de carbono (grafeno, dopagens e defeitos) e ouro (Au(111));
- Avaliar processos de fisorção, quimissorção e possíveis efeitos de envenenamento superficial na resposta eletroquímica;
- Estabelecer curvas de calibração para quantificação da BAI, determinando faixa linear, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ);
- Aplicar o método desenvolvido em matrizes simuladas e reais (plasma e soro), avaliando seletividade, sensibilidade e efeitos de matriz.

2.2.2. Estudos com eletrodos de ouro nanoporo (NPGE)

- Desenvolver eletrodos de ouro nanoporo (NPGE) por processo de anodização controlada;

- Caracterizar a superfície dos NPGE por técnicas físico-químicas (SEM, AFM, XPS e EIS), correlacionando morfologia, rugosidade e composição com o desempenho eletroquímico;
- Investigar experimental e teoricamente a influência do tempo de anodização, do tamanho e da morfologia dos poros na interação e resposta eletroquímica da BAI em NPGE;
- Selecionar e otimizar técnicas de alta sensibilidade, com destaque para Adsorptive Stripping Voltammetry (AdSV), visando aprimorar a detecção da BAI;
- Validar o método proposto por meio de parâmetros de mérito (faixa linear, LOD, LOQ, precisão, exatidão, seletividade, robustez e repetibilidade);
- Avaliar a aplicabilidade do método em amostras biológicas simuladas (plasma e urina), utilizando o método de adição padrão para garantir confiabilidade analítica;
- Comparar os métodos baseados em GCE, GE e NPGE com aqueles já descritos na literatura.

3. CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA

Os estudos realizados nesta tese envolveram etapas experimentais, teóricas e de caracterização em colaboração com diferentes grupos de pesquisa. Toda a parte eletroquímica experimental foi conduzida no ampere – Laboratório de Plataformas Eletroquímicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foram desenvolvidos os métodos voltamétricos, o preparo das soluções e as análises em matrizes biológicas sintéticas. As investigações teóricas (DFT e AIMD) foram realizadas em cooperação com o Departamento de Física da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e com o Departamento de Ciências Exatas e Educação da UFSC – Campus Blumenau, enquanto as caracterizações físico-químicas dos materiais foram conduzidas em parceria com o Departamento de Física da PUC-Rio, o Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e o Nanotechnology Engineering Program da COPPE/UFRJ.

3.1. Reagentes e soluções

Os reagentes empregados neste trabalho foram de grau analítico (tabela 1). Para o preparo das soluções utilizou-se água ultrapura obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), apresentando resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25 °C.

REAGENTES	FÓRMULA QUÍMICA	PROCEDÊNCIA
Ácido acético	CH ₃ COOH	Vetec (≥99,7%)
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma-Aldrich (≥99,0%)
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Acros Organics (≥99,5%)
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Sigma-Aldrich (≥99,5%)
Ácido clorídrico	HCl	Neon (≥37,0%)
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Neon (≥85,0%)
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Quimex (≥95,0%)
Ácido úrico	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	Sigma-Aldrich (≥99,0%)
Baicaleína	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Sigma-Aldrich (≥98,0%)
Cloreto de potássio	KCl	Isofar (≥99,0%)
Cobalto	Co	Specsol (≥99,0%)
Dopamina	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Sigma-Aldrich (≥99,0%)

Etanol	C_2H_5OH	Cromoline ($\geq 99,5\%$)
Ferricianeto de potássio	$K_3[Fe(CN)_6]$	Merck ($\geq 95,0\%$)
Fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	Neon ($\geq 98,0\%$)
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich ($\geq 99,0\%$)
Hidróxido de sódio	$NaOH$	Vetec ($\geq 99,0\%$)
Melatonina	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	Sigma-Aldrich ($\geq 99,0\%$)
Metanol	CH_3OH	Cromoline ($\geq 99,5\%$)
Naringenina	$C_{15}H_{12}O_5$	Sigma-Aldrich ($\geq 95,0\%$)
Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Sigma-Aldrich ($\geq 95,5\%$)
Ureia	CH_4N_2O	Sigma-Aldrich ($\geq 99,0\%$)
Zinco	Zn	Specsol ($\geq 99,0\%$)

Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 1 - Lista de reagentes utilizados, com as respectivas fórmulas químicas e fornecedores.

3.1.1 Espécies em estudo e eletólitos de suporte

A espécie investigada neste trabalho foi a BAI, cujo estudo eletroquímico comparativo em eletrodos de carbono vítreo e ouro é apresentado no Capítulo 4, enquanto o Capítulo 5 dedica-se ao desenvolvimento de uma plataforma baseada em NPGE. As soluções estoque de BAI foram preparadas em etanol, nas concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (Capítulo 4) e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Capítulo 5), sendo mantidas sob refrigeração e protegidas da luz. Para os estudos voltamétricos foram empregados diferentes eletrólitos de suporte: o tampão Britton-Robinson (BR), obtido a partir da mistura de ácidos acético, bórico e fosfórico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); o tampão McIlvaine, preparado a partir da combinação de fosfato monossódico (NaH_2PO_4 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido cítrico ($C_6H_8O_7$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$); e o tampão fosfato (PB), elaborado a partir de fosfato monossódico (NaH_2PO_4 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Os valores de pH foram ajustados com soluções de NaOH ou HCl, conforme necessário, e todas as soluções permaneceram estáveis sob condições de refrigeração.

3.2 Desenvolvimento de análises aos Capítulos 4 e 5

O desenvolvimento experimental desta tese foi estruturado em duas etapas complementares, apresentadas e discutidas nos Capítulos 4 e 5. A primeira etapa concentrou-se na investigação do comportamento eletroquímico da BAI em eletrodos de GCE e de ouro GE) não modificados. Essa escolha inicial teve como propósito compreender, de forma sistemática, os processos fundamentais de oxirredução da molécula em superfícies condutoras de uso consagrado na eletroquímica, permitindo estabelecer parâmetros de referência e uma base sólida para o avanço das etapas subsequentes.

Na segunda etapa, o foco deslocou-se para o desenvolvimento de uma plataforma inovadora, baseada em eletrodos de ouro NPGE. A modificação superficial desses eletrodos conferiu propriedades únicas, como aumento da área ativa e maior eficiência na transferência eletrônica, possibilitando a construção de um sensor mais sensível e seletivo. Essa abordagem foi especialmente direcionada à aplicação em matrizes biológicas complexas, como plasma e urina, ampliando a relevância prática do estudo.

Dessa forma, a transição metodológica entre as duas etapas ilustra a progressão natural da pesquisa: partindo da exploração de sistemas convencionais para a implementação de um sistema avançado, com características estruturais adaptadas às demandas de detecção em condições reais. A seguir, são descritos em detalhe os procedimentos experimentais empregados em cada uma dessas etapas, organizados por tópicos de modo a facilitar a comparação e evidenciar suas especificidades.

3.3.1 GCE e GE não modificados

As análises voltamétricas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato PalmSens (Palm Instruments BV, Holanda), conectado a um computador com software PSTrace (versões 5.5 e 5.8). A escolha desse equipamento deve-se à sua robustez e confiabilidade em análises eletroquímicas de bancada, permitindo aquisição de dados de corrente e potencial com alta resolução temporal.

O tratamento inicial dos dados foi conduzido diretamente no PSTrace, que possibilitou a correção automática de linha de base por meio do modo fixo, assegurando maior consistência na análise dos sinais eletroquímicos. Posteriormente, os resultados foram importados para o

software de ajustes gráficos e cálculos estatísticos, permitindo uma análise mais refinada das respostas.

Foram exploradas as principais técnicas de voltametria, a saber: CV, utilizada como método diagnóstico para investigar o mecanismo de transferência eletrônica da BAI; LSV, empregada para explorar a resposta em diferentes regimes de potencial; DPV e SWV, ambas aplicadas com o intuito de melhorar a sensibilidade e reduzir o ruído de fundo, sendo particularmente úteis para determinação analítica em baixas concentrações.

O pH das soluções foi cuidadosamente monitorado com pHmetro Ohaus ST3100-F, dada a sensibilidade da BAI às variações de protonação, que influenciam diretamente em seus processos de oxirredução. A solubilização de alguns reagentes mais difíceis foi auxiliada por banho de ultrassom Unique UltraCleaner 800, enquanto a homogeneização das soluções na célula eletroquímica foi realizada com agitador magnético IKA Lab Disc. As pesagens de todos os reagentes utilizados foram conduzidas em balança analítica Shimadzu Unibloc AUX320, assegurando precisão na preparação das soluções.

3.3.2 Eletrodo de ouro nanoporoso (NPGE)

No Capítulo 5, as medidas voltamétricas mantiveram a mesma instrumentação básica descrita para o Capítulo 4, mas expandiram-se em complexidade, incluindo não apenas CV, LSV, DPV e SWV, mas também a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

A EIS foi realizada em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5 mmol L⁻¹, atuando como sonda redox clássica para caracterização de superfícies condutoras. Esse experimento permitiu avaliar propriedades fundamentais do NPGE, como resistência de transferência eletrônica, capacitância dupla camada e alterações estruturais decorrentes do processo de anodização.

As CVs foram obtidas em velocidades de varredura variando entre 20 e 100 mV s⁻¹, faixa escolhida para permitir a análise dos regimes cinético e difusional da transferência eletrônica. A equação de Laviron foi aplicada para extrair parâmetros como o coeficiente de transferência de carga (α) e a constante heterogênea de transferência eletrônica (k^0), contribuindo para a compreensão da dinâmica de interação entre a BAI e a superfície nanoporosa.

Todos os experimentos foram realizados em condições ambientais controladas, sendo mantida a mesma padronização de pH, solubilização e preparo de soluções do Capítulo 4, garantindo comparabilidade entre os dois sistemas investigados.

3.4 Célula eletroquímica e configuração dos eletrodos

Tanto no Capítulo 4 quanto no Capítulo 5, utilizou-se célula eletroquímica de compartimento único, com volume útil de 10,0 mL. O arranjo clássico de três eletrodos foi adotado, com diferenças específicas conforme a etapa do estudo:

- Capítulo 4: foram utilizados como eletrodos de trabalho o GCE ($\varnothing$ 2,0 mm) e o GE ($\varnothing$ 3,0 mm), em experimentos comparativos. O CE foi constituído por fio de platina, enquanto o eletrodo de referência foi o Ag/AgCl saturado em KCl (comercial), adotado como padrão de referência para todos os potenciais relatados.
- Capítulo 5: empregou-se inicialmente o GE ($\varnothing$ 3,0 mm), que após o processo de anodização-redução passou a atuar como NPGE. O CE consistiu em uma placa de platina, e o eletrodo de referência permaneceu o mesmo do Capítulo 4.

Essa padronização de configuração permitiu uma comparação justa entre os sistemas, garantindo que as diferenças observadas nas respostas eletroquímicas fossem atribuídas às características intrínsecas dos eletrodos e não a variações do arranjo experimental.

3.5 Pré-tratamento e modificação dos eletrodos

3.5.1 GCE e GE não modificados

O GCE foi submetido a um rigoroso protocolo de polimento manual, utilizando suspensões aquosas de alumina em granulometrias decrescentes (1,00; 0,50; 0,30 e 0,05 μ m, Micropolishing Material, Buehler Ltda). Esse procedimento promoveu a renovação da superfície, aumentando a área ativa e garantindo a reprodutibilidade dos experimentos. Após o polimento, o eletrodo foi lavado com água ultrapura e etanol, seguido de sonicação por 3 minutos, etapa fundamental para eliminar resíduos de alumina que poderiam comprometer a resposta voltamétrica[20].

O GE, por sua vez, foi ativado eletroquimicamente em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , aplicando-se 50 ciclos de CV entre 0,0 e +1,6 V vs. Ag/AgCl, com velocidade de varredura de

500 mV s⁻¹. Esse tratamento regenerou a superfície metálica, removendo contaminantes orgânicos e promovendo uma camada superficial mais limpa e reativa[65].

3.5.2 Preparação dos eletrodos de ouro nanoporoso (NPGE)

O pré-tratamento foi complementado pela etapa de anodização-redução, responsável por conferir ao GE a característica nanoporosa. Antes da modificação, o eletrodo foi polido com alumina em granulometrias de 0,05; 0,30; 1,00 e 3,00 µm, seguido de lavagem em água ultrapura.

O processo de anodização foi conduzido em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, aplicando-se varreduras de 0,00 a +2,00 V a uma velocidade de 20 mV s⁻¹, com manutenção em +2,00 V por períodos controlados. Em seguida, aplicou-se uma varredura reversa, promovendo a redução parcial da camada de óxidos[65].

A otimização desse processo foi realizada empiricamente: após cada intervalo de anodização, registrava-se a corrente de pico associada à oxidação da BAI, até que aumentos adicionais de tempo não resultassem em ganhos de sinal, indicando a saturação da modificação. Essa estratégia permitiu estabelecer o tempo ótimo de anodização para maximizar a sensibilidade do sensor. A estabilidade da modificação foi confirmada por CV, monitorando os picos de formação e redução de óxidos de ouro, característica essencial para assegurar a confiabilidade do NPGE em análises sucessivas.

3.6 Caracterizações físicas da superfície referentes ao Capítulo 5

Para complementar os dados eletroquímicos, foram realizadas análises físico-químicas da superfície dos NPGE:

- XPS: espectros obtidos em equipamento Specs PHOIBOS 100/150, com fonte de raios X Al K α (1486,6 eV). Foram analisadas as regiões do Au 4f, permitindo identificar estados de oxidação do ouro e confirmar a efetividade do processo de anodização-redução.
- AFM: imagens coletadas em NT-MDT NTEGRA SPECTRA em modo semicontato, com ponta de silício. Essa técnica possibilitou avaliar a evolução da rugosidade e topografia superficial em diferentes tempos de anodização.

- SEM: imagens obtidas em microscópio eletrônico de emissão de campo Jeol JSM-7100F, fornecendo evidências diretas da formação da porosidade na superfície do ouro e permitindo correlacionar morfologia com desempenho eletroquímico.

Essas caracterizações reforçaram a compreensão da estrutura superficial dos NPGE, confirmando que as modificações eletroquímicas foram responsáveis pelas melhorias observadas na resposta analítica.

3.7 Curvas de calibração e parâmetros analíticos

Em ambas as etapas do estudo, as curvas de calibração foram elaboradas a partir de soluções padrão de BAI em concentrações crescentes, sempre analisadas em triplicata para assegurar reprodutibilidade estatística.

- Capítulo 4: utilizou-se solução estoque de BAI 0,01 mol L⁻¹, com calibração por adição de padrão (GE) e externa (GCE). A precisão foi avaliada em regimes intra-dia (cinco repetições) e inter-dia (15 medições ao longo de cinco dias consecutivos).
- Capítulo 5: as curvas foram obtidas com solução estoque de BAI 0,10 mol L⁻¹, diluída conforme necessário. As condições otimizadas de DPAdSV (Edeposição = -0,25 V; tdeposição = 50 s) foram empregadas, assegurando maior sensibilidade. Também se avaliaram seletividade mediante adição de interferentes (dopamina, glicose e melatonina), em proporção de 5:1 em relação à concentração de BAI.

3.8 Critérios comuns de validação

Os LOD e LOQ foram calculados segundo recomendações da IUPAC[99], como observado na equação a seguir:

$$LOD = \frac{3S_{blank}}{slope}; LOQ = 3 LOD$$

Onde S_{blank} corresponde ao desvio padrão da corrente medida nos brancos e $slope$ representa a inclinação da curva de calibração.

A repetibilidade foi avaliada por meio de cinco medidas consecutivas sob condições idênticas, e expressa em termos de desvio padrão relativo (%RSD) como observado na equação a seguir:

$$\%RSD = S. \frac{100}{x}$$

3.9 Aplicação analítica em matrizes complexas

3.9.1 Plasma e soro simulado

O que se refere ao capítulo 4, a primeira avaliação da aplicabilidade dos métodos propostos foi realizada em plasma humano comercial (Sigma-Aldrich) e em soro simulado, preparados segundo metodologias descritas na literatura[100][101]. As amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de BAI, permitindo avaliar o efeito de matriz e a exatidão dos métodos.

As análises foram realizadas tanto por voltametria quanto por espectrofotometria de absorção molecular, em espectrofotômetro KASVI K37, empregando cubetas de 1 cm e comprimento de onda de 274 nm. As curvas de calibração foram obtidas na faixa de 0,8 a 1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, em triplicata. A concordância entre os métodos foi validada por meio de teste t de Student, confirmando a confiabilidade dos resultados obtidos[102].

3.9.2 Plasma e urina sintética

O que se refere ao capítulo 5, ampliou-se a avaliação para plasma comercial e urina sintética, a fim de demonstrar a robustez do método desenvolvido com NPGE frente a matrizes ainda mais desafiadoras.

A urina sintética foi preparada conforme protocolo descrito na literatura [34], com a seguinte composição: 0,06 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g de KCl, 0,07 g de KH_2PO_4 , 0,15 g de NaCl, 0,11 g de Na_2SO_4 , 0,05 g de NH_4Cl e 1,25 g de ureia, dissolvidos em água ultrapura e ajustados para 50,00 mL em balão volumétrico[103].

As amostras fortificadas com BAI foram analisadas por voltametria e, paralelamente, por espectrofotometria UV-Vis. As curvas de calibração foram estabelecidas pelo método de adição de padrão em três níveis distintos de concentração dentro da faixa linear de resposta. A confiabilidade dos resultados foi novamente assegurada por teste t de Student, evidenciando concordância entre os métodos e confirmando a aplicabilidade do NPGE como plataforma analítica promissora para matrizes biológicas.

3.10 Métodos Computacionais

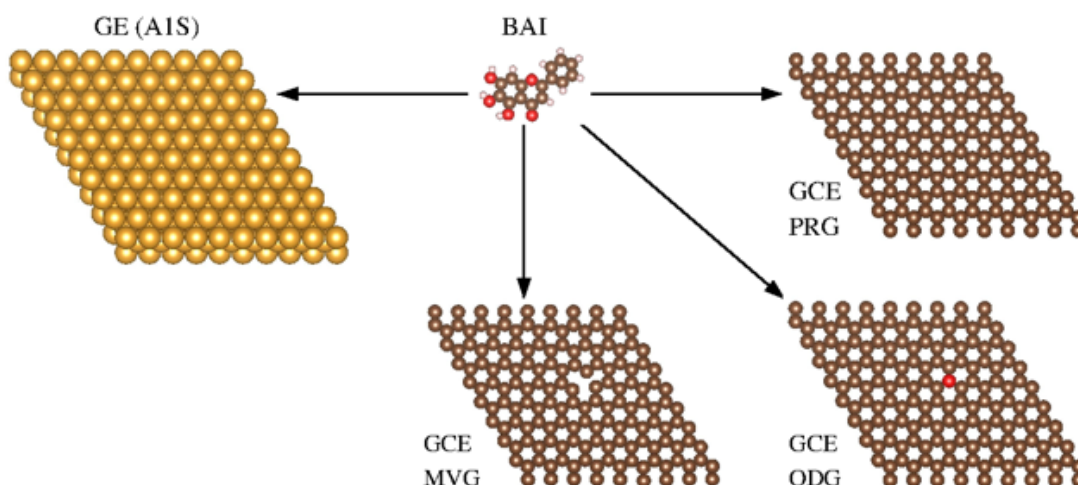
O emprego de métodos computacionais neste trabalho não se limitou a um papel auxiliar, mas constituiu uma ferramenta essencial para aprofundar a compreensão dos fenômenos de adsorção e interação molecular da BAI em superfícies condutoras. Embora os experimentos eletroquímicos ofereçam respostas diretas e quantitativas, muitas vezes permanecem questões em aberto quanto aos mecanismos microscópicos que governam tais respostas. Assim, a modelagem teórica baseada em AIMD e em DFT permitiu investigar, em nível atômico, de como a molécula de BAI se organiza, interage e estabiliza em diferentes substratos.

Essa abordagem foi estruturada em duas etapas distintas, que acompanham a lógica da tese: no Capítulo 4, concentrou-se a análise em eletrodos convencionais, GCE e GE, para estabelecer os parâmetros de referência fundamentais. Já no Capítulo 5, a modelagem foi direcionada para os NPGes, permitindo compreender como modificações estruturais e morfológicas podem potencializar o desempenho eletroquímico observado experimentalmente.

3.10.1. Modelagem de GCE e GE não modificados

A etapa teórica associada ao Capítulo 4 buscou esclarecer os mecanismos de adsorção da BAI em eletrodos amplamente utilizados em eletroquímica: o GCE e GE. Apesar da reconhecida relevância experimental do GCE, sua natureza estrutural complexa torna difícil a representação direta por modelos computacionais. Nesse sentido, a literatura tem consolidado o uso de grafeno como substituto adequado, uma vez que o carbono vítreo é constituído majoritariamente por átomos de carbono hibridizados em sp^2 [104][105][106]. Para tornar a análise mais realista, três cenários distintos foram considerados: grafeno pristino (PRG), grafeno com defeitos de oxigênio (ODG) e grafeno com monovacância (MVG). Já para o GE, utilizou-se como modelo teórico a superfície de ouro mais estável, a Au(111), obtida a partir do corte da estrutura cúbica de face centrada (fcc) na direção[107], estão reunidos na figura 9.

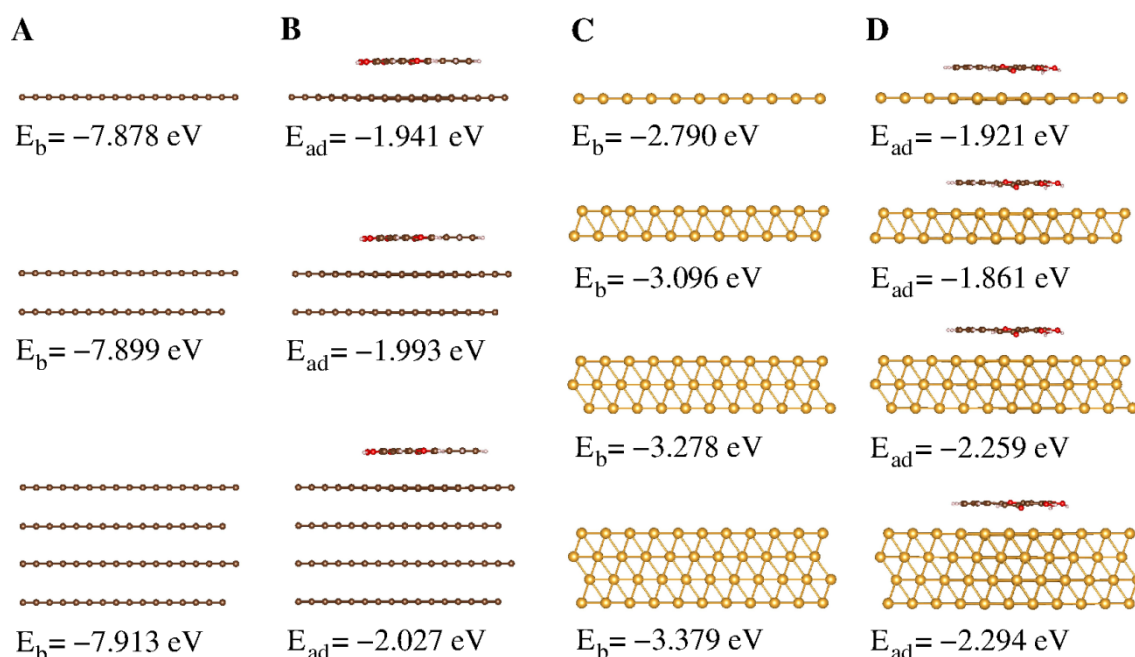
Figura 9 - Representação esquemática da molécula de BAI interagindo com diferentes substratos (PRG, ODG, MVG e Au(111)).



Fonte: Retirado da referência [63]

As diferenças energéticas e estruturais entre os substratos de carbono e ouro tornam-se mais claras quando se analisam as vistas laterais do grafeno e do grafite em múltiplas camadas, acompanhadas das respectivas energias de ligação (E_b). Também se observa o comportamento da energia de adsorção (E_{ad}) da BAI sobre essas superfícies carbonáceas e sobre o Au(111). Essas comparações, apresentadas na figura 10, oferecem suporte quantitativo para avaliar a afinidade e a estabilidade das interações.

Figura 10 - Comparação estrutural e energética entre superfícies de carbono e ouro: vistas laterais de grafeno/grafite, energias de ligação (E_b) e energias de adsorção (E_{ad}) da BAI em grafeno, grafite (2 e 4 camadas) e Au(111).



Fonte: Retirado da referência [63]

Para todas as simulações, uma molécula de BAI foi inserida por supercélula, explorando-se múltiplas orientações iniciais em relação ao substrato. O protocolo de AIMD envolveu uma etapa de termalização a 300 K, seguida de um recozimento simulado (300 a 0 K), permitindo que a molécula percorresse diferentes sítios de adsorção antes de se estabilizar na configuração mais favorável. Os instantâneos obtidos ao longo dessas simulações foram posteriormente refinados por cálculos de DFT, assegurando maior precisão nos parâmetros geométricos e energéticos.

Os cálculos foram realizados utilizando o funcional de troca de correlação (PBE) com correção de dispersão D3[108][109][110][111][112], método de onda aumentada por projeções (PAW) implementado no pacote VASP[113][114], energia de corte de 450 eV e malha k de 4x4x1. A convergência geométrica foi alcançada quando as forças residuais ficaram abaixo de 0,015 eV/Å, garantindo confiabilidade nos resultados obtidos.

3.10.2. Modelagem de Eletrodos de Ouro Nanoporoso (NPGE)

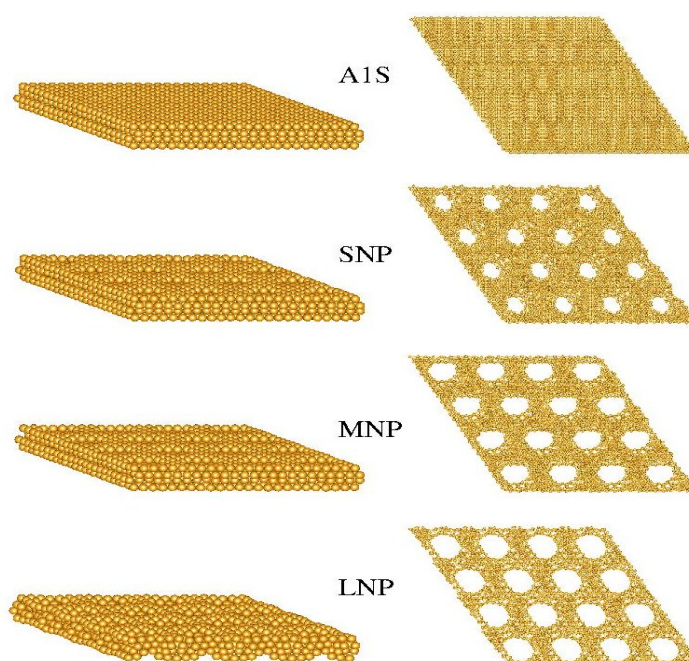
Com base nos avanços obtidos no Capítulo 4, a etapa subsequente buscou aprofundar a investigação no contexto dos NPGEs, cuja relevância experimental ficou evidenciada pela

melhoria significativa na sensibilidade e seletividade da detecção da BAI. A modelagem do NPGE exigiu a introdução de maior complexidade estrutural, refletindo os diferentes ambientes de adsorção presentes em sua superfície.

O ponto de partida foi novamente a superfície Au(111) (A1S)[106][107], já consolidada como referência. A partir dela, geraram-se três modelos distintos de porosidade: pequena (SNP $\sim 0,8$ nm), média (MNP $\sim 1,0$ nm) e grande (LNP $\sim 1,2$ nm)[107]. Essa estratégia permitiu explorar como diferentes diâmetros de poros influenciam a acomodação da BAI e sua Ead.

A construção dos modelos de ouro nanoporoso envolveu uma sequência metodológica cuidadosamente delineada, que incluiu desde a definição do número de camadas do slab até os testes de recozimento simulado (SA)[106]. O resultado desse processo levou à obtenção de quatro configurações distintas (A1S, SNP, MNP e LNP), cuja representação gráfica pode ser observada na figura 11, juntamente com o fluxograma de construção e exemplos de variação de temperatura durante o SA.

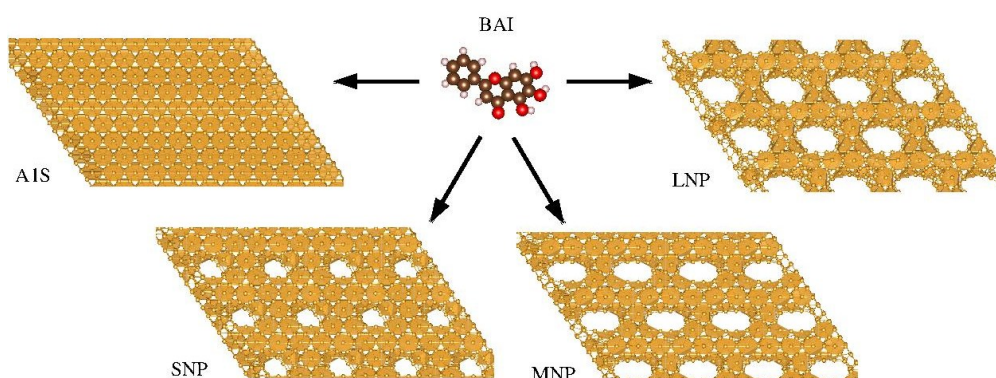
Figura 11 - Construção dos modelos de ouro nanoporoso: fluxograma metodológico, testes para determinar número de camadas, exemplo de processo SA e representações dos substratos finais (A1S, SNP, MNP e LNP).



Fonte: Retirado da referência [98]

O processo de adsorção da BAI em superfícies de ouro nanoporoso pode ser entendido a partir da análise das diferentes orientações testadas em supercélulas contendo os modelos A1S, SNP, MNP e LNP. A dinâmica de estabilização da molécula nos sítios de menor energia, explorados durante o recozimento simulado, é ilustrada na figura 12, que também traz o fluxograma do protocolo de adsorção e exemplos da evolução de temperatura ao longo da simulação[106][107].

Figura 12 - Esquema da adsorção da BAI em diferentes substratos de ouro (A1S, SNP, MNP e LNP).



Fonte: Retirado da referência [98]

Os cálculos de DFT seguiram as mesmas diretrizes já descritas: funcional PBE com correção D3[108][109][110][111][112], método PAW[113][115][116][114], energia de corte de 450 eV, malha k de 4x4x1 e critério de convergência energética de 10^{-6} eV. As simulações SA tiveram duração de aproximadamente 10 ps, com passo temporal de 1 fs, gerando instantâneos otimizados posteriormente.

Em síntese, a metodologia computacional foi estruturada de forma a garantir consistência e comparabilidade entre os diferentes sistemas investigados. O uso de modelos baseados em grafeno para o GCE, de superfícies Au(111) para o GE e de configurações com diferentes graus de porosidade para o NPGE permitiu representar adequadamente a diversidade de substratos estudados. A aplicação integrada de AIMD e DFT, aliada a protocolos padronizados de construção, simulação e otimização, assegurou a reprodutibilidade dos cálculos e a obtenção de parâmetros confiáveis. Dessa forma, esta etapa metodológica estabelece um elo claro com os procedimentos experimentais, preparando o terreno para a análise crítica desenvolvida nos capítulos seguintes.

4. CAPÍTULO 4 – Estudos eletroquímicos, teóricos e analíticos da baicaleína em eletrodos de carbono vítreo e ouro

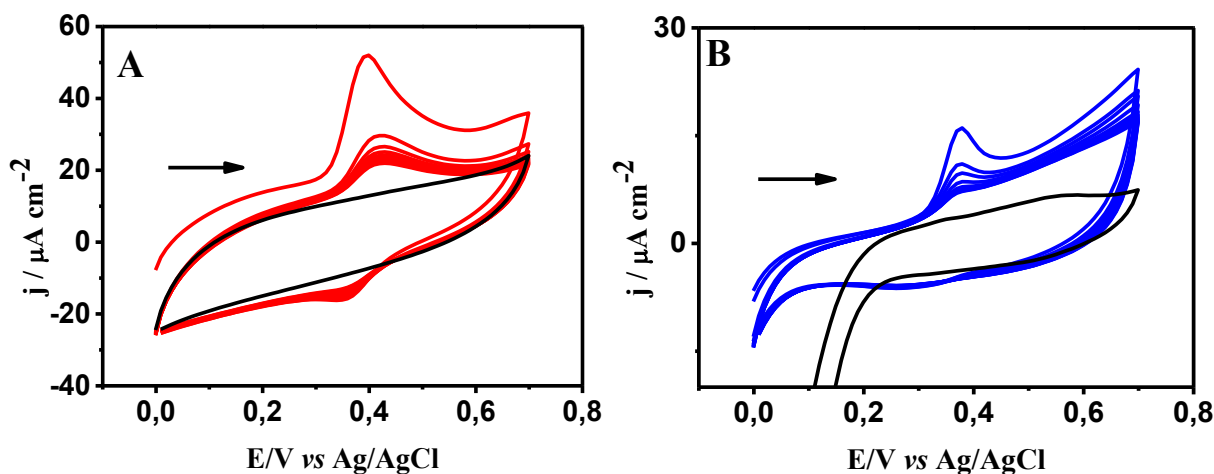
Este capítulo aborda a investigação integrada do comportamento eletroquímico e teórico da BAI em solução aquosa, utilizando GCE e GE em suas formas não modificadas. A partir das técnicas voltamétricas, foi possível caracterizar os processos de oxirredução da molécula em diferentes condições experimentais, enquanto as simulações computacionais permitiram explorar, em escala atômica, os modos de adsorção e estabilização da BAI sobre as superfícies condutoras. A correlação entre os resultados obtidos experimentalmente e os modelos teóricos estabeleceu bases sólidas para a interpretação dos fenômenos observados, além de sustentar a aplicação da abordagem eletroanalítica proposta por meio da construção de curvas de calibração para detecção da BAI.

4.1. Comportamento eletroquímico comparativo da baicaleína em eletrodos de carbono vítreo e ouro

O primeiro passo desta investigação concentrou-se na determinação do comportamento eletroquímico da BAI utilizando dois eletrodos não modificados de uso consagrado em eletroquímica: o GCE e GE. O estudo comparativo nesses substratos teve como finalidade compreender como as propriedades intrínsecas de cada material, tais como área ativa, natureza da superfície e condutividade, influenciam a resposta redox da molécula. Dessa forma, buscou-se estabelecer parâmetros iniciais de referência que permitissem interpretar com maior clareza os fenômenos observados e fundamentar as etapas posteriores desta tese.

O comportamento eletroquímico da BAI foi investigado por meio de CV, sendo os dados obtidos na presença de $12,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI, abrangendo a faixa de potencial de 0,0 a +0,7 V (varredura reversa) versus Ag/AgCl, com taxa de varredura de 50 mV s^{-1} , conforme ilustrado nas figuras 13A e B. Para ambos os eletrodos, observou-se dois processos eletroquímicos análogos, ocorrendo aproximadamente em +0,39 V para o GCE e +0,37 V para o GE. Não foi detectada a presença de outros compostos eletroativos ao longo de toda a faixa analisada, indicando que a BAI apresenta um comportamento de oxidação bem definido nesses substratos.

Figura 13 - CV para $12,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI utilizando A) GCE (linha vermelha) e B) GE (linha azul). A linha preta refere-se ao eletrólito suporte. Condições experimentais: eletrólito suporte BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0). Taxa de varredura: 50 mV s^{-1} .



Fonte: Retirado da referência [63]

Os resultados sugerem que o processo de oxidação da BAI pode ser favorecido pela interação do analito com a superfície do GCE, facilitando taxas mais elevadas de transferência de elétrons. Esse efeito pode ser atribuído às interações intermoleculares π - π entre os anéis aromáticos da BAI e os átomos de carbono sp^2 presentes no substrato, cuja morfologia é altamente complexa e capaz de promover uma maior estabilidade e orientação das moléculas sobre a superfície [59][106][108]. Tal fenômeno evidencia a importância das características estruturais e eletrônicas do substrato na determinação da resposta eletroquímica da molécula, reforçando a necessidade de compreender as interações analito-substrato antes de avançar para sistemas modificados ou funcionalizados.

Diante do caráter bem definido do processo de oxidação da BAI em ambos os eletrodos, estudos subsequentes foram conduzidos para explorar os aspectos mecanísticos intrínsecos dessas interações, com foco em entender como as propriedades da superfície do eletrodo influenciam a transferência de elétrons e, consequentemente, a intensidade e a forma dos sinais voltamétricos.

4.2. Avaliação teórica de eletrodos à base de ouro e carbono

A avaliação teórica teve como objetivo compreender, de maneira aprofundada, as interações entre a molécula de BAI e diferentes substratos eletroquímicos de carbono e ouro, fornecendo subsídios para a interpretação dos resultados experimentais. O estudo iniciou-se

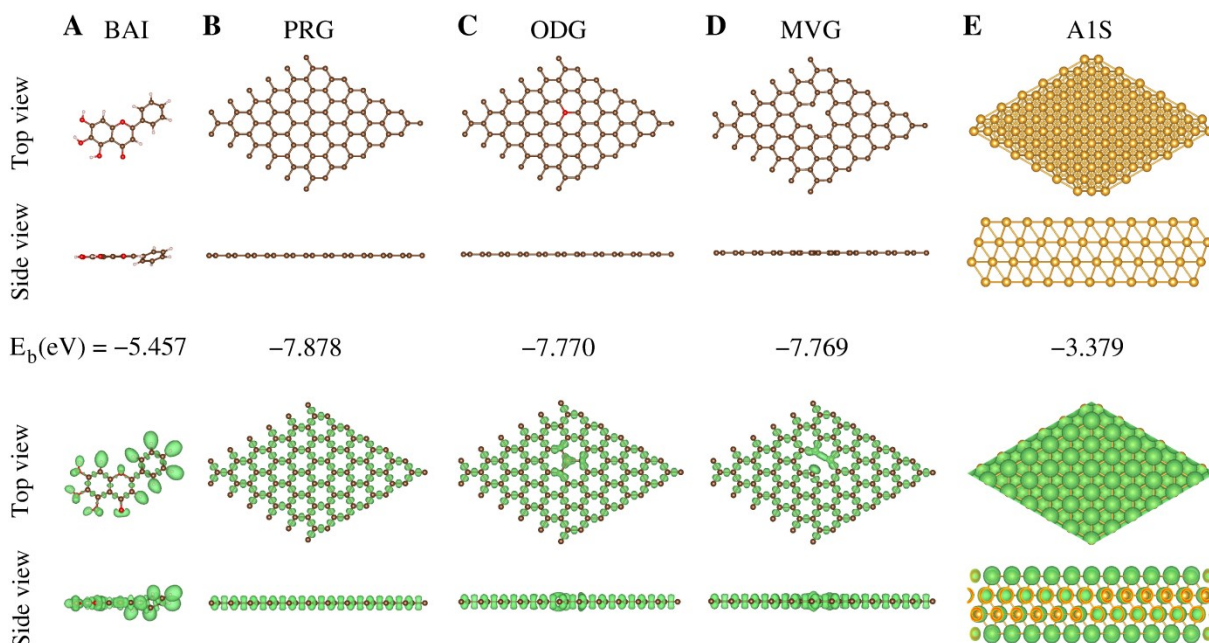
caracterizando as propriedades individuais de cada sistema antes do processo de adsorção molecular, considerando a estabilidade estrutural, a distribuição eletrônica e a reatividade dos materiais. Foram analisados a molécula de BAI, os substratos de carbono, PRG, ODG e MVG, e de ouro AIS, sendo todas as análises acompanhadas das funções de localização eletrônica (ELF), apresentadas na figura 14. A caracterização inicial é fundamental para entender como as diferenças estruturais e eletrônicas influenciam o comportamento da BAI quando em contato com os diferentes substratos.

4.2.1 Analito e substratos

A molécula de BAI apresentou constituição não magnética e energia de ligação de $-5,457$ eV/átomo, indicando estabilidade energética favorável à sua formação. Os comprimentos de ligação e os modos vibracionais da molécula concordaram de forma satisfatória com resultados teóricos previamente reportados[117], incluindo bandas associadas às ligações duplas. Essa estabilidade intrínseca garante que alterações observadas na interação com os substratos possam ser atribuídas às propriedades da superfície do eletrodo e não a instabilidades moleculares.

Entre os substratos de carbono, as energias de ligação foram $-7,878$ eV para PRG, $-7,770$ eV para ODG e $-7,769$ eV para MVG, evidenciando estabilidade energética para todos os casos. O PRG apresentou leve preferência estatística, sugerindo maior probabilidade de ocorrência em superfícies de carbono vítreo, embora as pequenas diferenças de energia entre PRG, ODG e MVG indiquem que defeitos pontuais, dopagens ou vacâncias podem surgir com relativa facilidade. O PRG é um grafeno monolayer plano e não magnético, com átomos dispostos em rede hexagonal bidimensional, parâmetro de rede de $2,461$ Å, coordenação exata de 3 para todos os átomos de C e comprimento médio de ligação C–C de $1,421$ Å, em concordância com a literatura[20][118][119].

Figura 14 - Visões superior e lateral de A) BAI e sua função de localização eletrônica (ELF) com isossuperfície (iso) igual a 0,65, B) PRG e sua ELF (iso = 0,50), C) ODG e sua ELF (iso = 0,50), D) MVG e sua ELF (iso = 0,50) e E) A1S e sua ELF (iso = 0,15). Também é mostrada a energia de ligação (E_b) para cada sistema. Os átomos de H, C, O e Au são representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja claro, respectivamente, enquanto a isossuperfície da ELF é representada pela cor verde.



Fonte: Retirado da referência [63]

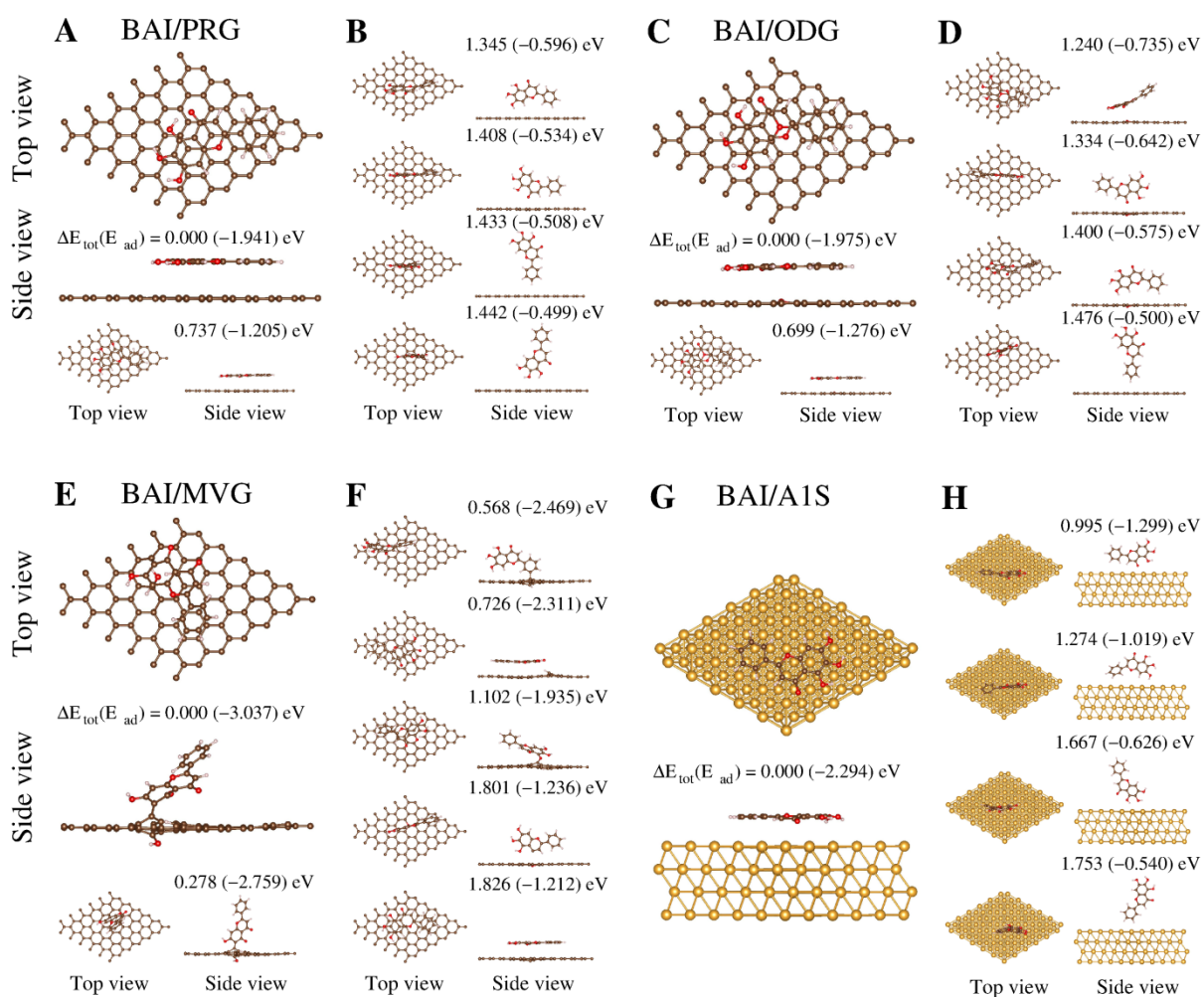
O substrato MVG resulta da remoção de um átomo de carbono do PRG, o que aumenta sua reatividade devido a ligações pendentes insaturadas. A configuração mais estável de MVG (figura 14) apresenta redução de simetria, com um comprimento C–C de 1,98 Å menor que os demais (2,55 Å), e momento magnético total de 1,5 μB , indicando ruptura da simetria dos elétrons π . A energia de formação da monovacância foi de 7,707 eV, em acordo com resultados teóricos e experimentais[20][120]. O substrato ODG, derivado do MVG, incorpora oxigênio em substituição ao carbono removido, resultando em menor reatividade e energia de dopagem de -7,819 eV, com ligações C–O de 1,484 Å.

O substrato de ouro A1S foi obtido a partir do corte do ouro fcc na direção (111), apresentando energia de ligação de -3,379 e V/átomo e comprimento médio Au–Au de 2,91 Å. A análise do espaçamento intercamadas revelou relaxamento interno, com contrações para 2,375 Å e 2,426 Å entre camadas internas e externas, respectivamente, em consonância com valores de função trabalho e energia superficial reportados na literatura[121][122].

4.2.2 Interação analito-substrato: energia total relativa

Embora o número de ambientes químicos considerados seja limitado, cada sistema analito-substrato apresenta uma vasta gama de possíveis modos de interação. Utilizando nossa estratégia baseada na exploração das superfícies de energia potencial (PES) derivadas de AIMD, foi possível identificar um conjunto de configurações mais prováveis para cada sistema. Algumas das conformações mais estáveis estão apresentadas na figura 15, juntamente com os respectivos valores de energia total relativa, definidos como $\Delta E_{tot} = E_{tot}^i - E_{tot}^{mais\ baixa}$, onde E_{tot}^i é a energia total da configuração i e $E_{tot}^{mais\ baixa}$ é a energia da configuração de menor energia, representando a conformação mais estável.

Figura 15 - Visões superior e lateral de algumas das conformações mais representativas: as configurações de menor energia e suas variações para A) BAI/PGR, C) BAI/ODG, E) BAI/MVG e G) BAI/A1S; e as configurações de maior energia B) BAI/PGR, D) BAI/ODG, F) BAI/MVG e H) BAI/A1S. Também são mostradas a energia total relativa (ΔE_{tot}) em relação à conformação de menor energia (0,000 eV) para cada conjunto e a E_{ad} para cada configuração. Os átomos de H, C, O e Au são representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja claro, respectivamente.



Fonte: Retirado da referência [63]

Para o sistema BAI/PRG, observou-se que a molécula de BAI tende a interagir de forma horizontal e paralela ao substrato, de modo a maximizar a área de contato entre molécula e superfície. A segunda configuração mais estável difere apenas por um pequeno deslocamento da BAI, tentando alinhar os hexágonos da molécula com os do substrato. Configurações nas quais os hexágonos da molécula e do substrato estão perpendiculares apresentam menor estabilidade, refletindo a redução da área de contato superficial e a consequente diminuição da interação energética. Já no caso do BAI/ODG, a presença do átomo de oxigênio substitucional no local da vacância reduz a reatividade do substrato; ainda assim, a conformação mais estável mantém a interação horizontal e paralela, similar ao comportamento observado em BAI/PRG.

O cenário muda drasticamente para o sistema BAI/MVG, onde a presença de uma vacância única no substrato aumenta significativamente sua reatividade. Isso provoca interações mais intensas entre a molécula e o substrato, chegando a induzir dissociação parcial da BAI. Na conformação de menor energia, cada um dos três átomos de carbono de baixa coordenação da vacância desempenha um papel específico: um átomo captura um grupo –OH da BAI, outro átomo captura um hidrogênio proveniente de outro grupo funcional da molécula, e o terceiro estabelece uma ligação C–C com o fragmento dissociado da BAI. Configurações de energia mais elevada incluem interações inclinadas, laterais e verticais, demonstrando diferentes graus de dissociação molecular e reorganização estrutural do sistema.

No caso do BAI/A1S, a molécula se posiciona paralela à superfície de ouro na conformação de menor energia, garantindo a máxima cobertura da superfície metálica. Configurações de maior energia mostram orientações perpendiculares ou inclinadas da molécula, sendo que a interação via átomos de oxigênio da BAI é energeticamente mais favorável, reforçando a importância da polaridade do analito na estabilização sobre superfícies metálicas nobres.

4.2.3 Interação analito-substrato: propriedades de adsorção

Para caracterizar de forma detalhada as conformações de menor energia, foram calculadas diversas propriedades associadas à adsorção: energia de adsorção (E_{ad}), menor distância entre a BAI e o substrato ($d_{\min}^{\text{BAI-sub}}$), desvio relativo dos comprimentos médios de ligação lengths ($\Delta d_{\text{av}}^{\text{BAI}}$ and $\Delta d_{\text{av}}^{\text{sub}}$), carga efetiva de Bader da BAI (q^{BAI}) e do substrato (q^{sub}), e momento magnético total (m_T), conforme apresentado na tabela 2.

Sistemas	E_{ad} (eV)	E_{int} (eV)	E_{dist}^{BAI} (eV)	E_{dist}^{sub} (eV)	$d_{min}^{BAI-sub}$ (Å)	Δd_{av}^{BAI} (%)	Δd_{av}^{sub} (%)	q^{BAI} (e)	q^{sub} (e)	m_T (μ_B)
BAI/PRG	-1,941	-1,176	-0,771	0,006	3,227	0,522	0,007	-0,010	0,010	0
BAI/ODG	-1,975	-1,208	-0,767	0,000	3,389	0,522	0,028	-0,006	0,006	0
BAI/MVG	$\approx -3,037$	$\approx -14,658$	$\approx 9,210$	2,410	-	-	-	-0,626	0,626	0
BAI/A1S	-2,294	-2,447	0,167	-0,014	2,633	0,094	0,065	-0,079	0,079	0

Fonte: Retirado da referência [63]

Tabela 2 - Propriedades de adsorção para as conformações de menor energia BAI/PRG, BAI/ODG, BAI/MVG e BAI/A1S: energia de adsorção (E_{ad}), energia de interação (E_{int}), energias de distorção (E_{dist}^{BAI} and E_{dist}^{sub}), menores distâncias de ligação entre BAI e os substratos ($d_{min}^{BAI-sub}$), desvio relativo para as distâncias médias de ligação (Δd_{av}^{BAI} and Δd_{av}^{sub}), cargas efetivas de Bader (q^{BAI} and q^{sub}), e momentos magnéticos totais (m_T).

Os valores de energia de adsorção confirmam os resultados experimentais, mostrando que a interação da BAI com os substratos, sejam de carbono ou de ouro, é energeticamente favorável. Dois comportamentos principais podem ser destacados: (i) em superfícies de carbono pristinas (BAI/PRG) ou dopadas com oxigênio (BAI/ODG), ocorre físico-adsorção, caracterizada pela orientação horizontal e paralela da molécula em relação ao substrato; (ii) em regiões com vacâncias (BAI/MVG), ocorre quimissorção, marcada por forte interação, dissociação parcial da molécula e possível alteração estrutural do substrato.

As energias de adsorção das conformações mais estáveis foram de $-1,941$ eV para BAI/PRG, $-1,975$ eV para BAI/ODG, $-2,294$ eV para BAI/A1S e $-3,307$ eV para BAI/MVG. Esses valores indicam que, exceto para o caso do BAI/MVG, a interação é predominantemente de natureza dispersiva. As menores distâncias entre a molécula e o substrato foram $3,227$ Å e $3,389$ Å para BAI/PRG e BAI/ODG, respectivamente, e $2,633$ Å para BAI/A1S, demonstrando a planarização da molécula de BAI como um fator-chave para maximizar a área de contato e a estabilização energética.

Nos sistemas de físico-adsorção, não há transferência significativa de carga entre a molécula e o substrato, e o momento magnético total permanece nulo. Já no caso de BAI/MVG, ocorre transferência de carga de $0,626$ e do substrato para a molécula, associada à dissociação molecular e à formação de novas ligações químicas. Além disso, o momento magnético total do sistema é completamente suprimido, refletindo a reorganização eletrônica provocada pelas

ligações com os átomos de carbono de baixa coordenação da vacância e pelos grupos funcionais da BAI.

A análise teórica das interações entre a BAI e os substratos de carbono e ouro revelou como diferenças estruturais e eletrônicas modulam a estabilidade molecular, a transferência de carga e a orientação sobre a superfície. Observou-se que, enquanto superfícies planas e não defeituosas favorecem a físico-adsorção e a manutenção da planaridade da molécula, substratos com vacâncias ou dopagens promovem interações mais intensas, incluindo quimissorção e reorganização molecular. Esses achados fornecem um referencial direto para interpretar os dados experimentais de voltametria cíclica, nos quais a BAI apresentou processos de oxidação bem definidos, próximos de +0,39 V no GCE e +0,37 V no GE (Figura 13), confirmando a influência das propriedades intrínsecas do substrato sobre a resposta redox. Assim, a integração entre simulações teóricas e resultados experimentais permite compreender de forma abrangente o comportamento eletroquímico da molécula, oferecendo base sólida para investigações subsequentes envolvendo eletrodos modificados ou funcionalizados, e delineando o caminho para a exploração detalhada de mecanismos de transferência de elétrons e interações analito-substrato em sistemas mais complexos.

1.8. 4.3 Visão Experimental

Após a avaliação detalhada dos aspectos mecanísticos intrínsecos das interações entre o analito e o substrato, torna-se fundamental correlacionar essas evidências com os resultados experimentais obtidos. A abordagem experimental não apenas valida as previsões teóricas, como também fornece informações complementares sobre o comportamento eletroquímico da BAI em diferentes condições. Assim, os dados apresentados a seguir abordam a influência de parâmetros experimentais cruciais, como o sistema solvente-eletrólito de suporte, que desempenha papel central na estabilização da molécula e na modulação dos processos de oxidação e transferência eletrônica.

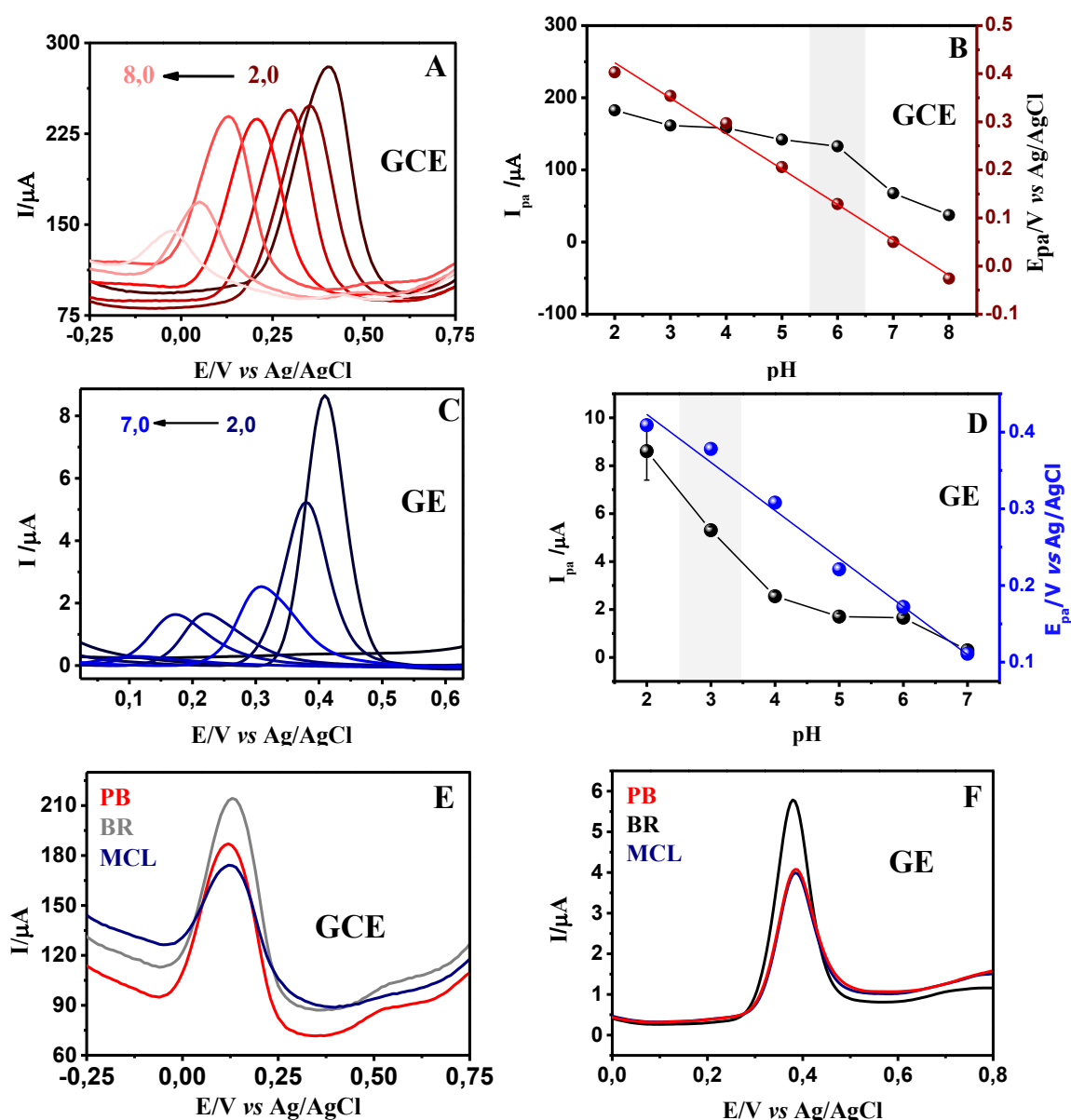
4.3.1 Influência do sistema eletrolítico de suporte ao solvente

O sistema formado pelo solvente e eletrólito de suporte pode influenciar significativamente os processos de transporte de massa, as reações eletroquímicas e os mecanismos químicos acoplados. A fim de avaliar a influência do solvente na mobilidade de

prótons e no comportamento eletroquímico da BAI, investigou-se sua resposta eletroquímica em tampão BR, em uma ampla faixa de valores de pH.

Os voltamogramas obtidos por DPV para a BAI ($25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando GCE são apresentados na figura 16A. Observa-se que a corrente de pico anódico diminui com o aumento do pH, no intervalo de 2,0 a 8,0. Além disso, o potencial de oxidação da BAI (E_{pa}) desloca-se para valores menos positivos à medida que o pH aumenta, atingindo aproximadamente $-0,025 \text{ V}$ em pH 8,0. Nota-se que, em pH 2,0, a cinética de transferência eletrônica é favorecida.

Figura 16 - A) DPV do GCE na presença de BAI em diferentes valores de pH de 2,0 a 8,0; B) intensidade de corrente de pico e potencial de pico em função do valor de pH para o GCE; C) DPV do GE na presença de BAI em diferentes valores de pH de 2,0 a 8,0; D) intensidade de corrente de pico e potencial de pico em função do valor de pH para o GE; E) DPV utilizando tampões PB, BR e McIlvaine no GCE; F) DPV utilizando tampões PB, BR e McIlvaine no GE.



Fonte: Retirado da referência [63]

Para melhor compreender esse comportamento, a figura 16B apresenta as relações entre E_{pa} e pH. A variação do potencial de oxidação com o pH pode ser descrita pela equação $E(V) = -0.074 \pm 0.003 \text{ pH} + 0.57 \pm 0.01$ ($R^2 = 0.9924$). Apesar do coeficiente angular de $-0,074 \text{ V pH}^{-1}$ ser próximo ao valor previsto pela equação de Nernst ($-0,059 \text{ V pH}^{-1}$), essa comparação deve ser feita com cautela, uma vez que o sistema estudado apresenta comportamento irreversível. Nesse contexto, o deslocamento do potencial de oxidação com o pH indica a participação de prótons no processo redox, mas não permite estabelecer com precisão a proporção entre o número de prótons e elétrons envolvidos na reação. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores com sistemas irreversíveis[2][27][123]

A mesma abordagem foi aplicada ao GE, com a BAI na concentração de $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH (figura 16C). O GE apresentou comportamento análogo ao GCE, com redução da corrente de pico e deslocamento do E_{pa} para valores menos positivos com o aumento do pH. A figura 16D mostra a relação entre E_{pa} e pH em pH ácido, descrita pela equação $E/V = -0.063 \pm 0.003 \text{ pH} + 0.55 \pm 0.02$ ($R^2=0.9854$).

Novamente, embora o coeficiente angular esteja próximo do valor teórico de Nernst, a irreversibilidade do processo impede a conclusão sobre a estequiometria exata dos prótons e elétrons. Ainda assim, os resultados indicam que o meio levemente ácido favorece a oxidação da BAI.

A fim de explorar a influência do eletrólito de suporte na resposta eletroquímica da BAI, diferentes sistemas tampão como o fosfato (PB), McIlvaine e BR, foram avaliados, todos na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A escolha adequada do eletrólito de suporte é um fator decisivo na construção de métodos eletroanalíticos sensíveis, pois afeta diretamente a estabilidade do analito, o equilíbrio ácido-base no meio, a condutividade da solução e até mesmo as interações específicas com a superfície do eletrodo. Além disso, a natureza do tampão pode interferir na atividade de prótons e, conseqüentemente, na eficiência da transferência de carga durante o processo redox. A figura 16E apresenta os DPV obtidos com GCE em pH 6,0 para cada um dos tampões testados. Os resultados mostram que tanto o tampão fosfato quanto o BR promoveram respostas de corrente similares, com perfis de pico bem definidos. O tampão McIlvaine, embora útil em certas aplicações biológicas, apresentou menor intensidade de sinal, o que pode estar

relacionado à sua menor capacidade tamponante nessa faixa de pH ou à possível interação desfavorável com o analito. Diante disso, o tampão fosfato (PB) foi selecionado para os experimentos subsequentes com o GCE, principalmente por sua ampla aplicabilidade em amostras clínicas e fisiológicas, facilidade de preparação, boa estabilidade, baixo custo e compatibilidade com sistemas biológicos, o que favorece o futuro emprego do método em matrizes reais.

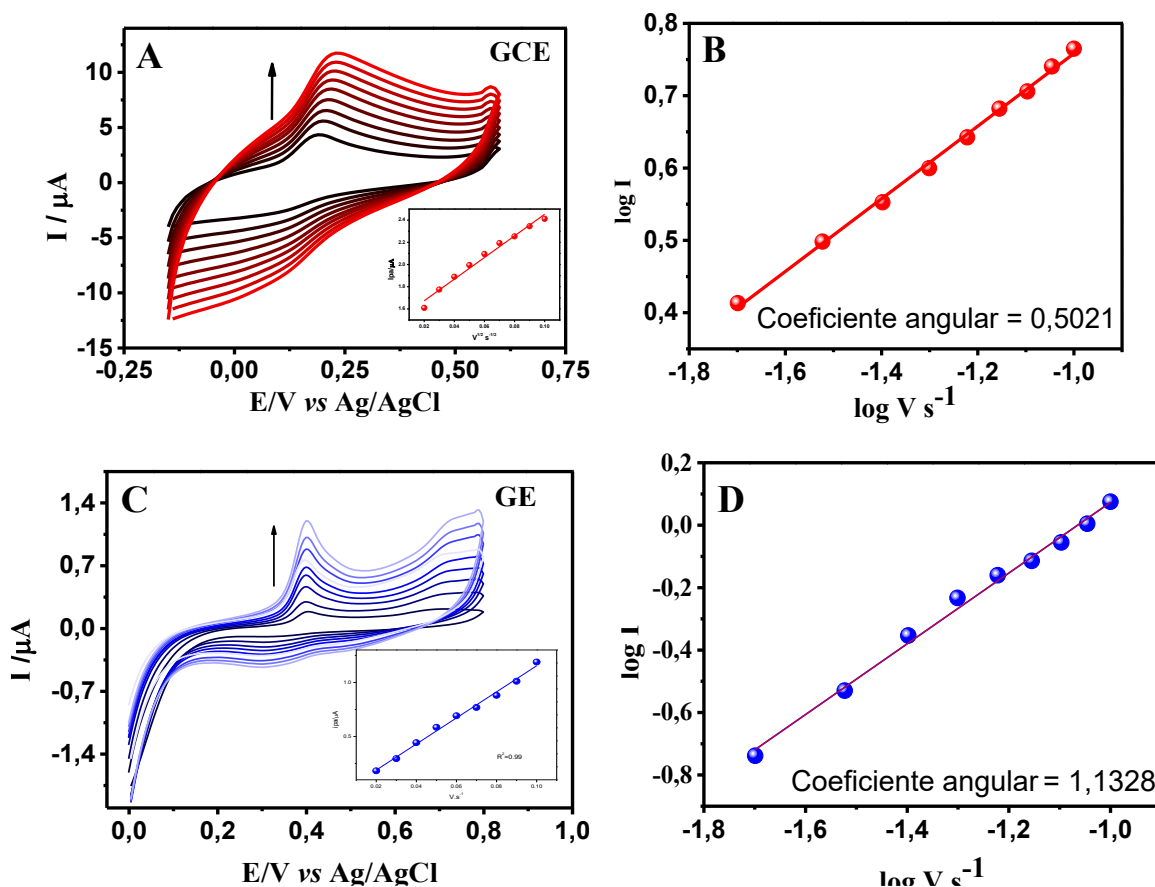
No caso do (GE), os voltamogramas obtidos (figura 16F) revelaram comportamento distinto. Observou-se um aumento expressivo na corrente de pico da BAI quando o tampão BR foi utilizado, em comparação com os demais eletrólitos. Este resultado pode estar associado à composição do tampão BR, que contém ácidos orgânicos (ácido acético, fosfórico e bórico), os quais podem interagir de maneira mais favorável com a superfície do GE, promovendo maior estabilização da espécie oxidada ou facilitando o processo de transferência eletrônica. Assim, o tampão BR foi escolhido como eletrólito de suporte ideal para as análises subsequentes envolvendo o GE.

Além da natureza do tampão, a força iônica da solução eletrolítica também desempenha papel fundamental na sensibilidade e reprodutibilidade da resposta voltamétrica. Para avaliar esse parâmetro, a concentração do eletrólito de suporte foi variada no intervalo de 0,05 a 0,15 mol L⁻¹, tanto para PB quanto para BR. A otimização revelou que a concentração de 0,075 mol L⁻¹ para o PB (em GCE) e de 0,10 mol L⁻¹ para o BR (em GE) forneceram as melhores respostas em termos de corrente de pico e definição do sinal analítico. Essas concentrações foram, portanto, utilizadas nas etapas experimentais subsequentes, garantindo equilíbrio entre condutividade, capacidade tamponante e sinal analítico ideal.

4.3.2 Influência da velocidade de varredura e dos processos eletroquímicos

A investigação da dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura (v) é uma ferramenta fundamental na caracterização de mecanismos eletroquímicos, permitindo diferenciar processos controlados por difusão daqueles regidos por adsorção, além de auxiliar na avaliação da reversibilidade da reação redox. Neste estudo, foram realizados experimentos de CV com velocidades variando de 20 a 100 mV s⁻¹ para o sistema BAI utilizando GCE e GE, conforme ilustrado na figura 17.

Figura 17 - A) CV do GCE em diferentes velocidades de varredura na presença de BAI. Inserto: relação linear entre I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura; B) relação linear entre $\log I$ e $\log V$ obtida para o GCE; C) CV do GE em diferentes velocidades varredura na presença de BAI. Inserto: relação linear entre I_{pa} e a velocidade de varredura; D) relação linear entre $\log I$ e $\log V$ obtida para o GE.



Fonte: Retirado da referência [63]

No GCE, observou-se um aumento progressivo da corrente de pico anódico (I_{pa}) com o aumento da velocidade de varredura. A plotagem de I_{pa} em função da raiz quadrada da velocidade ($v^{1/2}$) resultou em uma relação linear ($R^2 = 0,98$), conforme apresentado na Figura 17A. Tal comportamento é típico de processos governados por difusão linear do analito até a superfície do eletrodo, sugerindo que, neste substrato, a BAI não apresenta interação significativa com a interface eletrodo/solução e que seu transporte até a superfície ativa é o fator limitante do processo redox.

Além disso, foi verificado um deslocamento do potencial de pico de oxidação (E_{pa}) para valores mais positivos à medida que a velocidade de varredura aumentava, o que indica uma reação eletroquímica de caráter irreversível, conforme previsto pela teoria de Laviron para

sistemas onde a transferência eletrônica não ocorre de forma rápida o suficiente para manter o equilíbrio termodinâmico durante a varredura[124].

A relação entre o logaritmo da corrente de pico ($\log I_{pa}$) e o logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$), representada na Figura 17B, resultou em uma inclinação de $0,50 \pm 0,01$. Esse valor está em excelente concordância com o previsto teoricamente (0,5) para sistemas controlados por difusão, confirmando que a oxidação da BAI no GCE ocorre majoritariamente via transporte difusional, mesmo em condições irreversíveis[124]. Esse tipo de comportamento é desejável em sistemas analíticos, pois minimiza efeitos relacionados à saturação da superfície ou acúmulo de analito, proporcionando maior reprodutibilidade e linearidade na faixa de concentrações.

Por outro lado, quando a mesma determinação foi realizada com o eletrodo de grafite (GE), observou-se um comportamento distinto. Os voltamogramas obtidos (figura 17C) indicaram também um aumento linear da corrente de pico com o aumento da velocidade de varredura ($R^2 = 0,9930$). No entanto, a relação $\log I_{pa}$ vs. $\log v$ (figura 17D) apresentou uma inclinação de $1,13 \pm 0,03$, valor próximo ao limite teórico de 1,0, característico de processos eletroquímicos controlados por adsorção[124].

Esse resultado sugere que, no GE, a BAI interage fortemente com a superfície do eletrodo, possivelmente por meio de interações π - π entre os sistemas aromáticos da molécula e as estruturas gráficas presentes no substrato. Esse tipo de interação favorece a acumulação do analito na interface eletrodo/solução, promovendo uma maior sensibilidade do sinal voltamétrico, mas também requer cuidados adicionais quanto à reprodutibilidade e saturação de superfície. O caráter adsorptivo pode ser explorado estrategicamente em metodologias de pré-concentração, aumentando o limite de detecção em análises de traços.

Com o intuito de aprofundar a análise do mecanismo de transferência de carga da BAI no GCE, foi empregada a DPV utilizando pulsos de baixa amplitude[33]. A largura do pico à meia altura ($W_{1/2}$), uma vez que é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos, pode ser utilizada para estimar esse valor por meio da relação:

$$W_{1/2} = \frac{3,52 RT}{nF} \quad \text{ou} \quad W_{1/2} \approx \frac{90}{n} \quad (\text{a } 25^\circ \text{C})$$

No experimento realizado, o valor de $W_{1/2}$ obtido foi de 105 mV, o que indica que o processo de oxidação da BAI no GCE envolve aproximadamente um elétron ($n \approx 1$). Este resultado é coerente com estudos prévios envolvendo flavonoides fenólicos, nos quais a oxidação de um dos grupos hidroxila é o primeiro passo do processo eletroquímico, geralmente envolvendo apenas um elétron e um próton.

Considerando a natureza adsorviva do processo no GE, a equação de Laviron foi aplicada para determinar o número de elétrons envolvidos na oxidação da BAI. A equação de Laviron, para processos irreversíveis, prevê que o potencial de pico (E_p) varia linearmente com o logaritmo da velocidade de varredura (v), de acordo com a equação:

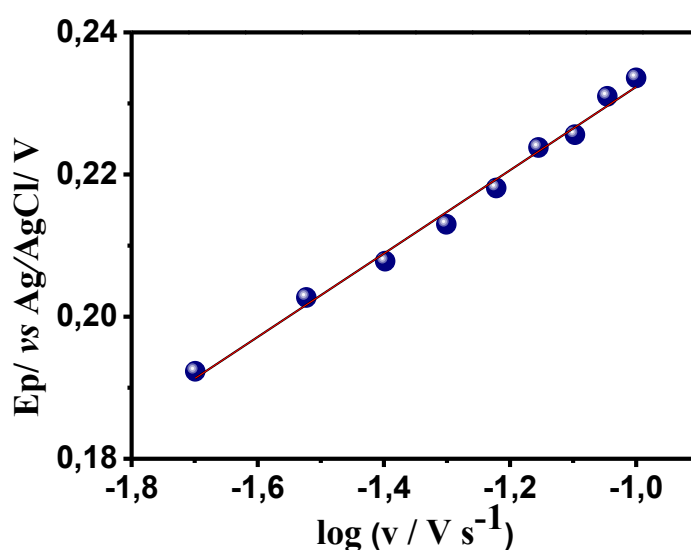
$$E_p = E^0 + \frac{2,303 RT}{\alpha n F} \cdot \log v$$

Onde E^0 é o potencial formal de redução, R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (298 K), α é o coeficiente de transferência eletrônica, n o número de elétrons transferidos e F a constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$).

Na Figura 18, essa relação foi representada e descrita pela equação:

$$E_p(V) = 0,111 \pm 0,002 \cdot \log v + 39,667 \pm 0,002$$

Figura 18 - Relação linear entre E_p e $\log v$ obtida para o GE na presença de BAI.



Fonte: Retirado da referência [63]

Assumindo um coeficiente de transferência $\alpha = 0,5$ o número de elétrons (n) envolvidos foi calculado como igual a 1, corroborando os resultados obtidos por DPV no GCE. Esses achados indicam que, mesmo em eletrodos com comportamento adsorptivo, a oxidação fundamental da BAI envolve apenas uma transferência eletrônica.

Os resultados destacam que a natureza do eletrodo influencia diretamente o regime de transporte e o comportamento redox da BAI. Enquanto o GCE proporciona um sistema predominantemente difusional, com resposta estável e adequada para análises quantitativas com mínima interferência de adsorção, o GE apresenta comportamento adsorptivo, vantajoso para métodos sensíveis baseados em acúmulo superficial, mas que requer maior controle experimental para evitar saturação ou histerese.

4.3.3 Desenvolvimento do método eletroanalítico

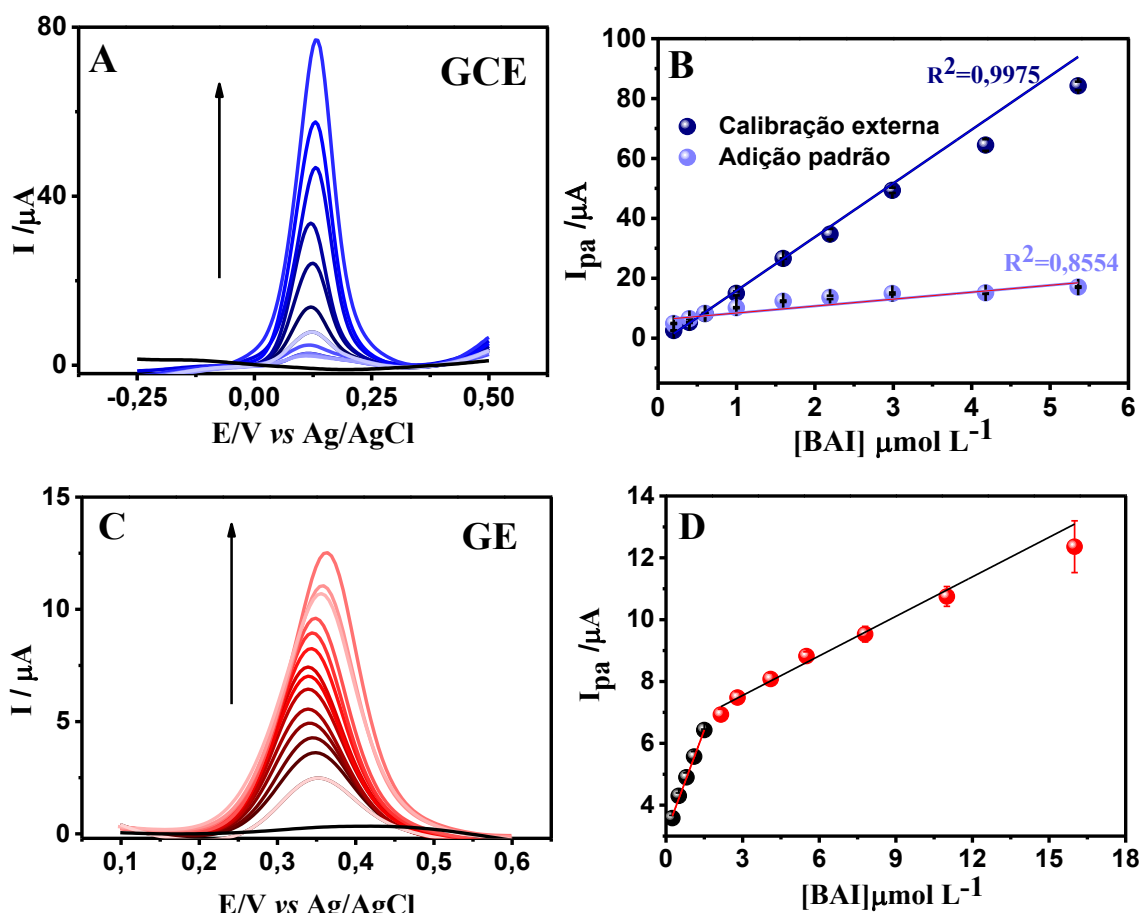
Para a determinação eletroquímica da BAI, foram avaliadas três técnicas voltamétricas: LSV, DPV e SWV. A LSV apresentou baixa resposta devido à elevada contribuição da corrente capacitiva, enquanto SWV e DPV forneceram picos mais bem definidos. A DPV destacou-se ao apresentar a maior intensidade de corrente de pico, sendo selecionada como técnica analítica para os estudos subsequentes.

A otimização dos parâmetros experimentais da DPV foi conduzida de forma sequencial para maximizar a sensibilidade, a definição do pico e a reprodutibilidade do sinal. Inicialmente, a velocidade de varredura foi avaliada na faixa de 0,01 a 0,1 V s⁻¹, mantendo o tempo de pulso e a amplitude de pulso constantes em 0,02 s e 0,05 V, respectivamente. Em seguida, com a velocidade de varredura otimizada, o tempo de pulso foi variado entre 0,01 e 0,08 s, permitindo selecionar o valor que forneceu melhor definição de pico e consistência nos resultados. Finalmente, com velocidade de varredura e tempo de pulso ajustados, a amplitude de pulso foi estudada na faixa de 0,01 a 0,10 V, garantindo máxima sensibilidade e estabilidade da corrente de pico.

No GCE, a combinação ideal encontrada foi velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, tempo de pulso de 0,02 s e amplitude de pulso de 80 mV, em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹ (pH 6,0). Para o GE, as condições otimizadas foram velocidade de varredura de 40 mV s⁻¹, tempo de pulso de 0,01 s e amplitude de pulso de 90 mV, em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,0), selecionadas com base em ensaios preliminares e literatura, garantindo adequada intensidade de corrente e definição de pico.

O método eletroanalítico baseado na DPV foi aplicado à quantificação da BAI utilizando os GCE e GE. Para o GCE, as análises foram realizadas na presença de concentrações de BAI variando de 200 nmol L⁻¹ a 41,8 µmol L⁻¹. Como ilustrado na figura 19A, observou-se um aumento progressivo na I_{pa} com o acréscimo da concentração de analito, comportamento típico de sistemas eletroativos, independentemente do mecanismo dominante de transporte de massa. A partir de aproximadamente 4,14 µmol L⁻¹, identificou-se uma tendência à saturação do sinal, o que pode estar relacionado à limitação de sítios ativos na superfície do eletrodo.

Figura 19 - A) DPV para diferentes concentrações de BAI utilizando o GCE. B) Gráficos de calibração comparativos obtidos para o GCE usando o método de adição padrão e calibração externa. C) DPV para diferentes concentrações de BAI utilizando o GE. A linha preta refere-se ao eletrólito de suporte. D) Gráfico de calibração correspondente usando o GE e o método de adição padrão. Voltamogramas DP submetidos à correção de linha de base.



Fonte: Retirado da referência [63]

A figura 19B apresenta a comparação entre duas abordagens analíticas: o método de adição padrão e a curva de calibração externa. A calibração externa, conduzida na faixa de 125

nmol L⁻¹ a 5,36 µmol L⁻¹, exibiu excelente linearidade entre a corrente de pico e a concentração de BAI ($R^2 = 0,9975$), com sensibilidade aproximadamente oito vezes maior que a observada com a adição padrão ($R^2 = 0,8554$). Os LOD e LOQ foram estimados em 31,5 nmol L⁻¹ e 105 nmol L⁻¹, respectivamente, com base nos critérios de 3σ e 10σ divididos pela inclinação da curva[125].

Do ponto de vista eletroquímico, a oxidação da BAI no GCE revelou-se irreversível, com formação de produto não eletroativo, conforme indicado pela ausência de picos de redução e pela análise da resposta em potencial. Tal comportamento limita a reutilização da superfície eletroativa devido ao envenenamento do eletrodo, o que pode comprometer a sensibilidade e a faixa linear em ensaios repetidos. Diante disso, a calibração externa com GCE mostrou-se mais eficiente quando aplicada em concentrações controladas e com renovação periódica da superfície.

Complementarmente, o GE foi avaliado por DPV empregando o método de adição padrão, na faixa de 0,25 a 16,0 µmol L⁻¹ de BAI. A figura 19C apresenta os voltamogramas obtidos para diferentes concentrações, e a figura 19D mostra a correspondente curva de calibração. Observou-se uma resposta linear ao longo de uma faixa mais ampla, sem indícios de saturação do sinal, evidenciando maior robustez do GE frente à contaminação ou bloqueio de sítios ativos. Para esse eletrodo, os valores de LOD e LOQ foram estimados em 68,1 nmol L⁻¹ e 227 nmol L⁻¹, respectivamente.

4.3.4 Comparação com métodos eletroanalíticos

Os LODs obtidos neste trabalho (31,5 nmol L⁻¹ para GCE e 68,1 nmol L⁻¹ para GE) estão de acordo com a faixa esperada de BAI em amostras clínicas e demonstram desempenho satisfatório em relação aos métodos previamente descritos na literatura (tabela 3). Embora alguns trabalhos relatem LODs mais baixos, esses resultados geralmente exigem estratégias de modificação complexas, que envolvem etapas adicionais de síntese, materiais de alto custo e, muitas vezes, substâncias potencialmente tóxicas, o que compromete a reprodutibilidade e a viabilidade prática.

Modificação/ Eletrodo de trabalho	Método	Amostra	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD (nmol L^{-1})	Ref
^a TRGO/GCE	DPV	água	0,01 – 10	6,0	[126]
^b RuO ₂ -PDDA- rGO/GCE	DPV	produtos farmacêuticos	0,002 – 0,4	0,6	[127]
^c PLL/GCE	DPV	urina	0,5 – 10	48	[128]
^d LCuO/ZnO- CCNT@CFP	DPV	fitoterapia	0,03 – 0,70	1,7	[129]
^e Ta ₂ O ₅ -CTS- CPE	LSV	medicamento fitoterápico	0,08 – 4,0	30	[130]
^f BDDE	SWV	urina	1,0 – 95,0	260	[131]
^g GCE	DPV	soro e plasma simulado	0,12 – 5,36	31,5	Este trabalho
GE			0,25 – 1,50 and 2,15 – 16,0	68,1	

Fonte: Retirado da referência [63]

Tabela 3 - Desempenho analítico de diferentes métodos eletroanalíticos para a detecção de BAI.

a. Eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com óxido de grafeno termicamente reduzido (TRGO); b. Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de rutênio (RuO₂) carregado em grafeno funcionalizado; c. Eletrodo de carbono vítreo modificado com polilisina (PLL/GCE); d. Arranjos de nanobastões de ZnO verticalmente homogeneizados crescidos em papel de fibra de carbono (CFP) com nanosheets de CuO e nanotubos de carbono carboxilados (CCNTs), CuO/ZnO@CFP; e. Eletrodo de pasta de carbono modificado com partículas de óxido de tântalo (Ta₂O₅) e quitosana (Ta₂O₅-CTS-CPE); f. Eletrodo de diamante dopado com boro; g. Eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de ouro.

Por exemplo, os eletrodos modificados com RuO₂-PDDA-rGO/GCE e LCuO/ZnO-CCNT@CFP alcançaram LODs de 0,6 e 1,7 nmol L⁻¹, respectivamente[127][129], mas demandam procedimentos sofisticados e o uso de nanomateriais que dificultam sua aplicação

em laboratórios convencionais. Já o PLL/GCE, apesar de mais simples, apresentou um LOD de 48 nmol L^{-1} [128], superior ao obtido neste trabalho com o GCE não modificado.

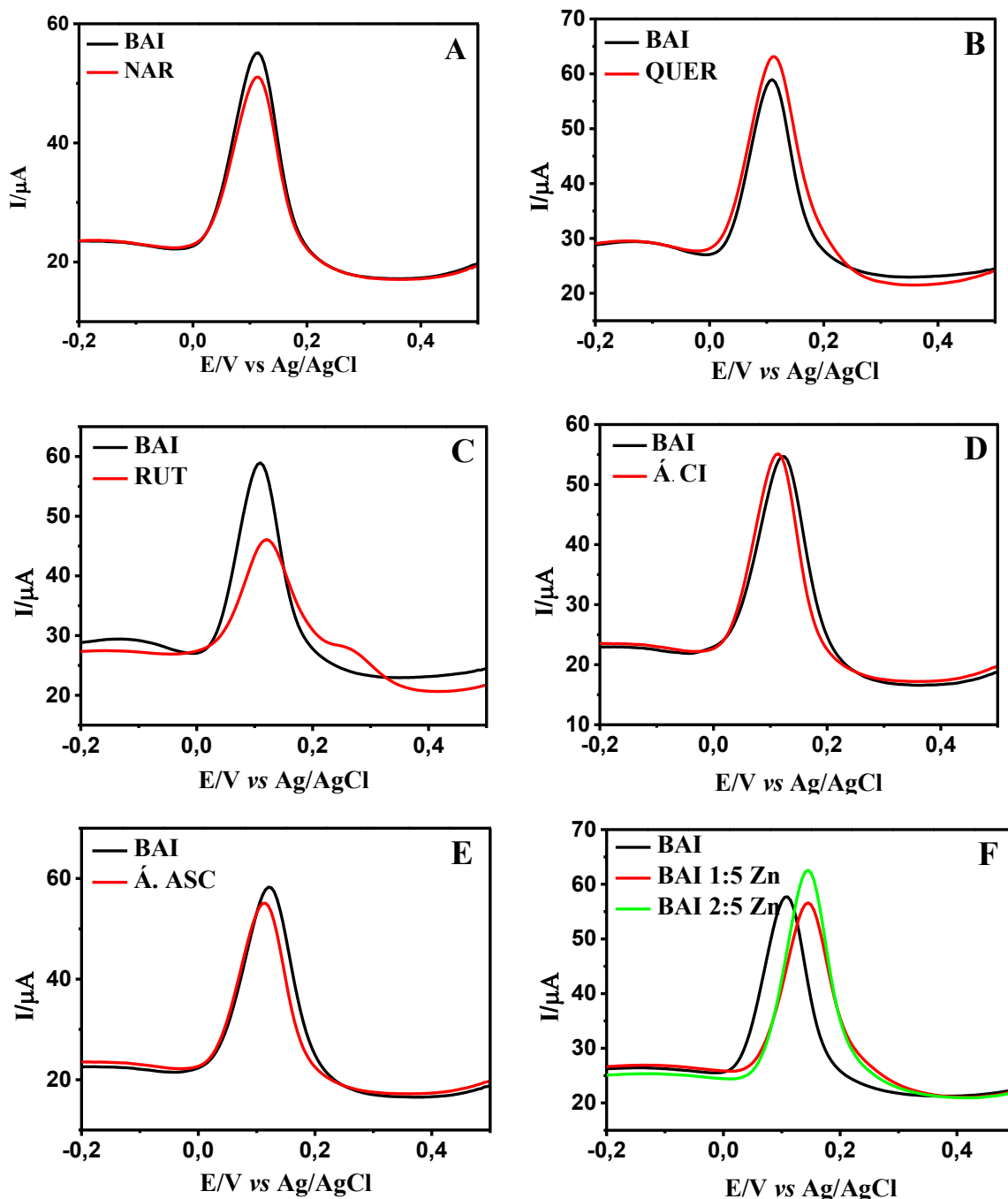
Neste contexto, os métodos aqui desenvolvidos destacam-se por utilizarem eletrodos comerciais sem qualquer modificação, resultando em uma abordagem mais limpa, econômica e sustentável. Ainda assim, os parâmetros analíticos alcançados são altamente competitivos. Além disso, a simplicidade experimental favorece a reprodutibilidade, o baixo custo operacional e a facilidade de implementação em diferentes matrizes e contextos analíticos.

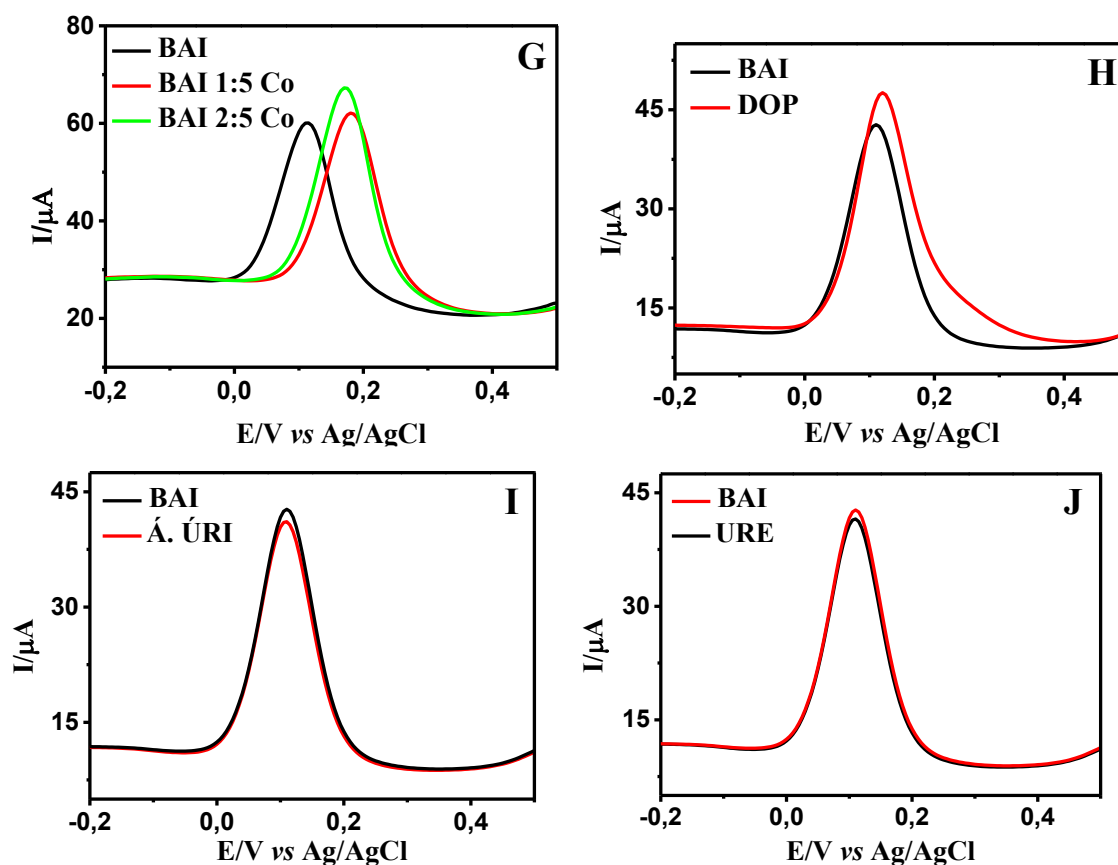
4.3.5 Repetibilidade e seletividade

Sob condições otimizadas, a DPV foi utilizada para avaliar a exatidão e a precisão dos dois métodos, considerando a presença de $2,50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI (dados não mostrados). A precisão intra-dia, determinada em cinco repetições ($n = 5$), apresentou RSD de 1,99% para o GCE e 6,62% para o GE, indicando que ambos os eletrodos fornecem respostas estáveis em medições repetidas no mesmo dia. A precisão inter-dia, avaliada ao longo de cinco dias consecutivos, apresentou RSD de 4,66% para o GCE e 11,7% para o GE, confirmando que os métodos mantêm boa reprodutibilidade ao longo do tempo, embora o GCE seja ligeiramente mais consistente. Esses resultados mostram que ambos os eletrodos oferecem medições confiáveis e consistentes para a determinação da BAI.

A seletividade dos métodos também foi investigada frente à presença de compostos orgânicos e inorgânicos comuns em plasma e sangue que poderiam interferir na quantificação da BAI. Para isso, as medições foram realizadas com $2,20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI, adicionando-se cinco vezes a quantidade de cada espécie potencialmente interferente. Os compostos testados incluíram naringenina, quercetina, rutina, ácido ascórbico, zinco, cobalto, dopamina, ácido úrico e ureia, representando moléculas e íons típicos de matrizes biológicas (figura 20 e 21).

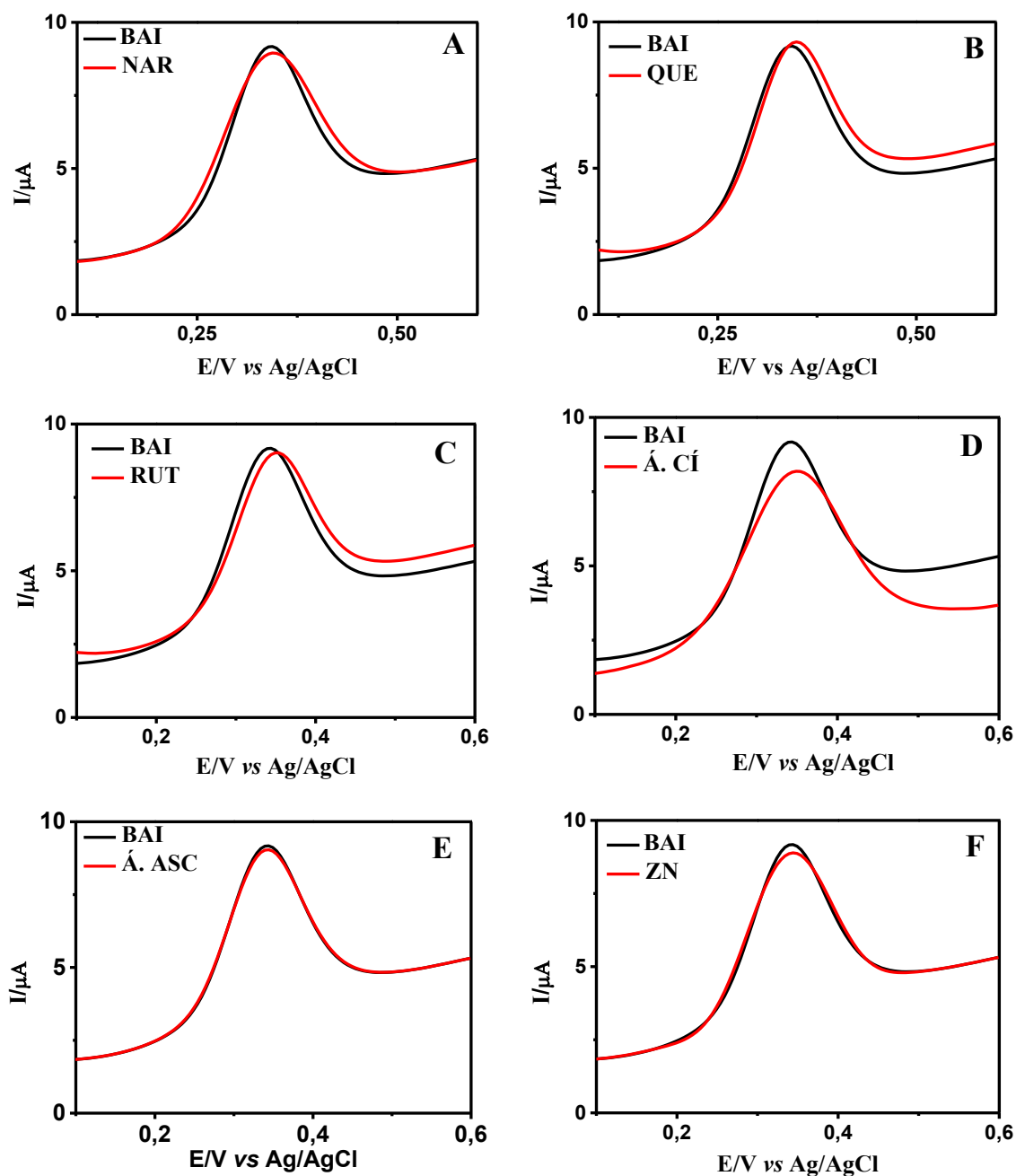
Figura 20 - Estudos de interferentes por DPV em $2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI no GE antes e após a adição de interferentes (1:5) A) Naringenina; B) Quercetina; C) Rutina; D) Ácido cítrico; E) Ácido ascórbico; F) Zinco; G) Cobalto; H) Dopamina; I) Ácido úrico; e J) Ureia. PB $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) sob condições otimizadas.

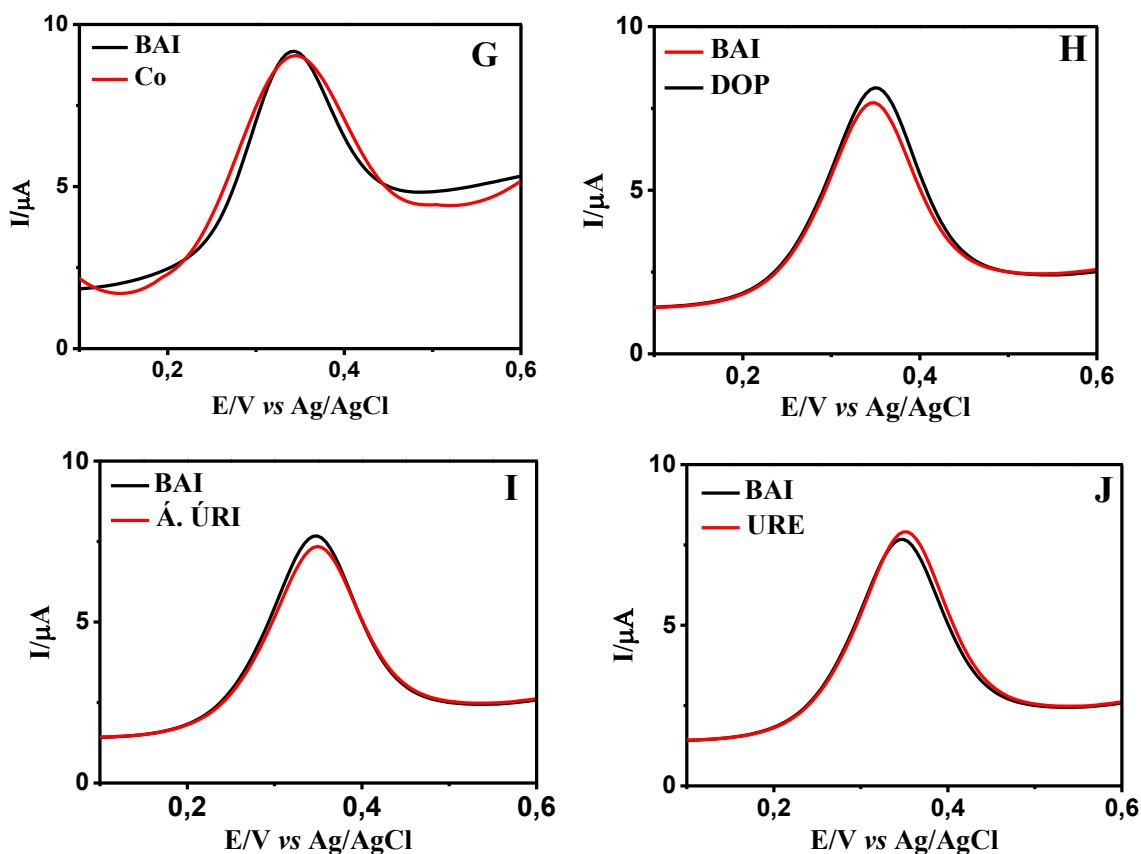




Fonte: Retirado da referência [63]

Figura 21 - Estudos de interferentes por DPV em $2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI no GCE antes e após a adição de interferentes (1:5) A) Naringenina; B) Quercetina; C) Rutina; D) Ácido cítrico; E) Ácido ascórbico; F) Zinco; G) Cobalto; H) Dopamina; I) Ácido úrico; e J) Ureia. Tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) sob condições otimizadas.





Fonte: Retirado da referência [63]

No caso do GCE, a rotina apresentou a maior interferência, reduzindo a corrente de pico em aproximadamente 35,6%, possivelmente devido à semelhança estrutural com a BAI. A interferência de todos os outros compostos foi inferior a 15%, indicando seletividade satisfatória para a determinação da BAI (ver tabela 4)[125]. Já o GE apresentou respostas de interferência menores para naringenina, quercetina, rutina e dopamina, com variações de +7,47%, -4,34%, -14% e +8,38%, respectivamente. Apesar de ter sensibilidade menor que o GCE, o método baseado no GE mostrou maior seletividade, possivelmente devido a interações específicas entre a superfície de ouro e os grupos oxigenados da BAI, que reduzem interferências de outras moléculas.

Potenciais interferentes	GCE erro (%)	GE erro (%)
Naringenina	- 13,34	+7,47
Quercetina	+11,37	-4,34
Rutina	-35,65	-14,00
Ácido cítrico	+0,51	+4,34
Ácido ascórbico	+11,35	+2,45
Zinco	-3,47	-2,40
Cobalto	+5,95	-4,30
Dopamina	+11,89	+8,38
Ácido úrico	-4,36	-6,08
Ureia	-3,09	+3,79

Fonte: Retirado da referência [63]

Tabela 4 - Resposta comparativa a interferentes ($n = 3$) testada na presença de concentrações cinco vezes maiores de diferentes espécies potencialmente interferentes.

4.3.6 Eletroanálise de amostras simuladas e comparação com método de referência

A quantificação de BAI em amostras simuladas de plasma e soro foi realizada utilizando o método de adição padrão, aplicado apenas ao GCE. Esse método permite avaliar a exatidão do procedimento em matrizes complexas. Conforme mostrado na tabela 5, foram adicionados $2,98 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI em cada amostra. Por voltametria, os resultados obtidos foram $3,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ no soro e $3,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ no plasma, correspondendo a recuperações de 101,56% e 104,22%, com desvios padrão relativo (RSD) de 2,11% e 2,35%, respectivamente. Esses valores indicam que o método apresenta boa precisão e exatidão, sugerindo que o efeito da matriz nas amostras simuladas é relativamente baixo, o que é importante para garantir a confiabilidade das medições em condições semelhantes às clínicas.

Técnica	Dados	Soro	Plasma
Voltametria	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,98	2,98
	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3,03	3,11
	RSD (%)	2,11	2,35
	Recuperação (%)	101,56	104,22
Espectrometria de absorção molecular	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,98	2,98
	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3,16	3,26
	RSD (%)	1,55	0,9
	Recuperação (%)	105,63	109,01
Teste t		0,74	0,40

Fonte: Retirado da referência [63]

Tabela 5 - Recuperação de BAI ($n = 3$) em amostras simuladas de soro e plasma obtida por voltametria e método comparativo.

Para comparação, a quantificação também foi realizada por espectrometria de absorção molecular, considerada como método de referência. Nesse caso, foram encontrados $3,16 \mu\text{mol L}^{-1}$ no soro e $3,26 \mu\text{mol L}^{-1}$ no plasma, com recuperações de 105,63% e 109,01% e RSD de 1,55% e 0,90%, respectivamente. Embora esses valores sejam ligeiramente maiores que os obtidos por voltametria, o teste t não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os métodos para o soro ($t = 0,74$) e o plasma ($t = 0,40$), considerando um nível de confiança de 95%.

5. CAPÍTULO 5 –Integração de estudos teóricos e experimentais em eletroquímica de ouro nanoporoso para melhoria do desempenho na detecção de baicaleína

Neste capítulo aborda a investigação da BAI utilizando um NPGE, desenvolvido como alternativa de elevada área superficial e propriedades eletrônicas diferenciadas em comparação aos eletrodos convencionais, assim, avalia-se de que forma a estrutura nanoporosa do ouro influencia a resposta eletroquímica da BAI, possibilitando ganhos em sensibilidade e seletividade frente aos substratos já explorados no Capítulo 4.

Para isso, primeiramente são apresentadas as caracterizações físico-químicas do NPGE, incluindo técnicas de microscopia, espectroscopia e medidas eletroquímicas, com o intuito de confirmar a morfologia porosa, a composição química da superfície e a ampliação da área eletroativa. Em seguida, discute-se o comportamento voltamétrico da BAI no NPGE, comparando os resultados com os obtidos nos eletrodos de carbono vítreo e de ouro maciço, a fim de estabelecer a relevância do NPGE para aplicações analíticas.

5.1. Etapas de caracterização do processo de nanoestruturação

O primeiro passo desta investigação concentrou-se na caracterização do NPGE, desenvolvido com o intuito de ampliar a área superficial e, conseqüentemente, potencializar os processos de transferência eletrônica em estudos eletroanalíticos. A análise inicial deste material teve como finalidade compreender como as propriedades estruturais, morfológicas e químicas do NPGE, tais como a presença de poros interconectados, a rugosidade superficial e a composição predominante de ouro metálico, influenciam sua resposta eletroquímica. Dessa forma, buscou-se estabelecer parâmetros de referência capazes de fundamentar a interpretação dos fenômenos observados na interação com BAI e sustentar as etapas posteriores desta tese, nas quais o desempenho do NPGE é comparado a eletrodos convencionais.

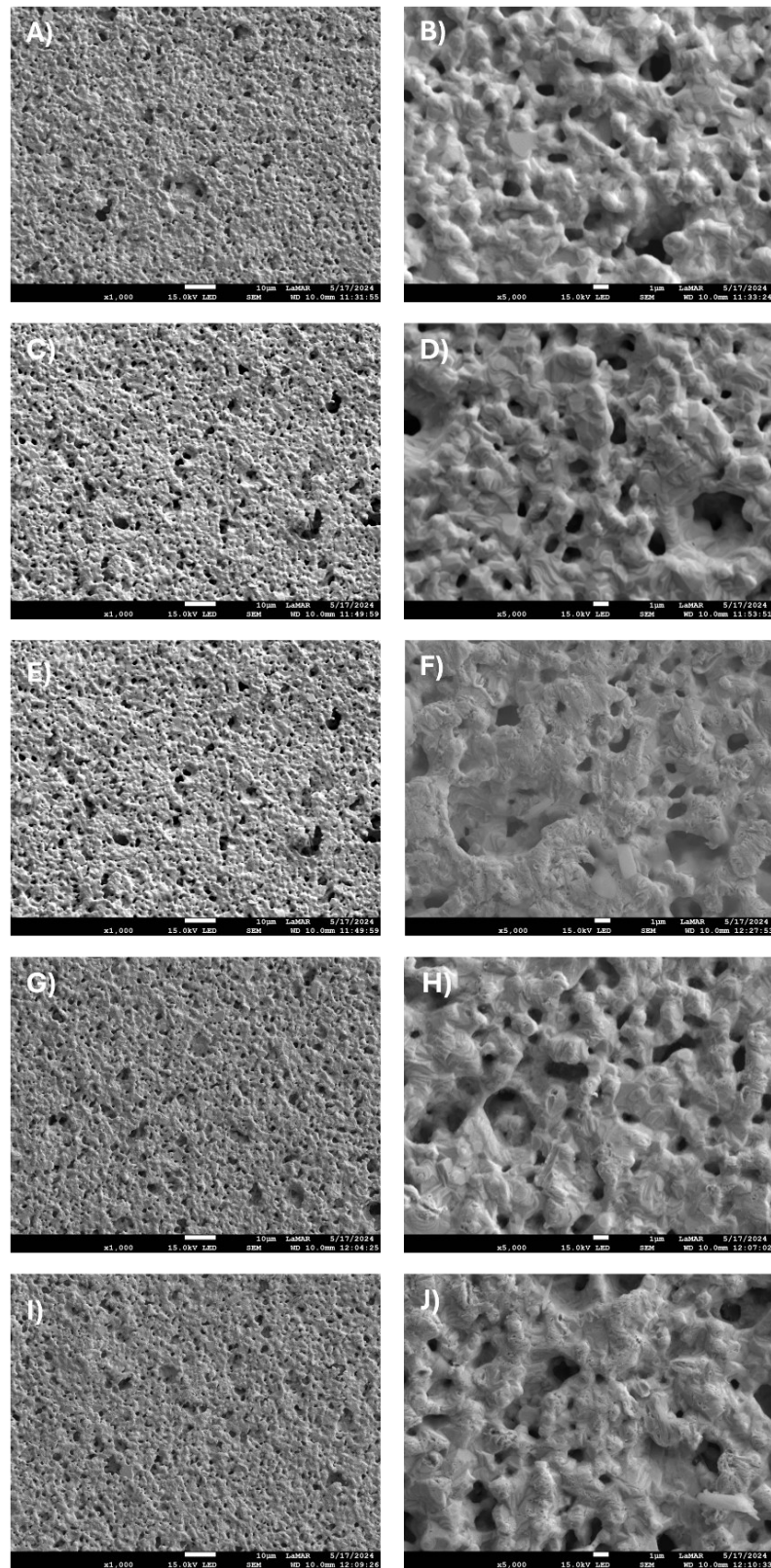
Iniciamos a investigação aplicando um potencial específico aos eletrodos de ouro durante diferentes intervalos de tempo, com o objetivo de promover a nanoestruturação da superfície. Um estudo anterior de nosso grupo explorou uma técnica semelhante de modificação 3D, utilizando um processo de anodização de 20 minutos[65]. No presente trabalho, contudo, buscou-se observar o comportamento do sistema sob tempos de anodização mais curtos e como modificações rápidas da superfície impactam o desempenho dos eletrodos.

Para dar início às caracterizações, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) dos GEs submetidos à anodização por diferentes durações (5 s, 10 s, 20 s, 40

s e 60 s) sob uma tensão constante de 2,0 V, conforme mostrado na figura 22. Cada tempo de anodização é representado por duas imagens: uma de baixa ampliação à esquerda (A, C, E, G, I) e uma de alta ampliação à direita (B, D, F, H, J).

As imagens de baixa ampliação (figura 22A, C, E, G, I) revelam a morfologia geral da superfície dos eletrodos, indicando que a estrutura superficial permanece relativamente consistente entre os diferentes tempos de anodização, sem alterações significativas observáveis. Em contraste, as imagens de alta ampliação (figura 22B, D, F, H, J) fornecem uma visão mais detalhada da evolução da superfície durante o processo de modificação. A estrutura da superfície parece relativamente uniforme entre 5 e 10 s (figura 22B e D), sem diferenças substanciais perceptíveis. No entanto, mudanças notáveis começam a aparecer aos 20 s (figura 22F), com aumento da textura superficial e surgimento de defeitos. Essa tendência se mantém e se torna ainda mais evidente aos 40 s (figura 22H) e 60 s (figura 22J). A intensificação da modificação da textura ao longo do tempo sugere que, mesmo em curtos intervalos, tempos maiores de anodização influenciam significativamente a estrutura superficial.

Figura 22 - Imagens de SEM de eletrodos de ouro anodizados a 2 V por diferentes tempos. As imagens de baixa ampliação estão à esquerda e as de alta ampliação à direita, correspondendo aos tempos de anodização de (A, B) 5 s, (C, D) 10 s, (E, F) 20 s, (G, H) 40 s e (I, J) 60 s.



Fonte: Retirado da referência [98]

É importante destacar que as imagens de SEM fornecem apenas uma observação visual da superfície do material e indicam possíveis alterações na textura; parâmetros específicos, como rugosidade e porosidade para cada tempo de modificação, precisam ser avaliados por técnicas complementares.

Para complementar a caracterização por SEM, a técnica de AFM foi empregada, permitindo uma análise detalhada das características superficiais dos eletrodos em cada tempo de ativação (5 s, 10 s, 20 s, 40 s e 60 s), conforme apresentado na figura 23. Esses resultados são fundamentais para compreender as alterações da superfície em escala nanométrica, particularmente por meio de dois parâmetros principais: altura média e rugosidade média. A altura média representa o desvio das características da superfície, fornecendo informações sobre a topografia geral, enquanto a rugosidade média quantifica os desvios médios em altura, indicando a textura e a irregularidade da superfície.

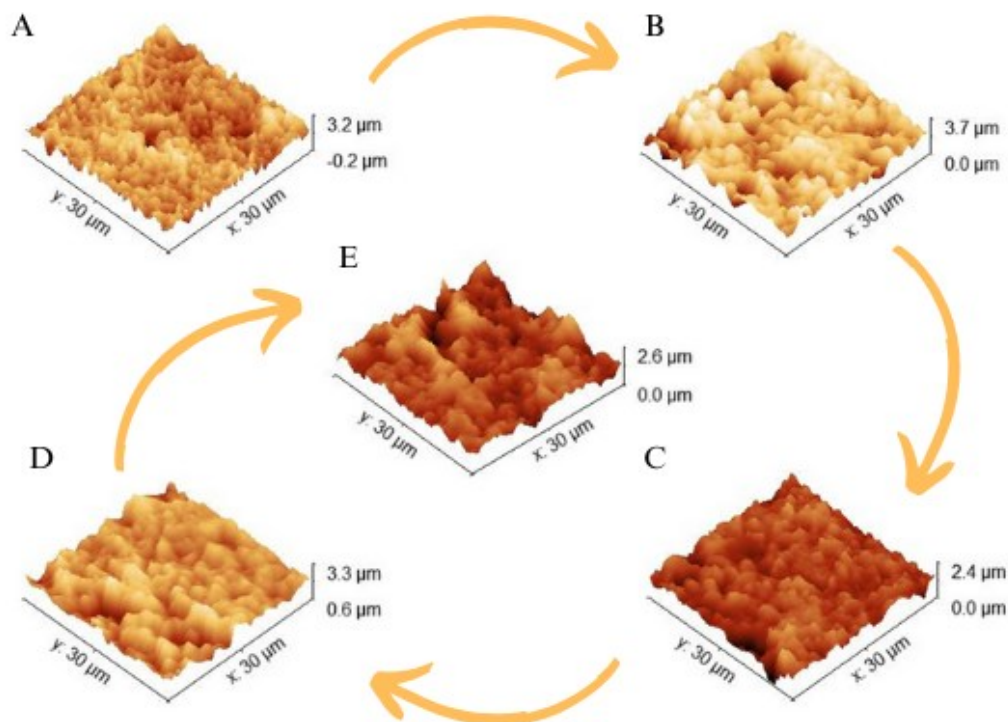
Após 5 s de ativação, o eletrodo apresentou uma altura média de 2,2316 μm e uma rugosidade média de 314,1 nm, exibindo uma textura moderadamente áspera. A imagem 3D da superfície (figura 23A) sugere uma rugosidade perceptível, porém controlada. A figura 23B mostra a superfície do eletrodo que passou por 10 s de ativação; este eletrodo apresentou a maior altura média (3,1515 μm) e a maior rugosidade (414,9 nm) entre os tempos analisados, evidenciados na imagem 3D correspondente.

Em contraste, o eletrodo ativado por 20 s (figura 23C) apresentou a menor altura média (1,5382 μm) e rugosidade (220,2 nm), indicando uma superfície relativamente mais lisa. Após 40 s de ativação (figura 23D), a superfície do eletrodo apresentou altura média de 1,7575 μm e rugosidade de 258,7 nm, enquanto a ativação de 60 s (figura 23E) resultou em altura média de 2,1660 μm e rugosidade de 295,1 nm, valores intermediários em relação aos extremos observados em 5 s e 10 s.

Com base nesses resultados, observa-se que a relação entre tempo de ativação e rugosidade superficial não é estritamente linear. Isso pode ser explicado pelos complexos processos eletroquímicos envolvidos. A anodização é um processo eletroquímico que normalmente consiste na formação de uma camada de óxido sobre a superfície do eletrodo, que ocorre rapidamente no início, aumentando os parâmetros até 10 s. Entretanto, parte dessa camada de óxido formada pode ser dissolvida de volta no eletrólito (20 s). Em tempos mais longos de ativação (40 s), a camada de óxido pode atingir um ponto em que a superfície está amplamente coberta, e a continuação da anodização leva principalmente ao espessamento da camada de óxido, sem alterações significativas na textura superficial. Em potencial de

anodização constante por tempo ainda maior (60 s), a camada de óxido pode se tornar instável em certas regiões, provocando aumentos súbitos na rugosidade.

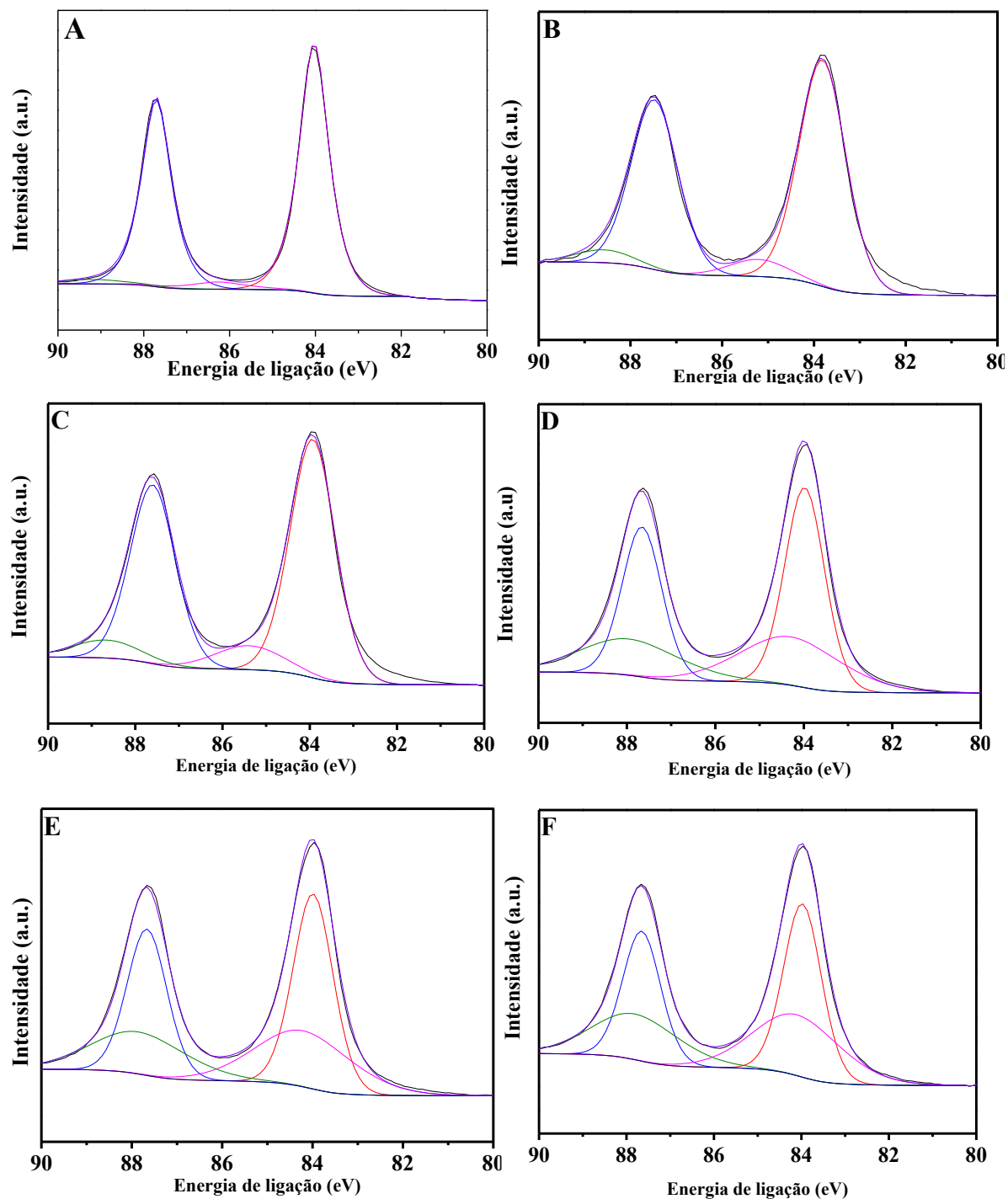
Figura 23 - Imagens de AFM 3D do GE at A) 5, B) 10, C) 20, D) 40, and E) 60 s.



Fonte: Retirado da referência [98]

Estudos foram realizados em espectroscopia de fotoelétrons excitados por XPS onde foi empregada para avaliar possíveis alterações nos estados químicos do ouro nos eletrodos ativados (figura 24). Os espectros de alta resolução revelaram a presença de dois estados químicos distintos de ouro em todos os eletrodos, tanto ativados quanto não ativados. O processo de deconvolução utilizou um fundo do tipo Shirley e curvas Gaussianas-Lorentzianas, evidenciando dois pares de picos correspondentes ao desdobramento spin-órbita $\text{Au}4f_{7/2}$ e $\text{Au}4f_{5/2}$.

Figura 24 - Espectros de XPS de alta resolução do eletrodo submetido a ativação de A) 0, B) 5, C) 10, D) 20, E) 40 e F) 60 s.



Fonte: Retirado da referência [98]

Especificamente, os picos em aproximadamente 84,0 e 87,6 eV estão associados às espécies Au^0 , enquanto os picos em ~85,4 e 88,6 eV são atribuídos às espécies Au^{3+} . Padrões de picos semelhantes foram observados de forma consistente em todas as superfícies dos

eletrodos, apresentando apenas variações menores. No entanto, a quantidade de Au^0 diminuiu com o tempo, acompanhada por um aumento de Au^{3+} , conforme indicado na Tabela 6.

Observa-se que, mesmo antes do processo de anodização, o GE apresenta algumas espécies oxidadas; curiosamente, com o aumento do tempo de ativação, a proporção de espécies oxidadas também aumentou. Esses resultados corroboram os dados anteriores, confirmando que tempos maiores de ativação levam a alterações na superfície, evidenciadas pelo aumento da quantidade de espécies de ouro oxidado na análise de XPS.

Eletrodo	Au^0	Au^{3+}
0 s	94,4	5,6
5 s	91,4	8,6
10 s	86,7	13,3
20 s	62,0	38,0
40 s	59,4	40,6
60 s	55,5	44,5

Fonte: Retirado da referência [98]

Tabela 6 - Distribuição das espécies de ouro (%) de acordo com o tempo de ativação.

5.2. Caracterização eletroquímica da superfície e comportamento eletroquímico da BAI

Conseguimos uma melhoria significativa nas propriedades eletroquímicas da superfície do eletrodo por meio da criação de nanoporos através da aplicação de um potencial de 2,00 V a um GE durante diferentes durações, variando de 0 a 60 s. Notavelmente, mesmo com a variação do tempo de ativação, os resultados de CV mantiveram o perfil característico do ouro, conforme mostrado na figura 25A.

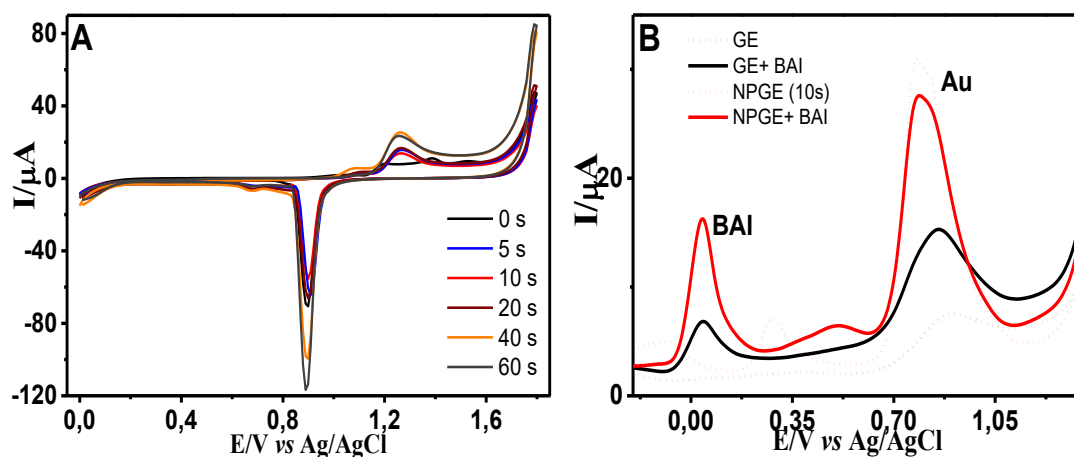
À medida que o tempo de ativação aumentou, observou-se um incremento significativo nas correntes associadas aos processos de oxidação e redução do ouro, fornecendo evidências claras da formação dos nanoporos. Esse desenvolvimento amplia consideravelmente a área superficial do eletrodo, melhorando substancialmente a atividade eletroquímica ao aumentar a disponibilidade de sítios ativos para reações redox.

A exploração adicional por meio de análise de EIS revelou padrões semicirculares tanto para os eletrodos não alterados quanto para os nanoporos (figura 26A), com foco nos eletrodos

ativados por 40 s. O tamanho reduzido e a semicircunferência menos definida do eletrodo nanoporo indicam uma alteração significativa na resposta EIS, consequência direta da estrutura nanoporosa formada durante o processo de ativação. Essa semicircunferência reduzida sugere uma diminuição da resistência à transferência de carga, destacando uma cinética de transferência eletrônica mais eficiente, facilitada pela maior condutividade proporcionada pelo arranjo nanoporoso. Seu tamanho ligeiramente menor indica processos de transferência de carga mais rápidos no NPGE em comparação ao GE não ativado; embora não tenham sido observadas diferenças na composição superficial.

A introdução de nanoporos melhora significativamente o desempenho eletroquímico, como evidenciado pelo aumento das respostas de corrente na análise de CV. Esses avanços representam um passo importante no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a detecção de BAI, demonstrando o potencial das estruturas nanoporosas em melhorar a funcionalidade e a eficiência dos sensores.

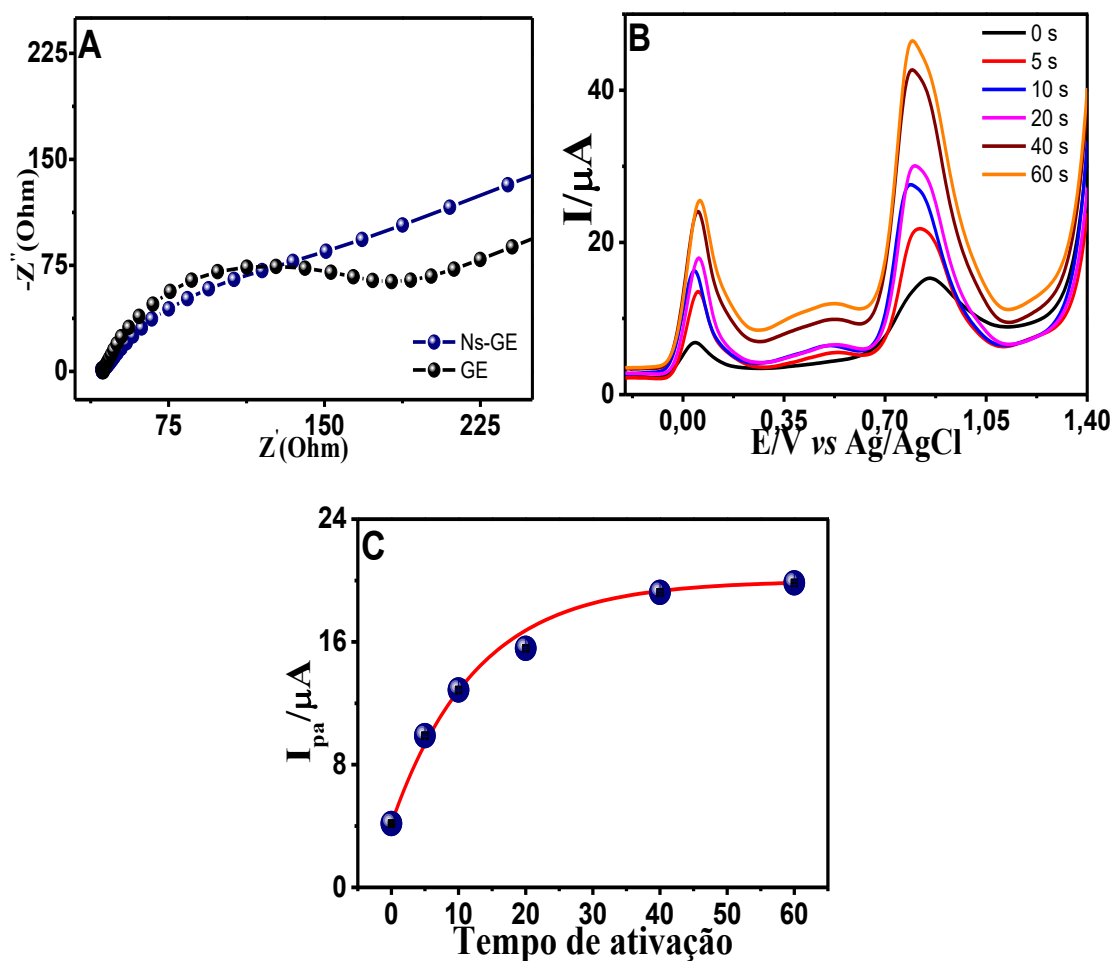
Figura 25 - A) CV do GE imerso em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, realizada a uma taxa de varredura de $0,01 \text{ V s}^{-1}$ para tempos de ativação de 0 a 60 s; B) comparação entre GE não ativado e NPGE ativado por 10 s na presença de $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI em tampão BR pH 7,0.



Fonte: Retirado da referência [98]

Posteriormente, investigamos o comportamento eletroquímico da BAI utilizando tanto o GE quanto o NPGE. O NPGE ativado por 10 s apresentou uma resposta de corrente significativamente maior para a BAI, demonstrando um aumento de 4,1 vezes em relação ao GE não ativado (figura 25B). Para otimizar ainda mais o processo de ativação, examinamos diferentes tempos de ativação (0 s, 5 s, 10 s, 20 s, 40 s e 60 s) até que não houvesse aumento adicional no pico de corrente, conforme apresentado nas figura 26B e C.

Figura 26 - A) Diagramas de Nyquist obtidos em solução contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e 5 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ para GE e NPGE. B) Voltammogramas de pulso diferencial (DPV) variando o tempo de ativação de 0 a 60 s e C) a correspondente resposta de corrente de pico.



Fonte: Retirado da referência [98]

Os resultados revelaram um aumento contínuo na resposta de corrente com os tempos de ativação até 40 s, após o qual a corrente atingiu um platô. Esse platô indica que estender o tempo de ativação além de 40 s não aumentou significativamente o sinal de pico da BAI. Consequentemente, 40 s foi identificado como o tempo de ativação ideal, proporcionando a maior resposta de corrente para a BAI.

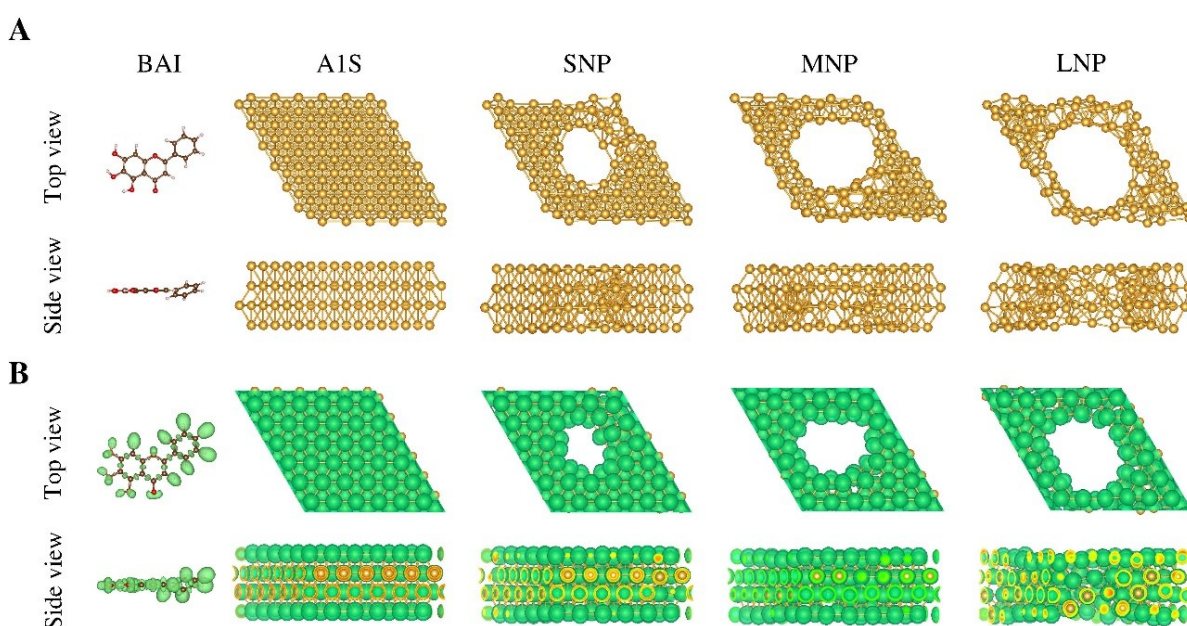
5.3 Resultados teóricos para BAI e eletrodos à base de ouro

5.3.1 Caracterização da molécula de BAI e dos substratos de ouro

Antes de investigar a adsorção, foram caracterizadas as propriedades individuais da molécula de BAI e dos quatro substratos de ouro modelados: A1S, SNP, MNP e LNP (figura

27A). A ELF (figura 27B) mostraram regiões de alta densidade eletrônica na molécula de BAI e em sítios específicos nos substratos[117]. A molécula de BAI apresentou estabilidade energética e conformações consistentes com a literatura, sendo não magnética e com energia de ligação de -5,46 eV/átomo em fase gasosa. Isso indica que o sistema é estável, calculado a partir da diferença entre a energia total do sistema e a soma das energias dos átomos isolados.

Figura 27 - Vistas lateral e superior de A) da molécula de BAI e dos substratos de ouro (A1S, SNP, MNP e LNP), e B) das respectivas superfícies de função de localização eletrônica (ELF): 0,65 para BAI e 0,15 para os substratos de ouro. Os átomos de H, C, O e Au estão representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja lavado, respectivamente, enquanto as superfícies ELF são mostradas em verde.



Fonte: Retirado da referência [98]

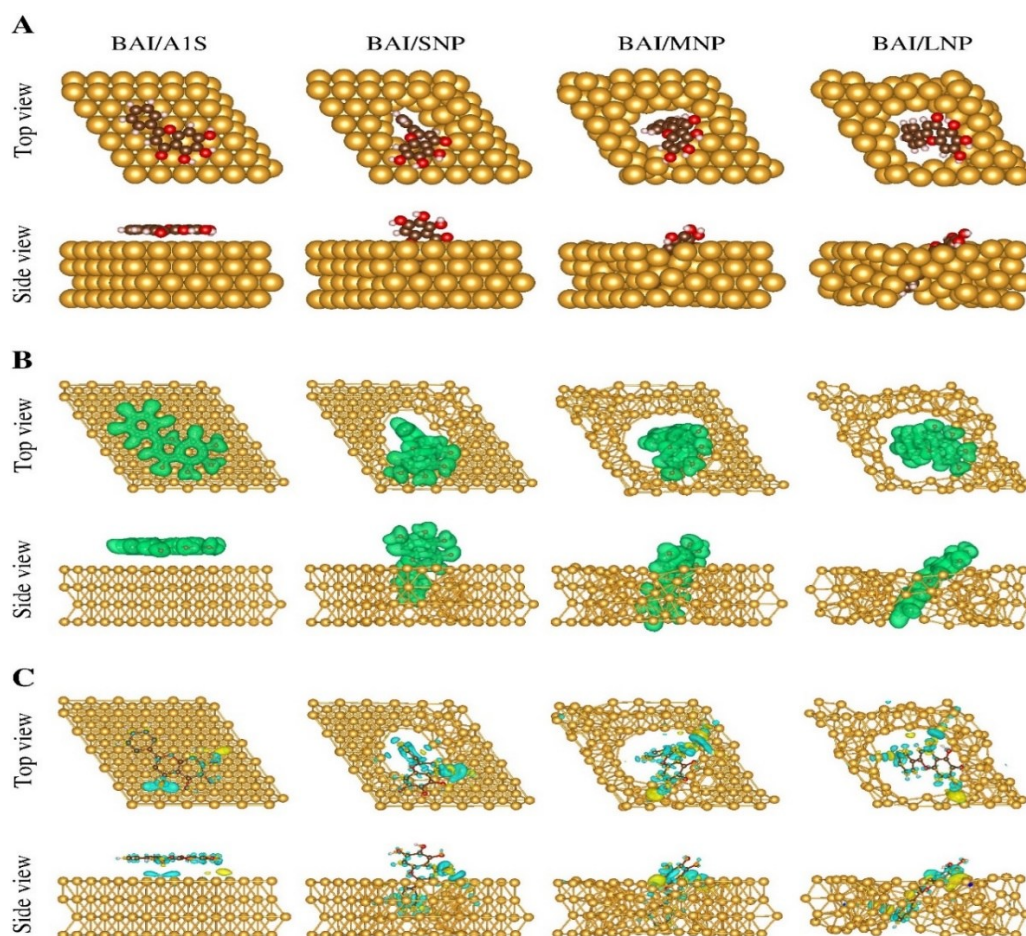
Os substratos de ouro foram modelados em superfícies planas e nanoporosas. A configuração A1S, derivada do corte do ouro cúbico de face centrada (fcc) na direção [111], apresentou energia de ligação de -3,38 eV/átomo. Os espaçamentos intercamadas e o comprimento médio de ligação Au-Au (2,91 Å) estão de acordo com dados experimentais. Para os substratos nanoporosos (SNP, MNP e LNP), as energias de ligação diminuíram ligeiramente (-3,25; -3,18; -3,11 eV/átomo), enquanto os comprimentos médios de ligação Au-Au também reduziram (2,89; 2,87; 2,84 Å), refletindo reconstrução superficial causada pela formação dos nanoporos. Todos os substratos apresentam momento magnético total nulo, sugerindo que a reconstrução elimina ligações pendentes, mas mantém sítios de baixa coordenação que favorecem a interação com moléculas adsorvidas[121].

A análise indica que a estabilidade energética segue a ordem $A1S > SNP > MNP > LNP$, demonstrando que superfícies nanoporosas possuem maior reatividade. Isso está de acordo com a presença de nanoporos em eletrodos de ouro ativados experimentalmente, justificando a relevância dos modelos para entender a interação com BAI.

5.3.2 Interação BAI-substrato

As simulações AIMD-SA permitiram identificar as configurações de menor energia para cada sistema BAI/substrato (figura 28A), com ELF e mapas de diferença de densidade de carga (figuras 28B e 28C).

Figura 28 - Vistas lateral e superior de A) das configurações de menor energia para BAI/A1S, BAI/SNP, BAI/MNP e BAI/LNP; B) das respectivas superfícies da função de localização eletrônica (ELF) com isosuperfície de 0,25; e C) dos mapas de diferença de densidade de carga (isosuperfície = 0,0015). Os átomos de H, C, O e Au estão representados pelas cores rosa claro, marrom médio, vermelho e laranja, respectivamente. As superfícies ELF são mostradas em verde, enquanto as superfícies de diferença de densidade de carga aparecem em ciano e amarelo, indicando regiões de depleção e acúmulo de carga, respectivamente.



Fonte: Retirado da referência [98]

Na superfície plana (BAI/A1S), a molécula interage horizontalmente e paralela ao substrato, com distância mínima de 2,63 Å, maximizando a cobertura da superfície e predominando interações do tipo fisisorção. Nos substratos nanoporosos (BAI/SNP, BAI/MNP e BAI/LNP), a molécula tende a penetrar parcialmente ou totalmente nos nanoporos, aumentando a área de contato e caracterizando quimissorção, devido à presença de sítios de baixa coordenação e maior reatividade superficial.

As propriedades de adsorção calculadas (tabela 7) confirmam a tendência: a interação entre BAI e os substratos é energeticamente favorável e cresce em magnitude com o aumento do tamanho dos nanoporos. Para BAI/A1S, $E_{ad} = -2,29$ eV, predominando forças dispersivas; para BAI/SNP, $E_{ad} = -2,35$ eV, com efeito capilar importante; para BAI/MNP, $E_{ad} = -3,88$ eV, com ligação Au-O mais próxima (2,23 Å); e para BAI/LNP, $E_{ad} = -4,06$ eV, com interação ainda mais forte via Au-O (2,45 Å).

Sistemas	E_{ad} (eV)	E_{int} (eV)	E_{dist}^{BAI} (eV)	E_{dist}^{sub} (eV)	Δd_{av}^{BAI} (%)	Δd_{av}^{sub} (%)	q^{BAI} (e)	q^{sub} (e)	m_T (μ_B)
BAI/A1S	-2,29	-2,45	0,17	-0,01	0,09	-0,06	0,08	-0,08	0
BAI/SNP	-2,35	-2,85	0,30	0,20	0,15	0,01	0,18	-0,18	0
BAI/MNP	-3,88	-3,58	0,24	-0,54	0,27	-0,29	0,14	-0,14	0
BAI/LNP	-4,06	-2,87	-0,32	-0,87	-0,49	-0,39	0,11	-0,11	0

Fonte: Retirado da referência [98]

Tabela 7 - Propriedades relacionadas à adsorção para as conformações de menor energia BAI/A1S, BAI/SNP, BAI/MNP e BAI/LNP: energia de adsorção (E_{ad}), energia de interação (E_{int}), energias de distorção da molécula e do substrato (E_{dist}^{BAI} and E_{dist}^{sub}), desvio relativo dos comprimentos médios de ligação (Δd_{av}^{BAI} and Δd_{av}^{sub}), cargas efetivas de Bader (q^{BAI} and q^{sub}), e momento magnético total (m_T). A decomposição da energia de adsorção mostra comportamentos distintos: em A1S e SNP, a energia de interação é maior que a E_{ad} , enquanto as distorções molecular e do substrato contribuem de forma negativa ou mínima. Já para MNP e LNP, a maior parte da energia de adsorção provém da interação, e as distorções moleculares e do substrato apresentam contribuição aditiva. Esses resultados indicam que superfícies nanoporo possuem maior reatividade e potencial para interações mais fortes com BAI.

O acompanhamento da distorção estrutural, Δd_{av}^{BAI} e Δd_{av}^{sub} , reforça essa observação: BAI/A1S e BAI/SNP apresentam variações inferiores a 0,15% nos comprimentos médios de ligação, enquanto BAI/MNP e BAI/LNP apresentam distorções maiores, indicando

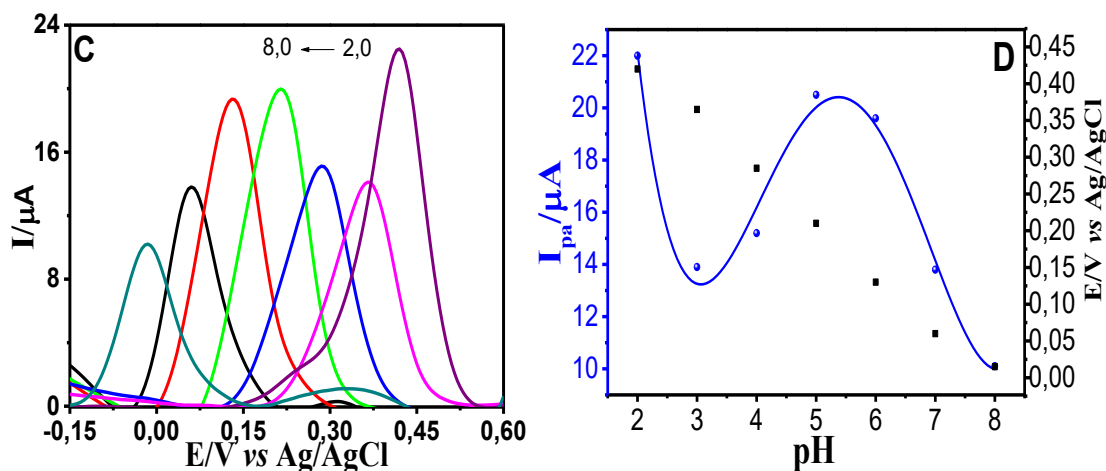
reorganização molecular e estrutural significativa durante a adsorção. A análise de cargas de Bader mostra transferência de carga do BAI para o substrato, com regiões de acúmulo e depleção de carga concentradas em sítios Au-O e Au-OH nos substratos nanoporo. O momento magnético total permanece nulo para todos os sistemas, confirmando a ausência de magnetismo induzido pela adsorção.

Os resultados teóricos até o momento evidenciam, em nível molecular, aspectos do comportamento da molécula de BAI em interação com os substratos de ouro. A presença de nanoporos nos substratos aumenta a área superficial acessível e gera sítios de baixa coordenação, nos quais a molécula tende a se posicionar, favorecendo interações mais intensas em regiões específicas. Essa distribuição de interações resulta em variações na transferência de carga observadas nos cálculos de Bader e em distorções localizadas na geometria da molécula e do substrato. Adicionalmente, a forma, o tamanho e a disposição dos nanoporos influenciam a reorganização estrutural do sistema, sugerindo que a geometria e a reatividade local podem modular a interação entre o analito e o eletrodo.

5.4 Influência do valor de pH e da velocidade de varredura no comportamento eletroquímico da BAI

Para entender o desempenho eletroquímico da BAI sobre o NPGE, avaliou-se como fatores experimentais, como o pH da solução, influenciam a resposta do sistema. Na figura 29A, a DPV mostra o comportamento eletroquímico da BAI em uma concentração de $15,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre o NPGE, variando-se o pH de 2,0 a 8,0. Para o NPGE, observa-se que a intensidade do pico anódico varia de acordo com o pH, apresentando valores menores em condições alcalinas (figura 29B) em comparação com ambientes ácidos. O pico anódico mais elevado é registrado em pH 2,0, indicando resposta eletroquímica mais intensa em condições altamente ácidas. Apesar dessa maior corrente em pH 2,0, existe uma correlação significativa entre os picos anódicos em pHs menos extremos, como 5,0 e 6,0. Com base nesses resultados, o pH 6,0 foi selecionado como condição adequada para investigações subsequentes na plataforma NPGE, considerando dois fatores principais: embora a corrente em pH 6,0 seja ligeiramente inferior à observada em pH 5,0, a diferença é pequena, e o pH 6,0 apresenta maior compatibilidade com amostras clínicas.

Figura 29 -n A) perfis de DPV para 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI em diferentes valores de pH e B) variação da corrente de pico anódico e do potencial de pico da BAI em resposta a alterações de pH de 2,0 a 8,0.

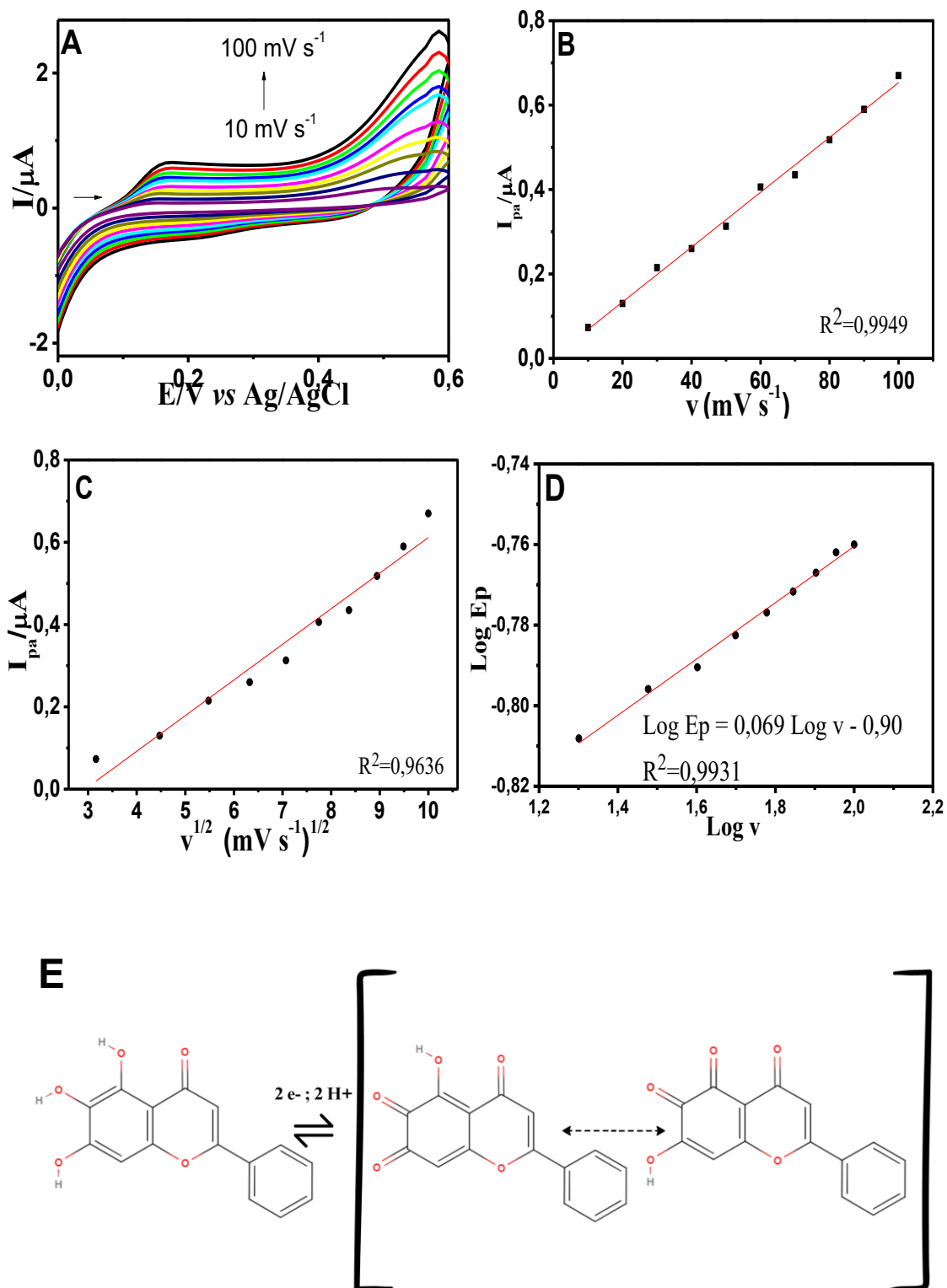


Fonte: Retirado da referência [98]

A figura 29B ilustra a relação entre I_{pa} e E_{pa} em função do pH. Essa dependência sugere que o processo de oxidação da BAI no NPGE envolve prótons, com o potencial de oxidação diminuindo à medida que o pH aumenta.

Além disso, a figura 30 (A, B, C e D) apresenta os resultados da CV conduzida sobre o NPGE em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}). Observou-se um aumento linear da corrente de pico anódico com a velocidade de varredura, caracterizado por um elevado coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9949$), sugerindo que o processo eletroquímico é controlado por adsorção (figura 30B). Também foi notado um deslocamento positivo do potencial de oxidação com o aumento da velocidade de varredura, indicando reações irreversíveis[27].

Figura 30 - A) CV conduzida em velocidades de varredura variando de 10 a 100 mV s^{-1} ; B) Relação entre corrente de pico (I_{pa}) e velocidade de varredura (v); C) Correlação entre corrente de pico (I_{pa}) e raiz quadrada da velocidade de varredura; D) Relação logarítmica entre corrente de pico (I_{pa}) e velocidade de varredura; E) Mecanismo sugerido para o processo de oxidação eletroquímica.



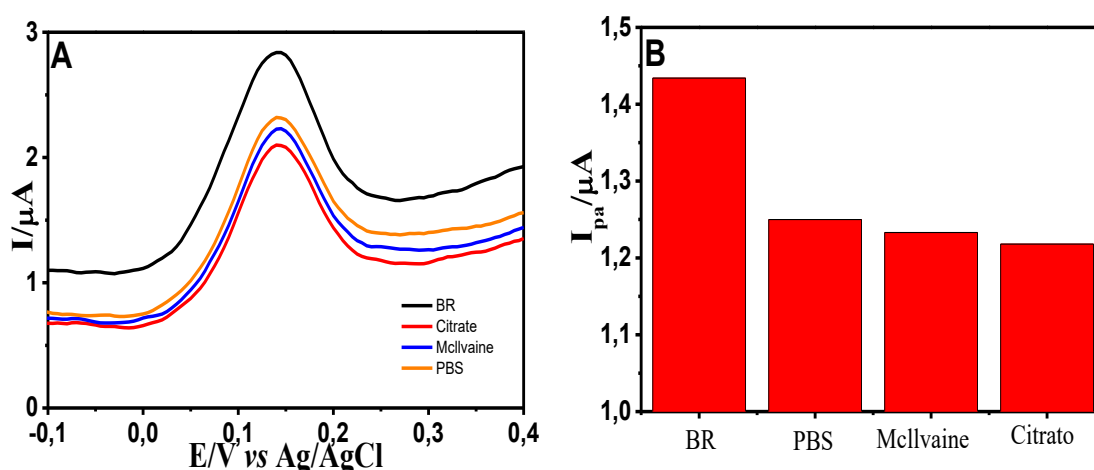
Fonte: Retirado da referência [98]

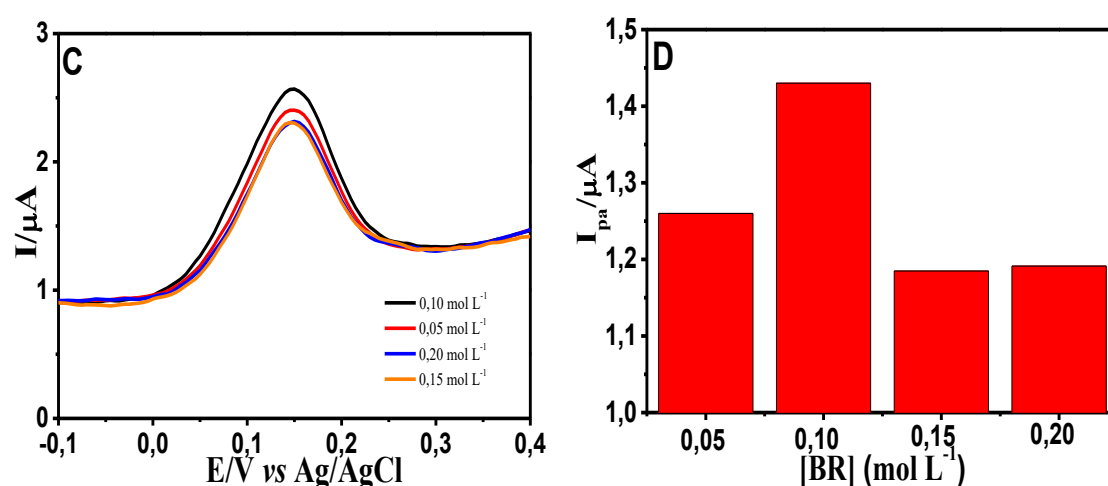
Para melhor compreensão do comportamento eletroquímico, a equação de Laviron foi aplicada, permitindo a determinação do número de elétrons envolvidos, em que o valor da inclinação corresponde a $2,303 RT/\alpha nF$ [124]. A figura 30D mostra a correlação linear entre E_p e $\log v$, derivada dos estudos de velocidade de varredura, indicando um processo de dois elétrons na oxidação da BAI sobre o NPGE. Esse comportamento controlado por adsorção está de acordo com relatos anteriores e auxilia na compreensão dos mecanismos envolvidos na oxidação da BAI [63]. Por fim, Complementarmente, a Figura 30E apresenta um esquema do processo de eletrooxidação da BAI, mostrando a transferência sequencial de elétrons e prótons. Os grupos fenólicos da molécula sofrem desprotonação concomitante à remoção de elétrons, formando intermediários reativos e promovendo rearranjos eletrônicos locais que estabilizam a molécula durante a oxidação. O esquema ilustra de forma clara as transformações redox e a dinâmica de transferência de carga e prótons na BAI.

1.9. 5.5 Influência do eletrólito suporte

A influência do eletrólito suporte sobre a resposta eletroquímica da BAI foi investigada utilizando diferentes soluções tampão (BR, Citrato, McIlvaine e PBS) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 6,0, por meio da técnica DPV (figura 31A). Como evidenciado nos gráficos, a solução tampão BR promoveu o maior pico de corrente de oxidação, destacando-se em relação aos demais tampões (figura 31B), o que justifica sua escolha para os experimentos subsequentes.

Figura 31 - Seleção do eletrólito de suporte para uma resposta de $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI: A) Análise por DPV utilizando os eletrólitos BR, McIlvaine, PBS e Citrato na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; B) Respostas de corrente comparativas entre os diferentes eletrólitos; C) Ajustes na concentração do eletrólito de suporte BR variando de $0,05$ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; D) Respostas de corrente correspondentes às diferentes concentrações do eletrólito de suporte BR.





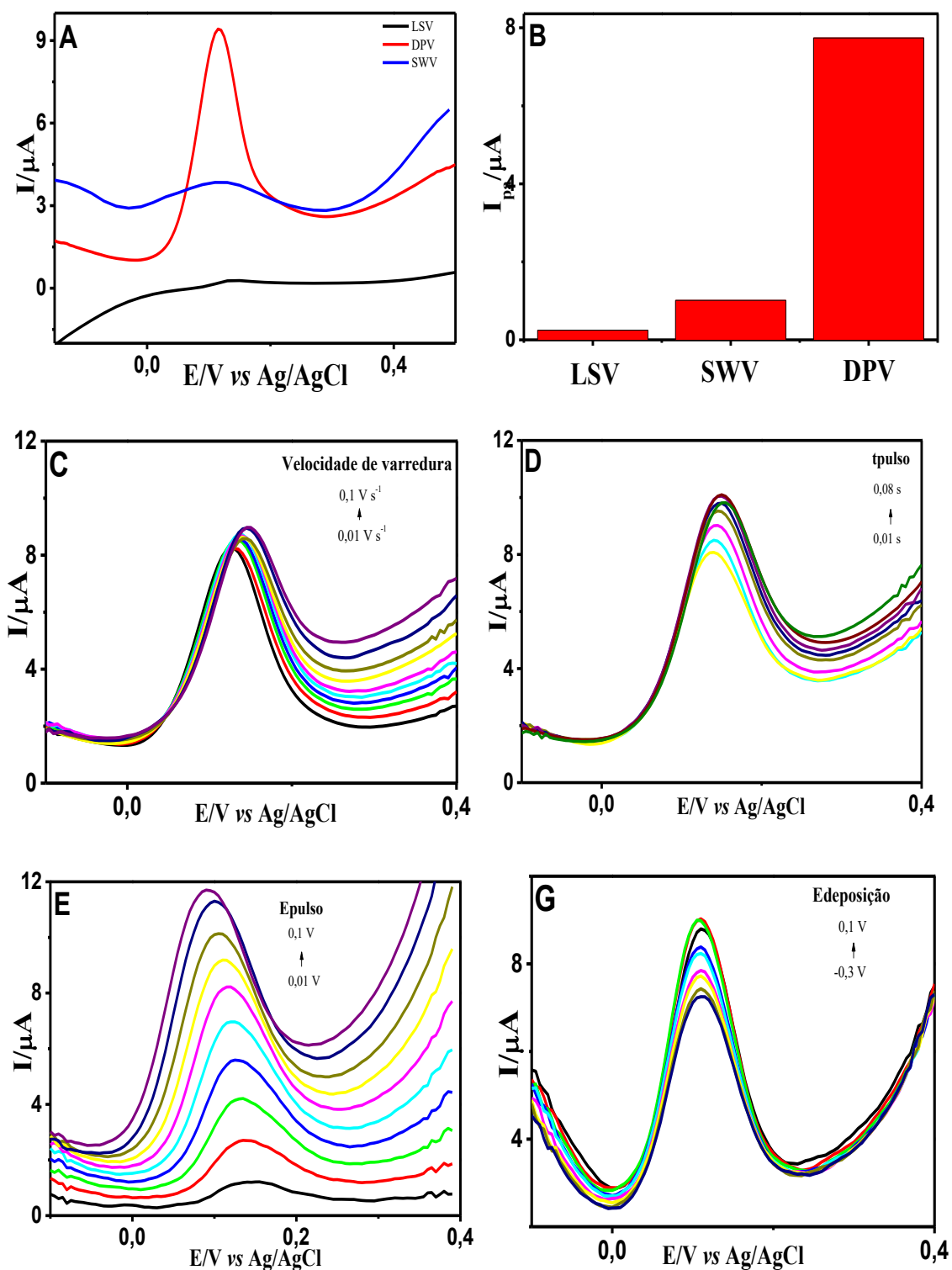
Fonte: Retirado da referência [98]

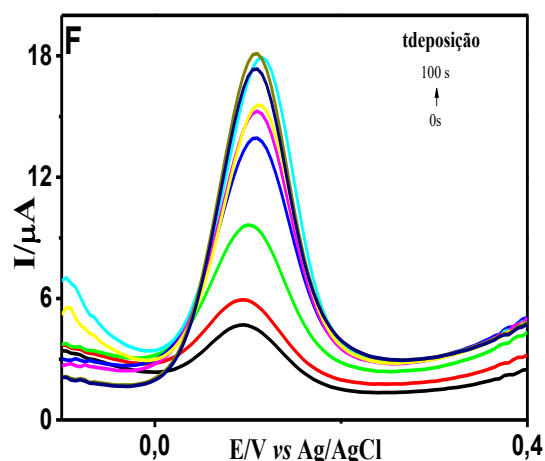
Em seguida, foi avaliado o efeito da concentração do tampão BR na faixa de 0,05 a 0,20 mol L⁻¹ (figura 31C). Observou-se que a corrente de pico atingiu um valor máximo em 0,10 mol L⁻¹ (figura 31D), indicando que essa concentração fornece condições ideais de condutividade e estabilidade para a oxidação da BAI. Concentrações acima ou abaixo de 0,10 mol L⁻¹ resultaram em correntes ligeiramente menores, sugerindo que o equilíbrio entre a condutividade do eletrólito e a estabilidade do sistema é sensível a alterações na concentração do tampão.

5.6 Desenvolvimento do método eletroanalítico

Diversas técnicas eletroanalíticas foram empregadas para potencializar o sinal analítico do método. A Figura 32A apresenta a intensidade do pico da BAI medida por LSV, DPV e SWV. Observa-se que a corrente de pico anódico obtida por DPV apresenta um aumento significativo, aproximadamente 30 vezes e 7,5 vezes maior do que os valores obtidos por SWV e LSV, respectivamente (figura 32B).

Figura 32 - Otimização dos parâmetros experimentais: A) técnicas voltamétricas; B) corrente de pico obtida em cada técnica voltamétrica; C) taxa de varredura; D) t_{pulse} ; E) E_{pulse} ; F) $E_{\text{(deposition)}}$; e G) $t_{\text{(deposition)}}$ na presença de $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI.





Fonte: Retirado da referência [98]

Além disso, o ajuste cuidadoso dos parâmetros da DPV pode influenciar de forma marcante a intensidade da corrente de pico, aumentando a sensibilidade do método. Para isso, diversos parâmetros experimentais foram otimizados na presença de $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI, incluindo taxa de varredura, E_{pulso} , t_{pulso} , $E_{(\text{deposição})}$ e $t_{(\text{deposição})}$, conforme ilustrado nas Figuras 32C–G. As faixas estudadas foram: taxa de varredura ($10\text{--}100 \text{ mV s}^{-1}$), E_{pulso} ($10\text{--}100 \text{ mV}$), t_{pulso} ($10\text{--}80 \text{ ms}$), $E_{(\text{deposição})}$ ($-0,3 \text{ a } 0,1 \text{ V}$) e $t_{(\text{deposição})}$ ($0\text{--}100 \text{ s}$).

Após experimentação sistemática, valores específicos desses parâmetros foram selecionados para investigações posteriores, com base em sua associação com a maior intensidade de corrente e o perfil de pico mais definido. Um resumo completo de todos os parâmetros otimizados é apresentado na tabela 8.

Parâmetro	Faixa	Otimizado
Velocidade de varredura (Vs^{-1})	0,01 – 0,1	0,02
t_{pulso} (s)	0,01 – 0,8	0,06
E_{pulso} (V)	0,01 – 0,1	0,09
$E_{\text{deposição}}$ (V)	-0,3 – 0,1	-0,25
$t_{\text{deposição}}$ (s)	0 – 100	50

Fonte: Retirado da referência [98]

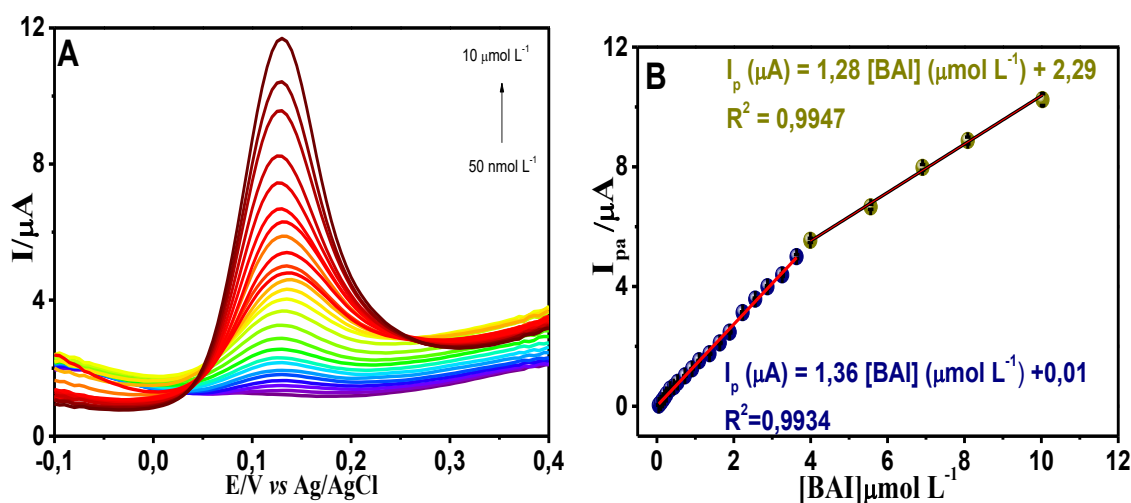
Tabela 8 - Estudo de otimização para a detecção de BAI utilizando o NPGE.

O comportamento eletroquímico da BAI empregando a voltametria de redissolução adsorbtiva (AdSV) em condições previamente otimizadas, estabelecidas em $E_{(\text{deposition})} = -0,25 \text{ V}$ e $t_{(\text{deposition})} = 50 \text{ s}$. Os voltamogramas obtidos (figura 33A) revelaram um aumento progressivo

e bem definido da corrente de pico anódico em função do acréscimo da concentração de BAI, que variou de 50 nmol L^{-1} a $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Essa resposta demonstra não apenas a boa atividade eletroquímica do sistema, mas também a interação favorável do analito com a superfície do eletrodo, refletida em picos simétricos e reproduzíveis.

A partir dos dados experimentais, foram construídas curvas de calibração (figura 33B), nas quais se observaram diferentes inclinações ao longo da faixa de concentração estudada. Esse comportamento resultou em duas regiões lineares distintas, representadas pelas equações: $I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,01 + 1,38 [\text{BAI}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ para concentrações mais baixas, e $I_{pa} (\mu\text{A}) = 2,29 + 1,28 [\text{BAI}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ para concentrações mais elevadas. A presença de duas faixas de linearidade pode estar associada a mudanças no processo de adsorção do analito na superfície eletródica, um fenômeno frequentemente relatado em sistemas de redissolução adsortiva, que apresentam diferentes comportamentos de saturação de sítios ativos conforme a concentração do analito aumenta.

Figura 33 - A) DPAdSV para BAI em uma concentração variando de $0,05 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $10,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. B) A correspondente curva de calibração.



Fonte: Retirado da referência [98]

Para avaliar a sensibilidade do método desenvolvido, foram determinados o LOD e o LOQ com base no desvio padrão de 10 medições do branco ($S_0 = 0,0068 \text{ } \mu\text{A}$) e na inclinação da curva de calibração correspondente às baixas concentrações. Os valores obtidos foram $\text{LOD} = 0,015 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 0,045 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Esses resultados confirmam a alta capacidade do

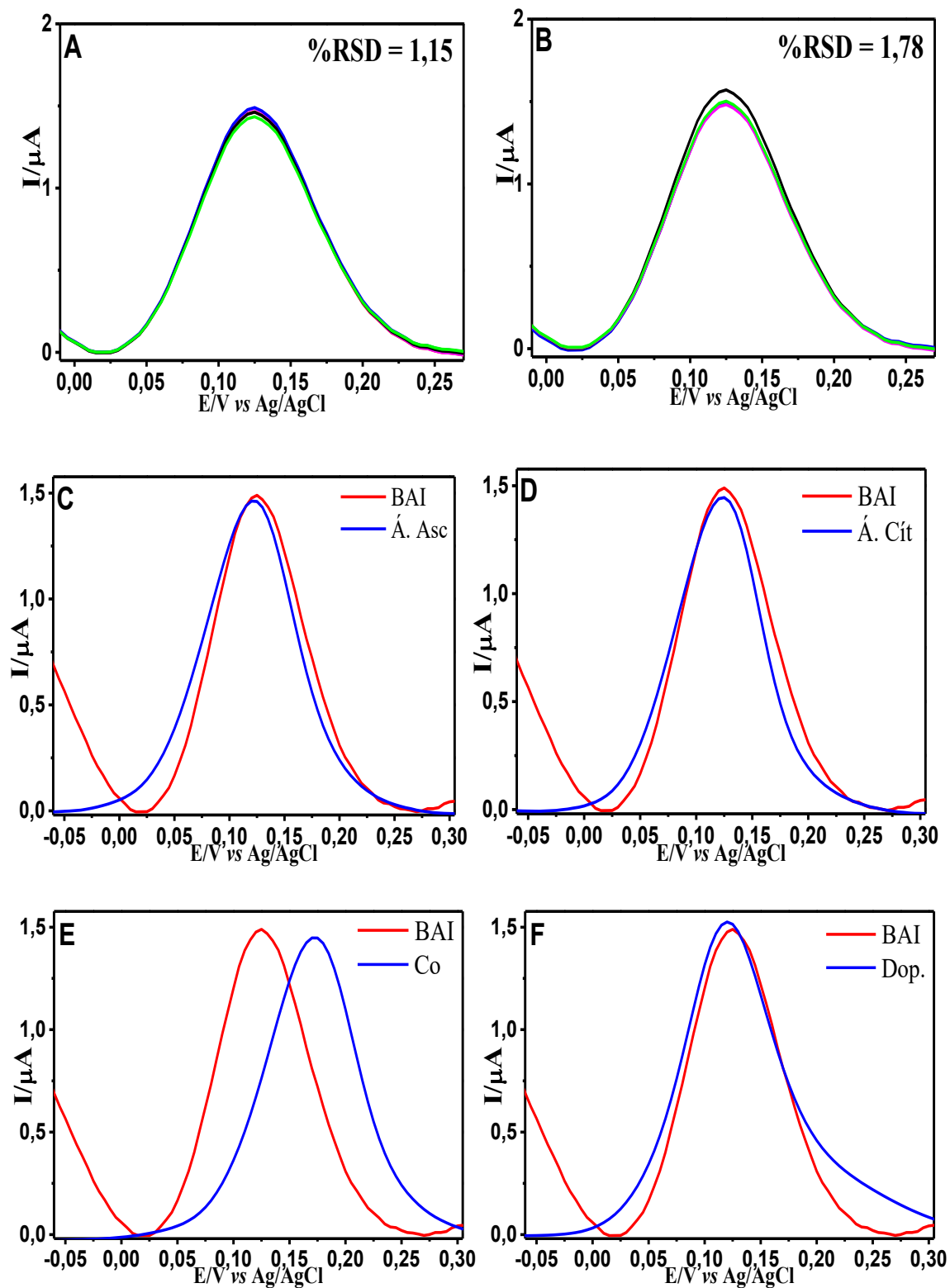
método em detectar pequenas quantidades de BAI, o que amplia sua aplicabilidade em análises de interesse clínico.

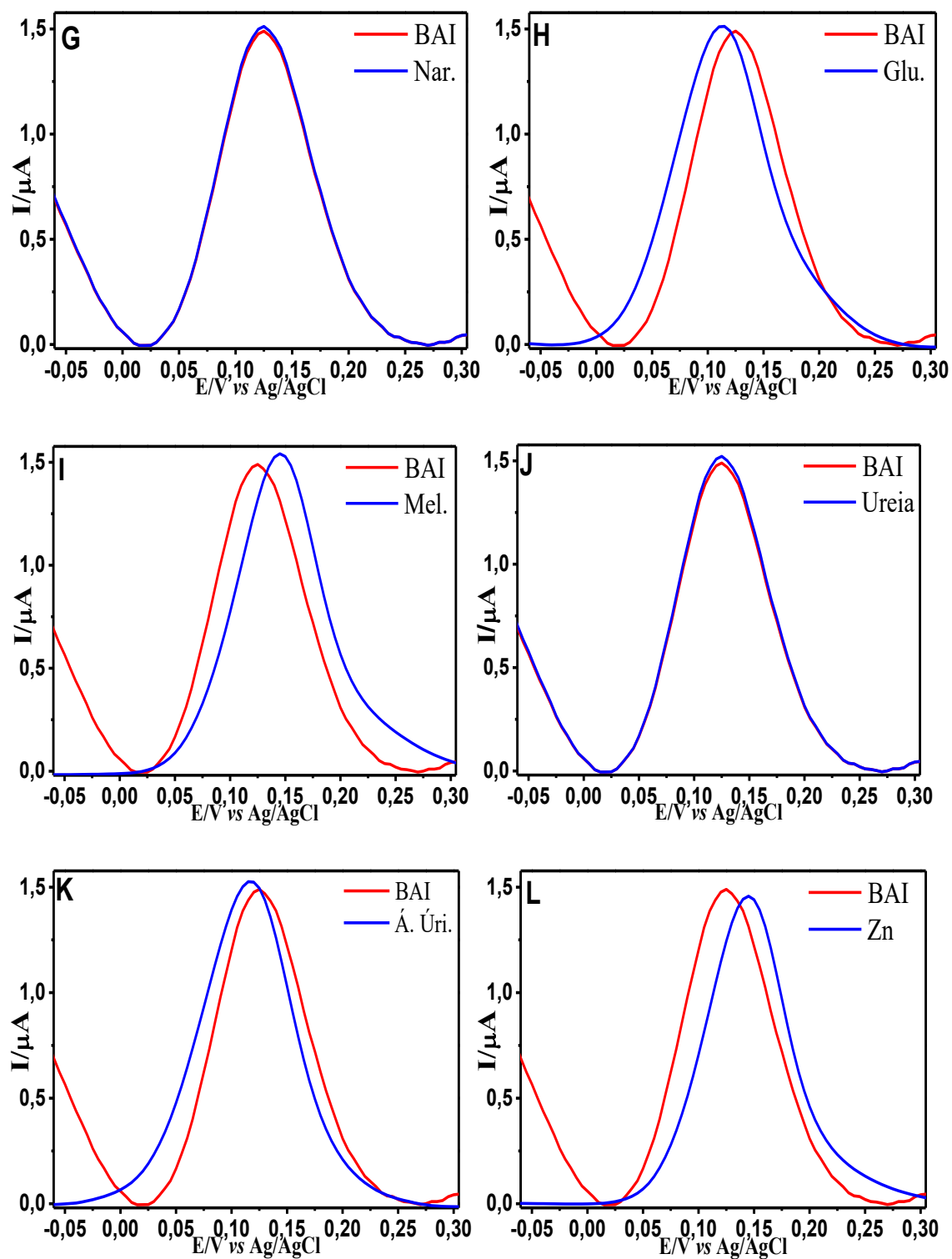
5.7 Seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade

A avaliação da precisão do método eletroanalítico incluiu testes de repetibilidade intra-dia e inter-dia em condições otimizadas, utilizando DPAdSV ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI). Para análise da repetibilidade intra-dia (figura 34A), foram realizadas cinco medidas em réplicas, resultando em um desvio padrão relativo (RSD) de 1,15 % para as respostas de corrente de pico. De forma análoga, a repetibilidade inter-dia foi avaliada ao longo de cinco dias consecutivos, obtendo-se um RSD de 1,78 % (figura 34B). Esses resultados evidenciam a alta uniformidade e confiabilidade das medições proporcionadas pelo NPGE[125].

O estudo teve como objetivo elucidar a seletividade do método eletroquímico desenvolvido na presença de interferentes ambientais comumente encontrados em matrizes biológicas, como sangue e urina. As medidas de DPAdSV foram realizadas em uma concentração fixa de $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BAI na presença dos possíveis interferentes, sendo os voltamogramas resultantes apresentados na figura 34 e os dados correspondentes na tabela 9. Cada interferente foi adicionado diretamente à célula eletroquímica em uma proporção de concentração de 1 (BAI):5 (interferente). Conforme ilustrado nas figuras 34K e 34L, o efeito observado dos interferentes investigados variou de $-2,36 \%$ a $+4,25 \%$, sendo a melatonina o composto que ocasionou a maior interferência na corrente de pico. Ainda assim, a variação de corrente medida em função da presença desses interferentes manteve-se inferior a 15 %, demonstrando a adequada aplicabilidade do novo sensor para fins analíticos[125].

Figura 34 - A) Resposta DPAdSV para BAI no NPGE utilizando cinco eletrodos modificados diferentes; B) Resposta DPAdSV para BAI com cinco medições diferentes no mesmo eletrodo. Estudo de interferentes na proporção 1:5: C) Ácido Ascórbico; D) Ácido Cítrico; E) Cobalto; F) Dopamina; G) Naringenina; H) Glicose; I) Melatonina; J) Ureia; K) Ácido Úrico; L) Zinco.





Fonte: Retirado da referência [98]

Potenciais interferentes	Erro(%)
Ácido ascórbico	-1,04
Ácido cítrico	-1,01
Cobalto	-1,90
Dopamina	+2,64
Narigenina	+1,04
Glicose	+2,15
Melatonina	+4,25
Ureia	+2,17
Ácido úrico	-2,36
Zinco	-1,40

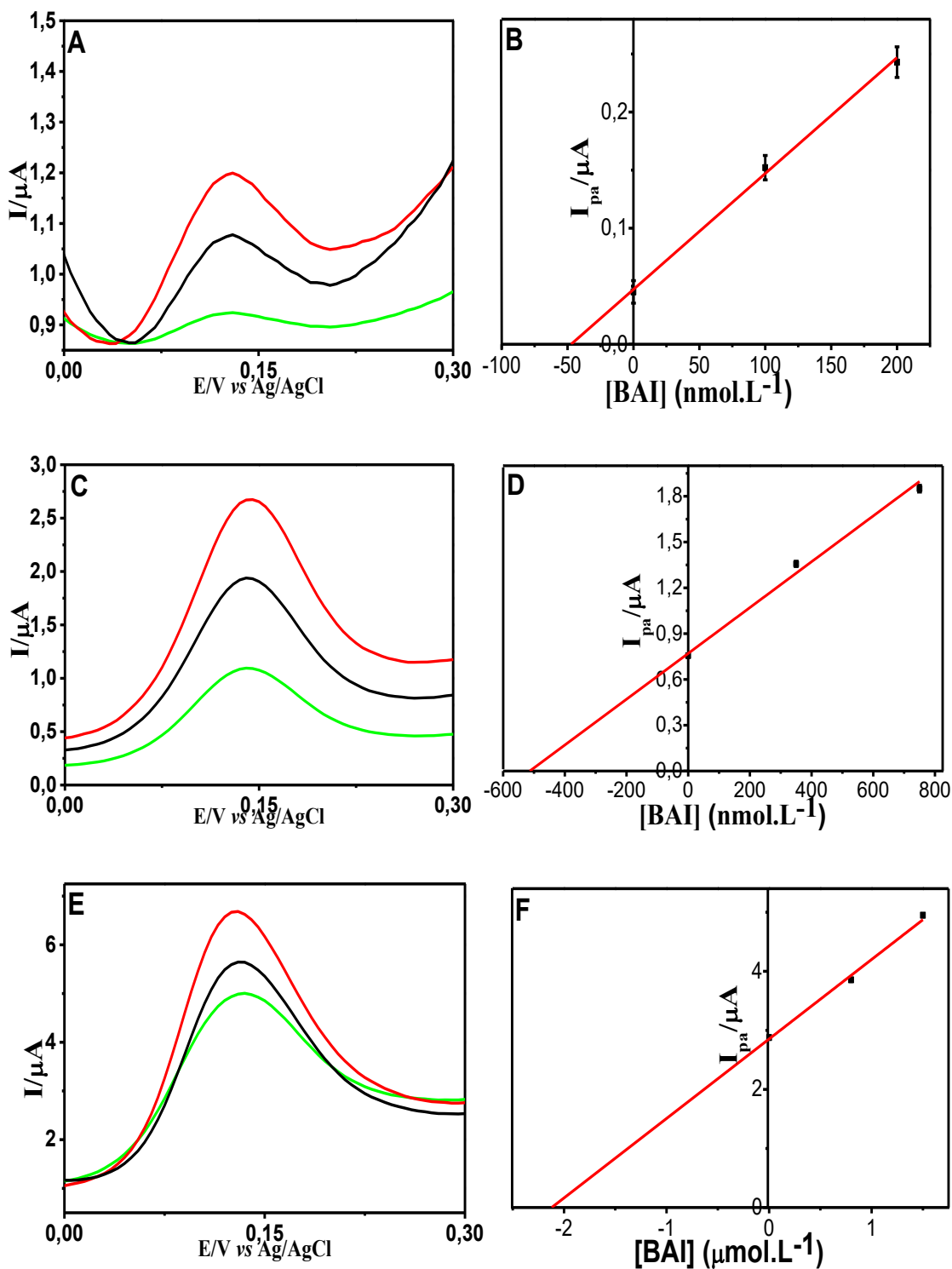
Fonte: Retirado da referência [98]

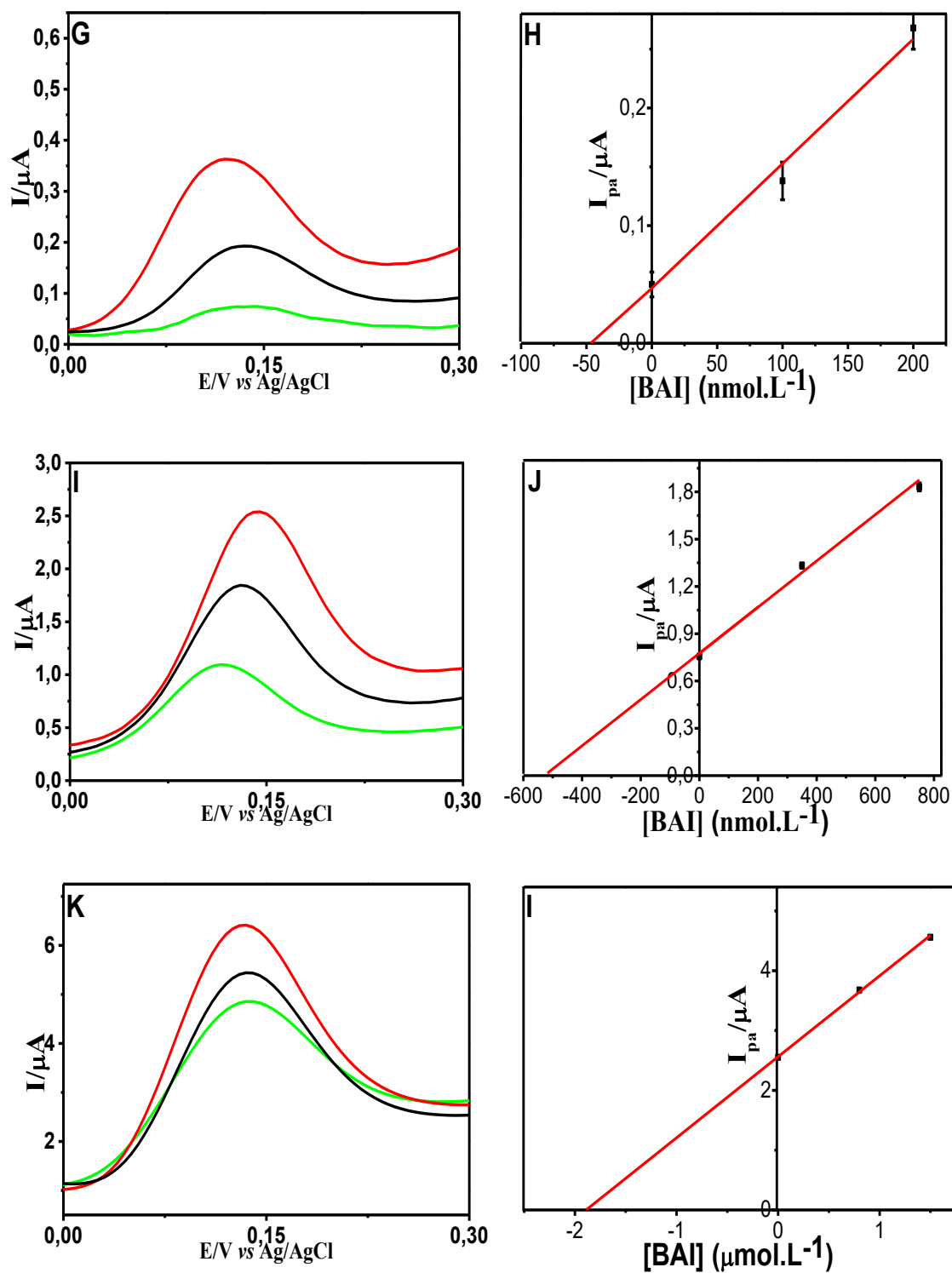
Tabela 9 - Resposta comparativa a interferentes ($n=3$) testada na presença de uma concentração 5 vezes maior de diferentes espécies potencialmente interferentes.

5.8 Determinação de BAI em amostras sintéticas

Para avaliar a aplicabilidade prática do sensor em análises de rotina, realizamos a determinação de BAI em amostras sintéticas de plasma e urina fortificadas ($n=3$). A quantificação foi realizada por meio de uma estratégia de calibração externa, e os resultados são apresentados na figura 35 e tabela 10. No plasma sintético, os valores encontrados para BAI variaram de 0,047 a 2,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$, correspondendo a percentuais de recuperação entre 93,4 % e 106 % e RSDs de 3,94 a 4,28 %. Na urina sintética, os valores encontrados estiveram na faixa de 0,046 a 1,89 $\mu\text{g L}^{-1}$, com recuperações entre 93,6 % e 95,8 % e RSDs de 3,78 a 4,32 %.

Figura 35 - Recuperação de BAI fortificado por DPAdSV na presença de A) $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ em plasma sintético; B) I_{pa} versus concentração de BAI em plasma sintético; C) $0,55 \mu\text{mol L}^{-1}$ em plasma sintético; D) I_{pa} versus concentração de BAI em plasma sintético; E) $2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ em plasma sintético; F) I_{pa} versus concentração de BAI em plasma sintético; G) $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ em urina sintética; H) I_{pa} versus concentração de BAI em urina sintética; I) $0,55 \mu\text{mol L}^{-1}$ em urina sintética; J) I_{pa} versus concentração de BAI em urina sintética; K) $2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ em urina sintética; L) I_{pa} versus concentração de BAI em urina sintética.





Fonte: Retirado da referência [98]

A análise comparativa entre as duas matrizes sugere que a urina apresentou uma leve vantagem em termos de consistência dos resultados, com RSDs ligeiramente menores e recuperações mais homogêneas, enquanto o plasma apresentou valores de recuperação ligeiramente mais altos em concentrações maiores, indicando boa exatidão mesmo em níveis

elevados de BAI. Esses resultados demonstram excelente exatidão e reprodutibilidade, estando todos dentro dos critérios de aceitabilidade do diagrama de trombeta de Horwitz[132]. Além disso, a ausência de efeitos de matriz, combinada com os resultados de interferentes, evidencia a capacidade do sensor de detectar BAI com precisão em diferentes tipos de amostras biológicas.

Os NPGEs já foram relatados como superfícies adequadas para contato direto com amostras clínicas, como soro e urina, devido à resistência ao biofouling[133]. A elevada precisão observada reforça o potencial do sensor para aplicações bioanalíticas, abrindo caminho para sua utilização em contextos clínicos e diagnósticos.

Amostra	Dados	Valores		
sintética				
Plasma	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,05	0,55	2,00
	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,047	0,51	2,12
	RSD (%)	4,28	3,94	4,24
	Recuperação (%)	94,6	93,4	106
Urina	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,05	0,55	2,00
	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,046	0,53	1,89
	RSD (%)	4,32	3,84	3,78
	Recuperação (%)	93,6	95,8	94,6

Fonte: Retirado da referência [98]

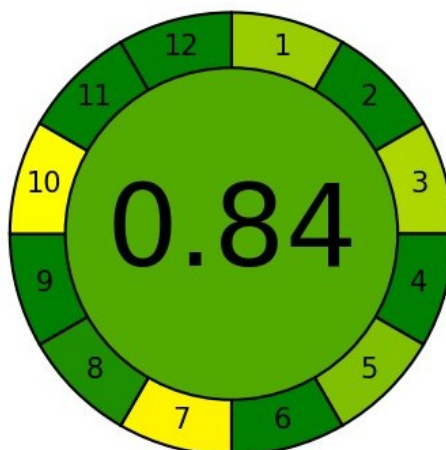
Tabela 10 - dados do estudo de recuperação para a determinação de BAI ($n = 3$) em amostras sintéticas.

5.9 Métricas analíticas e comparação com a literatura

Na busca por técnicas analíticas sustentáveis, a Abordagem de Métricas de GREENness (AGREE) é crucial para avaliar o equilíbrio entre a eficácia analítica e o impacto ambiental[134]. Nosso estudo utilizou a estrutura AGREE para examinar a ecoeficiência do método proposto para a detecção de BAI em amostras complexas. Notavelmente, o método alcançou uma excelente pontuação AGREE de 0,84, conforme mostrado na figura 36. Isso

posiciona nossa abordagem como uma opção viável e ambientalmente consciente para a detecção de BAI.

Figura 36 - Aplicação do método AGREE para avaliação da verdeza (sustentabilidade ambiental).



Fonte: Retirado da referência [98]

Revisões recentes da literatura destacam vários métodos clinicamente aceitos para a detecção de BAI, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo e tempo de voo (HPLC-Q-TOF)[129][135]. Essa técnica tem sido aplicada em amostras clínicas, como plasma e urina, demonstrando LOQ de $3,7 \text{ nmol L}^{-1}$ no plasma, dentro de uma faixa linear de $3,7 \times 10^{-3}$ a $1,85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Para a urina, o LOQ alcançado foi de $37,0 \text{ nmol L}^{-1}$, com faixa linear de $0,037$ a $11,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Em comparação, nosso método eletroquímico baseado em NPGE apresenta LOQ de $45,0 \text{ nmol L}^{-1}$ e opera em uma faixa linear de 50 nmol L^{-1} a $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Isso oferece uma alternativa altamente sensível que simplifica o processo de detecção de BAI, permitindo testes mais rápidos, econômicos e potencialmente portáteis. Ao utilizar uma estrutura nanoporosa, nosso eletrodo aumenta a eficiência de captura do analito, levando a leituras mais precisas e consistentes dentro de faixas clinicamente relevantes. Além disso, nosso método é menos intensivo em recursos, não requer preparo extenso de amostras e é compatível com diagnósticos ponto de atendimento, tornando-o uma opção mais acessível e eficiente para ambientes clínicos.

Ao comparar nossa abordagem com outros métodos eletroquímicos para detecção de BAI, é importante destacar a variedade de modificações mais elaboradas aplicadas em

diferentes plataformas sensoriais. A excelência do nosso método é ainda mais evidente ao compará-lo com diversos relatos anteriores focados na detecção de BAI, conforme apresentado na tabela 11. Funcionalidades de trabalhos anteriores incluem o uso de BDDE não modificado[131], e o do capítulo 4, baseado em DPV utilizando os GCE e GE não modificados, mostrou-se eficiente para a quantificação de BAI com limites de detecção adequados.

Plataforma sensorial	Técnica	Amostra	Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD nmol L^{-1}	Ref
PLL/GCE ^a	DPV	Urine	0,5 - 10	48	[128]
CuO/ZnO-CCNT@CFP ^b	DPV	Produtos farmacêuticos	0,03 – 0,7	1,7	[129]
Ta ₂ O ₅ -CTS-CPE ^c	LSV	Produtos farmacêuticos	0,08 – 4,0	30	[130]
AgNP/ZnONR@CFP ^d	DPV	Produtos farmacêuticos			[136]
Bi ₂ O ₃ -WCNTs/GCE ^e	LSV	Urina e Fitoterápico	0,01 - 15	2,0	[135]
BDDE ^f	SWV	Urina	1,0 - 95	260	[131]
GCE ^g	DPV	Soro e plasma simulados	0,12 – 5,36	31,5	[63]
GE ^h	DPV	Soro e plasma simulados	0,25 - 16	68	[63]
NPGE ⁱ	AdSV	Urina e plasma simulados	0,05 - 10	15	Este trabalho

Fonte: Retirado da referência [98]

Tabela 11 - Desempenho analítico de diferentes métodos eletroanalíticos para a detecção de BAI.

a. eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-L-lisina (PLL/GCE); b. arranjos de nanohastes de ZnO verticalmente alinhadas sobre papel de fibra de carbono (CFP) com CuO; nanosheets com nanotubos de carbono carboxilados (CCNTs), CuO/ZnO@CFP; c. partículas de óxido de tântalo (Ta₂O₅) e eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana (Ta₂O₅-CTS-CPE); d. nanohastes de ZnO (ZnONR) sobre papel de fibra de carbono (CFP) e funcionalizadas com nanopartículas de prata (AgNP), eletrodo em papel; e. eletrodo de óxido de bismuto com nanotubos de carbono multiwall carboxilados/eletrodo de carbono vítreo; f.

eletrodo de diamante dopado com boro; g. eletrodo de carbono vítreo; h. eletrodo de ouro; i. eletrodo de ouro nanoporoso.

Por exemplo, um estudo utilizando CuO/ZnO-CCNT@CFP (arrays de nanohastes de ZnO verticalmente alinhadas sobre papel de fibra de carbono, funcionalizadas com CuO e nanosheets de nanotubos de carbono carboxilados) apresenta uma estratégia de modificação mais complexa. Essa abordagem incorpora diversos materiais para melhorar as propriedades do sensor, resultando em uma faixa linear mais estreita de 0,03 a 0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LOD de 1,7 nmol L^{-1} [129]. Embora essa complexidade vise aumentar a sensibilidade e seletividade, também exige processos de síntese e caracterização mais elaborados.

Em contraste, nossa abordagem é notavelmente mais simples, evitando o uso de materiais complexos como grafeno ou polímeros molecularmente impressos. Em vez disso, baseia-se em um processo direto de pré-tratamento da superfície do eletrodo, rápido e fácil de executar, distinguindo-se de alternativas mais demoradas. O método desenvolvido se destaca na detecção de BAI com alta precisão, superando muitos métodos existentes documentados na literatura científica. Com um limite de detecção baixo, permite a identificação precisa de níveis mínimos de BAI dentro de uma faixa padrão, característica crítica para monitoramento preciso em diversos contextos.

Além disso, o uso mínimo de solventes orgânicos em nosso método reduz significativamente seu impacto ambiental, ao mesmo tempo em que diminui os custos operacionais, tornando-o ecoeficiente e economicamente viável. Nosso método combina sustentabilidade ambiental com desempenho analítico excepcional em um formato fácil de usar. Ao simplificar o processo de fabricação e minimizar a pegada ambiental, o NPGE se destaca como uma solução eficaz para a detecção de BAI, representando um avanço significativo em relação às técnicas tradicionais e oferecendo um meio prático para medições precisas em amostras biológicas.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, desenvolvemos e avaliamos métodos eletroquímicos para a quantificação da BAI, utilizando eletrodos não modificados de GCE e GE, bem como um NPGE com pré-tratamento simples. As abordagens adotadas mostraram-se eficazes para a detecção de BAI,

combinando baixo custo, simplicidade operacional e alto desempenho analítico, evidenciando a viabilidade desses métodos eletroanalíticos diretos em amostras biológicas.

No quarto capítulo, o comportamento eletroquímico da BAI foi investigado de forma integrada com estudos teóricos sobre adsorção e interação molecular nos eletrodos de GCE e GE. As análises voltamétricas, realizadas por DPV, revelaram mecanismos de oxidação distintos para cada eletrodo: controle por difusão no GCE e controle por adsorção no GE. Ambos os eletrodos apresentaram boa seletividade na presença de espécies interferentes, além disso, o GCE foi aplicado com sucesso à quantificação de BAI em amostras de plasma e soro, com recuperação satisfatória. Esses resultados demonstram que eletrodos não modificados podem ser utilizados como ferramentas simples e confiáveis para triagem de flavonas em amostras clínicas, sugerindo aplicações em monitoramento farmacológico.

No quinto capítulo, o desenvolvimento do NPGE proporcionou melhorias significativas na detecção de BAI. Caracterizações físicas indicaram alterações nanoscópicas relevantes na superfície eletrodica, refletindo diretamente em seu desempenho eletroquímico. A aplicação de DPAdSV permitiu a identificação de picos de oxidação bem definidos em amostras de plasma e urina. Estudos teóricos, utilizando métodos DFT e AIMD-SA, mostraram que a presença de nanoporos aumenta a energia de adsorção e fortalece as interações analito-eletrodo, favorecendo quimissorção em substratos altamente porosos. O método demonstrou excelente sensibilidade, seletividade e aplicabilidade prática, reforçando a viabilidade do uso de eletrodos não modificados ou ativados eletroquimicamente em detecções eletroanalíticas rotineiras de BAI.

Portanto, os métodos desenvolvidos neste trabalho apresentam alta confiabilidade, baixo custo e potencial de portabilidade, oferecendo alternativas práticas para análises laboratoriais e de campo. A integração de estudos teóricos e experimentais permitiu compreender os mecanismos de interação da BAI com diferentes eletrodos, orientando futuras aplicações em monitoramento clínico e desenvolvimento de sensores baseados em ouro nanoporoso.

REFERÊNCIAS

- [1] Y. Pyo, K.H. Kwon, Y.J. Jung, Anticancer Potential of Flavonoids: Their Role in Cancer Prevention and Health Benefits, *Foods*. 13 (2024) 2253. <https://doi.org/10.3390/foods13142253>.
- [2] S. Gupta, H.S. Buttar, G. Kaur, H.S. Tuli, Baicalein: Promising Therapeutic Applications With Special Reference to Published Patents, *Pharm. Pat. Anal.* 11 (2022) 23–32. <https://doi.org/10.4155/ppa-2021-0027>.
- [3] P.. HADDAD, Chapter 10 Electrochemical Detection (Amperometry, Voltammetry and Coulometry), in: *J. Chromatogr. Libr.*, 1990: pp. 291–321. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)61142-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61142-2).
- [4] J. Baranwal, B. Barse, G. Gatto, G. Broncova, A. Kumar, Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review, *Chemosensors*. 10 (2022) 363. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- [5] P. Sengupta, K. Khanra, A.R. Chowdhury, P. Datta, Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications, in: *Bioelectron. Med. Devices*, Elsevier, 2019: pp. 47–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102420-1.00004-2>.
- [6] Z. Li, M. Zhu, Detection of pollutants in water bodies: electrochemical detection or photo-electrochemical detection?, *Chem. Commun.* 56 (2020) 14541–14552. <https://doi.org/10.1039/D0CC05709F>.
- [7] A.G. dos Santos Neto, C.S. de Sousa, A. da Silva Freires, S.M. Silva, H. Zanin, F.S. Damos, R. de Cássia Silva Luz, Electrochemical sensor for detection of imipramine antidepressant at low potential based on oxidized carbon nanotubes, ferrocenecarboxylic acid, and cyclodextrin: application in psychotropic drugs and urine samples, *J. Solid State Electrochem.* 22 (2018) 1385–1394. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3772-3>.
- [8] T. Mahmudiono, D. Olegovich Bokov, S. Abdalkareem Jasim, W. Kamal Abdelbasset, Dinora M. Khashirbaeva, State-of-the-art of convenient and low-cost electrochemical sensor for food contamination detection: Technical and analytical overview, *Microchem. J.* 179 (2022) 107460. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107460>.
- [9] J. Hu, Z. Zhang, Application of Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanomaterials for Detection of Flavonoids, *Nanomaterials*. 10 (2020) 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10102020>.
- [10] L. Li, L. Liu, J. Zhou, C. Gu, X. Wu, C. Lei, L. Yan, Cadmium telluride quantum dot-MXene composite-based electrochemical sensing platform for simultaneous determination of rutin and quercetin in foods, *Microchim. Acta.* 192 (2025) 238. <https://doi.org/10.1007/s00604-025-07092-2>.
- [11] S.-L. Yang, G. Li, J. Feng, P.-Y. Wang, L.-B. Qu, Synthesis of core/satellite donut-shaped ZnO–Au nanoparticles incorporated with reduced graphene oxide for electrochemical sensing of rutin, *Electrochim. Acta.* 412 (2022) 140157. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140157>.

- [12] M. Vasudevan, V. Perumal, S. Karuppanan, M. Ovinis, P. Bothi Raja, S.C.B. Gopinath, T.N.J. Immanuel Edison, A Comprehensive Review on Biopolymer Mediated Nanomaterial Composites and Their Applications in Electrochemical Sensors, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 54 (2024) 1871–1894. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2135090>.
- [13] X. Liu, J. Liu, Biosensors and sensors for dopamine detection, *VIEW.* 2 (2021). <https://doi.org/10.1002/VIW.20200102>.
- [14] P. Faradilla, H. Setiyanto, R.V. Manurung, V. Saraswaty, Electrochemical sensor based on screen printed carbon electrode–zinc oxide nano particles/molecularly imprinted-polymer (SPCE–ZnONPs/MIP) for detection of sodium dodecyl sulfate (SDS), *RSC Adv.* 12 (2022) 743–752. <https://doi.org/10.1039/D1RA06862H>.
- [15] S. Ramaraj, M. Sakthivel, S.-M. Chen, M.S. Elshikh, T.-W. Chen, M.-C. Yu, K.-C. Ho, Electrochemical sensing of anti-inflammatory agent in paramedical sample based on FeMoSe₂ modified SPCE: Comparison of various preparation methods and morphological effects, *Anal. Chim. Acta.* 1083 (2019) 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.019>.
- [16] M. Mujeeb-U-Rahman, M. Honarvar Nazari, M. Sencan, A novel semiconductor based wireless electrochemical sensing platform for chronic disease management, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.077>.
- [17] C. Laghlimi, A. Moutcine, A. Chtaini, J. Isaad, A. Soufi, Y. Ziat, H. Amhamdi, H. Belkhanchi, Recent advances in electrochemical sensors and biosensors for monitoring drugs and metabolites in pharmaceutical and biological samples, *ADMET DMPK.* (2023). <https://doi.org/10.5599/admet.1709>.
- [18] R.A.S. Couto, J.L.F.C. Lima, M.B. Quinaz, Screen-printed Electrode Based Electrochemical Sensor for the Detection of Isoniazid in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids, *Int. J. Electrochem. Sci.* 10 (2015) 8738–8749. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)11132-1](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)11132-1).
- [19] M. Zanoni, A. Borges, A. Benedetti, H. Yamanaka, M. del P. Sotomayor, G. Bessegato, N. Stradiotto, C.L. Zanta, A. Andrade, PANORAMA DA ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA NO BRASIL, *Quim. Nova.* (2017). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170072>.
- [20] K.A.P. Sousa, F. de M. Morawski, C.E.M. de Campos, R.L.T. Parreira, M.J. Piotrowski, G.R. Nagurniak, C.L. Jost, Electrochemical, theoretical, and analytical investigation of the phenylurea herbicide fluometuron at a glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta.* 408 (2022) 139945. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.139945>.
- [21] D. de Souza, S.A.S. Machado, L.A. Avaca, Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos, *Quim. Nova.* 26 (2003) 81–89. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>.
- [22] T. Yang, T. Shen, B. Duan, Z. Liu, C. Wang, In Vivo Electrochemical Biosensing Technologies for Neurochemicals: Recent Advances in Electrochemical Sensors and Devices, *ACS Sensors.* 10 (2025) 100–121. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c03314>.

- [23] Ana Maria Oliveira Brett; Cristopher Michael Ashton Brett, *Electroquímica: princípios, métodos e aplicações*, (1996).
- [24] F. Scholz, *Voltammetric techniques of analysis: the essentials*, ChemTexts. 1 (2015) 17. <https://doi.org/10.1007/s40828-015-0016-y>.
- [25] J.M. Pingarrón, J. Labuda, J. Barek, C.M.A. Brett, M.F. Camões, M. Fojta, D.B. Hibbert, Terminology of electrochemical methods of analysis (IUPAC Recommendations 2019), *Pure Appl. Chem.* 92 (2020) 641–694. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0109>.
- [26] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, 2000.
- [27] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochemistry - Principles, methods and applications*, Oxford, 1993.
- [28] A.T. Lawal, Recent developments in electrochemical sensors based on graphene for bioanalytical applications, *Sens. Bio-Sensing Res.* 41 (2023) 100571. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2023.100571>.
- [29] A. Selvam, G. Meenakumari Gopakumar, C.-Y. Kuo, K. Yusuf, B. Saraswathyamma, M. Govindasamy, Design of an ultrasensitive electrochemical sensor using a carbon black/zinc-organic framework nanocomposite for quantifying quercetin in fruits, *Food Chem.* 491 (2025) 145222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145222>.
- [30] L. Zhang, D. Qin, J. Feng, T. Tang, H. Cheng, Rapid quantitative detection of luteolin using an electrochemical sensor based on electrospinning of carbon nanofibers doped with single-walled carbon nanotubes, *Anal. Methods.* 15 (2023) 3073–3083. <https://doi.org/10.1039/D3AY00497J>.
- [31] S. Ghanbari, F. Ahour, S. Keshipour, An optical and electrochemical sensor based on l-arginine functionalized reduced graphene oxide, *Sci. Rep.* 12 (2022) 19398. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23949-5>.
- [32] A. Gomes dos Santos Neto, F. de Matos Morawski, A. Caroline Ferreira Santos, C. Quintino da Rocha, R. Batista de Lima, M. Oliveira Fonseca Goulart, C. Costa dos Santos, F. Colmati, A. Euzébio Goulart Santana, M. Aurélio Suller Garcia, A. Atsushi Tanaka, Host-guest Assembly Based on γ -Cyclodextrin-functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes for Rutin Electrochemical Sensing, *Electroanalysis.* 35 (2023). <https://doi.org/10.1002/elan.202200390>.
- [33] E.S. Orlando. Fatibello-Filho, T. Almeida. Silva, F.C. de. Moraes, *Eletroanálises : aspectos teóricos e práticos*, n.d. <https://pt.everand.com/book/594945200/Eletroanalises-aspectos-teoricos-e-praticos>.
- [34] I. de O. Borges, A.R. Silva Lima, A. Gomes dos Santos Neto, H.K. Stulzer, C.L. Jost, Selective sensing of terbinafine hydrochloride using carbon-based electrodes: a green and sustainable electroanalytical method for pharmaceutical products, *Anal. Methods.* 17 (2025) 1658–1669. <https://doi.org/10.1039/D4AY02151G>.

- [35] K.A. P. Sousa, C. S. de Sousa, F. M. Morawski, A. G. dos Santos Neto, C.L. Jost, Development of an Electroanalytical Method for the Simultaneous Determination of Isoproturon and p-Nitrophenol Using a Non-Modified Glassy Carbon Electrode, *J. Braz. Chem. Soc.* (2025). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20250033>.
- [36] A.R.S. Lima, G. Chitolina-Rodrigues, S.V.S. Dória, D.D.R. Grundmann, T.A. de Lima, H. de A. Silva-Neto, G.R. Nagurniak, H.K. Stulzer, C.L. Jost, Electrochemical sensing of cannabidiol in pharmaceutical dosage forms using modification-free carbon-based electrodes: A voltammetric approach for on-site detection, *Electrochim. Acta.* 541 (2025) 147291. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.147291>.
- [37] J.T. Stock, C.J.O.R. Morris, J.E.B. Randles, L. Airey, *Polarography, Analyst.* 72 (1947) 291. <https://doi.org/10.1039/an9477200291>.
- [38] H.W. Nürnberg, *Polarography and voltammetry in studies of toxic metals in man and his environment, Sci. Total Environ.* 12 (1979) 35–60. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(79\)90005-6](https://doi.org/10.1016/0048-9697(79)90005-6).
- [39] E. Antolini, Platinum-based ternary catalysts for low temperature fuel cells, *Appl. Catal. B Environ.* 74 (2007) 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.03.001>.
- [40] P. Waszczuk, G.-Q. Lu, A. Wieckowski, C. Lu, C. Rice, R.I. Masel, UHV and electrochemical studies of CO and methanol adsorbed at platinum/ruthenium surfaces, and reference to fuel cell catalysis, *Electrochim. Acta.* 47 (2002) 3637–3652. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(02\)00334-1](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(02)00334-1).
- [41] C.S. de Sousa, J.A. de Oliveira Junior, A.G. dos Santos Neto, A.C. Ferreira Santos, G.F. Caramori, A.E. Goulart Santana, G.R. Nagurniak, C.L. Jost, Unlocking the electrochemical signature of Naringenin: Implications for screening in pharmaceutical formulations, *Microchem. J.* 203 (2024) 110896. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110896>.
- [42] V. Ganesh, S.K. Pal, S. Kumar, V. Lakshminarayanan, Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxy cyanobiphenyl thiols on gold—A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 296 (2006) 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.08.051>.
- [43] B.C. Lourencao, R.F. Brocenschi, R.A. Medeiros, O. Fatibello-Filho, R.C. Rocha-Filho, Analytical Applications of Electrochemically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrodes, *ChemElectroChem.* 7 (2020) 1291–1311. <https://doi.org/10.1002/celec.202000050>.
- [44] G.S. Schmitz, E.R. Santana, L.G. Baumgarten, J.P. Winiarski, M.C. Colaço, G.F. Caramori, A. Spinelli, I.C. Vieira, A simple and reliable electrochemical method employing an unmodified boron-doped diamond electrode for the determination of triclocarban, *Electrochim. Acta.* 486 (2024) 144093. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.144093>.
- [45] K.A.O. Souza, A.M.F. Nunes, D.M. Pimentel, R.M. Verly, E.S. Gil, A.R. Malagutti, W.T.P. dos Santos, Altered electrochemistry of amiloride drug on boron-doped diamond electrode: Rapid and selective detection in urine by square-wave cathodic stripping

voltammetry for application in doping control, *Electrochim. Acta.* 373 (2021) 137891. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.137891>.

[46] A.G. dos S. Neto, J.H. Costa, F. de M. Morawski, G. Valentini, F.L. Faita, A.L. Parize, C.L. Jost, Core–Shell Chitosan Cobalt Ferrite Nanoparticles for Ultrasensitive Simultaneous Voltammetric Determination of Pb(II) and Cd(II), *ACS Appl. Nano Mater.* 7 (2024) 18499–18510. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c05627>.

[47] A.-N. Kawde, N. Baig, M. Sajid, Graphite pencil electrodes as electrochemical sensors for environmental analysis: a review of features, developments, and applications, *RSC Adv.* 6 (2016) 91325–91340. <https://doi.org/10.1039/C6RA17466C>.

[48] V.N. Ataide, I.V.S. Arantes, L.F. Mendes, D.S. Rocha, T.A. Baldo, W.K.T. Coltro, T.R.L.C. Paixão, Review—A Pencil Drawing Overview: From Graphite to Electrochemical Sensors/Biosensors Applications, *J. Electrochem. Soc.* 169 (2022) 047524. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac68a0>.

[49] N. Soltani, M. Khayat Kashani, J. Ebrahimian, N. Tavakkoli, A. Rezaei, A. Ryadh, M. Salavati-Niasari, A novel modified CPE using CE-Zno-Lapis lazuli nanocomposite as a sensitive electrochemical sensor for the determination of anti-cancer drug of etoposide, *J. Alloys Compd.* 968 (2023) 171900. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2023.171900>.

[50] Q. Liang, W. Xiao, C. Zhang, D. Zhu, S.-L. Wang, S.-Y. Tian, T. Long, E.-L. Yue, J.-J. Wang, X.-Y. Hou, MOFs-based Fe@YAU-101/GCE electrochemical sensor platform for highly selective detecting trace multiplex heavy metal ions, *Talanta.* 259 (2023) 124491. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124491>.

[51] A. Chaudhary, M.Q. Khan, R.A. Khan, A. Alsalmeh, K. Ahmad, H. Kim, Fabrication of CeO₂/GCE for Electrochemical Sensing of Hydroquinone, *Biosensors.* 12 (2022) 846. <https://doi.org/10.3390/bios12100846>.

[52] C. Gibi, C.-H. Liu, S.C. Barton, S. Anandan, J.J. Wu, Carbon Materials for Electrochemical Sensing Application – A Mini Review, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 154 (2024) 105071. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105071>.

[53] S. Sharma, C.N. Shyam Kumar, J.G. Korvink, C. Kübel, Evolution of Glassy Carbon Microstructure: In Situ Transmission Electron Microscopy of the Pyrolysis Process, *Sci. Rep.* 8 (2018) 16282. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34644-9>.

[54] L. de S. Vieira, A review on the use of glassy carbon in advanced technological applications, *Carbon N. Y.* 186 (2022) 282–302. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.10.022>.

[55] V. Uskoković, A historical review of glassy carbon: Synthesis, structure, properties and applications, *Carbon Trends.* 5 (2021) 100116. <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2021.100116>.

[56] J.D. Benck, B.A. Pinaud, Y. Gorlin, T.F. Jaramillo, Substrate Selection for Fundamental Studies of Electrocatalysts and Photoelectrodes: Inert Potential Windows in

Acidic, Neutral, and Basic Electrolyte, PLoS One. 9 (2014) e107942.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107942>.

[57] E.A. Taft, H.R. Philipp, Optical Properties of Graphite, Phys. Rev. 138 (1965) A197–A202. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.138.A197>.

[58] P.J.F. Harris †, Fullerene-related structure of commercial glassy carbons, Philos. Mag. 84 (2004) 3159–3167. <https://doi.org/10.1080/14786430410001720363>.

[59] G.M. JENKINS, K. KAWAMURA, Structure of Glassy Carbon, Nature. 231 (1971) 175–176. <https://doi.org/10.1038/231175a0>.

[60] S. YAMADA, H. SATO, Some Physical Properties of Glassy Carbon, Nature. 193 (1962) 261–262. <https://doi.org/10.1038/193261b0>.

[61] M.S. Islam, S. Banik, M.M. Collinson, Recent Advances in Bimetallic Nanoporous Gold Electrodes for Electrochemical Sensing, Nanomaterials. 13 (2023) 2515.
<https://doi.org/10.3390/nano13182515>.

[62] S. Nemati, A. Sadeghi, S.M. Khoshfetrat, H. Mohammad Rahimi, K. Omidfar, H. Mirjalali, Development and synthesis of DNA-based label-free electrochemical biosensor for detection of Enterocytozoon bienersi using screen-printed gold electrode, BMC Chem. 19 (2025) 184. <https://doi.org/10.1186/s13065-025-01547-6>.

[63] A.G. dos Santos Neto, T.F. Santos, J.A. de O. Junior, F. de M. Morawski, C.S. de Sousa, G.R. Nagurniak, M.J. Piotrowski, C.L. Jost, Combining novel theoretical and experimental insights into the physical electrochemistry of gold and carbon-based electrodes and baicalein flavonoid sensing, Electrochim. Acta. 475 (2024) 143684.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.143684>.

[64] A. Sukeri, A. Arjunan, M. Bertotti, New strategy to fabricate a polydopamine functionalized self-supported nanoporous gold film electrode for electrochemical sensing applications, Electrochem. Commun. 110 (2020) 106622.
<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.106622>.

[65] J.A. de Oliveira Júnior, G.P. Siqueira, L.K. Ribeiro, D. Coelho, E. Longo, A.M. Batista, H.-B. Kraatz, A.A. Tanaka, L.M.F. Dantas, M.A.S. Garcia, I.S. da Silva, Direct anodization–reduction nanomodification of gold films: investigating electrocatalysis of the emerging contaminant halobenzoquinone, J. Mater. Sci. 57 (2022) 1230–1245.
<https://doi.org/10.1007/s10853-021-06616-4>.

[66] J. Janata, Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers, Phys. Today. 61 (2008) 56–57. <https://doi.org/10.1063/1.2897955>.

[67] C.G. ZOSKI, Handbook of Electrochemistry, n.d.

[68] M.Â.F. PEREZ, Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante., Bol. Tecnol. e Desenvol. Embalagens,. 22, n. 3 (2010) 1–9.

- [69] O. Benedito da Silva, S.A.S. Machado, Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination, *Anal. Methods*. 4 (2012) 2348. <https://doi.org/10.1039/c2ay25111f>.
- [70] M. Sharma, D. Ahuja, A. Jain, Designing and Synthesis of Flavonoids Derivatives and Screening of their Antioxidant Activity, *J. Drug Deliv. Ther.* 9 (2019) 1226–1231. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i2-s.3965>.
- [71] C. Majee, R. Mazumder, A.N. Choudhary, Salahuddin, An Insight into the Hepatoprotective Activity and Structure-activity Relationships of Flavonoids, *Mini-Reviews Med. Chem.* 23 (2023) 131–149. <https://doi.org/10.2174/1389557522666220602141142>.
- [72] A. Tajammal, A. Siddiq, A. Irfan, M. Azam, H. Hafeez, M.A. Munawar, M.A.R. Basra, Antioxidant, molecular docking and computational investigation of new flavonoids, *J. Mol. Struct.* 1254 (2022) 132189. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132189>.
- [73] N.F. Shamsudin, Q.U. Ahmed, S. Mahmood, S.A. Ali Shah, A. Khatib, S. Mukhtar, M.A. Alsharif, H. Parveen, Z.A. Zakaria, Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation, *Molecules*. 27 (2022) 1149. <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>.
- [74] Z. Tan, J. Deng, Q. Ye, Z. Zhang, The Antibacterial Activity of Natural-derived Flavonoids, *Curr. Top. Med. Chem.* 22 (2022) 1009–1019. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220221110506>.
- [75] A. Periferakis, K. Periferakis, I.A. Badarau, E.M. Petran, D.C. Popa, A. Caruntu, R.S. Costache, C. Scheau, C. Caruntu, D.O. Costache, Kaempferol: Antimicrobial Properties, Sources, Clinical, and Traditional Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 15054. <https://doi.org/10.3390/ijms232315054>.
- [76] S.P. Bangar, V. Chaudhary, N. Sharma, V. Bansal, F. Ozogul, J.M. Lorenzo, Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 63 (2023) 9580–9604. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2067121>.
- [77] Z. Mushtaq, N.B. Sadeer, M. Hussain, Mahwish, S.A. Alsagaby, M. Imran, T. Mumtaz, M. Umar, A. Tauseef, W. Al Abdulmonem, T. Tufail, E. Al Jbawi, M.F. Mahomoodally, Therapeutic properties of apigenin: a review on the experimental evidence and basic mechanisms, *Int. J. Food Prop.* 26 (2023) 1914–1939. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2236329>.
- [78] K.S. Allemailem, A. Almatroudi, H.O.A. Alharbi, N. AlSuhaymi, M.H. Alsugoor, F.M. Aldakheel, A.A. Khan, A.H. Rahmani, Apigenin: A Bioflavonoid with a Promising Role in Disease Prevention and Treatment, *Biomedicines*. 12 (2024) 1353. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061353>.
- [79] A. Baranwal, P. Aggarwal, A. Rai, N. Kumar, Pharmacological Actions and Underlying Mechanisms of Catechin: A Review, *Mini-Reviews Med. Chem.* 22 (2022) 821–833. <https://doi.org/10.2174/1389557521666210902162120>.

- [80] H. Yong, J. Liu, Polysaccharide-catechin conjugates: Synthesis methods, structural characteristics, physicochemical properties, bioactivities and potential applications in food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 145 (2024) 104353. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104353>.
- [81] J. Song, L. Zhang, Y. Xu, D. Yang, L. Zhang, S. Yang, W. Zhang, J. Wang, S. Tian, S. Yang, T. Yuan, A. Liu, Q. Lv, F. Li, H. Liu, B. Hou, X. Peng, Y. Lu, G. Du, The comprehensive study on the therapeutic effects of baicalein for the treatment of COVID-19 in vivo and in vitro, *Biochem. Pharmacol.* 183 (2021) 114302. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114302>.
- [82] C. Yun, S. Wang, Y. Gao, Z. Zhao, N. Miao, Y. Shi, I. Ri, W. Wang, H. Wang, Optimization of ultrasound-assisted enzymatic pretreatment for enhanced extraction of baicalein and wogonin from *Scutellaria baicalensis* roots, *J. Chromatogr. B.* 1188 (2022) 123077. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123077>.
- [83] H. Cheng, W. Weng, H. Xie, J. Liu, G. Luo, S. Huang, W. Sun, G. Li, Au-Pt@Biomass porous carbon composite modified electrode for sensitive electrochemical detection of baicalein, *Microchem. J.* 154 (2020) 104602. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104602>.
- [84] Drugbank online, “Baicalein”, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB16101>.
- [85] PubChem Compound Summary for CID 5281605, Baicalein, Natl. Cent. Biotechnol. Inf. (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Baicalein>.
- [86] G. Xu, J. Dou, L. Zhang, Q. Guo, C. Zhou, Inhibitory Effects of Baicalein on the Influenza Virus in Vivo Is Determined by Baicalin in the Serum, *Biol. Pharm. Bull.* 33 (2010) 238–243. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.238>.
- [87] S. Ji, R. Li, Q. Wang, W. Miao, Z. Li, L. Si, X. Qiao, S. Yu, D. Zhou, M. Ye, Anti-H1N1 virus, cytotoxic and Nrf2 activation activities of chemical constituents from *Scutellaria baicalensis*, *J. Ethnopharmacol.* 176 (2015) 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.018>.
- [88] E. Verma, A. Kumar, U. Devi Daimary, D. Parama, S. Girisa, G. Sethi, A.B. Kunnumakkara, Potential of baicalein in the prevention and treatment of cancer: A scientometric analyses based review, *J. Funct. Foods.* 86 (2021) 104660. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104660>.
- [89] M.M. Lamers, B.L. Haagmans, SARS-CoV-2 pathogenesis, *Nat. Rev. Microbiol.* 20 (2022) 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>.
- [90] C.B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe, Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23 (2022) 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- [91] M. Mori, D. Quaglio, A. Calcaterra, F. Ghirga, L. Sorrentino, S. Cammarone, M. Fracella, A. D’Auria, F. Frasca, E. Criscuolo, N. Clementi, N. Mancini, B. Botta, G. Antonelli, A. Pierangeli, C. Scagnolari, Natural Flavonoid Derivatives Have Pan-Coronavirus

Antiviral Activity, *Microorganisms*. 11 (2023) 314.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11020314>.

[92] H. Wang, Y. Sun, W. Guo, J. Wang, J. Gao, W. Peng, J. Gu, Identification and high-throughput quantification of baicalein and its metabolites in plasma and urine, *J. Ethnopharmacol.* 301 (2023) 115853. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115853>.

[93] M.A. Khazeei Tabari, A. Iranpanah, R. Bahramsoltani, R. Rahimi, Flavonoids as Promising Antiviral Agents against SARS-CoV-2 Infection: A Mechanistic Review, *Molecules*. 26 (2021) 3900. <https://doi.org/10.3390/molecules26133900>.

[94] Y. Wang, Y. Zhang, J. Xiao, R. Xu, Q. Wang, X. Wang, Simultaneous determination of baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin, scutellarin, berberine, coptisine, ginsenoside Rb1 and ginsenoside Re of Banxia xiexin decoction in rat plasma by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018).
<https://doi.org/10.1002/bmc.4083>.

[95] Y. Guo, W. Li, P. Guo, X. Han, Z. Deng, S. Zhang, Z. Cai, One facile fluorescence strategy for sensitive determination of baicalein using trypsin-templated copper nanoclusters, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 268 (2022) 120689.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120689>.

[96] G. Kesavan, V. Vinothkumar, S.-M. Chen, D.T. Thangadurai, Phosphorus-doped graphitic carbon nitride: A metal-free electrocatalyst for quercetin sensing in fruit samples, *Electrochim. Acta*. 426 (2022) 140759. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140759>.

[97] Y. Zhang, X. Wang, L. Wang, M. Yu, X. Han, Interactions of the baicalin and baicalein with bilayer lipid membranes investigated by cyclic voltammetry and UV–Vis spectroscopy, *Bioelectrochemistry*. 95 (2014) 29–33.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.10.008>.

[98] A.G. dos Santos Neto, J.A. de Oliveira, G.R. Nagurniak, S. Zhang, M.E.H.M. da Costa, L. Liu, M.A.S. Garcia, S.Y.G. González, M.J. Piotrowski, C.L. Jost, Integrating theoretical and experimental insights into nanoporous gold electrochemistry for enhanced baicalein sensing performance, *Electrochim. Acta*. 509 (2025) 145316.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.145316>.

[99] J. Mocak, A.M. Bond, S. Mitchell, G. Scollary, A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 297–328. <https://doi.org/10.1351/pac199769020297>.

[100] A. Gomes dos Santos Neto, A. Caroline Ferreira Santos, J. Antonio de Oliveira Junior, C. Luisa Jost, C. Silva de Sousa, M. Oliveira Fonseca Goulart, A. Euzébio Goulart Santana, S. Yesid Gomez Gonzalez, E. Esteves da Silva, J. Eliza Silva Fonsaca, S. Humberto Domingues, D. Fossatti Dall'Oglio, H. Aguilar Vitorino, A. Atsushi Tanaka, F. de Matos Morawski, M. Aurélio Suller Garcia, Exploiting synergistic effects: Cheap ultra-sensitive electrochemical rutin detection using WO₃/rGO nanocomposite in combination with multiwalled carbon nanotubes, *Microchem. J.* 193 (2023) 109090. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109090>.

- [101] É.T.G. Cavaleiro, C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho, Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds, *Bioanal. Rev.* 4 (2012) 31–53. <https://doi.org/10.1007/s12566-012-0027-8>.
- [102] P.W. S. Bhusari, B. Gotmare, Development and Validation of UV-Spectrophotometric Method for Estimation of Baicalein in *Oroxylum indicum* Leaf Extract, *Pharma Innov.* 8 (2019) 366–370.
- [103] J. de Oliveira S. Silva, M.V.S. Sant’Anna, A. Gevaerd, J.B.S. Lima, M.D.S. Monteiro, S.W.M.M. Carvalho, E. Midori Sussuchi, A Novel Carbon Nitride Nanosheets-based Electrochemical Sensor for Determination of Hydroxychloroquine in Pharmaceutical Formulation and Synthetic Urine Samples, *Electroanalysis*. 33 (2021) 2152–2160. <https://doi.org/10.1002/elan.202100170>.
- [104] L.I. Perea-Ramírez, R. Vargas, Z. Domínguez, M. Salas-Reyes, M.H. Matus, M. Galván, Theoretical study of the adsorption of substituted guaiacol and catechol radicals on a graphite surface, *Electrochim. Acta*. 242 (2017) 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.04.146>.
- [105] R. Jaimes, R. Cervantes-Alcalá, W. García-García, M. Miranda-Hernández, Ab initio computational modeling of the electrochemical reactivity of quinones on gold and glassy carbon electrodes, *Electrochim. Acta*. 284 (2018) 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.07.110>.
- [106] P. Mélinon, Vitreous Carbon, Geometry and Topology: A Holistic Approach, *Nanomaterials*. 11 (2021) 1694. <https://doi.org/10.3390/nano11071694>.
- [107] N.E. Singh-Miller, N. Marzari, Surface energies, work functions, and surface relaxations of low-index metallic surfaces from first principles, *Phys. Rev. B*. 80 (2009) 235407. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.80.235407>.
- [108] P. Hohenberg, W. Kohn, Inhomogeneous Electron Gas, *Phys. Rev.* 136 (1964) B864–B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>.
- [109] W. Kohn, L.J. Sham, Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Phys. Rev.* 140 (1965) A1133–A1138. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133>.
- [110] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865–3868. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>.
- [111] S. Grimme, Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1787–1799. <https://doi.org/10.1002/jcc.20495>.
- [112] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H–Pu, *J. Chem. Phys.* 132 (2010). <https://doi.org/10.1063/1.3382344>.
- [113] P.E. Blöchl, Projector augmented-wave method, *Phys. Rev. B*. 50 (1994) 17953–17979. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.50.17953>.

- [114] D.D. Koelling, B.N. Harmon, A technique for relativistic spin-polarised calculations, *J. Phys. C Solid State Phys.* 10 (1977) 3107–3114. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/10/16/019>.
- [115] G. Kresse, J. Hafner, Ab initio molecular dynamics for open-shell transition metals, *Phys. Rev. B.* 48 (1993) 13115–13118. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.48.13115>.
- [116] G. Kresse, J. Furthmüller, Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set, *Phys. Rev. B.* 54 (1996) 11169–11186. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.54.11169>.
- [117] T.P. Brdarić, Z.S. Marković, D. Milenković, J.M. Dimitrić Marković, A joint application of vibrational spectroscopic and quantum mechanical methods in quantitative analysis of baicalein structure, *Monatshefte Für Chemie - Chem. Mon.* 143 (2012) 1369–1378. <https://doi.org/10.1007/s00706-012-0805-6>.
- [118] P. Koskinen, S. Malola, H. Häkkinen, Self-Passivating Edge Reconstructions of Graphene, *Phys. Rev. Lett.* 101 (2008) 115502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.101.115502>.
- [119] D.C. Elias, R.R. Nair, T.M.G. Mohiuddin, S. V. Morozov, P. Blake, M.P. Halsall, A.C. Ferrari, D.W. Boukhvalov, M.I. Katsnelson, A.K. Geim, K.S. Novoselov, Control of Graphene's Properties by Reversible Hydrogenation: Evidence for Graphane, *Science* (80-.). 323 (2009) 610–613. <https://doi.org/10.1126/science.1167130>.
- [120] P.A. Thrower, R.M. Mayer, Point defects and self-diffusion in graphite, *Phys. Status Solidi.* 47 (1978) 11–37. <https://doi.org/10.1002/pssa.2210470102>.
- [121] L. Guan, X. Li, Q. Li, J. Guo, L. Jin, Q. Zhao, B. Liu, Relaxation and electronic states of Au(100), (110) and (111) surfaces, *Solid State Commun.* 149 (2009) 1561–1564. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2009.05.046>.
- [122] R. Tran, Z. Xu, B. Radhakrishnan, D. Winston, W. Sun, K.A. Persson, S.P. Ong, Surface energies of elemental crystals, *Sci. Data.* 3 (2016) 160080. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.80>.
- [123] J. Zhou, F. Wang, K. Zhang, G. Song, J. Liu, B. Ye, Electrochemical sensor for Baicalein using a carbon paste electrode doped with carbon nanotubes, *Microchim. Acta.* 178 (2012) 179–186. <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0812-7>.
- [124] E. Laviron, Adsorption, autoinhibition and autocatalysis in polarography and in linear potential sweep voltammetry, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 52 (1974) 355–393. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(74\)80448-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(74)80448-1).
- [125] H.M. R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárcel, Widmer, *Analytical Chemistry: A modern approach to analytical science*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New Jersey, 2004.

- [126] D. Zhang, Y. Zhang, L. He, Sensitive Voltammetric Determination of Baicalein at Thermally Reduced Graphene Oxide Modified Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis*. 25 (2013) 2136–2144. <https://doi.org/10.1002/elan.201300189>.
- [127] J. Qiao, Y. Zhang, S. Lei, Z. Liu, G. Li, B. Ye, Sensitive determination of baicalein based on functionalized graphene loaded RuO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode, *Talanta*. 188 (2018) 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.047>.
- [128] C.M.W. B. Yang, F. Di Hu, J.P. Wei, Electrochemical study on baicalein at poly-L-lysine modified glass carbon electrode, *Acta Chim. Sin.* 67 (n.d.) 2585–2591.
- [129] Z. Zhang, Y. Fan, X. Wang, H. Tu, J. Jiang, C. Zhang, X. Zhao, J. Ma, M. Wang, R. Xu, Efficient simultaneous determination of baicalein and luteolin based on a carbon fiber paper electrode modified with CuO/ZnO-CCNT ternary nanocomposite, *J. Appl. Electrochem.* 54 (2024) 189–202. <https://doi.org/10.1007/s10800-023-01954-4>.
- [130] Z. Xie, G. Li, Y. Fu, M. Sun, B. Ye, Sensitive, simultaneous determination of chrysin and baicalein based on Ta₂O₅-chitosan composite modified carbon paste electrode, *Talanta*. 165 (2017) 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.021>.
- [131] D. Kuzmanović, D.M. Stanković, D. Manojlović, K. Kalcher, G. Roglić, Baicalein – main active flavonoid from *Scutellaria baicalensis* – voltammetric sensing in human samples using boron doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 58 (2015) 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2015.06.002>.
- [132] G.W. Latimer, ed., Guidelines for Standard Method Performance Requirements, in: *Off. Methods Anal. AOAC Int.*, Oxford University Press, New York, 2023. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.005.006>.
- [133] B. Beykal, M. Herzberg, Y. Oren, M.S. Mauter, Influence of surface charge on the rate, extent, and structure of adsorbed Bovine Serum Albumin to gold electrodes, *J. Colloid Interface Sci.* 460 (2015) 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.08.055>.
- [134] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.
- [135] S. Shi, Y. Wei, J. Feng, C. Zhou, J. Zuo, L. Yao, J. Ding, K. Li, Q. He, Facile and ultrasensitive electrochemical detection of baicalein on bismuth oxide-carboxylated multi-walled carbon nanotube/glassy carbon electrode, *J. Food Compos. Anal.* 123 (2023) 105557. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105557>.
- [136] Z. Zhang, Y. Zuo, Y. Fan, X. Wang, C. Wang, S. Yang, X. Zhao, M. Wang, R. Xu, In situ fabrication of Ag nanoparticles modified vertically-grown ZnO nanorods on carbon fiber paper electrode for simultaneous detection of luteolin, daidzein and baicalein, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 694 (2024) 134118. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.134118>.