



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO DE
NANOPLAQUETAS DE GRAFITE DISPERSAS EM
QUITOSANA PARA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL
EM FÁRMACOS**

STEPHANI STAMBOROSKI

Florianópolis
Julho/2016

Stephani Stamboroski

**SENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO DE NANOPLAQUETAS
DE GRAFITE DISPERSAS EM QUITOSANA PARA DETERMINAÇÃO
DE PARACETAMOL EM FÁRMACOS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: Prof. Dr^a Alessandra Smaniotto

Florianópolis
Julho/2016

Stephani Stamboroski

**SENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO DE NANOPLAQUETAS
DE GRAFITE DISPERSAS EM QUITOSANA PARA DETERMINAÇÃO
DE PARACETAMOL EM FÁRMACOS**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a. Alessandra Smaniotto
Orientador

Prof. Dr. Daniel Lázaro Galindo Borges

Dr^a. Adriana Neves Dias

Florianópolis
julho/2016

**Aos meus pais,
Zilmar e Amauri**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida e por guiar os meus caminhos e os de minha família;

Agradeço aos meus pais, Amauri e Zilmar, que me ensinaram que amar é querer ver o outro feliz, independentemente de onde outrem estiver e também por estarem sempre presentes em minha vida, mesmo longe, me apoiando em minhas decisões e aventuras;

Aos meus irmãos, Maycon e Junior por me inspirarem e me incentivarem a seguir meus sonhos;

À minha orientadora Alessandra, não apenas pela orientação maravilhosa, mas também pela amizade desenvolvida, pela paciência, dedicação e por sempre alegrar o laboratório com seu bom humor;

Ao Douglas pela irmandade e companheirismo desenvolvidos ao longo da graduação. Serei sempre grata a sua amizade;

Ao Vinicius por todo carinho, paciência, amor, parceria e incentivo;

Aos amigos e amigas que conquistei ao longo da graduação, especialmente a Lela, Nine, Amanda, Lu e Pati por terem compartilhado comigo tantos momentos e histórias engraçadas e inesquecíveis;

À família do 401 pelos finais de semana regados a muita comida gostosa e momentos compartilhados;

À minha cunhada e amiga Rafa, pela amizade e empoderamento e por ter me emprestado seu notebook para eu continuar escrevendo quando o meu estragou;

Ao sucessoren pela amizade maravilhosa e por terem compartilhado comigo a experiência inesquecível de morar na Alemanha;

Às minhas amigas de Cascavel Agatha e Mirian;

Às meninas e ao Lucas do LaBios pelo companheirismo e ajuda sempre que precisei;

À Welch e ao Michael, pelos conhecimentos compartilhados, pelo crescimento profissional e por todos os votos de confiança;

À professora Maria da Graça pela dedicação aos seus alunos e pelo carinho de sempre;

À Salete, por encher o Douglas e eu de elogios e por todo carinho e amor dedicados a nós. Seremos sempre seus amadinhos Sassá!

À professora Iolanda pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelas orientações e incentivos;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores e servidores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC), pelas análises de microscopia;

Ao professor Dr. Daniel Lázaro Galindo Borges e à Dr^a. Adriana Neves Dias por aceitarem participar da banca examinadora;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro concedido ao longo do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS	iv
RESUMO	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 SENSORES ELETROQUÍMICOS E ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM's)	2
2.1.1 Monocamadas Auto Organizadas em Eletrodos de Ouro	3
2.1.2 Nanoplaquetas de Grafite	5
2.2 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	7
2.3 PARACETAMOL	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 OBJETIVO GERAL	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	11
4.2 EQUIPAMENTOS	12
4.3 CONSTRUÇÃO DO SENSOR	12
4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	13
4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO SENSOR ELETROQUÍMICO	14
4.5.1 Construção da curva de calibração	14

4.5.2 Estudo de Interferentes	14
4.5.3 Estudo de repetibilidade intra-dia e repetibilidade entre eletrodos	14
4.5.4 Determinação de paracetamol em amostras farmacêuticas	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA	16
5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO MODIFICADO.....	17
5.2.1 Avaliação do comportamento eletroquímico em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	17
5.2.2 Efeito da velocidade de varredura e determinação da área eletroativa do sensor	20
5.3 CONTRIBUIÇÃO DOS MODIFICADORES NA RESPOSTA ANALÍTICA PARA PARACETAMOL	22
5.4 OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE CONSTRUÇÃO E OPERAÇÃO DO SENSOR.....	24
5.4.1 Efeito do tempo de contato com MPA.....	24
5.4.2 Seleção e otimização da técnica eletroanalítica.....	25
5.4.3 Efeito do pH do eletrólito de suporte.....	27
5.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO SENSOR	28
5.6.1 Curva de calibração	28
5.6.2 Estudos de repetibilidade intra-dia e repetibilidade entre eletrodos.....	30
5.6.3 Estudo de interferentes.....	30
5.6.4 Determinação de paracetamol em uma amostra farmacêutica.....	31
6 CONCLUSÕES	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da formação de monocamada de tiol (ácido 3-mercaptopropiônico) em superfície de ouro.....	4
Figura 2. Representação da estrutura cristalina do grafite	5
Figura 3. Estrutura primária da quitosana	6
Figura 4. Mecanismo de oxidação eletroquímica do PCT, formando N-acetil-p-benzoquinona imina	8
Figura 5. Imagens de TEM (A e B) e da suspensão (D) das nanoplaquetas de grafite dispersas em quitosana e (C) NPQ em água.....	16
Figura 6. Imagens de SEM-FEG obtidas com 5,0 kV para (A) e (B) AuE limpo e (C) e (D) para NPQ/SAM/AuE e ampliação de 1000x para (A) e (B) e 5000x para (C) e (D).	17
Figura 7. Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ obtidos com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para (a) AuE, (b) SAM/AuE e (c) NPQ/SAM/AuE.	18
Figura 8. Diagramas de Nyquist obtidos em KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}), modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1 a 100.000 Hz para (a) AuE, (b) SAM/AuE e (c) NPQ/SAM/AuE.	20
Figura 9. (A) CVs obtidos com o sensor proposto em KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}) em diferentes velocidades de varredura de (a) 10,0; (b) 20,0; (c) 30,0; (d) 50,0; (e) 70,0; (f) 100,0; (g) 120,0; (h) 150,0; (i) e (j) 250 mV s^{-1}	21
Figura 10. (A) Gráfico de i_{pa} e i_{pc} vs. $v^{1/2}$ para (1) AuE e (2) NPQ/SAM/AuE. (B) $\log i_{pa}$ e i_{pc} vs. $\log v$	22
Figura 11. SWV empregando (a) AuE e (b) SAM/AuE e (c) NPQ/SAM/AuE em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0) contendo $10,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol. Frequência de 40 Hz; amplitude de 80 mV; incremento de 3 mV	23
Figura 12. Representação esquemática do princípio de funcionamento do sensor.	24
Figura 13. Diagramas de Nyquist obtidos em KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}), modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para (A) SAM/AuE e (B) NPQ/SAM/AuE em diferentes tempos de imersão em MPA: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 3, (e) 5 e (f) 24 horas.	25
Figura 14. Comparação entre técnicas relacionando a concentração de paracetamol ($3,1$ a $14,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) com a corrente de pico gerada (medidas realizadas em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0), utilizando (a) SWV e (b) DPV.....	26

Figura 15. Investigação dos parâmetros de SWV ($n = 3$) sobre a resposta analítica do sensor proposto empregando paracetamol ($10,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0). (A) Estudo da frequência (10 - 100 Hz); (B) Estudo da amplitude de pulso (10 - 100 mV); (C) Estudo do incremento de potencial (1 - 10 mV).....27

Figura 16. (A): Voltamogramas de voltametria cíclica empregando paracetamol $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato em: pH 4,0 e pH 5,0; tampão fosfato pH 6,0; pH 7,0 e pH 8,0. (B): (I) Resposta relativa (%) para o paracetamol em diferentes pH; (II) Deslocamento linear do potencial de pico com a variação do pH, para SWV.28

Figura 17. (A) Voltamogramas de SWV (frequência de 40 Hz, amplitude de pulso de 80 mV e incremento de varredura de 3 mV) obtidos utilizando o sensor proposto em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0) e soluções de paracetamol, nas seguintes concentrações: (a) $1,5 \times 10^{-6}$; (b) $3,1 \times 10^{-6}$; (c) $4,6 \times 10^{-6}$ (d) $6,1 \times 10^{-6}$; (e) $7,6 \times 10^{-6}$; (f) $9,1 \times 10^{-6}$; (g) $1,05 \times 10^{-5}$; (h) $1,2 \times 10^{-5}$; (i) $1,35 \times 10^{-5}$; (j) $1,49 \times 10^{-5}$; (k) $1,64 \times 10^{-5}$; (l) $1,78 \times 10^{-5}$ e (m) $1,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração para (a) NPQ/SAM/AuE e (b) AuE.29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da determinação de paracetamol em amostra farmacêutica utilizando o método analítico proposto e o valor de referência rotulado na embalagem da amostra.....	32
--	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

A – Área do eletrodo

Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata/cloreto de prata

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AuE – Eletrodo de ouro

C – Concentração

Chi – Quitosana

CV – Voltametria cíclica (inglês: *Cyclic Voltammetry*)

D – Coeficiente de difusão

DPR % - Desvio padrão relativo em porcentagem

DPV – Voltametria de pulso diferencial (inglês: *differential pulse voltammetry*)

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (inglês: *electrochemical impedance spectroscopy*)

EQM – Eletrodos quimicamente modificados

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

i_{pa} – Corrente de pico anódica

i_{pc} – Corrente de pico catódica

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LOD – Limite de detecção (inglês: *limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (inglês: *limit of quantification*)

MPA – Ácido 3- mercaptopropiônico

NPQ – Nanoplaquetas de grafite

PCT – Paracetamol

r – Coeficiente de correlação

R_{ct} – Resistência à transferência de elétrons

SAM – Monocamadas auto-organizadas (inglês: *Self Assembled Monolayers*)

SEM-FEG – Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (inglês: *field emission gun scanning electron microscope*)

SWV – Voltametria de onda quadrada (inglês: *square wave voltammetry*)

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (inglês: *transmission electron microscopy*)

Δi – Corrente de pico resultante

RESUMO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado em monocamadas auto organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) e filme de nanoplaquetas de grafite dispersas em quitosana para a determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas. As nanoplaquetas de grafite (NPQ) foram dispersas em uma solução de quitosana em ácido acético e ancoradas à superfície de eletrodos de ouro por meio de monocamadas auto-organizadas (SAM) de MPA. A caracterização do sensor proposto foi realizada por voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG). A área eletroativa do sensor, determinada por CV empregando $K_4[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como sonda redox, foi cerca de 2 vezes maior que do eletrodo de ouro. O efeito do tempo de contato com MPA na formação das SAMs e na adesão do filme foi avaliado por EIS e CV, selecionando-se um tempo de imersão do eletrodo em solução de MPA de 2 h. A voltametria de onda quadrada (SWV) foi selecionada como técnica eletroanalítica. As condições experimentais que resultaram em um melhor perfil voltamétrico para a aplicação analítica foram o emprego de tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0) como eletrólito de suporte e os parâmetros da técnica de SWV de 40 Hz de frequência, 80 mV de amplitude e 3 mV de incremento de potencial. A curva de calibração para o paracetamol foi obtida nas condições otimizadas e apresentou uma faixa linear de $1,5$ a $19,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação (r) de 0,995 e limite de detecção de $0,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. O sensor apresentou um desempenho analítico aceitável em termos da repetibilidade intra-dia e entre eletrodos (2,5 % e 9,4%, respectivamente). A determinação de paracetamol em uma amostra farmacêutica utilizando o método proposto apresentou erro relativo de 1,7% e recuperação entre 97,3 e 101,4 %. Dessa forma, o eletrodo desenvolvido se mostrou adequado para a determinação de paracetamol em amostras farmacêuticas, sendo uma ferramenta útil para análises rápidas e com exatidão satisfatória.

Palavras-chave: paracetamol, eletrodo quimicamente modificado, monocamadas auto-organizadas, quitosana, nanoplaquetas de grafite.

1 INTRODUÇÃO

O composto *N*-(4-hidroxifenil)etanamida, popularmente conhecido como paracetamol, é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas amplamente receitado e utilizado mundialmente. É uma droga substituta ao ácido acetilsalicílico (aspirina) e ministrada para dores de cabeça, dores nas articulações, dores reumáticas, enxaqueca, dismenorreia, entre outras. Quando usado de forma adequada, dentro da dose recomendada, essa substância não apresenta risco à saúde. Entretanto, a facilidade de acesso e aquisição de medicamentos analgésicos aliada à variedade de fármacos que contém o paracetamol preocupa as agências e organizações de saúde, uma vez que o número de intoxicações por medicamentos tem crescido. Em doses elevadas ou usado concomitantemente com álcool, o paracetamol possui um alto potencial hepatotóxico, podendo causar falência hepática e levar o indivíduo a óbito.

Além da problemática da automedicação, outro fator de risco é a falsificação dos medicamentos, que podem causar danos à saúde por falta de efeitos terapêuticos ou efeitos adversos. O paracetamol também é considerado um poluente emergente, ou seja, uma substância química sintética encontrada em matrizes ambientais e biológicas que apresenta potencial risco à saúde. Sendo assim, é notável a importância do monitoramento do teor de paracetamol em amostras farmacêuticas, matrizes ambientais e fluidos biológicos.

O desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos é uma área em contínuo crescimento, devido a vantagens como a rapidez, baixo custo de instrumentação e simplicidade de operação inerente às técnicas eletroanalíticas. Eletrodos quimicamente modificados (EQM) têm sido amplamente utilizados como eletrodos de trabalho, pois possibilitam um aumento na sensibilidade e seletividade de eletrodos convencionais. A modificação do eletrodo normalmente concede a este as características físico-químicas do modificador utilizado. Neste trabalho, tem-se como objetivo o desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico para detecção de paracetamol em fármacos a partir da modificação de um eletrodo de ouro com nanoplaquetas de grafite ancoradas em monocamadas auto-organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SENSORES ELETROQUÍMICOS E ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM's)

Segundo a IUPAC¹, sensores eletroquímicos são um tipo específico de sensor químico que transformam a interação eletroquímica entre o analito e um eletrodo em um sinal analiticamente útil. Dentre os principais tipos de sensores eletroquímicos (potenciométricos, amperométricos e condutimétricos), os amperométricos utilizam a aplicação de um potencial entre um eletrodo de referência e de trabalho para causar oxidação ou redução de espécies eletroativas, o que gera uma corrente que é então mensurada.²

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica. Esse destaque pode ser devido a características como sensibilidade e seletividade dos sensores aliadas à rapidez na detecção, simplicidade e baixo custo, além da possibilidade de portabilidade.^{3,4}

O desempenho de sensores amperométricos é fortemente influenciado pelo material que constitui os eletrodos de trabalho. Eletrodos sólidos e de metais nobres, como os de ouro, são amplamente utilizados devido à sua ampla faixa de potencial anódico, cinética de transferência de elétrons favorável, inércia química, baixo custo e versatilidade. Entretanto, os eletrodos de ouro possuem uma pequena faixa de potencial catódica, que pode ser ampliada pela modificação da superfície do metal.^{2,5}

Os EQM's surgiram como uma maneira de aumentar a sensibilidade e seletividade dos sensores eletroquímicos e minimizar suas limitações, como a gradativa passivação da superfície devida à adsorção de espécies presentes em solução.^{2,3,6,7} As modificações desses eletrodos se dão pela imobilização de espécies quimicamente ativas em sua superfície com o objetivo de controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. Fenômenos como pré-concentração do analito, eletrocatalise e exclusão de interferentes são os responsáveis pela melhora na sensibilidade e seletividade dos sensores.^{2,6}

Neste trabalho, um eletrodo de ouro convencional foi modificado com monocamadas auto organizadas de tiol (MPA) e nanoplaquetas de grafite. Algumas das principais propriedades desses modificadores encontram-se descritas a seguir.

2.1.1 Monocamadas Auto Organizadas em Eletrodos de Ouro

Monocamadas auto organizadas (SAM *self-assembled monolayers*) podem ser descritas como um arranjo de moléculas (ou átomos) adsorvidas em superfícies sólidas e que podem ser formadas espontaneamente por meio da imersão dessas superfícies em soluções de moléculas anfóteras.^{3,8} Cada molécula constituinte desse sistema geralmente apresenta três regiões distintas: cabeça, esqueleto e grupo terminal. A cabeça guia o processo de organização, já que apresenta um grupo ligante responsável pela fixação da cadeia carbônica ao substrato. O esqueleto garante a organização devido à repulsão causada pelas interações intermoleculares hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas. E por fim, grupos funcionais terminais (que podem ou não estar presentes) conferem propriedades específicas à superfície, além de possibilitar a ancoragem de outras moléculas, biomoléculas ou nanoestruturas.⁸⁻¹⁰ Sendo assim, as monocamadas podem ser consideradas interfaces multifuncionais, capazes de interagir com substâncias que possuam características hidrofílicas ou hidrofóbicas, proporcionando a união entre moléculas ou materiais com propriedades completamente diferentes.⁸

SAM's têm sido amplamente estudadas e utilizadas como forma de modificação de eletrodos.^{3,9-11} Existem diversos mecanismos de adesão de monocamadas aos eletrodos sólidos,¹⁰ sendo que um dos sistemas mais utilizados envolve a adsorção irreversível de alcanos funcionalizados em superfícies metálicas.^{9,10} Dentro dessa abordagem, é muito empregada a quimissorção de derivados de enxofre, como tióis, em eletrodos de ouro, pois a ligação entre o ouro e tióis é termodinamicamente favorável e estável em uma ampla faixa de potencial.^{8,12-15}

Alcanotióis contendo ácidos carboxílicos como grupos terminais são frequentemente empregados na obtenção de monocamadas, pois (i) possibilitam interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos terminais e moléculas presentes ao longo da interface, (ii) apresentam um grupo funcional reativo que permite a ancoragem de outras moléculas ou estruturas à superfície e (iii) proporcionam alterações na polaridade da interface.¹² A Figura 1 representa a formação de uma monocamada de MPA, cuja estrutura envolve uma cadeia carbônica curta com um grupo carboxílico e um grupo tiol em extremidades opostas,

em uma superfície de ouro. Na molécula de MPA, o grupo tiol constitui a cabeça, a cadeia carbônica é o esqueleto e o grupamento carboxílico é o grupo funcional terminal.

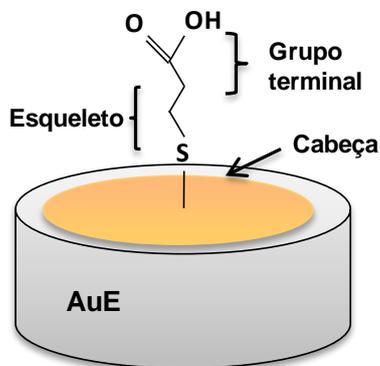


Figura 1. Representação esquemática da formação de monocamada de tiol (ácido 3-mercaptopropiônico) em superfície de ouro.

O tamanho e o ordenamento da cadeia alquílica desses alcanotióis influencia no mecanismo de transferência de elétrons na superfície do eletrodo. De maneira geral, com o aumento da cadeia carbônica ocorre um bloqueio progressivo da transferência eletrônica, devido a um melhor empacotamento das monocamadas, que dificulta a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o seio da solução.¹⁶⁻¹⁹ Entretanto, mesmo em sistemas muito bem ordenados, podem ocorrer defeitos nas monocamadas, caracterizados tanto pela falta de um pequeno número de moléculas (também chamado de *pinholes*) quanto por regiões onde as moléculas apresentam um certo grau de desordem.⁸

A deformidade das monocamadas interfere nos mecanismos de transferência de carga através da monocamada. Em geral, supõe-se que o mecanismo de transferência de carga ocorra por efeito de tunelamento através das cadeias carbônicas, entretanto, quando há defeitos na monocamada, estes podem oferecer um caminho alternativo para a passagem de elétrons.⁸ Monocamadas formadas por alcanotióis de cadeias mais curtas geralmente apresentam mais defeitos e menor cobertura da superfície e, portanto, exibem menor resistência à passagem de elétrons, o que pode ser uma vantagem na aplicabilidade dessas monocamadas em sensores eletroquímicos.¹⁸ Neste trabalho, monocamadas auto-organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico foram utilizadas para possibilitar a ancoragem de

nanoplaquetas de grafite (um material particulado com características hidrofóbicas) a um eletrodo de ouro.

2.1.2 Nanoplaquetas de Grafite

Materiais gráfiticos particulados como nanotubos de carbono, fulerenos e grafeno têm atraído grande interesse no meio científico devido às suas notáveis características elétricas, térmicas e mecânicas, que possibilitam suas aplicações no desenvolvimento de nanodispositivos, fibras ultra-resistentes, sensores e suportes para catalisadores.^{20,21}

A grafite (Figura 2) é uma das formas alotrópicas do carbono em que os átomos de carbono apresentam hibridização sp^2 e uma estrutura lamelar, ou seja, é composta por infinitas camadas de átomos de carbono. Essas camadas são conhecidas como camadas de grafeno e se ligam fracamente por interações de Van der Waals.²²

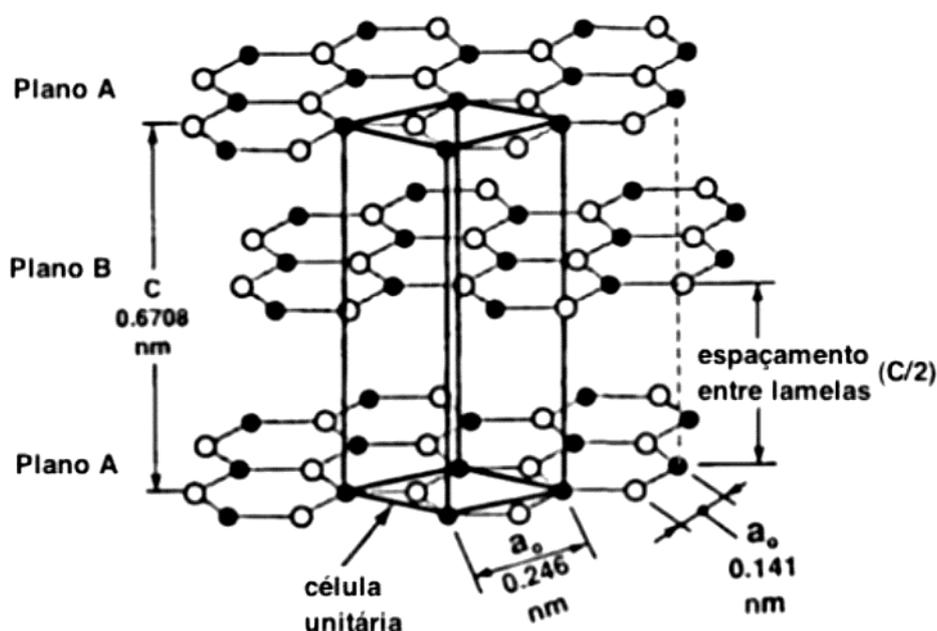


Figura 2. Representação da estrutura cristalina do grafite.²³

A partir da exfoliação de grafite é possível obter materiais como grafeno e nanoplaquetas de grafite. Grafeno é o nome dado a uma monocamada bidimensional de carbonos hibridizados em sp^2 organizados de forma hexagonal,

que é a unidade elementar presente em outras formas alotrópicas do carbono como grafite, fulerenos e nanotubos.^{21,24-25} O grafeno, assim como os nanotubos de carbono, apresenta excelente condutividade elétrica, uma característica muito atraente para aplicação na modificação de sensores. Entretanto, esses materiais possuem um elevado custo de obtenção, sendo as nanoplaquetas de grafite uma alternativa economicamente favorável.²¹

As nanoplaquetas de grafite (NPQ) são constituídas por algumas camadas de grafeno empilhadas que mantêm parcialmente as propriedades elétricas desse material. Além disso, apresentam um custo de obtenção inferior aos nanotubos de carbono e ao grafeno, tornando promissora sua aplicação no campo da eletroanalítica. Por possuírem características hidrofóbicas devido às interações de Van der Waals entre as camadas de grafeno, as nanoplaquetas de grafite não são estáveis em meio aquoso e, portanto, estudos para obter suspensões estáveis desse material em surfactantes e polieletrólitos têm sido desenvolvidos.^{21,26}

Eletrodos modificados com dispersões ou nanocompósitos de quitosana e nanotubos de carbono^{27,28,29,30,31}, quitosana e grafeno^{32,33} e quitosana e nanoplaquetas de grafite³⁴ têm sido estudados e desenvolvidos visando diferentes aplicações. A quitosana, cuja estrutura é apresentada na Figura 3, é um biopolímero derivado da desacetilação da quitina que é biocompatível, biodegradável, de baixa toxicidade e elevada resistência mecânica.²⁶⁻²⁸ Além disso, possui uma excelente capacidade de formação de filmes, alta permeabilidade em água, boa adesão em superfícies e baixo custo.^{27,28,32} A quitosana apresenta alta porosidade, com poros muito pequenos, em escala nanométrica, o que faz desse polímero um excelente suporte para a imobilização de diversas espécies eletroativas.^{26,29} Devido a todas essas propriedades, a quitosana é um polieletrólito capaz de formar suspensões estáveis com materiais gráfiticos como as nanoplaquetas de grafite, possibilitando a deposição e adesão de filmes desse material sobre eletrodos convencionais.^{30-34,37}

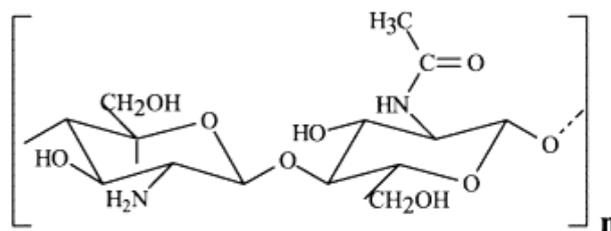


Figura 3. Estrutura primária da quitosana.³⁸

2.2 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas envolvem a análise indireta a partir da relação entre medidas de propriedades elétricas, tais como corrente, potencial e carga, com propriedades químicas inerentes a um determinado sistema.³⁹ Dentre as técnicas eletroanalíticas, serão empregadas nesse trabalho a voltametria cíclica (CV), a voltametria de onda quadrada (SWV) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

A voltametria é uma técnica eletroanalítica baseada na medida da corrente gerada em função do potencial aplicado e, por isso, é considerada uma técnica dinâmica.⁴⁰ Consiste na medida da corrente em uma célula eletroquímica, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo de trabalho. Sendo assim, quando uma diferença de potencial é aplicada na célula eletroquímica, é medida a corrente elétrica gerada entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, o que constitui o sinal analítico.⁴¹

A CV é uma técnica útil para obtenção de informações qualitativas a respeito de processos eletroquímicos sob diferentes condições e encontra ampla aplicabilidade no estudo de reações redox, detecção de intermediários de reação e acompanhamento de reações envolvendo produtos formados no eletrodo. Na CV, a varredura de potencial é realizada no sentido da oxidação ou da redução e, em seguida, na direção contrária, sendo a corrente medida ao longo da varredura.⁴¹ Já a SWV é uma técnica de pulso rápida e sensível muito utilizada em medidas quantitativas, com limites de detecção comparáveis aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas.⁴² Na SWV a corrente é medida no final dos pulsos diretos e reversos, o que minimiza o efeito da corrente capacitiva.⁴³

Por fim, a EIS é uma técnica muito empregada para caracterização de materiais e filmes e em estudos de mecanismos de eletro-deposição, entre outros. Na EIS, um sinal de excitação sinusoidal de pequena amplitude é aplicado ao sistema sob investigação e a resposta é medida em forma de corrente, tensão ou outro sinal de interesse.⁴⁴

2.3 PARACETAMOL

O paracetamol (PCT), também conhecido como acetaminofeno, é um analgésico e antipirético amplamente conhecido e utilizado, sendo facilmente encontrado em farmácias e drogarias. É, também, uma droga substituta à aspirina e administrada para dores de cabeça, dores nas articulações, dores reumáticas, enxaqueca, dismenorreia, entre outras.^{28,29,32}

Apesar de seu uso terapêutico, doses excessivas de PCT podem ser prejudiciais à saúde, podendo causar danos hepáticos e renais severos. O PCT é também utilizado na indústria de corantes, como precursor da penicilina, estabilizador de peróxido de nitrogênio e como aditivo no petróleo.^{32,33,35} Consequentemente, o paracetamol é inevitavelmente lançado ao meio ambiente, sendo considerado um poluente emergente.^{33,45}

Sendo assim, diversos métodos têm sido desenvolvidos para monitorar e detectar paracetamol em fármacos, meios biológicos e na água. Espectrometria, cromatografia e titrimetria são exemplos de métodos utilizados para este fim sendo recomendado pela farmacopeia brasileira o doseamento de paracetamol em comprimidos empregando o método de cromatografia líquida de alta eficiência ou espectrometria no UV-Vis.⁴⁶ Entretanto, métodos cromatográficos possuem elevado custo operacional e, portanto, sendo o paracetamol um composto eletroativo^{27,35} (Figura 4), sua análise utilizando técnicas eletroanalíticas se torna atrativa, sendo que essas técnicas apresentam vantagens como o baixo custo, rapidez e simplicidade operacional, além de apresentarem alta sensibilidade.^{32,33,35}

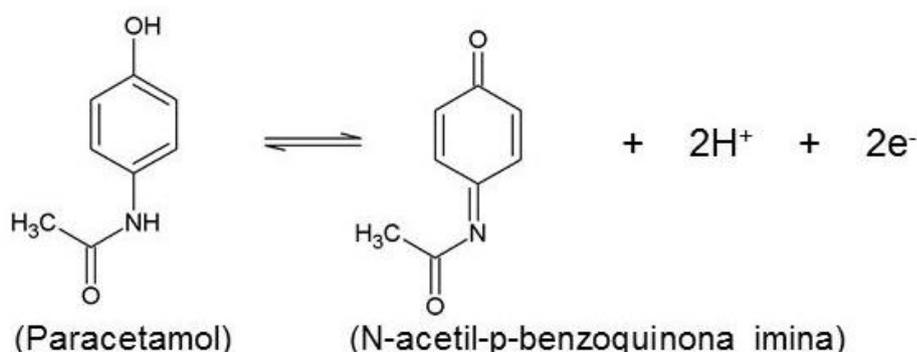


Figura 4. Mecanismo de oxidação eletroquímica do PCT, formando N-acetil-p-benzoquinona imina.³²

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um novo sensor eletroquímico a partir da modificação da superfície de eletrodos de ouro com nanoplaquetas de grafite dispersas em quitosana e ancoradas aos eletrodos por meio de monocamadas auto-organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico. Os eletrodos modificados serão empregados na determinação de paracetamol em uma amostra farmacêutica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter suspensões estáveis e homogêneas de nanoplaquetas empregando uma solução de quitosana em meio ácido como dispersante;
- Construir monocamadas auto-organizadas na superfície de eletrodos de ouro por imersão em solução etanólica de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA);
- Aderir o filme de nanoplaquetas dispersas em quitosana na superfície recoberta com monocamadas auto-organizadas de MPA por gotejamento da suspensão;
- Estudar a influência do tempo de imersão em ácido 3-mercaptopropiônico na formação das monocamadas e na adesão do filme de nanoplaquetas de grafite por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS);
- Empregar as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG) para caracterizar a suspensão de nanoplaquetas de grafite em quitosana e a morfologia da superfície dos eletrodos modificados;
- Estudar o efeito da velocidade de varredura e determinar a área eletroativa do eletrodo de ouro limpo e do sensor desenvolvido empregando voltametria cíclica em presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$;
- Avaliar o comportamento eletroquímico do sensor e a contribuição de cada modificação por CV e EIS em presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ou paracetamol;
- Selecionar a técnica eletroanalítica mais sensível para a determinação de paracetamol empregando o eletrodo modificado entre a voltametria de pulso diferencial (DPV) e a SWV;

- Otimizar as condições experimentais para a operação do sensor na determinação de paracetamol: natureza e pH do eletrólito suporte e parâmetros da técnica voltamétrica selecionada;
- Realizar estudos de repetibilidade intra-dia e repetibilidade entre eletrodos;
- Construir uma curva de calibração com o intuito de avaliar o desempenho analítico do sensor.
- Aplicar o sensor modificado na determinação de paracetamol em amostra farmacêutica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore). Todos os reagentes foram obtidos comercialmente, em grau analítico, sem realização de purificação adicional.

As soluções tampão fosfato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando-se uma mistura de monohidrogenofosfato (Na_2HPO_4) e dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4). O ajuste do pH destas soluções foi realizado na faixa de 6,0 a 8,0 através da adição de hidróxido de sódio ou ácido fosfórico de acordo com a necessidade.

As soluções tampão acetato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas usando uma mistura de acetato de sódio e ácido acético. O ajuste do pH destas soluções foi realizado na faixa de 4,0 a 5,0, através da adição de hidróxido de sódio ou ácido acético.

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica foram realizadas utilizando-se uma solução aquosa com concentração de 5 mmol L^{-1} de ferrocianeto ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, que foi preparada pela dissolução desses sais em água.

As suspensões de nanoplaquetas de grafite foram preparadas a partir da mistura de uma solução 10 mg mL^{-1} de quitosana de baixa massa molar (Sigma-Aldrich) em ácido acético 1% (m/v) com uma mistura de nanoplaquetas de grafite (XG Sciences) em água deionizada (1 mg mL^{-1}). A mistura foi agitada magneticamente por 30 min e sonicada por 20 min. A suspensão obtida foi centrifugada a 15.000 rpm por 1 hora e o sobrenadante foi desprezado. As nanoplaquetas foram, então, ressuspendidas em água ultrapura para obtenção de uma concentração de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de nanoplaquetas em suspensão.

As soluções etanólicas de ácido 3-mercaptopropiônico (Fluka) foram preparadas em álcool etílico absoluto (Synth) na concentração de $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

As soluções de paracetamol (Sigma-Aldrich) empregadas como padrão analítico nos estudos de otimização e aplicação do sensor foram preparadas anteriormente a cada estudo pela dissolução do paracetamol em água ultrapura de

modo a se obter uma concentração de 1 mmol L⁻¹. As concentrações subsequentes foram obtidas a partir da diluição da mesma.

A amostra farmacêutica utilizada para quantificação de paracetamol, com uma concentração nominal de 750 mg, foi obtida em uma farmácia de Florianópolis-SC.

4.2 EQUIPAMENTOS

As medidas eletroanalíticas de CV, DPV e SWV foram realizadas utilizando-se um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT101 e as de EIS um PGSTAT128N (módulo FRA) conectados a um computador contendo o software NOVA (versão 1.10). Para todas as medidas foi empregado um sistema de três eletrodos: o eletrodo modificado como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 molL⁻¹) como eletrodo de referência e uma placa de platina de aproximadamente 0,5 cm² como contra-eletrodo. Juntamente a esse sistema foi utilizado um agitador magnético para homogeneização das soluções.

As medidas de SEM-FEG e TEM foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. Um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV foi utilizado para caracterização da morfologia da superfície dos eletrodos modificados e um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM para a caracterização da suspensão de nanoplaquetas de grafite em quitosana.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um medidor de pH Micronal (modelo B-475) contendo um eletrodo de vidro combinado. Um banho ultra-sônico da Cristófoli Biossegurança foi utilizado para auxiliar no preparo das soluções e suspensões. Uma centrífuga *ependorf Centrifuge 5424R* foi utilizada para obtenção de diferentes concentrações da suspensão de nanoplaquetas de grafite em quitosana.

4.3 CONSTRUÇÃO DO SENSOR

Primeiramente foi realizada a limpeza do eletrodo: o eletrodo de ouro foi polido mecanicamente com suspensão aquosa de alumina 0,05 µm sobre feltro por cerca de 5 min e lavado com água deionizada para retirada das partículas de alumina residuais. Por fim, uma limpeza eletroquímica foi realizada imergindo-se o

eletrodo em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e aplicando-se varreduras sucessivas de potencial (0,0 V a 1,7 V vs Ag/AgCl) até que um voltamograma cíclico característico de eletrodos de ouro limpos fosse obtido.⁴⁷

Após a limpeza, o eletrodo limpo foi imerso em soluções etanólicas de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) para a formação de monocamadas auto-organizadas. Essa imersão foi realizada variando-se o tempo de contato (de 1 a 24 hs). A formação das monocamadas foi monitorada por EIS.

Posteriormente, os eletrodos modificados com MPA foram lavados com etanol. Após a secagem, $2 \mu\text{L}$ da suspensão de nanoplaquetas de grafite em quitosana foram gotejados sob a superfície do eletrodo, sendo esse, então, incubado por 5 min e por fim colocado em um dessecador sob vácuo até completa evaporação do solvente. A influência do tempo de contato do eletrodo em solução de MPA na adesão do filme de nanoplaquetas de grafite e na resposta do eletrodo foi acompanhada por EIS e CV.

4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente em uma célula eletroquímica contendo 12,5 mL do eletrólito suporte e o volume apropriado de solução do analito. Após a agitação magnética por 60 segundos para homogeneização da solução, os voltamogramas foram obtidos por medidas de potencial contra Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em intervalo de potencial de -0,4 a +1,0 V com velocidade de varredura de 10 a 200 mV s^{-1} .

Ao final de cada medida eletroquímica realizada na presença de paracetamol o eletrodo NPQ/SAM/AuE foi lavado com 10 gotas de solução de NaOH 4,8% e água deionizada para remover possíveis moléculas de paracetamol adsorvidas na superfície do eletrodo.

Alguns parâmetros relativos às condições experimentais de operação do sensor foram avaliados a fim de se obter uma melhor resposta analítica. Foram investigados o pH, a composição e a concentração do eletrólito suporte (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na faixa de pH de 6,0 a 8,0 e tampão acetato na faixa de pH de 4,0 a 5,0). Também foram avaliados os parâmetros da técnica de SWV: frequência (de 10 a 100 Hz), amplitude (de 10 a 100 mV) e incremento (de 1 a 10 mV).

4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO O SENSOR ELETROQUÍMICO DESENVOLVIDO

4.5.1 Construção da curva de calibração

Para avaliar o desempenho analítico do sensor, foi construída uma curva de calibração relacionando a variação da corrente do pico de oxidação do paracetamol (medido por SWV nas condições otimizadas) com a concentração de paracetamol na célula. Para tal, foram realizadas adições sucessivas da solução estoque do analito (1 mmol L^{-1}) com o auxílio de uma micropipeta.

4.5.2 Estudo de Interferentes

Após a otimização das condições experimentais, o efeito de potenciais interferentes foi investigado através da adição de determinados compostos a uma solução contendo $10,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol em tampão acetato (pH 5,0). Cada um dos possíveis interferentes foi adicionado à solução inicial numa proporção de 10:1, 1:1 e 1:10 em relação à concentração de paracetamol. As correntes de pico mensuradas foram comparadas com a obtida utilizando apenas a solução padrão de paracetamol.

Algumas substâncias geralmente encontradas em fármacos²⁶ que contêm paracetamol foram estudadas como possíveis interferentes, sendo elas cafeína, glicose, sacarina, ácido ascórbico e ácido cítrico.

4.5.3 Estudo de repetibilidade intra-dia e repetibilidade entre eletrodos

O estudo de repetibilidade intra-dia foi realizado a partir de dez medidas sucessivas de SWV do sensor construído em soluções contendo $10,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol (tampão acetato; pH 5,0). O estudo de repetibilidade entre eletrodos foi realizado nas mesmas condições operacionais do estudo de repetibilidade intra-dia, mas nesse caso analisando-se a resposta de quatro sensores diferentes construídos da mesma maneira.

4.5.4 Determinação de paracetamol em amostra farmacêutica

Dez comprimidos de uma amostra de paracetamol da marca TEUTO foram macerados com um pistilo de porcelana. Uma massa de 150 mg dessa amostra macerada foi dissolvida em 2,5 mL de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH, acrescidos de 5 mL de água e deixada sob agitação por 15 min. Essa solução foi, então, aferida para 10 mL com água e filtrada em seguida. Um volume de 1 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL que foi preenchido com água ultrapura. Da solução resultante, foi retirado 1 mL e transferido para outro balão volumétrico de 10 mL, onde foi adicionado 1 mL da solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e avolumado com água até o menisco. A solução final foi transferida para um frasco âmbar e armazenada sob refrigeração.

A quantificação de paracetamol nessa amostra foi realizada por SWV empregando o sensor proposto como eletrodo de trabalho. A determinação foi realizada pelo método de adição de padrão. Assim, alíquotas da amostra preparada foram transferidas para a cela eletroquímica contendo tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0) e quantificadas a partir das correntes medidas após sucessivas adições da solução padrão de paracetamol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA

Nanoplaquetas de grafite tendem a formar aglomerados em soluções aquosas devido às interações hidrofóbicas entre as folhas de grafeno que formam este material.²² Dessa forma, foi necessário evitar a agregação das nanoplaquetas para a construção do sensor em questão (NPQ/SAM/AuE). Neste trabalho, a quitosana, que é um polímero natural de baixo custo com alta capacidade de formação de filmes,²⁸ foi escolhida como dispersante para prevenir a aglomeração das nanoplaquetas de grafite. As NPQ foram adequadamente dispersas na solução aquosa de quitosana, já que uma suspensão escura e estável foi obtida. A Figura 5 apresenta as imagens de TEM e da suspensão, nas quais é possível observar a estrutura lamelar característica de materiais do tipo grafeno.²³

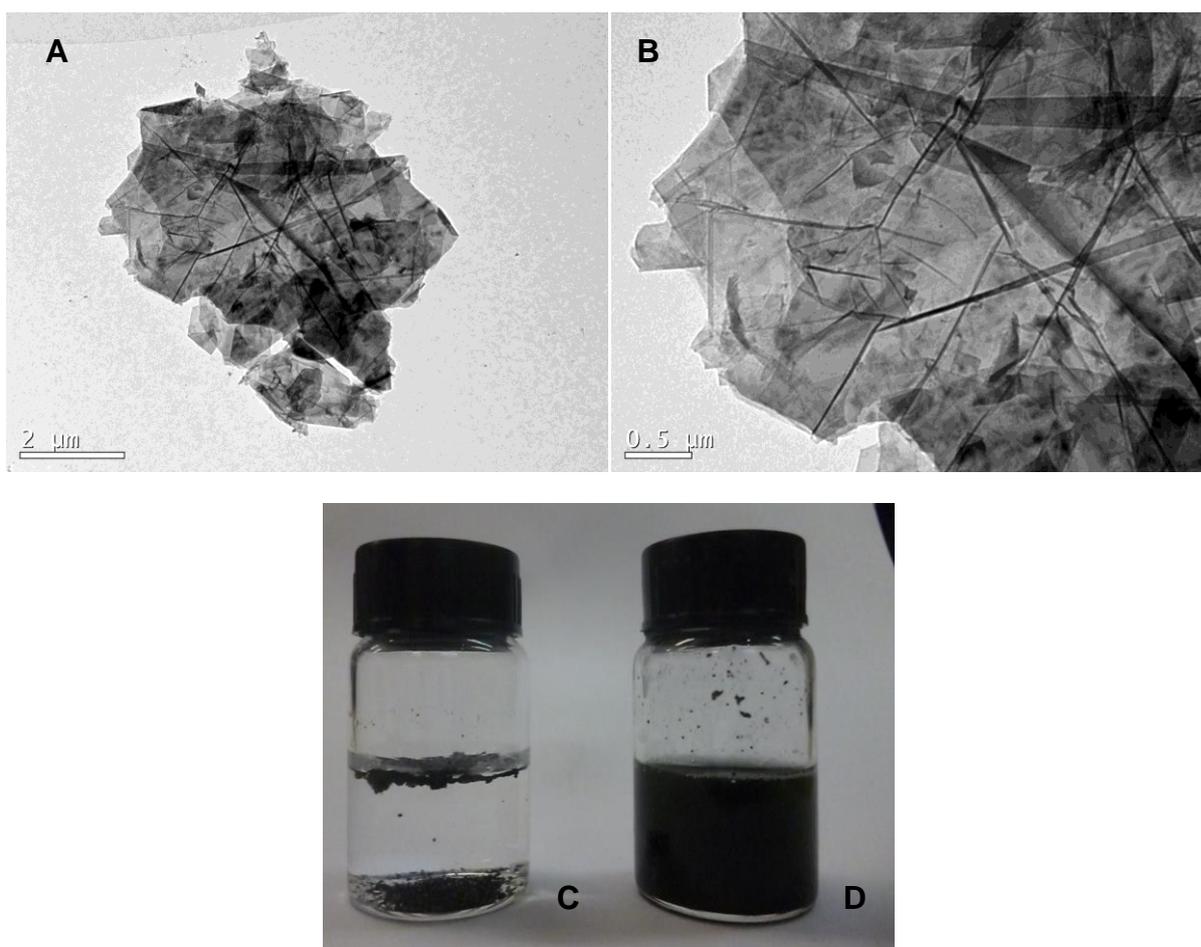


Figura 5. Imagens de TEM (A e B) e da suspensão (D) das nanoplaquetas de grafite dispersas em quitosana e (C) NPQ em água.

A morfologia da superfície do eletrodo de ouro antes e depois da modificação foi investigada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG) e as imagens obtidas podem ser observadas na Figura 6. As imagens A e B da Figura 6 mostram a superfície do eletrodo de ouro limpo com algumas ranhuras resultantes da limpeza mecânica do eletrodo. As imagens das Figuras 6C e 6D mostram que um filme homogêneo de nanoplaquetas e quitosana foi depositado uniformemente na superfície do ouro.

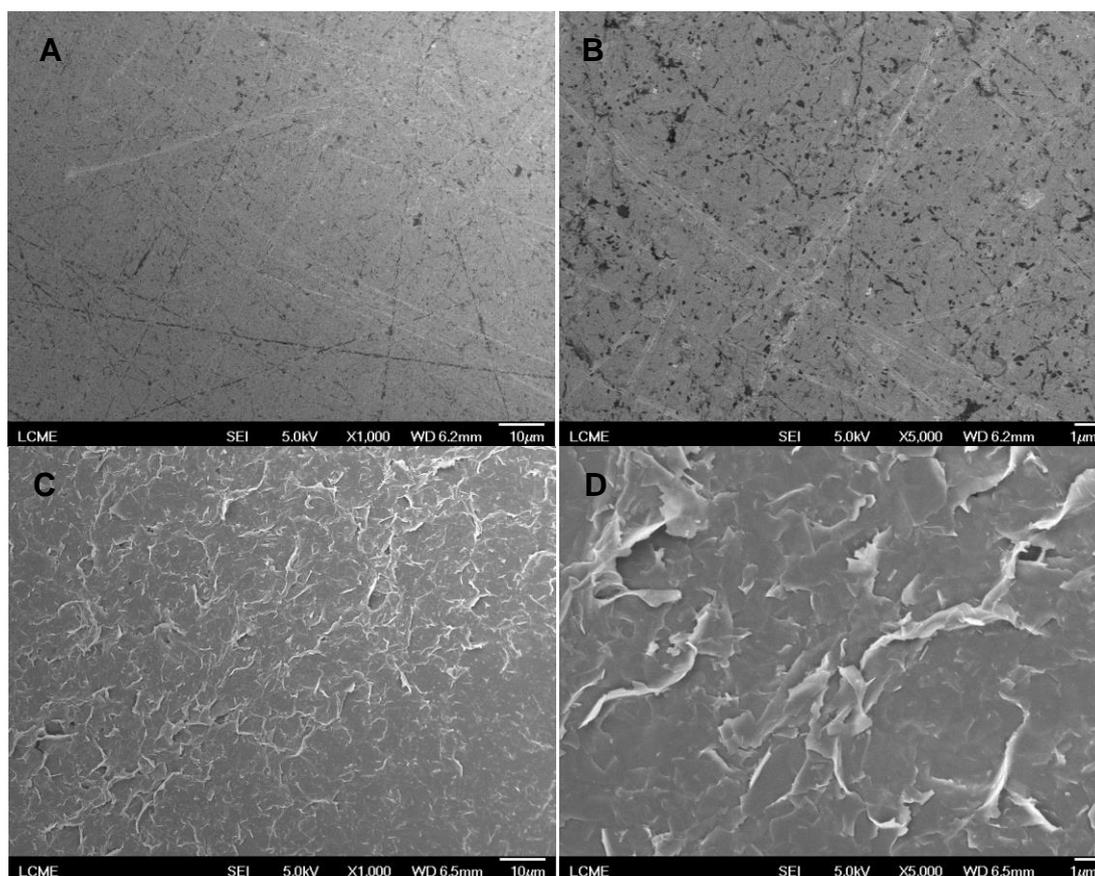


Figura 6. Imagens de SEM-FEG obtidas com 5,0 kV para (A) e (B) AuE limpo e (C) e (D) para NPQ/SAM/AuE e ampliação de 1000x para (A) e (C) e 5000x para (B) e (D).

5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO MODIFICADO

5.2.1 Avaliação do comportamento eletroquímico em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$

O comportamento eletroquímico do eletrodo modificado foi avaliado a cada etapa de construção do sensor por CV e EIS utilizando 5 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda redox em $\text{KCl } 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A Figura 7 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ empregando (a) o eletrodo de ouro não modificado (AuE); (b) o eletrodo de ouro modificado com monocamada de MPA (SAM/AuE) e (c) o eletrodo de ouro modificado com SAM e filme de nanoplaquetas dispersas em quitosana (NPQ/SAM/AuE). De acordo com a Figura 7, pode ser observada uma grande diferença nas respostas eletroquímicas devido a cada etapa de modificação do eletrodo resultar na formação de diferentes estruturas interfaciais.

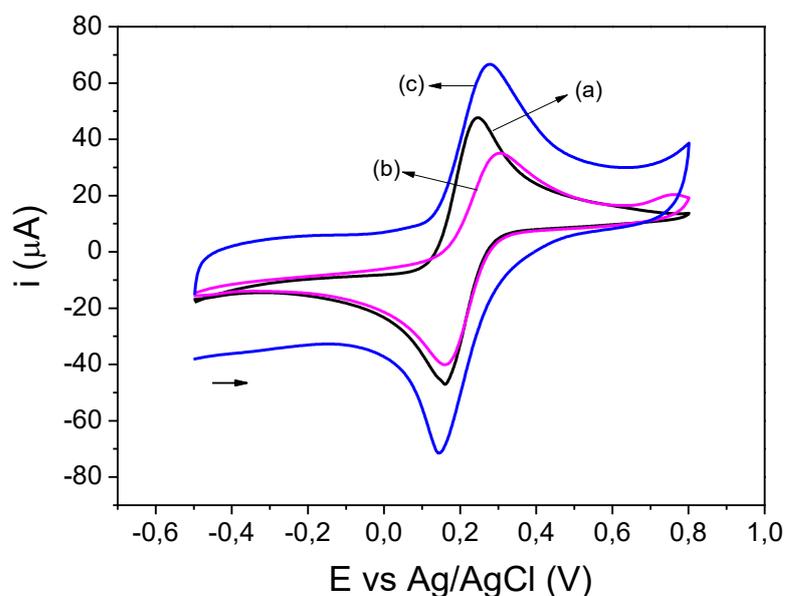


Figura 7. Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ obtidos com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para (a) AuE, (b) SAM/AuE e (c) NPQ/SAM/AuE.

Para o eletrodo de ouro não modificado (a), observa-se um par de picos redox bem definido com uma razão entre as correntes anódica e catódica (i_{pa}/i_{pc}) próxima à unidade ($\approx 1,07$), o que é característico de um processo redox reversível das espécies presentes em solução.⁴⁸ Contudo, a resposta voltamétrica para o eletrodo de ouro modificado com a monocamada de MPA (b) foi consideravelmente menor, indicando que a transferência eletrônica entre o eletrodo de ouro e o sistema redox

foi parcialmente bloqueada pela presença da SAM. Essa observação indica que a monocamada formada não é perfeitamente isolante, já que permite o livre movimento do mediador para a superfície do eletrodo, um comportamento típico de SAMs formadas por alquílios de cadeia curta. Conforme o tamanho da cadeia alquílica diminui, o nível de ordenamento das SAM's decresce também, assim como a densidade de empacotamento e a cobertura da superfície.¹⁷⁻²⁰ A ocorrência de defeitos na monocamada afeta a sua propriedade isolante,⁴⁹ sendo que a transferência de elétrons entre as espécies em solução e o eletrodo deve ocorrer por tunelamento e através dos defeitos da monocamada.⁵⁰ Comparativamente, quase nenhuma corrente é detectada no caso de SAM altamente ordenadas.¹⁸

Após a deposição do filme de nanoplaquetas dispersas em quitosana (c) observa-se um grande aumento na resposta voltamétrica do sistema redox, indicando que não há um impedimento considerável à transferência de elétrons. Dessa maneira, as nanoplaquetas de grafite fornecem um caminho condutivo para a transferência de elétrons. O processo redox parcialmente bloqueado pela SAM foi não apenas restaurado, mas também melhorado, pela ancoragem das nanoplaquetas na superfície do AuE por meio da SAM.

Essas observações são corroboradas pelas medidas de EIS. A Figura 8 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos a partir de medidas de EIS em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 5 mmol L⁻¹ da sonda redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. A EIS é uma ferramenta poderosa para monitorar as alterações de propriedades interfaciais da superfície de eletrodos, já que o diâmetro do semicírculo observado nos diagramas de Nyquist é igual à resistência à transferência de elétrons, R_{ct}, que controla a cinética da transferência eletrônica da sonda redox na interface do eletrodo.⁵¹ De acordo com a Figura 8, o diâmetro do semi-círculo da curva (a) é menor que o da curva (b), indicando que a resistência do eletrodo aumenta na presença da SAM (R_{ct} de 904 para AuE e 2680 Ω para SAM/AuE), confirmando o bloqueio parcial da superfície. Por outro lado, após a deposição do filme de nanoplaquetas, observa-se uma linha quase reta no diagrama de Nyquist, característica de processos de transferência de elétrons controlados por difusão. A R_{ct} diminuiu substancialmente para valores ainda menores que o AuE (R_{ct} de 43 Ω). Dessa forma, a velocidade de transferência de elétrons entre o AuE e as espécies redox em solução foi consideravelmente aumentada na presença do filme.

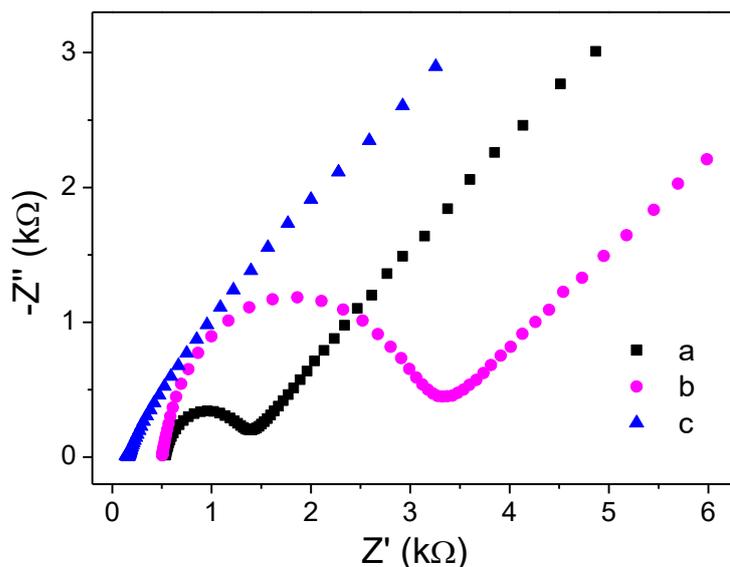


Figura 8. Diagramas de Nyquist obtidos em KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}), modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1 a 100.000 Hz para (a) AuE, (b) SAM/AuE e (c) NPQ/SAM/AuE.

5.2.2 Efeito da velocidade de varredura e determinação da área eletroativa do sensor

A influência da velocidade de varredura no perfil voltamétrico do eletrodo modificado (NPQ/SAM/AuE) pode ser observada na Figura 9. Para tal, medidas de CV em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 5 mmol L^{-1} da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ foram realizadas variando-se a velocidade de varredura de 10 a 250 mV s^{-1} . As áreas eletroativas dos eletrodos de AuE e NPQ/SAM/AuE foram estimadas a partir da medida da resposta de espécies de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (5 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) por CV e de acordo com a equação 1, conhecida como equação de Randles–Sevcik⁵²:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} C v^{1/2} \quad (\text{Equação 1})$$

onde i_p é a corrente de pico (A), A é a área eletroativa (cm^2), D é o coeficiente de difusão das espécies de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução ($7,17 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$),⁵³ n é o número de elétrons envolvidos na reação, $v^{1/2}$ é a raiz quadrada da velocidade (V s^{-1}) e C a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em mol L^{-1} .

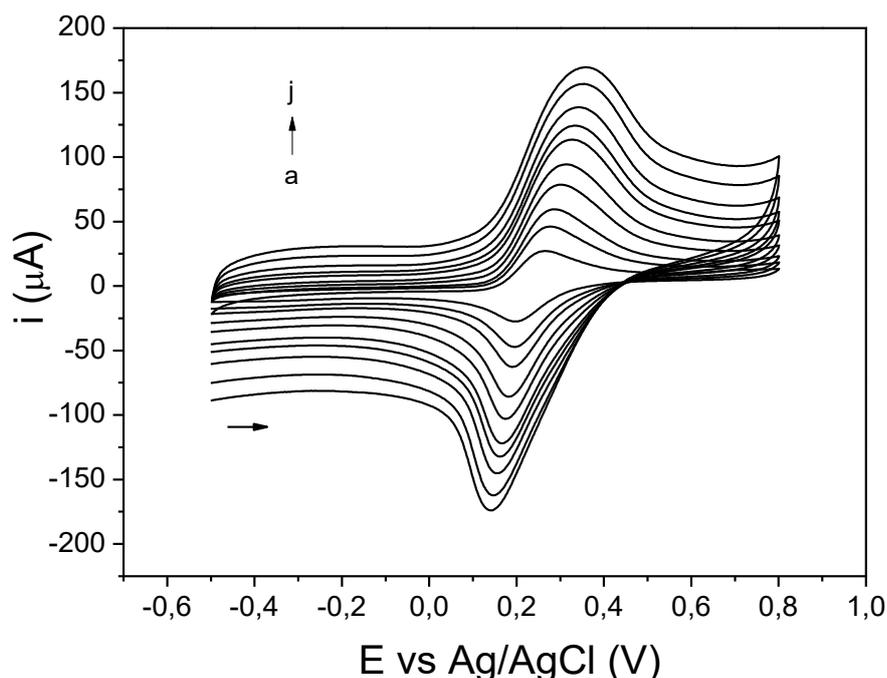


Figura 9. (A) CVs obtidos com o sensor proposto em KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}) em diferentes velocidades de varredura de (a) 10,0; (b) 20,0; (c) 30,0; (d) 50,0; (e) 70,0; (f) 100,0; (g) 120,0; (h) 150,0; (i) e (j) 250 mV s^{-1} .

Como pode ser observado na Figura 9, as correntes de pico aumentam com o aumento da velocidade de varredura, de acordo com a Equação 1 que demonstra que a corrente de pico é diretamente proporcional ao quadrado da velocidade de varredura. Por meio da linearização do gráfico de corrente de pico anódico (i_a) e catódico (i_c) em função da raiz da velocidade de varredura (Figura 10A) e utilizando a Equação 1 obteve-se uma área média de $0,027 \text{ cm}^2$ para o AuE e $0,052 \text{ cm}^2$ para NPQ/SAM/AuE, mostrando que a modificação possibilitou um aumento de área de aproximadamente duas vezes. Esse aumento na área eletroativa do sensor é um fator que contribui para o aumento da resposta eletroquímica do eletrodo após a modificação.

Além disso, o mecanismo de transporte de massa foi investigado plotando-se ($\log i_p$) em função de ($\log v$) para NPQ/SAM/AuE (Figura 10C). O coeficiente angular das curvas obtidas para as espécies anódicas e catódicas foram de 0,62 e 0,61, respectivamente. Esses valores são próximos do valor teórico de 0,5 que é esperado para processos controlados por difusão, nos quais o movimento das espécies em solução ocorre devido a um gradiente de concentração.^{42,52}

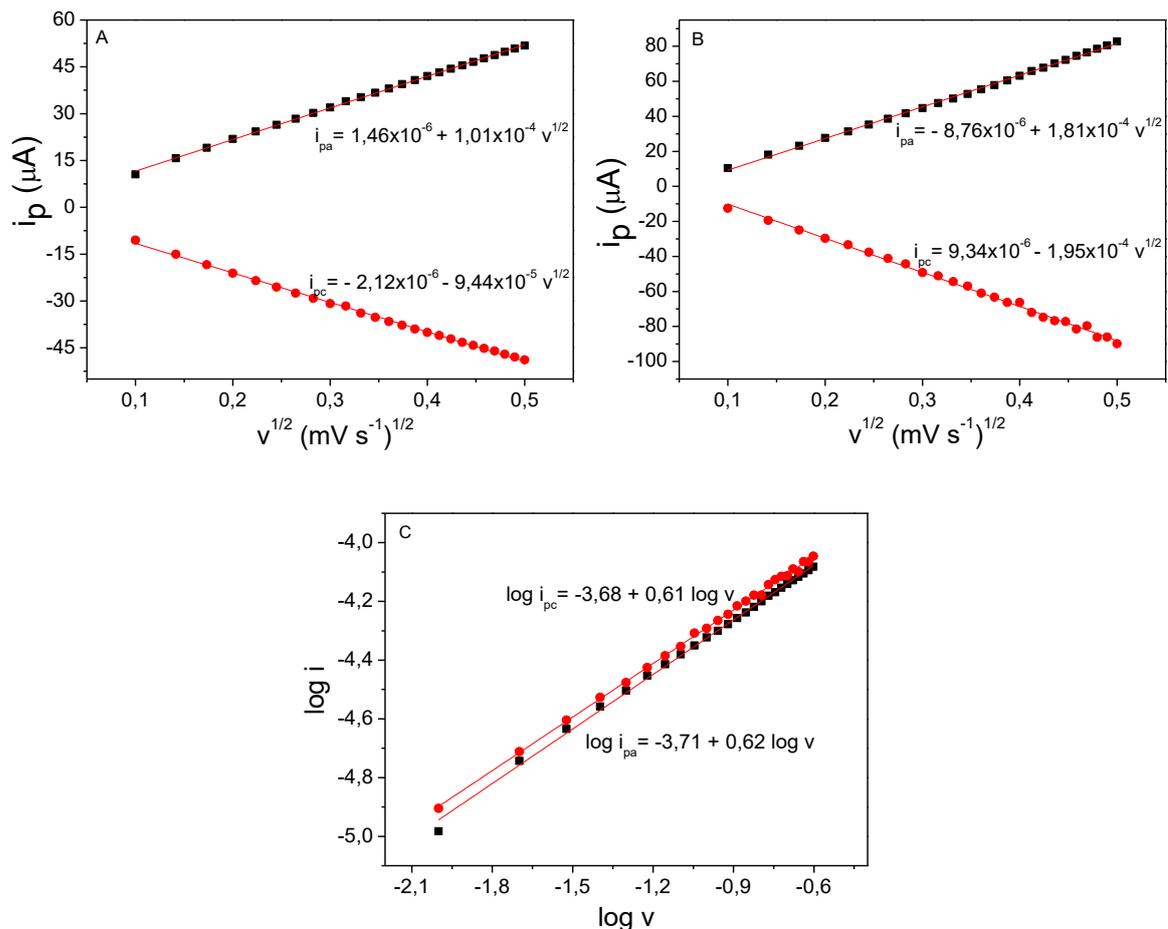


Figura 10. (A) Gráfico de i_{pa} e i_{pc} vs. $v^{1/2}$ para (1) AuE e (2) NPQ/SAM/AuE. (B) $\log i_{pa}$ e i_{pc} vs. $\log v$.

5.3 CONTRIBUIÇÃO DOS MODIFICADORES NA RESPOSTA ANALÍTICA PARA PARACETAMOL

Para estudar a influência de cada modificador na resposta analítica do sensor para o paracetamol, analisou-se a resposta de três diferentes eletrodos, o AuE, o AuE/SAM e o NPQ/SAM/AuE por SWV (frequência de 40 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de potencial de 3 mV) em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0) na faixa de potencial de 0,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl em presença de 10,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol. Como pode ser observado na Figura 11, uma maior corrente de pico foi medida para o paracetamol utilizando o sensor modificado em comparação ao eletrodo de ouro limpo. O sensor proposto (curva c) apresentou uma corrente de pico aproximadamente dez vezes maior que a observada para o AuE. O aumento na resposta analítica para o paracetamol sugere um processo de oxidação mais rápido na superfície do eletrodo, o que pode ser atribuído a um aumento da condutividade e

da área eletroativa da superfície proporcionado pela modificação, além de um efeito de pré-concentração do analito na superfície devido a possíveis interações entre os grupos amino da quitosana e os grupos hidroxila das moléculas de paracetamol.

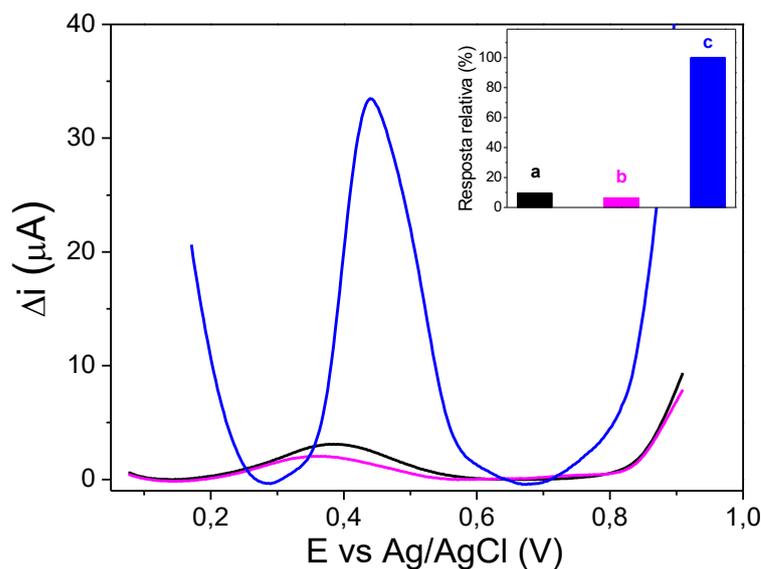


Figura 11. SWV empregando (a) AuE e (b) SAM/AuE e (c) NPQ/SAM/AuE em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0) contendo $10,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol. Frequência de 40 Hz; amplitude de 80 mV; incremento de 3 mV.

A Figura 12 apresenta uma representação esquemática da superfície do sensor desenvolvido e da reação eletroquímica envolvida na detecção de paracetamol. De acordo com a representação, a monocamada de MPA formada na superfície do eletrodo de ouro possibilita a adesão do filme de nanoplaquetas por interagir, provavelmente de maneira eletrostática, com a quitosana que envolve o nanomaterial. Por sua vez, o filme constituído de quitosana e nanoplaquetas de grafite atua como um catalisador da reação de oxirredução do paracetamol, interagindo com os grupos hidroxila desse analito por meio dos grupamentos amino da quitosana.

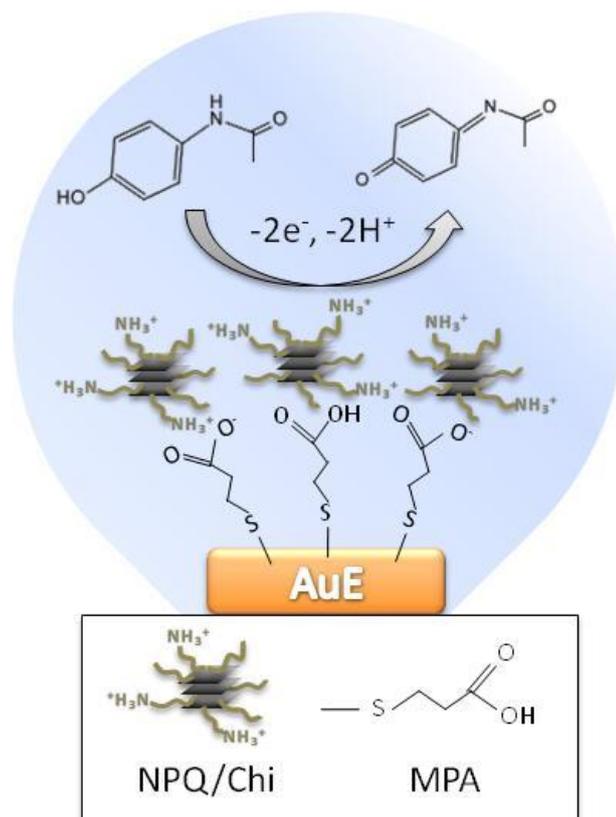


Figura 12. Representação esquemática do princípio de funcionamento do sensor.

5.4 OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE CONSTRUÇÃO E OPERAÇÃO DO SENSOR

5.4.1 Efeito do tempo de contato com MPA

A formação da SAM e do filme de nanoplaquetas em função do tempo de contato com a solução etanólica de MPA foi monitorada por EIS. Os diagramas de Nyquist para SAM/AuE e NPQ/SAM/AuE são apresentados nas Figuras 13A e 13B, respectivamente. É possível observar na Figura 13A que quanto maior o tempo de contato com a solução de MPA, maior a resistência à transferência de carga exibida pelo eletrodo de ouro modificado com SAM (R_{ct} de 1,2, 1,8, 4,6, 21 e 30 $k\Omega$ para 1, 2, 3, 5 e 24 horas, respectivamente). Esse aumento da resistência é devido a parâmetros da SAM que variam com o tempo de contato com o tiol, como a cobertura da superfície e o tamanho e distância entre os pinholes, especialmente para monocamadas formadas por alquiltióis de cadeia curta.¹⁹

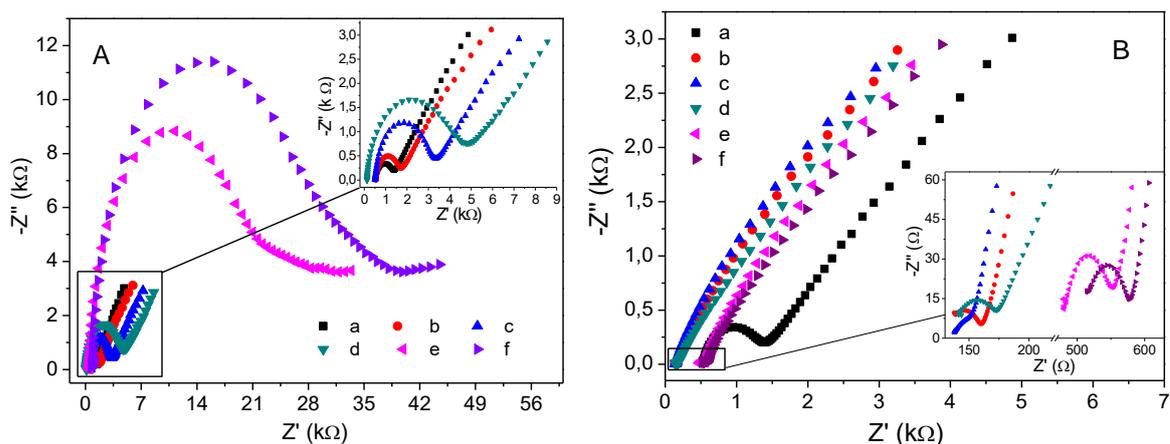


Figura 13. Diagramas de Nyquist obtidos em KCl contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol L^{-1}), modo de circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequência de 0,1–100.000 Hz para (A) SAM/AuE e (B) NPQ/SAM/AuE em diferentes tempos de imersão em MPA: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 3, (e) 5 e (f) 24 horas.

Qualitativamente, observou-se uma melhor adesão do filme de nanoplaquetas nas SAM's formadas em tempos de contato mais curtos, além de os filmes apresentarem os menores valores de R_{ct} (32, 40, 47, 83 e 85 Ω para 1, 2, 3, 5 e 24 horas, respectivamente), conforme mostra a Figura 13B. Em ensaios preliminares realizados, não foi possível aderir o filme de nanoplaquetas à superfície de SAMs de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), que apresenta uma maior cadeia alquílica e, portanto, gera SAMs com maior grau de ordenamento.¹⁷⁻²⁰ Essa observação, associada ao conjunto de resultados apresentados, indica que a adesão do filme de nanoplaquetas é favorecida pela presença de defeitos no empacotamento da SAM. Em Losic *et al.*, uma SAM de MPA exibiu uma menor resistência à transferência de elétrons comparada à SAM de MUA, o que conduziu a uma maior sensibilidade de detecção do eletrodo.⁵⁴ Considerando as evidências encontradas, o tempo de contato entre o eletrodo de ouro e a solução de MPA selecionado foi de 2h.

5.4.2 Seleção e otimização da técnica eletroanalítica

Com o intuito de escolher a técnica eletroanalítica com maior sensibilidade para a aplicação do sensor, medidas de diferentes concentrações de paracetamol em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 5 foram realizadas utilizando as técnicas de SWV e DPV. A Figura 14 mostra a comparação entre as técnicas em termos da relação entre concentração de paracetamol e a corrente de pico gerada em cada

técnica. A curva construída a partir da resposta obtida para a SWV foi a que apresentou maior inclinação (14 vezes maior que para DPV) e, portanto, maior sensibilidade, sendo, então, esta técnica a escolhida para os fins analíticos do sensor.

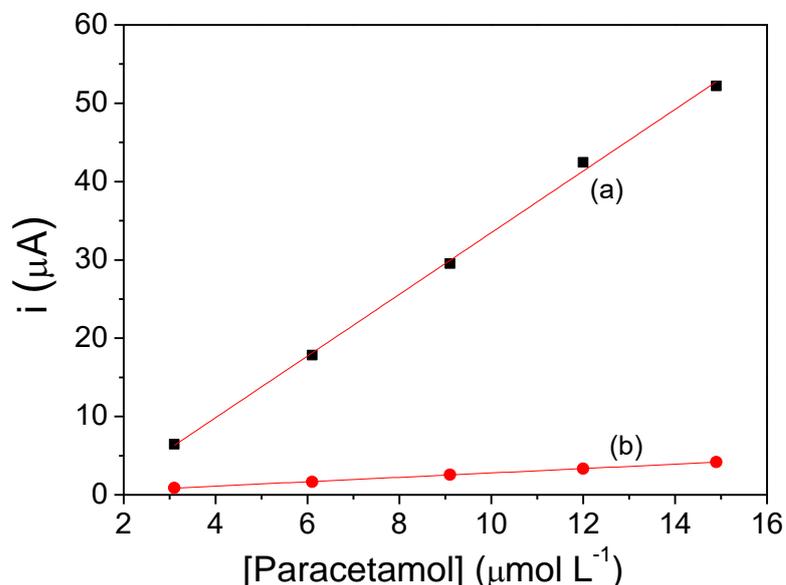


Figura 14. Comparação entre técnicas relacionando a concentração de paracetamol (3,1 a 14,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com a corrente de pico gerada (medidas realizadas em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} ; pH 5,0), utilizando (a) SWV e (b) DPV.

A fim de se definir as melhores condições de operação do sensor, bem como melhor definição de pico e maior resposta, os parâmetros da técnica de SWV foram otimizados. Os efeitos da variação da frequência, amplitude e incremento de potencial nas faixas de 10 a 100 Hz, 1 a 10 mV e de 1 a 10 mV, respectivamente, foram investigados, em triplicata, através de uma análise univariada empregando o sensor proposto na presença de paracetamol (10,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão acetato (0,1 mol L^{-1} ; pH 5,0). Nas Figuras 15A, 15B e 15C pode-se observar a influência da variação de cada parâmetro na corrente de pico resultante. Foram avaliados não apenas as maiores respostas de corrente de pico, mas também o melhor perfil voltamétrico. Dessa forma, os parâmetros da técnica selecionados foram 40 Hz de frequência, 80 mV de amplitude e 3 mV de incremento de potencial, os quais foram utilizados para os estudos posteriores.

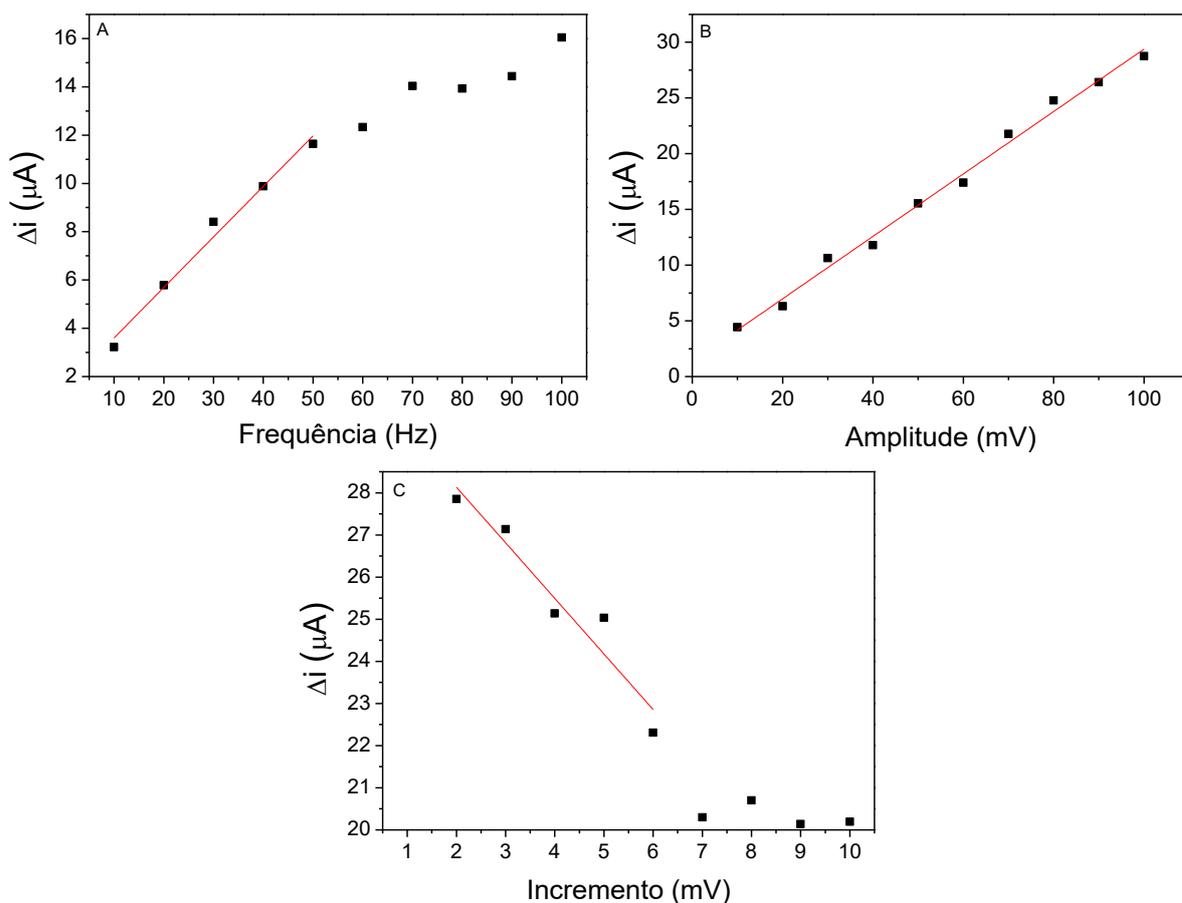


Figura 15. Investigação dos parâmetros de SWV ($n = 3$) sobre a resposta analítica do sensor proposto empregando paracetamol ($10,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0). (A) Estudo da frequência (10 - 100 Hz); (B) Estudo da amplitude de pulso (10 - 100 mV); (C) Estudo do incremento de potencial (1 - 10 mV).

5.4.3 Efeito do pH do eletrólito de suporte

O efeito do pH do eletrólito de suporte na resposta eletroquímica do sensor para o paracetamol ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) foi verificado a partir de medidas de SWV e CV nas faixas de pH de 4,0 a 5,0 (tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 6,0 a 8,0 (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). As respostas de corrente de pico (barra de erro proveniente do desvio padrão de três medidas) para diferentes valores de pH são mostrados na Figura 16, indicando que a maior corrente de pico observada para essa concentração de paracetamol foi no valor de pH igual a 5,0. Pode-se observar uma tendência de decrescimento da corrente de pico com o aumento do pH, exceto para pH 4,0, o que pode ser devido à gradual dissolução do filme de nanoplaquetas ocasionada pela protonação da quitosana³¹, que a torna solúvel em soluções

aquosas ácidas.^{25,26} Dessa forma, a solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0) foi selecionada como eletrólito de suporte para os estudos posteriores.

A partir da Figura 16A é possível observar que à medida que o pH diminui ocorre um deslocamento do potencial de pico do paracetamol em direção a potenciais mais positivos. No gráfico representado na Figura 16B pode-se observar uma relação linear entre o potencial de pico e o pH, com inclinação de -54,8 mV pH⁻¹ ($r^2 = 0,998$), um valor próximo ao esperado para sistemas que envolvem transferência de elétrons seguida de desprotonação (-59,2 mV pH⁻¹).³⁰ Esse resultado sugere que na reação de oxidação do paracetamol o número de elétrons e de íons hidrônio envolvidos é igual, em concordância com o que é descrito na literatura para a reação eletroquímica de paracetamol.^{26,27,32}

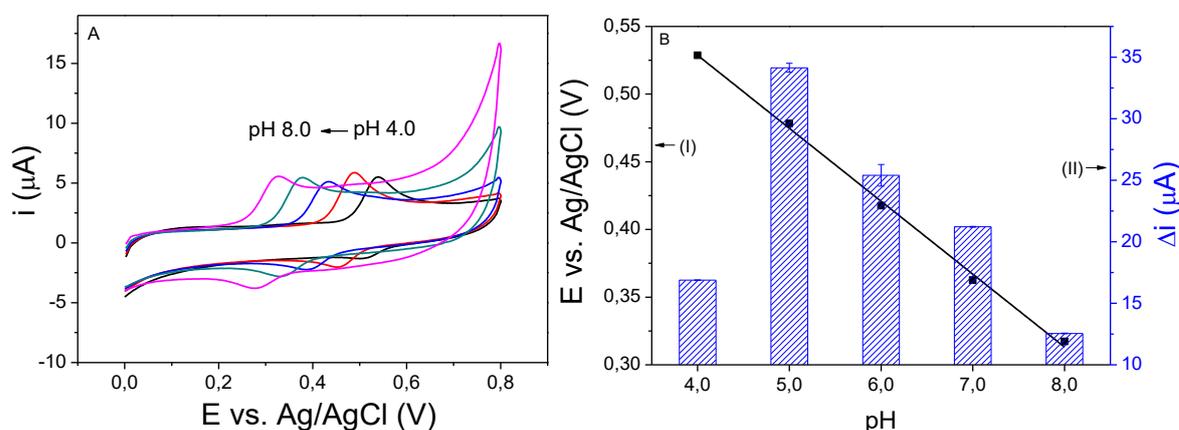


Figura 16. (A): Voltamogramas de voltametria cíclica empregando paracetamol 0,1 mmol L⁻¹ em tampão acetato em: pH 4,0 e pH 5,0; tampão fosfato pH 6,0; pH 7,0 e pH 8,0. (B): (I) Resposta relativa (%) para o paracetamol em diferentes pH; (II) Deslocamento linear do potencial de pico com a variação do pH, para SWV.

5.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO DO SENSOR

5.6.1 Curva de calibração

A curva de calibração relacionando a concentração de paracetamol e a corrente medida por SWV foi construída nas condições otimizadas (frequência de 40 Hz, amplitude de 80 mV, incremento de potencial de 3 mV, tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0) como eletrólito suporte na faixa de potencial de 0,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl. A Figura 17 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a curva de calibração

para o paracetamol (n=4) aplicando o sensor desenvolvido e o eletrodo de ouro limpo sem a modificação como eletrodos de trabalho. A curva de calibração para NPQ/SAM/AuE apresentou uma faixa linear de 1,5 a 19,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol ($\Delta i = - 8,79 \times 10^{-6} (\pm 1,23 \times 10^{-6}) + 3,82 (\pm 0,10) [\text{PCT}]$, $r = 0,995$), com limite de detecção (LOD) de 0,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação (LOQ) de 3,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados nos parâmetros da curva. A razão entre o valor do desvio padrão do intercepto e o valor do coeficiente angular da curva de calibração foi multiplicado por três para se obtenção do LOD e por dez para o LOQ. O valor encontrado de 0,995 para o coeficiente de correlação linear se encontra dentro dos valores recomendados pela ANVISA ($r = 0,99$) e pelo INMETRO ($r = 0,90$).⁵⁵

Como pode se observar na Figura 17B, a curva de calibração do eletrodo de ouro apresentou uma inclinação muito menor que para o eletrodo modificado ($\Delta i = 2,91 \times 10^{-6} (\pm 5,51 \times 10^{-8}) + 0,12 (\pm 9,29 \times 10^{-3}) [\text{PCT}]$, $r = 0,985$) e também uma faixa linear mais estreita (1,5 a 9,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e limites de detecção e quantificação maiores (LOD = 1,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LOQ = 4,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Além disso, a variação da concentração de paracetamol praticamente não influencia nos valores de corrente de pico obtidos, mostrando que o eletrodo de ouro sem modificação não pode ser utilizado para a determinação desse analito nessa faixa de concentração.

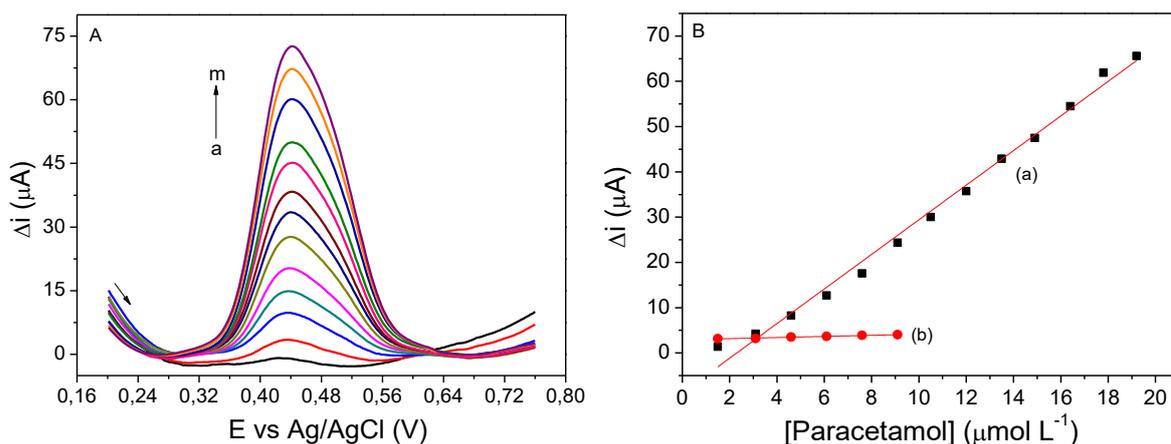


Figura 17. (A) Voltamogramas de SWV (frequência de 40 Hz, amplitude de pulso de 80 mV e incremento de varredura de 3 mV) obtidos utilizando o sensor proposto em solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0) e soluções de paracetamol, nas seguintes concentrações: (a) 1,5 x 10⁻⁶; (b) 3,1 x 10⁻⁶; (c) 4,6 x 10⁻⁶; (d) 6,1 x 10⁻⁶; (e) 7,6 x 10⁻⁶; (f) 9,1 x 10⁻⁶; (g) 1,05 x 10⁻⁵; (h) 1,2 x 10⁻⁵; (i) 1,35 x 10⁻⁵; (j) 1,49 x 10⁻⁵; (k) 1,64 x 10⁻⁵; (l) 1,78 x 10⁻⁵ e (m) 1,92 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. (B) Curva de calibração para (a) NPQ/SAM/AuE e (b) AuE.

5.6.2 Estudos de repetibilidade intra-dia e repetibilidade entre eletrodos

Esses estudos foram realizados por SWV nas condições otimizadas. A repetibilidade intra-dia foi avaliada a partir do cálculo do desvio padrão relativo % (DPR %) entre dez medidas sucessivas realizadas utilizando-se o mesmo sensor. O valor obtido foi de 2,5 %. A repetibilidade entre eletrodos foi avaliada utilizando a resposta de corrente obtida para a concentração de paracetamol selecionada empregando 4 diferentes sensores construídos da mesma maneira. Para este estudo, o DPR % entre as medidas de corrente de pico foi de 9,4 %, indicando que o sensor proposto apresenta uma precisão adequada.

5.6.3 Estudo de interferentes

O efeito de potenciais interferentes na determinação de paracetamol em formulações farmacêuticas foi avaliado. Estes compostos são excipientes ou outras substâncias com efeito terapêutico que podem estar presentes em amostras comerciais de medicamentos que contenham paracetamol.

Cada um dos possíveis interferentes (caféina, sacarina, ácido ascórbico, ácido cítrico e glicose) foi adicionado em três diferentes proporções (razão paracetamol/interferente de 10:1, 1:1 e 1:10) à célula eletroquímica contendo tampão acetato pH 5,0 e paracetamol numa concentração de $10,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e as alterações nos valores de corrente de pico foram avaliadas (n=3).

Caféina e sacarina não interferiram na análise de paracetamol utilizando o sensor, pois a alteração do sinal analítico foi menor que 10%. Sendo assim, o sensor desenvolvido pode ser utilizado para a determinação de paracetamol em amostras que contenham esses compostos. Entretanto, ácido ascórbico, ácido cítrico e glicose interferiram de maneira positiva na determinação de paracetamol. A glicose apresentou uma interferência que variou entre 11 e 15% e o ácido cítrico entre 14% e 40%. O ácido ascórbico foi o composto que apresentou o sinal analítico mais alterado para o paracetamol, interferindo de 13 a 54%, também de maneira positiva. Essa interferência pode ser explicada pelo fato de o potencial de oxidação do ácido ascórbico ser próximo ao potencial de oxidação do paracetamol. A interferência desses compostos pode limitar, mas não impossibilitar a análise de paracetamol em

fármacos que contenham os mesmos, pois utilizando uma curva de calibração do tipo adição de padrão é possível minimizar os efeitos da matriz.⁵⁵

5.6.4 Determinação de paracetamol em uma amostra farmacêutica

O sensor desenvolvido foi aplicado na determinação de paracetamol em uma amostra farmacêutica comercial a fim de avaliar o método proposto. A determinação e o estudo de recuperação foram realizados utilizando SWV com os parâmetros otimizados em tampão acetato pH 5,0 empregando o método de adição de padrão, realizado em cinco repetições. O resultado da determinação (apresentado na Tabela 1) mostra que o teor de paracetamol encontrado na amostra, em comparação com o valor descrito no rótulo, apresenta um erro relativo menor que 1,7%, o que indica que o método desenvolvido apresenta boa exatidão e pode ser utilizado na determinação de paracetamol para essa amostra farmacêutica.

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.⁵⁵ Os estudos de adição e recuperação de paracetamol na mesma solução da amostra apresentaram porcentagem de recuperação entre 97,3 e 101,4 % e, portanto, dentro dos valores aceitáveis recomendados pela ANVISA (valores entre 80 e 120%)⁵⁶, indicando pouca interferência da matriz na amostra.

Tabela 1: Resultado da determinação de paracetamol em amostra farmacêutica utilizando o método analítico proposto e o valor de referência rotulado na embalagem da amostra

Amostra	Concentração obtida (mg/comprimido) ^a	Concentração rotulada (mg/comprimido) ^a	Erro relativo (%) ^b
Paracetamol	737,5 (±16,0)	750,0	1,7

^aMédia ± desvio padrão; n = 5; ^bErro relativo = ((Concentração obtida - Concentração rotulada) / Concentração rotulada) x 100.

6 CONCLUSÕES

Uma suspensão estável e homogênea de nanoplaquetas de grafite em quitosana foi obtida, possibilitando a obtenção de um filme homogêneo que recobriu uniformemente a superfície do eletrodo de ouro, conforme confirmado pelas imagens de SEM-FEG.

De acordo com a caracterização eletroquímica do sensor desenvolvido (NPQ/SAM/AuE) por CV e EIS utilizando 5 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ como sonda redox em KCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, a modificação do eletrodo de ouro com MPA bloqueou parcialmente a resposta voltamétrica do sensor, mostrando que a monocamada formada não é perfeitamente isolante, podendo apresentar defeitos. Após a deposição do filme de nanoplaquetas de grafite, a resposta voltamétrica não apenas foi restaurada, como também, aumentada. Estudos de variação da velocidade de varredura mostraram que após a deposição do filme ocorreu um aumento da área eletroativa do sensor de cerca de duas vezes.

Por meio de medidas de SWV foi possível mensurar a influência de cada modificador na resposta do sensor para o paracetamol, mostrando que a modificação aumentou cerca de dez vezes a resposta do sensor para esse analito. O estudo do tempo de contato do eletrodo de ouro limpo em solução etanólica de MPA por EIS resultou na seleção de um tempo de 2 h de imersão para a montagem do sensor. A técnica escolhida para a determinação de paracetamol foi a SWV, por apresentar maior sensibilidade em relação à DPV. Os parâmetros da SWV foram otimizados e o melhor perfil voltamétrico para o paracetamol foi obtido utilizando-se tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), frequência de 40 Hz, amplitude de 80 mV e incremento de potencial de 3 mV.

O método desenvolvido para a determinação de paracetamol utilizando o sensor modificado apresentou repetibilidade intra-dia e entre eletrodos aceitáveis, ampla faixa linear e baixo limite de detecção. Além disso, a aplicação do método para determinação de paracetamol em amostra farmacêutica mostrou exatidão apropriada, confirmando que o sensor pode ser empregado para este fim.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HULANICKY, A.; GLAN, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classifications. **Pure Appl. Chem.**, 63, 1247-1250, 1991.
- 2 STRADIOTTO, N.R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M.V.B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **J. Brazil. Chem. Soc.**, 14, 159-173, 2003.
- 3 FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 26, 381-389, 2003.
- 4 WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, 8, 2043-2081, 2008.
- 5 LI, G.; MIAO, P. **Electrochemical Analysis of Proteins and Cells**, Springer International Publishing AG, 5-18, 2013.
- 6 SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, 20(2), 191-195, 1997.
- 7 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova**, 25, 1012-1021, 2002.
- 8 VERICAT, C. et al. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chem. Soc. Rev.**, 39, 1805-1834, 2010.
- 9 MENDES, R. K. et al. Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **J. Brazil. Chem. Soc.**, 15, 849-855, 2004.
- 10 MANDLER, Daniel; TURYSAN, Iva. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, 8.3: 207-213, 1996.
- 11 ZHAO, F. et al. Characterization of dodecanethiol SAM and multi-walled carbon nanotube modified gold electrodes, and voltammetric determination of prochlorperazine. **Microchim. Acta**, 150, 179-185, 2005.
- 12 SANDERS, W.; VARGAS, R. Characterization of carboxylic acid-terminated self-assembled monolayers by electrochemical impedance spectroscopy and scanning electrochemical microscopy. **Langmuir**, 24, 6133-6139, 2008.
- 13 FOLKERS, J. P.; LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G.M. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short-and long-chain constituents with methyl and hydroxymethyl terminal groups. **Langmuir**, 8, 1330-1341, 1992.
- 14 ESPLANDIU, M. J.; HAGENSTRÖM, H.; KOLB, D. M. Functionalized self-assembled alkanethiol monolayers on Au (111) electrodes: 1. Surface structure and electrochemistry. **Langmuir**, 17, 828-838, 2001.

- ¹⁵ ROWE, G. K.; CREAGER, S. E. Redox and ion-pairing thermodynamics in self-assembled monolayers. **Langmuir**, 7, 2307-2312, 1991.
- ¹⁶ BAIN, Colin D., et al. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **J. Am. Chem. Soc.** 111, 321-335, 1989.
- ¹⁷ BHALLA, V.; ZAZUBOVICH, V. Self-assembly and sensor response of photosynthetic reaction centers on screen-printed electrodes **Analytica Chimica Acta**, 707, 184–190, 2011.
- ¹⁸ DING, S. J.; CHANG, B. W.; WU, C. C.; LAI, M. F.; CHANG, H. C. Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes. **Anal. Chim. Acta**. 554, 43-51, 2005.
- ¹⁹ CAMPUZANO, S.; GALVEZ, R.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **J. Electroanal. Chem.** 526, 92-100, 2002.
- ²⁰ KANG, X. et al. A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol. **Talanta**, 81, 754-759, 2010.
- ²¹ LU, J. et al. Stable aqueous suspension and self-assembly of graphite nanoplatelets coated with various polyelectrolytes. **J. Nanomater.**, 2010: 2, 1-11, 2010.
- ²² CHUNG, D. D. L. Review graphite. **J. Mater. Sci.**, 22, 1475-1489, 2002.
- ²³ SMANIOTTO, A. **Obtenção, caracterização e funcionalização seletiva de óxido de grafeno com espécies sulfuradas e fragmentos orgânicos**. 2015. 158 p. Dissertação (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.
- ²⁴ ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, Richard B. Honeycomb carbon: a review of graphene. **Chemical reviews**, 110, 132-145, 2009.
- ²⁵ GENG, Y.; WANG, S. J.; KIM, J. Preparation of graphite nanoplatelets and graphene sheets. **J. Colloid Interf. Sci.**, 336, 592-598, 2009.
- ²⁶ LI, B; ZHONG, W. Review on polymer/graphite nanoplatelet nanocomposites. **J. Mater. Sci.**, 46, 5595-5614, 2011.

- 27 KIANIPOUR, S.; ASGHARI, A. Room Temperature Ionic Liquid/Multiwalled Carbon Nanotube/Chitosan-Modified Glassy Carbon Electrode as a Sensor for Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Uric Acid, Acetaminophen, and Mefenamic Acid. **IEEE Sens. J.**, 13, 2690-2698, 2013.
- 28 BABAEI, A.; GARRETT, D. J.; DOWNARD, A. J. Selective simultaneous determination of paracetamol and uric acid using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotube/chitosan composite. **Electroanal.**, 23, 417-423, 2011.
- 29 GONZÁLEZ-SEGURA, K. et al. Effect of the Dispersing Agent on the Electrochemical Response of Glassy Carbon Electrodes Modified with Dispersions of Carbon Nanotubes. **Electroanal.**, 24, 2317-2323, 2012.
- 30 YAN, L. et al. Individually dispersing single-walled carbon nanotubes with novel neutral pH water-soluble chitosan derivatives. **J. Phys. Chem. C**, 112, 7579-7587, 2008.
- 31 ZHANG, J. et al. Manipulated dispersion of carbon nanotubes with derivatives of chitosan. **Carbon**, 45, 1917-1920, 2007.
- 32 ZHENG, M. et al. Electrocatalytical oxidation and sensitive determination of acetaminophen on glassy carbon electrode modified with graphene–chitosan composite. **Mater. Sci. Eng. C**, 33, 1514-1520, 2013.
- 33 YIN, H. et al. Electrochemical behavior and voltammetric determination of 4-aminophenol based on graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode. **Electrochim. Acta**, 55, 7102-7108, 2010.
- 34 ZAPP, E. et al. Bio-inspired sensor based on glutathione peroxidase mimetic for hydrogen peroxide detection. **Sensor. Actuat. B-Chem.**, 176, 782-788, 2013.
- 35 LI, Y.; CHEN, S. The electrochemical properties of acetaminophen on bare glassy carbon electrode. **Int. J. Electrochem. Sc.**, 7, 2175-2187, 2012.
- 36 RAMOS, J. V. H. et al. Mesoporous chitosan/silica hybrid material applied for development of electrochemical sensor for paracetamol in presence of dopamine. **Micropor. Mesopor. Mat.**, 217, 109-118, 2015.
- 37 SHIEH, Y. T., WU, H. M., TWU, Y. K., & CHUNG, Y. C. An investigation on dispersion of carbon nanotubes in chitosan aqueous solutions. **Colloid and Polymer Science**, 288(4), 377-385, 2010.
- 38 JANEGITZ, B. C.; JUNIOR, L. H. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu (II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Quim. Nova**, 30, 1673-1676, 2007.
- 39 GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**, 29, 105-112, 2006.
- 40 PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, 5, 516-537, 2013.

- 41 SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. Reverté, 1997.
- 42 SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, 26, 81- 89, 2003.
- 43 SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quim. Nova**, 27, 790-797, 2004.
- 44 CARVALHO, L. A. de; ANDRADE, A. R. de; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, 29.4: 796-804, 2006.
- 45 SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quim. Nova**, 34, 665-676, 2011.
- 46 FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010. 2v, 904p.
- 47 CAMPIÑA, J. M.; MARTINS, A.; SILVA, F.. A new cleaning methodology for efficient Au-SAM removal. **Electrochim. Acta**, 53, 7681-7689, 2008.
- 48 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons Inc.: New York, 2001.
- 49 BHALLA, V.; CARRARA, S.; STAGNI, C.; SAMORI, B. Chip cleaning and regeneration for electrochemical sensor arrays. **Thin Solid Films**, 518, 3360-366, 2010.
- 50 HATEFI-MEHRJARD, A. Bienzyme self-assembled monolayer on gold electrode: an amperometric biosensor for carbaryl determination. **Electrochimica Acta** 114, 394-402, 2013.
- 51 K'OWINO, O.; SADIK, O. A. Impedance spectroscopy: a powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. **Electroanal.**, 17, 2101–2113, 2005.
- 52 A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 1980, 218p.
- 53 KONOPKA, S. J.; MCDUFFIE, Bruce. Diffusion coefficients of ferri-and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. **Analytical Chemistry**, 42.14: 1741-1746, 1970.
- 54 LOSIC, D.; GOODING, J. J.; SHAPTER, J. G.; HIBBERT, D.B.; SHORT, K. The influence of the underlying gold substrate on glucose oxidase electrodes fabricated using self-assembled monolayers. **Electroanal.** 13, 1385-1393, 2001.

- ⁵⁵ RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, 27, 771–780, 2004.
- ⁵⁶ BRASIL. ANVISA. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p.56-59.