



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

EDUARDO ZAPP

**SENSOR BIOINSPIRADO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS ESTABILIZADAS EM SURFACTANTE APLICADO À
DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS**

Florianópolis - SC

2012

EDUARDO ZAPP

**SENSOR BIOINSPIRADO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS ESTABILIZADAS EM SURFACTANTE APLICADO À
DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis

2012

EDUARDO ZAPP

**SENSOR BIOINSPIRADO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS ESTABILIZADAS EM SURFACTANTE APLICADO À
DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Aos meus pais,

Leonildo e Cirlene.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por tudo;

Aos meus pais, Leonildo e Cirlene, que são os meus maiores incentivadores e responsáveis pelas minhas conquistas;

A toda minha família, por todo carinho e atenção;

À Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira pela orientação, incentivo e dedicação durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Faruk Nome e à aluna Franciane Dutra de Souza pela síntese e caracterização dos surfactantes contendo nanopartículas de paládio;

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

A todos os professores da banca examinadora, por aceitarem fazer parte da mesma;

À minha namorada Daniela, pela ajuda, amor, e a sua constante companhia;

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios) – Ana, Cristiano, Daniela, Deise, Edson, Jéssica, Sally e Suellen – pela amizade e importante ajuda sempre que precisei;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURA	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. BIOSSENSORES E SENSORES BIOINSPIRADOS	01
1.1.1. Definição e Funcionamento de um biossensor/sensor bioinspirado	01
1.1.2. Componente biosseletivo	02
1.1.3. Transdutor	03
1.1.4. Aplicação dos sensores	03
1.2. SURFACTANTES	05
1.2.1. Definição e tipos de surfactantes	05
1.2.2. Surfactantes e nanopartículas	06
1.2.3. Aplicação em eletroanalíticas	08
1.3. COMPLEXOS METÁLICOS MIMETIZANDO ENZIMAS	09
1.3.1. Moléculas bioinspiradas	09
1.3.2. Seletividade e promiscuidade catalítica	10
1.4. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	10
1.4.1. Voltametria	10
1.4.1.1. Voltametria Cíclica.....	12
1.4.1.2. Voltametria de Onda Quadrada.....	15
1.4.2. Aplicação de técnicas voltamétricas na determinação de compostos fenólicos	16
1.5. COMPOSTOS FENÓLICOS	17
1.5.1. Isômeros do dihidroxibenzeno	17
1.5.1.1. Hidroquinona (HQ).....	18
1.5.1.2. Catecol (CC).....	18
1.5.2. HQ e CC no cigarro	19

2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	21
3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES E AMOSTRA.....	22
3.3. CONSTRUÇÃO DOS SENSORES.....	23
3.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	24
3.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DE CC E HQ.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. SELEÇÃO DO SISTEMA MICELAR.....	27
4.2. MORFOLOGIA DO ELETRODO RECOBERTO COM O FILME DE Pd-(ImS3-14).....	28
4.3. MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO.....	30
4.4. RESPOSTA ANALÍTICA PARA DIFERENTES SUBSTRATOS FENÓLICOS.....	32
4.5. CINÉTICA DO COMPLEXO Fe ^{III} Cu ^{II}	33
4.6. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA E MECANISMO ELETROQUÍMICO.....	35
4.7. TESTE DE COMPARAÇÃO PARA OS SENSORES MODIFICADOS.....	37
4.8. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO.....	39
4.8.1. Efeito da quantidade de Pd-(ImS3-14) e do complexo Fe ^{III} Cu ^{II} no filme.....	39
4.8.2. Efeito do pH do eletrólito suporte.....	40
4.8.3. Otimização dos parâmetros da SWV.....	41
4.9. CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	43
4.9.1. Curva de calibração e interferência do isômero.....	46
4.9.2. Limite de detecção e quantificação.....	48
4.10. REPETIBILIDADE, REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE.....	51
4.11. DETERMINAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CC E HQ EM AMOSTRAS DE FILTRO DE CIGARRO.....	51
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS	57

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um sensor bioinspirado utilizando o surfactante 3-(1-tetradecil-3-imidazólio)propanosulfonato contendo nanopartículas de paládio dispersas (Pd-(ImS3-14)) juntamente com o complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$. O sensor foi construído sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) pela deposição de um filme do surfactante Pd-(ImS3-14) e do complexo. Após otimização, o sensor foi utilizado na determinação de hidroquinona (HQ) e catecol (CC) em amostras de filtros de cigarros fumados usando a voltametria de onda quadrada (SWV). O complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ catalisa a oxidação de HQ e CC as suas respectivas quinonas, cuja redução eletroquímica ocorre em potencial de $-0,15$ e $+0,05$ V *vs.* Ag/AgCl, respectivamente. As melhores condições experimentais do sensor foram obtidas utilizando tampão fosfato pH 7,0, 1,5 nmol de Pd-(ImS3-14), 1,3 nmol do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ e parâmetros da SWV: frequência de 100 Hz, amplitude de pulso de 40 mV e incremento de 8 mV. Foram obtidas diferentes curvas de calibração para HQ e CC, construídas a partir da corrente resultante *versus* concentração de HQ e CC. As curvas obtidas para HQ e CC individualmente, apresentaram uma faixa linear de concentração de $4,99 \times 10^{-7}$ a $18,51 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A curva de calibração para HQ e CC obtida simultaneamente apresentou linearidade para ambos os substratos na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $9,09 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A curva obtida para CC na presença de uma concentração fixa de HQ ($3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foi linear na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $7,41 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, e a curva obtida para HQ com uma concentração fixa de CC ($3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foi linear na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Palavras-Chave: Sensor bioinspirado, Surfactante, Nanopartículas de paládio, Catecol, Hidroquinona, Voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

In this work, a bioinspired sensor using the surfactant 3-(1-tetradecyl-3-imidazolium)propanesulfonate containing the dispersed palladium nanoparticles (Pd-(ImS3-14)) together with the complex $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ was developed. The sensor is built on a surface of glassy carbon electrode (GCE) by Pd-(ImS3-14) surfactant and complex film depositing. After optimizing the sensor was used in the determination of hydroquinone (HQ) and catechol (CC) in samples of smoked cigarette filters by square wave voltammetry (SWV). The $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ complex catalyzes the HQ and CC oxidation to their respective quinone, whose electrochemical reduction occurs at potential of -0.15 and $+0.05$ V vs. Ag/AgCl, respectively. Optimum conditions of the sensor were obtained using phosphate buffer pH 7.0, 1.5 nmol of Pd-(ImS3-14), 1.3 nmol of the $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ complex, SWV parameters: frequency of 100 Hz, pulse amplitude of 40 mV and 8 mV increment. Different calibration curves for HQ and CC were constructed from the resulting current *versus* the HQ and CC concentrations. The curves obtained for HQ and CC individually, showed a linear concentration range of 4.99×10^{-7} to 18.51×10^{-6} mol L⁻¹. The calibration curve obtained for HQ and CC simultaneously, showed linear for both substrates in the range of 9.90×10^{-7} to 9.09×10^{-6} mol L⁻¹. The curve obtained for CC in the presence of a HQ fixed concentration (3.85×10^{-6} mol L⁻¹) was linear in the range of 9.90×10^{-7} to 7.41×10^{-6} mol L⁻¹, and the curve obtained for HQ with a CC fixed concentration (3.85×10^{-6} mol L⁻¹) was linear in the range of 9.90×10^{-7} to 7.4×10^{-6} mol L⁻¹.

Keywords: bioinspired sensor, Surfactant, Palladium nanoparticles, Catechol, Hydroquinone, Square wave voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do funcionamento de um biossensor/sensor bioinspirado.....	01
Figura 2. Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores e sensores bioinspirados.....	02
Figura 3. Estabilização de uma nanopartícula por moléculas do surfactante.....	07
Figura 4. Estrutura do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$, mimético funcional de uma hidrolase.....	09
Figura 5. Configuração da cela eletroquímica.....	11
Figura 6. (A) Sinal de excitação da voltametria cíclica. (B) Representação de voltametria cíclica típica, representando os parâmetros obtidos com esta técnica: (i_{pa}) corrente de pico anódica, (i_{pc}) corrente de pico catódica, (E_{pa}) potencial de pico anódico e (E_{pc}) potencial de pico catódico, potencial de inversão (E_i).....	13
Figura 7. Reversibilidade avaliada por voltametria cíclica: sistema reversível, quasi-reversível e irreversível.....	14
Figura 8. Voltamogramas de onda quadrada (1) processo redox de um sistema reversível e (2) processo redox de um sistema irreversível.....	15
Figura 9. Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada, onde E é o potencial, a é a amplitude de pulso, ΔE_s é o incremento de varredura de potenciais e τ período de duração do pulso, 1 representa final do pulso direto e 2 o final do pulso reverso.....	16
Figura 10. Isômeros do di-hidroxibenzeno: hidroquinona (isômero <i>para</i>), catecol (isômero <i>orto</i>) e resorcinol (isômero <i>meta</i>).....	17
Figura 11. Sistema usado para queima dos cigarros e obtenção dos filtros empregados na determinação de CC e HQ.....	25
Figura 12. Estudo do sistema micelar (a) GCE não modificado, (b) eletrodo QTS/Pd-(ImS3-14)/GCE (micela normal) (c) eletrodo Pd-(ImS3-14)/GCE (micela reversa) utilizando $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de HQ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).....	28
Figura 13. Morfologia do filme de Pd-(ImS3-14), (A) eletrodo de carbono sem o filme do surfactante e (B) eletrodo de carbono recoberto com o filme do surfactante..	29

Figura 14. (A) Proposta para reação catalisada na superfície do eletrodo entre o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ e as moléculas de CC e/ou HQ, com a redução eletroquímica das quinonas formadas; (B) Mecanismo detalhado da reação redox para CC na superfície do sensor para o CC.....	31
Figura 15. (A) Voltamogramas obtidos usando o eletrodo Pd-(ImS3-14)/($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$)/GCE para diferentes compostos fenólicos utilizando $2,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de cada analito em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0). (B) Resposta em corrente para os substratos analisados.....	32
Figura 16. Cinética do complexo, atividade como catecoloxidase, utilizando solução de HQ (A) e CC (B) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).....	34
Figura 17. Efeito da velocidade de varredura no GCE não modificado em solução de (A) CC $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) HQ $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).....	36
Figura 18. Efeito da velocidade de varredura no sensor bioinspirado em solução de (A) CC $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) HQ $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).....	36
Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada para os eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) sensor Pd-(ImS3-14)/GCE e (c) sensor Pd-(ImS3-14)/($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$)/GCE, em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada difenol (CC e HQ).....	37
Figura 20. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos: (a) GCE não modificado e (c) sensor Pd-(ImS3-14)/($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$)/GCE, em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ.....	38
Figura 21. Influência da quantidade de Pd-(ImS3-14) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ na resposta do sensor utilizando solução contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).....	39
Figura 22. Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do sensor utilizando solução contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ em tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) acetato: (a) pH 3,0; (b) pH 4,0 e (c) pH 5,0; (B) fosfato: (d) pH 6,0; (e) pH 7,0 e (f) pH 8,0; (C) TRIS pH 9,0 e (D) gráfico unificado das respostas.....	41

- Figura 23.** Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do sensor utilizando solução contendo $2,68 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para cada difenol (CC e HQ) em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0). (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento..... 42
- Figura 24.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o sensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) e soluções de HQ (A) e CC (B) em concentrações de (b) $4,99 \times 10^{-7}$ a (k) $18,51 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Curvas de calibração para (A) HQ e (B) CC..... 44
- Figura 25.** Voltamogramas de onda quadrada (A) obtidos usando o sensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) e soluções de HQ e CC em concentrações de (b) $9,90 \times 10^{-7}$ a (k) $9,09 \times 10^{-6} \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Inserido: curvas de calibração para (B) HQ e (C) CC..... 45
- Figura 26.** Voltamogramas de onda quadrada (A) obtidos usando o sensor em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo $3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de HQ e soluções de CC em concentrações de (b) $9,90 \times 10^{-7}$ a (i) $7,41 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. (B) Curva de calibração para o CC..... 46
- Figura 27.** Voltamogramas de onda quadrada (A) obtidos usando o sensor em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo $3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de CC e soluções de HQ em concentrações de (b) $9,90 \times 10^{-7}$ a (i) $7,41 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. (B) curva de calibração para a HQ..... 47
- Figura 28.** Investigação da repetibilidade da resposta analítica do sensor utilizando solução de CC e HQ em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0)..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos surfactantes.....	06
Tabela 2. Parâmetros de otimização do método proposto.....	43
Tabela 3. Dados das curvas de calibração.....	47
Tabela 4. Cálculo do LOD para as curvas de HQ e CC construídas individualmente..	49
Tabela 5. Cálculo do LOD para as curvas de HQ e CC construídas simultaneamente.	50
Tabela 6. Cálculo do LOD para as curvas de CC e HQ construídas na presença do isômero.....	50
Tabela 7. Cálculo do LOQ para as curvas de CC e HQ.....	51
Tabela 8. Determinação de CC e HQ nos extratos de filtro de cigarro.....	53
Tabela 9. Recuperação de CC e HQ nos extratos de filtro de cigarro usando o sensor proposto.....	54

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

a – Amplitude de pulso

A – Área do eletrodo

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

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CC – Catecol

CMC – Concentração micelar crítica

C – Concentração

CV – Voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*)

D – Coeficiente de difusão

DTAC – Cloreto de dodecil trimetil amônio (*Dodecyl trimethyl ammonium chloride*)

E_{pa} – Potenciais de pico anódico

E_{pc} – Potenciais de pico catódico

E_i – Potencial de inversão

Fe^{III}Cu^{II} – Complexo [Fe^{III}Cu^{II}(BPBPMP)(OAc)₂]ClO₄

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode*)

HQ – Hidroquinona

i_{max} – Corrente máxima, equivalente eletroquímico da velocidade máxima

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental

ImS3-14 – 3-(1-tetradecil-3-imidazólio)propanosulfonato

i_{pa} – Corrente de pico anódica

i_{pc} – Corrente catódica

K_m^{app} – Constante aparente de Michaelis-Menten

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

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

n – Número de elétrons

N – Ruído (*noise*)

NPs – Nanopartículas metálicas

Pd – Paládio

Pd-(ImS3-14) – 3-(1-tetradecil-3-imidazólio)propanosulfonato contendo NPs de Pd dispersas

Pd-(ImS3-14)/GCE – Sensor contendo apenas o surfactante e as NPs de Pd em micela reversa

Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/GCE – Sensor bioinspirado usando o complexo Fe^{III}Cu^{II} e o filme de surfactante e as NPs de Pd

QTS – Quitosana

QTS/Pd-(ImS3-14)/GCE – Sensor contendo o surfactante e as NPs de Pd em micela normal e um filme de quitosana

RSD – Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

S – Sinal analítico (*Signal*)

SCE – eletrodo saturado de calomelano (*saturated calomel electrode*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SEM – Microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*)

SWV – voltametria de onda quadrada (*square wave voltametry*)

TEM – Microscopia de transmissão (*transmission electron microscopy*)

v – velocidade de varredura do potencial

Δi – Pico de corrente resultante

Δes – Incremento de varredura de potenciais

τ – Período

[S] – Concentração do substrato

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOSSENSORES E SENSORES BIOINSPIRADOS

1.1.1. Definição e funcionamento de um biossensor/sensor bioinspirado

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo de análise empregado na detecção de um analito de interesse que combina um componente biológico com um componente de detecção, o transdutor (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MOUSTY, 2004; CÂMPAS *et al.*, 2008). Quando o componente biológico é substituído por uma molécula sintética que apresente características de mimetizar estruturalmente ou funcionalmente um biorreceptor, o dispositivo desenvolvido pode ser então denominado de sensor bioinspirado (DUJARDIN e STEPHEN, 2002; CÂMPAS *et al.*, 2008). O funcionamento destes sensores (Figura 1) baseia-se na interação seletiva do analito com o biorreceptor, esta interação resulta na variação de alguma propriedade físico-química que é reconhecida e medida por um transdutor adequado, e, finalmente, ocorre a amplificação e o processamento do sinal correspondente à concentração do analito na amostra (MELLO e KUBOTA, 2002; CÂMPAS *et al.*, 2008).

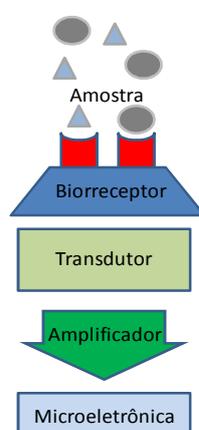


Figura 1. Esquema do funcionamento de um biossensor/sensor bioinspirado.

A Figura 2 apresenta esquematicamente os principais biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores e sensores bioinspirados.

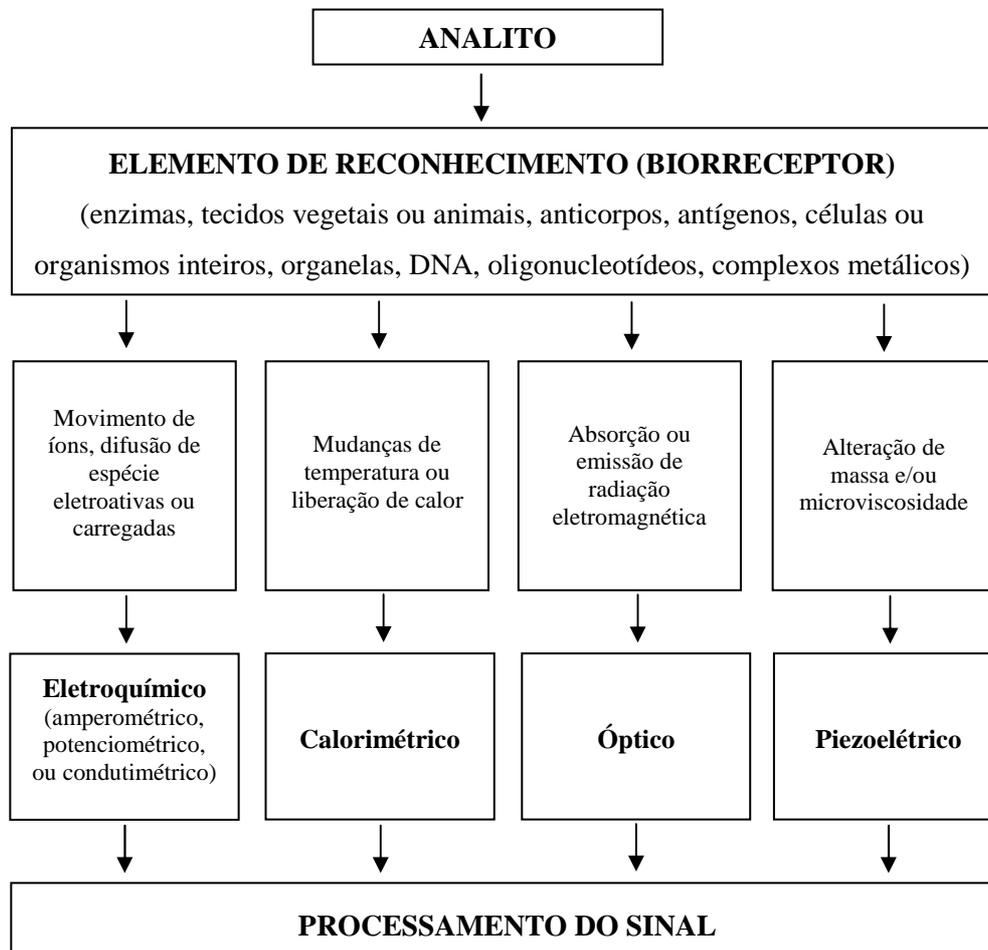


Figura 2. Biocomponentes e transdutores empregados na construção de biossensores e sensores bioinspirados (traduzido e adaptado de MELLO e KUBOTA, 2002).

1.1.2. Componente biosseletivo

O elemento biosseletivo, conhecido como biorreceptor, é o componente responsável pela seletividade/especificidade dos biossensores ou sensores bioinspirados, podendo ser composto por enzimas, anticorpos, DNA, ou quaisquer outras células ou organelas de seres vivos, ou então complexos miméticos (FATIBELLO-FILHO e

CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002; CÂMPAS *et al.*, 2008). É o elemento biosseletivo que possui o papel de reconhecer, reagir ou se ligar ao analito, fornecendo uma resposta físico-química (variação de massa, absorção ou emissão de luz, emissão de calor, mudança de estado de oxidação, liberação de gases), a qual é convertida por meio de um transdutor adequado em uma grandeza mensurável, como por exemplo, absorbância e corrente elétrica (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELO, 2008).

1.1.3. Transdutor

O transdutor ou elemento detector é a parte responsável pela conversão (transdução) do sinal bioquímico gerado pela interação do analito com o biocomponente, em um sinal que pode ser mais facilmente medido e quantificado (MELLO e KUBOTA, 2002). De acordo com a Figura 2, o transdutor pode operar baseado em diferentes propriedades físico-químicas, sendo classificado em: eletroquímico, calorimétrico, óptico e piezoelétrico. Na construção de biossensores/sensores que empregam medidas elétricas (sensores eletroquímicos), o transdutor corresponde ao eletrodo que tem a função de converter o sinal gerado pela interação biomolécula-substrato, em um sinal mensurável, nesse caso uma grandeza elétrica como corrente ou potencial (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002; MELO, 2008).

1.1.4. Aplicação dos sensores

A vasta possibilidade de aplicações dos sensores, tanto no campo da pesquisa acadêmica quanto para fins comerciais, vem sendo extensamente explorada, visando especialmente o desenvolvimento de dispositivos de baixo custo, portáteis e/ou

descartáveis, além de altamente seletivos e sensíveis para inúmeros tipos de analitos. As aplicações dos biossensores abrangem várias áreas, tais como indústrias de alimentos e bebidas, indústria farmacêutica, laboratório de análises clínicas, monitoramento ambiental, entre outras (MELLO e KUBOTA, 2002; CÂMPAS *et al.*, 2008).

Um tipo de aplicação dada aos sensores corresponde a situações em que substâncias que apresentem algum risco por sua toxicidade são detectadas numa concentração muito mais baixa do que os receptores humanos podem detectar, evitando assim algum dano direto ou indireto ao organismo (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004). Esses dispositivos podem então ser empregados no monitoramento ambiental, como por exemplo, na detecção de poluentes em efluentes e detecção de gases tóxicos em ambiente fechados ou em regiões de intensa atividade (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004). Além disso, uma grande parte das aplicações encontram-se na área de monitoramentos clínicos, como dosagem de glicose e colesterol (ARYA *et al.*, 2008; PEMBERTO *et al.*, 2011), na identificação de vírus (dengue e hepatite) (TELES *et al.*, 2007; ULIANA *et al.*, 2008), e no monitoramento da expressão de proteínas relacionadas a doenças (SILVA *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2011).

Um exemplo comum de um sensor comercial é o biossensor para detecção de glicose no sangue, que usa a enzima glicose oxidase para oxidar o açúcar, sendo a corrente resultante da oxidação proporcional concentração do mesmo. Neste caso, o eletrodo é o transdutor e a enzima é o componente biologicamente ativo (WANG, 2001; WANG, 2008).

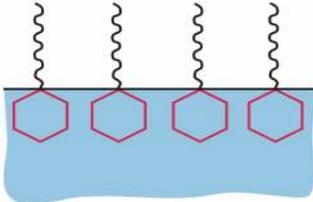
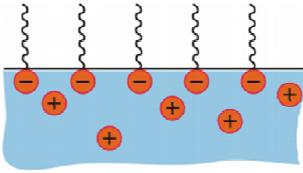
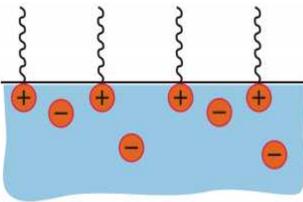
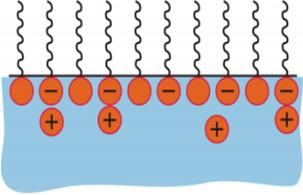
1.2. SURFACTANTES

1.2.1. Definição e tipos de surfactantes

Surfactantes são geralmente compostos orgânicos denominados de moléculas anfifílicas, pelo fato de conter uma ou mais de uma “cabeça” polar em uma das extremidades da molécula e uma ou mais de uma “cauda” hidrofóbica longa na outra (XU *et al.*, 2009). Eles podem espontaneamente adsorver sobre interfaces de duas fases com diferentes polaridades, alterando as propriedades superficiais e interfaciais de uma superfície (YI *et al.*, 2001; VITTAL *et al.*, 2006). Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados, chamados micelas. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), sendo esta uma importante característica de um surfactante (SHRESTHA *et al.*, 2007).

As moléculas de surfactantes podem ser classificadas em quatro diferentes tipos (Tabela 1) levando em consideração a existência e natureza de grupos carregados em sua estrutura. Uma molécula de surfactante que possui uma cabeça carregada negativamente (por exemplo: grupo sulfonil (SO_3^-)) é classificado como um surfactante aniônico. Já se a cabeça do surfactante possui um grupo carregado positivamente (por exemplo: NH_4^+), a molécula passa a ser classificada como um surfactante catiônico. Um terceiro grupo de moléculas possui na mesma cadeia de átomos os dois grupos, positivo e negativo, sendo o surfactante classificado como um surfactante zwitteriônico. Todavia, a molécula de surfactante pode não conter um grupo carregado, sendo então classificado como um surfactante não-iônico (YI *et al.*, 2001; SHRESTHA *et al.*, 2007; TONDO *et al.*, 2010).

Tabela 1. Classificação dos surfactantes

Tipo	Representação	Exemplo
Não-iônico		$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (\text{CH}_2)_{n-2} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array} $ <p data-bbox="1102 607 1171 640">Span</p>
Aniônico		$ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{O}^- \text{Na}^+ $ <p data-bbox="935 815 1339 848">Dodecil sulfato de sódio (SDS)</p>
Catiônico		$ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{C}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^- $ <p data-bbox="911 1061 1362 1151">Cloreto de dodecil trimetil amônio (DTAC)</p>
Zwiteriônico		$ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2\text{COO}^- $ <p data-bbox="1134 1330 1235 1364">Betaína</p>

1.2.2. Surfactantes e nanopartículas

Nanopartículas (NPs) são compostos integrantes da classe dos nanomateriais, que tem suas propriedades físicas e químicas significativamente alteradas pela diminuição de tamanho (menor do que 1 μm). Essas propriedades diferem das encontradas nos mesmos materiais quando em dimensões maiores (acima de 1 μm) (BUZEA *et al.*, 2007). NPs são utilizadas em diversas áreas, tais como, óptica (YANG *et al.*, 2007 A), catálise (XU *et al.*,

2009; GONÇALES-MARCIA *et al.*, 2011), bioquímica (RUSLING *et al.*, 1993; RHIEU *et al.*, 2009), medicina (LI *et al.*, 2008; SHAN *et al.*, 2008) e sensores (KHUN *et al.*, 2011). Estas aplicações requerem estratégias para evitar a formação dos aglomerados de NPs e, desta forma, suas propriedades, tais como o aumento da atividade catalítica, elevada área superficial e condutividade elétrica, possam ser totalmente utilizadas (HU *et al.*, 2000). Para isso é necessário a utilização de um agente estabilizante que seja capaz de evitar a coalescência e por sua vez manter o tamanho nanométrico das partículas em solução. Essa função estabilizante é desempenhada por diferentes substâncias, como os líquidos iônicos ou também por uma classe de compostos bastante empregada e capaz de produzir suspensões estáveis de NPs, a dos surfactantes (HU *et al.*, 2000). As moléculas de surfactante se adsorvem sobre a superfície das NPs, evitando a atração entre as NPs, utilizando para isso as forças repulsivas das cargas superficiais (YUAN *et al.*, 2005; KHUN *et al.*, 2011), como ilustrado na Figura 3.

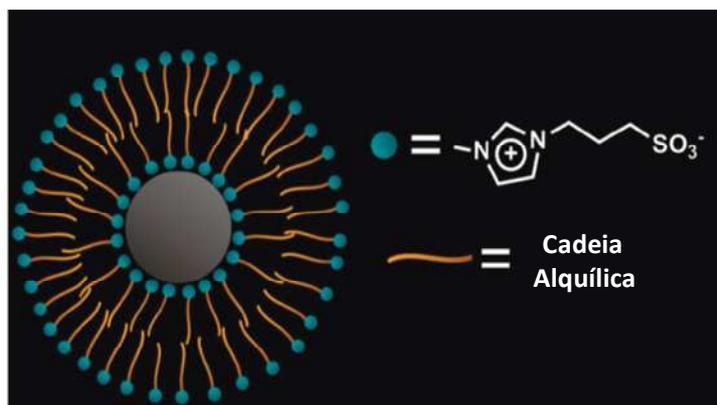


Figura 3. Estabilização de uma nanopartícula por moléculas do surfactante (extraído e adaptado de SOUSA *et al.*, 2012).

Essas NPs estabilizadas em surfactantes são uma classe de materiais que fornecem uma atraente alternativa na construção de sensores mais sensíveis e estáveis, especialmente

devido à capacidade catalítica e facilitação da transferência eletrônica que as NPs proporcionam. Além disso, o uso desses materiais possibilita a formação de um filme de surfactante sobre eletrodos sólidos, que além de manter um ambiente contendo as NPs estabilizadas, fornece um ambiente de imobilização para outras moléculas (SARKAR *et al.*, 2009).

1.2.3. Aplicação de surfactantes em eletroanalítica

Devido a capacidade de fornecer propriedades únicas à interface eletrodo/solução, os surfactantes têm sido amplamente utilizados em eletroanalítica (CAO *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2010; MAHMUD *et al.*, 2011). Esses materiais têm sido empregados junto ao eletrólito suporte, possibilitando melhoria do limite de detecção (LOD) de vários analitos (SARKAR *et al.*, 2009), justificado por um mecanismo de "sinergia de adsorção", isto é, a possibilidade que os surfactantes tem de interagirem com os analitos facilitando a difusão desses compostos entre a solução e o eletrodo, o que aumenta a concentração desses sobre a superfície do eletrodo e facilita a transferência de elétrons pois as moléculas de surfactante ordenam uma estrutura favorável à ocorrência da reação (XU *et al.*, 2009; RAJBONGSHI *et al.*, 2010).

Além da adição de surfactantes no eletrólito, muitos pesquisadores também modificaram a superfície de eletrodos para a detecção ou a imobilização de outras moléculas (naturais ou sintéticas). Os surfactantes, neste caso, formam bicamadas múltiplas na superfície do eletrodo e as biomoléculas ou moléculas bioinspiradas que serão imobilizadas se intercalam nas camadas do surfactante (SARKAR *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009), fornecendo um excelente meio de estabilização para enzimas e, assim, propiciando um maior tempo de vida útil do biossensor (MIMICA *et al.*, 2001).

1.3. COMPLEXOS METÁLICOS MIMETIZANDO ENZIMAS

1.3.1. Moléculas bioinspiradas

O conceito de um composto bioinspirado vem da observação de moléculas e arquiteturas que se baseiam em modelos biológicos. Mecanismos, funções e estruturas são inspirações para o desenvolvimento de novos materiais sintéticos (DUJARDIN E STEPHEN, 2002), tais como o mimetismo do sítio catalítico de enzimas (LANZMASTER *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 2010), biocerâmicas, biossensoriamento, engenharia biomédica e bionanotecnologia (DUJARDIN E STEPHEN, 2002). Nos últimos anos, Neves e colaboradores (OLIVEIRA *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2010) uniram esforços na síntese de moléculas com esse princípio bio-modelador, a Figura 4 mostra a estrutura do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$), que é um exemplo da construção de moléculas sintéticas que abordam esse conceito de síntese bioinspirada.

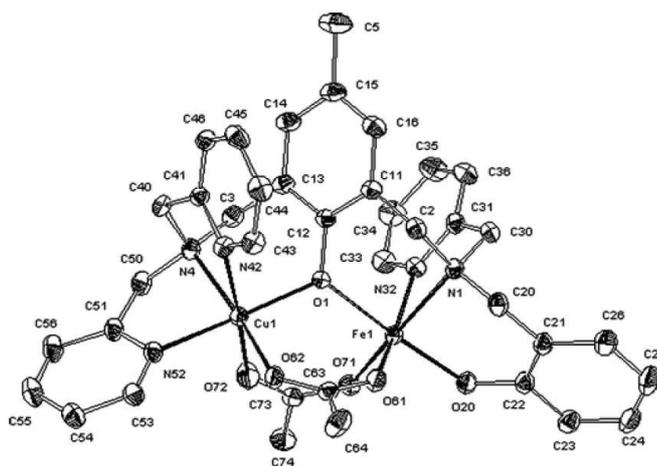


Figura 4. Estrutura do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ mimético funcional de uma hidrolase (extraído de LANZMASTER *et al.*, 2005).

1.3.2. Seletividade e promiscuidade catalítica

Neves e colaboradores (OLIVEIRA *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2010) têm observado e descrito o caráter promíscuo de complexos miméticos em reações catalíticas. Uma descrição mais completa para a promiscuidade catalítica seria a capacidade de um sítio ativo natural ou sintético de catalisar mais do que uma transformação química (NEVES *et al.*, 2010), ao invés de apresentar uma atividade exclusiva para o substrato da enzima. Um exemplo desta característica é o complexo $[(\text{BPBPMP})\text{Fe}^{\text{III}}(\text{m-OAc})_2\text{Fe}^{\text{II}}](\text{ClO}_4)$, um catalisador sintético com atividade promíscua, pois apresenta capacidade para oxidação de difenóis e também excelentes resultados na hidrólise de fosfodiésteres (NEVES *et al.*, 2010).

1.4. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

1.4.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica, que com base nos registros de curvas corrente *vs.* potencial feitos durante o processo eletroquímico fornece informações sobre a espécie eletroativa. A cela é constituída de um eletrodo de trabalho, sensível ao analito, um eletrodo de referência, para controle do potencial, e um contra-eletrodo, para controle da corrente (Figura 5).

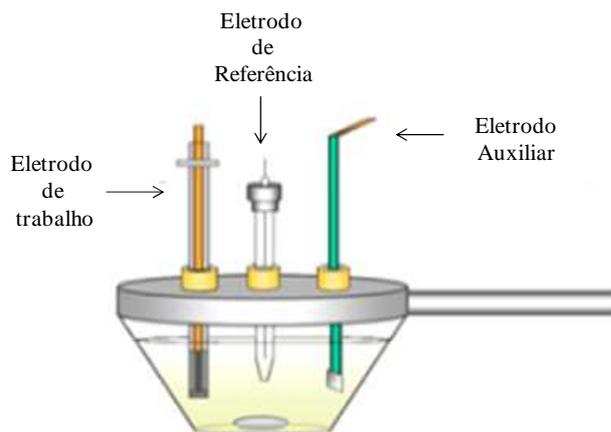


Figura 5. Configuração da cela eletroquímica.

O eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse e pode ser composto de diferentes materiais, tais como carbono, ouro e prata, além de conter outros materiais modificadores como enzimas (na construção de biossensores) ou complexos miméticos (na construção de sensores bioinspirados). O eletrodo de referência permite o monitoramento do potencial do eletrodo de trabalho, sendo composto geralmente por um eletrodo saturado de calomelano (SCE) ou prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). O eletrodo auxiliar atua no controle da corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho. Nesta situação, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência, o que acarretaria a mudança no potencial do mesmo, deixando então de atuar como um eletrodo de referência. Assim, a voltametria encontra aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento, tais como a área ambiental, médica, química e bioquímica (WANG, 1994; SOUZA *et al.*, 2003).

1.4.1.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente vs. potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica (BOLLO *et al.*, 2007; SILVA, 2010). Na CV, o potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho corresponde a uma onda triangular (Figura 6-A), ou seja, primeiramente a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na outra, enquanto a corrente é medida. Assim, esse programa de potenciais produz uma curva voltamétrica que constitui um ciclo, pois o potencial é varrido no sentido direto e depois no sentido inverso, sendo chamado de potencial de inversão o ponto onde ocorre a reversão. Os potenciais de inversão devem ser escolhidos de maneira que se possa observar a oxidação ou redução, controlada por difusão, de uma ou mais espécies de interesse (SKOOG *et al.*, 2002; HARRIS, 2005).

Na curva voltamétrica corrente-potencial, os processos de oxidação e de redução ocorrendo no eletrodo de trabalho são representados por correntes de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}). Outros parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica são os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), a velocidade de varredura do potencial (v) e o potencial de inversão (E_i). A Figura 6-B representa um típico voltamograma cíclico com seus principais parâmetros.

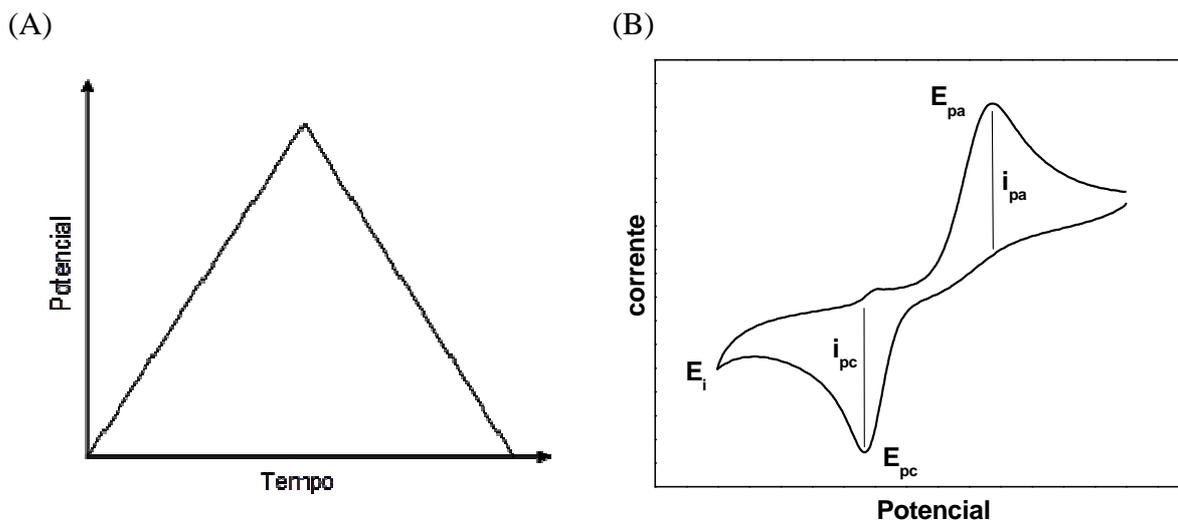


Figura 6. (A) Sinal de excitação da voltametria cíclica. (B) Representação de voltametria cíclica típica, representando os parâmetros obtidos com esta técnica: (i_{pa}) corrente de pico anódica, (i_{pc}) corrente de pico catódica, (E_{pa}) potencial de pico anódico e (E_{pc}) potencial de pico catódico, potencial de inversão (E_i).

A voltametria cíclica mostra-se particularmente eficiente quando se deseja conhecer a eletroatividade de compostos (especialmente moléculas biológicas), investigar reações químicas acopladas, análise de íons e estudar superfícies de eletrodos (BRUSCIOTTI *et al.*, 2007; SILVA, 2010). A técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade eletroquímica de um sistema, a qual está associada à troca rápida de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo. Os sistemas eletroquímicos podem ser classificados em três diferentes tipos quanto a sua reversibilidade, sendo eles: processo reversível, irreversível ou quasi-reversível, como ilustrado na Figura 7 (WANG, 2000; SILVA, 2010).

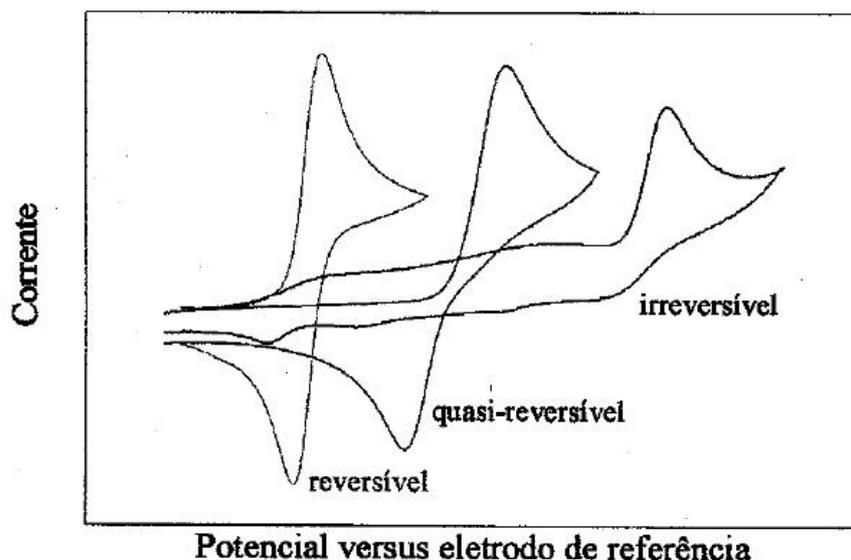


Figura 7. Reversibilidade avaliada por voltametria cíclica: sistema reversível, quasi-reversível e irreversível (FISHER, 1996).

A equação de Randles-Sevcik (Equação 1) é uma equação matemática que correlaciona as correntes de pico (i_{pa} , i_{pc}) e a velocidade de varredura obtidas por voltametria cíclica para um processo reversível a 25 °C (SILVA, 2010).

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

Onde n é o número de mols de elétrons, A é a área do eletrodo (em cm^2), C é a concentração (em mol/cm^3), D é o coeficiente de difusão (em cm^2/s), e v é a velocidade de varredura (em V/s). De acordo com a equação, a corrente é diretamente proporcional à concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

1.4.1.2 Voltametria de onda quadrada

Uma técnica voltamétrica de pulso bastante sensível e rápida é a voltametria de onda quadrada (SWV). Neste tipo de voltametria a medida de corrente é realizada com velocidades de varredura superiores a 100 mV s^{-1} , e as medidas de corrente são feitas apenas ao final do pulso de potencial, onde a corrente capacitiva já está minimizada (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; HARRIS, 2005).

Nesta técnica, a resposta obtida nos voltamogramas (Figura 8) – pico de corrente resultante (Δi) – provém da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulso), a uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração τ (período), representados na Figura 9, sendo esses os três parâmetros relevantes que determinam a sensibilidade e melhor aplicação desta técnica (SOUZA *et al.*, 2004). Assim, a sensibilidade obtida com essa técnica eletroquímica pode ser comparável a de outras técnicas analíticas instrumentais, como as técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SOUZA *et al.*, 2004).

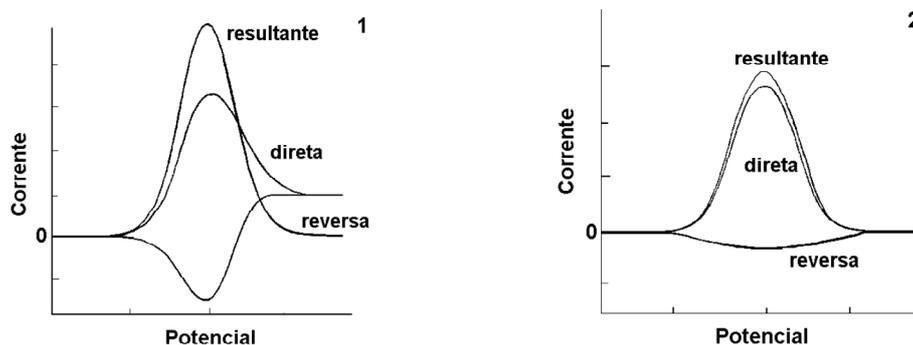


Figura 8. Voltamogramas de onda quadrada (1) processo redox de um sistema reversível e (2) processo redox de um sistema irreversível (SOUZA *et al.*, 2003).

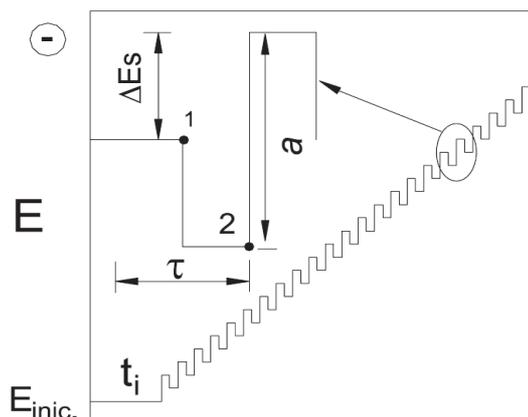


Figura 9. Sinal de excitação da voltametria de onda quadrada, onde E é o potencial, a é a amplitude de pulso, ΔE_s é o incremento de varredura de potenciais e τ período de duração do pulso, 1 representa final do pulso direto e 2 o final do pulso reverso (SOUZA *et al.*, 2004).

1.4.2. Aplicação de técnicas voltamétricas na determinação de compostos fenólicos

Detecções de compostos fenólicos são relatadas na literatura geralmente através de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Porém, a metodologia eletroquímica vem se tornando bastante difundida, principalmente com a utilização de biossensores ou outros eletrodos modificados, fazendo uso de técnicas como a SWV no monitoramento desses compostos. Assim como as modernas e sofisticadas técnicas analíticas, as principais vantagens das metodologias voltamétricas são o baixo custo e a rapidez operacional (SOUZA *et al.*, 2004).

1.5.COMPOSTOS FENÓLICOS

1.5.1. Isômeros do dihidroxibenzeno

Catecol (CC), hidroquinona (HQ) e resorcinol (Figura 10) são, respectivamente, os isômeros *orto*, *para* e *meta* do di-hidroxibenzeno, também denominado de difenol. Estes compostos fenólicos podem ser introduzidos no ambiente por diferentes fontes industriais, pois eles são amplamente utilizados em fotografia, produção de borracha, corantes, cosméticos, indústrias químicas e farmacêuticas, e também estão presentes em resíduos de cigarros (COUNTS *et al.*, 2005; CHANG CHIEN *et al.*, 2009). A enzima catecol oxidase apresenta atividade catalítica na oxidação dos isômeros orto e para, CC e HQ, sendo que isômero meta (resorcinol) não é um substrato desta enzima (GÓMEZ-LÓPEZ, 2002). Por causa da alta toxicidade e baixa degradabilidade, CC e HQ são consideradas como poluentes ambientais. Além das suas estruturas e características semelhantes, CC e HQ geralmente coexistem nas amostras e a identificação e quantificação dos mesmos separadamente é um desafio, devido a sobreposição dos sinais (LIU *et al.*, 2009).

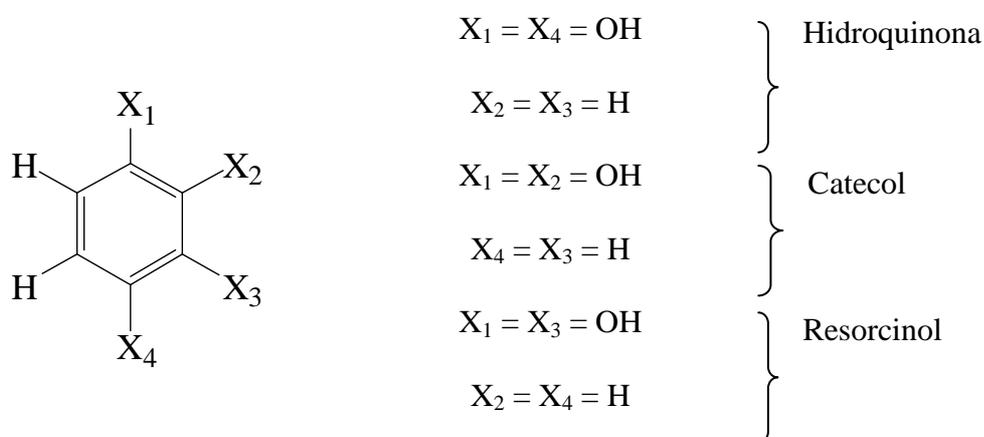


Figura 10. Isômeros do di-hidroxibenzeno: hidroquinona (isômero *para*), catecol (isômero *orto*) e resorcinol (isômero *meta*).

1.5.1.1. Hidroquinona (HQ)

A HQ (1,4–dihidroxibenzeno) é um composto fenólico importante em um grande número de processos biológicos e industriais com a função de estabilizante ou antioxidante. É empregada na produção da hulha de alcatrão, fabricação de papel, reveladores em fotografia preto e branco e revelador de imagens obtidas em filmes de raio-X, e também é encontrada em resíduos de cigarros (JAGETIA *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2011). A exposição humana a HQ ocorre principalmente pelo consumo de plantas, além do uso de cosméticos e fármacos contendo este composto. A HQ é um metabólito do benzeno, e contribui no desenvolvimento de doenças em organismos humanos (SMITH *et al.*, 2000).

1.5.1.2. Catecol (CC)

O CC (1,2–dihidroxibenzeno) é o isômero *orto* das três formas isoméricas do benzenodiol. Grandes quantidades deste composto são produzidas anualmente e empregadas principalmente como um precursor para pesticidas, sabores e fragrâncias.

Pequenas quantidades de catecol ocorrem naturalmente em frutas e legumes, juntamente com a enzima polifenol oxidase. Após o rompimento das células vegetais e exposição ao oxigênio (como quando uma batata ou maçã é cortada e deixada exposta ao ar), a enzima reage com o CC (incolor), o qual é oxidado produzindo pigmentos castanho-avermelhado (benzoquinona), característicos do escurecimento dos vegetais (DINÇKAYA *et al.*, 1998).

Grande parte do CC produzido sinteticamente é consumida na produção de pesticidas, sendo o restante usado como um precursor para a química fina, tais como perfumes e produtos farmacêuticos (DINÇKAYA *et al.*, 1998, PRAKASH *et al.*, 2010;

YANG *et al.*, 2007 B). Vários sabores e perfumes são preparados a partir de catecol. Por exemplo, o guaiacol é preparado por metilação do catecol e é então convertido em vanilina, componente responsável pelo aroma característico de baunilha (PRAKASH *et al.*, 2010).

1.5.2. Hidroquinona e catecol no cigarro

Quando um cigarro é queimado cerca de 4.700 substâncias diferentes podem ser identificadas, dentre elas o CC e a HQ (BORGERDING e KLUS, 2005). Os compostos fenólicos encontrados no cigarro, ou principalmente na fumaça do cigarro, são devidos a pirólise de polifenóis contidos no fumo, sendo o ácido clorogênico e a rutina os componentes majoritários (RISNER e CASH, 1990). Portanto, a queima do cigarro acarreta na formação, dentre outras substâncias, do CC e HQ, sendo que uma fração destes compostos é retida no filtro do cigarro, e tendo em vista seu potencial tóxico, tornam-se uma fonte de contaminação de novos ambientes, como rios e solos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver e avaliar o desempenho de um novo sensor bioinspirado modificado com nanopartículas metálicas estabilizadas em surfactante e aplicá-lo na quantificação seletiva de CC e HQ em filtros de cigarro.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar o tipo de sistema micelar empregado (reversa ou normal);
- Avaliar a formação do filme de surfactante sobre eletrodo de carbono vítreo;
- Modificar o sensor com a adição do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$;
- Realizar testes eletroquímicos, usando CV e SWV, para avaliação das respostas dos sensores;
- Realizar estudo cinético e de promiscuidade catalítica do complexo bioinspirado usado na construção do sensor;
- Investigar e otimizar parâmetros experimentais (quantidade de Pd-(ImS3-14); quantidade de complexo; parâmetros de SWV; eletrólito suporte e pH) através da SWV;
- Construir diferentes curvas de calibração para CC e/ou HQ;
- Avaliar repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade das respostas eletroquímicas dos sensores;
- Aplicar o sensor bioinspirado proposto na determinação de CC e HQ em amostras de extratos obtidos de filtros de cigarros pós-queima, usando SWV.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

Um banho de ultra-som Unique 1400A foi utilizado para auxiliar no preparo das soluções e limpeza dos eletrodos de carbono vítreo (GCE).

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N (Eco Chemie, The Netherlands), conectado a um *software* de processamento de dados (GPES, versão 4.9.007, Eco Chemie). Para execução das análises utilizou-se uma cela de vidro (capacidade máxima aproximada de 15 mL) sem compartimento divisório e com tampa de Teflon provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Foi utilizado um sistema de três eletrodos: o sensor desenvolvido no laboratório usando um GCE (Metrohm) com diâmetro de 2,0 mm como eletrodo de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e uma placa de platina (0,5 cm²) como eletrodo auxiliar.

As caracterizações morfológicas dos filmes desenvolvidos foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os filmes de Pd-(ImS3-14) sobre eletrodo de carbono foram cobertos com uma camada de ouro para formar um filme condutor utilizando um metalizador (Blazers SCD 005, Liechtenstein). As pastas foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura PHILIPS, modelo XL30, utilizando detector de elétrons secundários.

3.2. REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Reagentes de grau analítico foram obtidos comercialmente e usados no preparo de soluções, sem tratamento adicional para purificação. Todas as soluções foram preparadas usando-se água destilada e desionizada.

Soluções tampão acetato (pH 3,0; 4,0; 5,0), fosfato (pH 6,0; 7,0; 8,0) e TRIS (pH 9,0) foram preparadas nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando reagentes obtidos da Vetec.

A solução de quitosana (QTS) 0,5% (m/v) foi preparada pela dissolução de 0,5 g de QTS (Sigma-Aldrich) em 100 mL solução aquosa de ácido acético (pH 5,0).

Solução estoque de CC e HQ $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diariamente pela dissolução de 0,0055 g destes reagentes (Sigma) em balão volumétrico de 10 mL com água deionizada.

Para construção do sensor foi empregado um eletrodo de carbono vítreo obtido da Metrohn. O surfactante 3-(1-tetradecil-3-imidazólio)propanosulfonato (ImS3-14) e as nanopartículas de paládio dispersas em ImS3-14 (Pd-ImS3-14) foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob orientação do Prof. Dr. Faruk Nome (TONDO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012), e fornecidos para o presente trabalho. As nanopartículas de paládio foram obtidas pela redução dos íons paládios (K_2PdCl_4 , $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) usando como agente redutor ascorbato de sódio em ImS3-14 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), o diâmetro das NP obtidas foi 4,2 nm. O complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ foi sintetizado no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC) no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ademir Neves (LANZMASTER *et al.*, 2005).

Cigarros de três diferentes marcas (A, B e C), sendo três cigarros para cada marca

(totalizando 9 cigarros), foram obtidos no comércio da cidade de Florianópolis – SC, sendo os filtros destes cigarros pós-queima usados para obtenção dos extratos usados como amostras.

3.3. CONSTRUÇÃO DOS SENSORES

A superfície dos GCE foi tratada com polimento em suspensão de alumina (granulometria 0,05 μm) sobre papel feltro com movimentos em forma de “oito” para limpeza dos eletrodos. Para remoção da alumina residual, os eletrodos foram lavados com água destilada e sonicados por 10 minutos.

Três diferentes sensores contendo Pd-(ImS3-14) sobre GCE foram construídos do seguinte modo:

- **Sensor QTS/Pd-(ImS3-14)/GCE (Sensor contendo o surfactante e as NPs de Pd em micela normal e um filme de quitosana):** uma alíquota de 3 μL (1,5 nmol) de Pd-(ImS3-14) em água foi depositada sobre a superfície de um GCE previamente tratada, e deixado em repouso em um dessecador. Em seguida uma alíquota de 3 μL de QTS 0,5% em meio aquoso (pH 5,0) foi depositada sobre o filme do surfactante e novamente deixado em repouso para evaporação do solvente e formação do filme;
- **Sensor Pd-(ImS3-14)/GCE (Sensor contendo apenas o surfactante e as NPs de Pd em micela reversa):** uma alíquota de 3 μL (1,5 nmol) de Pd-(ImS3-14) em clorofórmio foi depositada sobre a superfície de um GCE previamente tratada, e deixado em repouso em um dessecador para evaporação do solvente e formação do filme;
- **Sensor Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/GCE (sensor bioinspirado usando o complexo Fe^{III}Cu^{II} e o filme de surfactante e as NPs de Pd em micela reversa):** uma alíquota de 3 μL (1,3 nmol) do complexo Fe^{III}Cu^{II} em diclorometano foi depositada sobre a superfície de

um GCE previamente tratada, e deixado em repouso para evaporação do solvente e formação do filme do complexo. Em seguida uma alíquota de 3 μL (1,5 nmol) de Pd-(ImS3-14) em clorofórmio foi depositada sobre o filme do complexo e deixado em repouso para evaporação do solvente e formação do filme sobre o eletrodo.

3.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas voltamétricas foram realizadas de acordo com o seguinte método: uma alíquota de 10,0 mL de solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) foi transferida para uma célula eletroquímica, e, em seguida, sucessivas adições de solução padrão de CC e/ou HQ, ou amostras de extrato de filtros de cigarro foram feitas com a utilização de um micropipetador. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em intervalo de potencial de +0,80 a -0,50 V, com velocidade de varredura de 25–200 mV s⁻¹, para o estudo dos coeficientes de difusão, e 100 mV s⁻¹ para o estudo de comparação das respostas dos sensores. As medidas de SWV foram obtidas aplicando varreduras de potencial entre +1,0 e -1,0 V para as medidas de resposta para diferentes substratos e seleção do sistema micelar, para o estudo do pH as faixas de potenciais usadas foram: +1,2 a +0,1 V (acetato), +0,50 e -0,50 V (fosfato) e -1,2 a -0,4V (TRIS). As demais medidas foram realizadas aplicando varreduras de potencial entre +0,50 e -0,50 V, com frequência de 10–100 Hz, amplitude de pulso de 10–100 mV e incremento de 1–10 mV, após adições sucessivas do analito. Todos os potenciais foram registrados *vs.* Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl), após um tempo de agitação de 60 segundos (suficiente para homogeneizar a solução), e sob temperatura ambiente.

3.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DE CC E HQ

Amostras de filtros de cigarros pós-queima foram obtidas através da queima de três cigarros de três diferentes marcas (A, B e C) com auxílio de uma bomba de vácuo (Figura 11), realizando-se sucções com duração de 3 segundos com intervalos de 30 segundos entre cada sucção. Após a queima dos cigarros, os filtros foram removidos e transferidos para um tubo tipo *Falcon* com 10 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0). Após três horas em repouso, os sobrenadantes (extratos) obtidos foram analisados empregando-se os sensores propostos para identificação e quantificação de CC e HQ que foram expressos em $\mu\text{g}/\text{extrato}$.



Figura 11. Sistema usado para queima dos cigarros e obtenção dos filtros empregados na determinação de CC e HQ.

O método de adição de padrão foi usado para determinação de CC e HQ nas amostras de filtro de cigarro. Alíquotas das amostras previamente preparadas foram transferidas para a célula eletroquímica, contendo o eletrólito suporte, e quantificadas

usando SWV, após sucessivas adições de solução padrão de CC e HQ. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DO SISTEMA MICELAR

Este estudo visou determinar qual sistema micelar, micela normal ou reversa, apresentaria melhores resultados quando empregado na formação de filme sobre um eletrodo sólido e aplicado em medidas eletroquímicas. Inicialmente, empregou-se uma solução de surfactante na forma de micela normal (em meio aquoso), para formação de filme sobre o eletrodo, onde as micelas estariam com suas cabeças polares em contato com a superfície do GCE. Neste sistema ocorre a solubilização do filme quando em contato com a solução do eletrólito suporte usada (meio aquoso). Para a realização das medidas empregando Pd-(ImS3-14) em micelas normal, o GCE contendo o filme do surfactante recebeu um recobrimento com um segundo filme de QTS, que é insolúvel no pH do eletrólito suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 7,0).

Também se avaliou o desempenho de um segundo sistema, usando uma solução de surfactante na forma de micela reversa, neste caso o solvente usado foi o clorofórmio, e, portanto, disponibilizando as caudas apolares da molécula do Pd-(ImS3-14) para adesão com a superfície do eletrodo (EGUSA *et al.*, 2010), e posterior, imersão no eletrólito suporte (neste caso não ocorre a solubilização do filme em meio aquoso).

Os resultados obtidos neste estudo empregando SWV são mostrados na Figura 12, onde é possível observar em termos de resposta (corrente de pico) um melhor desempenho quando a solução contendo micelas reversas foi empregada. O uso da QTS promove um indesejado decréscimo na resposta do eletrodo, sendo até mesmo menor do que a resposta obtida sem nenhuma modificação do carbono vítreo, representando um impedimento à superfície do eletrodo. Também é importante destacar o caráter hidrofóbico da superfície de

carbono vítreo, o que confere uma melhor adesão das caudas apolares em relação às cabeças polares do surfactante, tornando o filme mais estável e reproduzível (EGUSA *et al.*, 2010; RAJBONGSHI *et al.*, 2010).

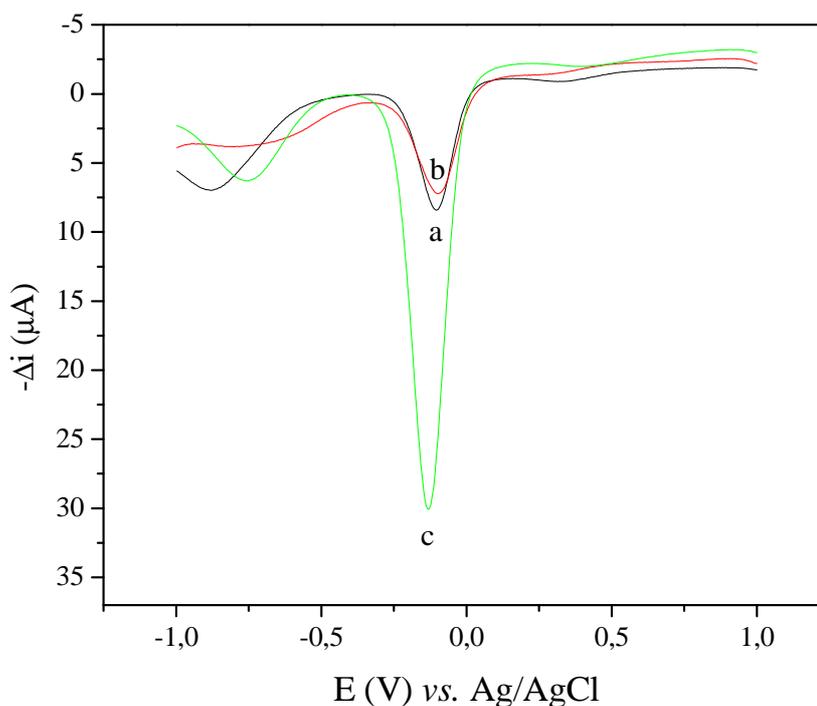


Figura 12. Estudo do sistema micelar (a) GCE não modificado, (b) eletrodo QTS/Pd-(ImS3-14)/GCE (micela normal) (c) eletrodo Pd-(ImS3-14)/GCE (micela reversa) utilizando $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução de hidroquinona em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

4.2. MORFOLOGIA DO ELETRODO RECOBERTO COM FILME DE Pd-(ImS3-14)

A Figura 13 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) de duas superfícies de carbono: (A) sem o filme do surfactante e (B) com a presença do filme de Pd-(ImS3-14). Características distintas na morfologia das superfícies podem ser observadas, onde o sensor que não apresenta o filme de surfactante é mais irregular e não homogênea enquanto a superfície recoberta com o filme do surfactante claramente exibiu uma superfície mais

uniforme devido à presença do filme. A adesão do surfactante à superfície do eletrodo se dá preferencialmente por interações hidrofóbicas (forças de London), tendo em vista que o carbono apresenta um elevado caráter hidrofóbico, sendo, portanto, compatível com as caudas apolares disponíveis pelo uso do sistema com micelas reversas (GILMARTIN e HART, 1995; LI *et al.*, 2008; SHAN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009). Essas interações mesmo não apresentando uma força relativamente elevada, como, por exemplo, a magnitude da ligação covalente, são suficientemente fortes para manter o filme de Pd-(ImS3-14) aderido a superfície de carbono vítreo (XU *et al.*, 2009). Em adição, os surfactantes apresentam outras vantagens quando empregados em sensores eletroquímicos, podendo-se destacar a facilitação na transferência de elétrons na superfície destes eletrodos, além de promover uma concentração de espécies iônicas ou polarizáveis na superfície do filme, aumentando assim, a sensibilidade dos sensores (XU *et al.*, 2009). Não foi possível observar a presença das NPs de Pd nestas imagens devido à baixa resolução do equipamento usado, além da SEM não ser a técnica mais recomendada para esse tipo de análise e sim a microscopia de transmissão (TEM).

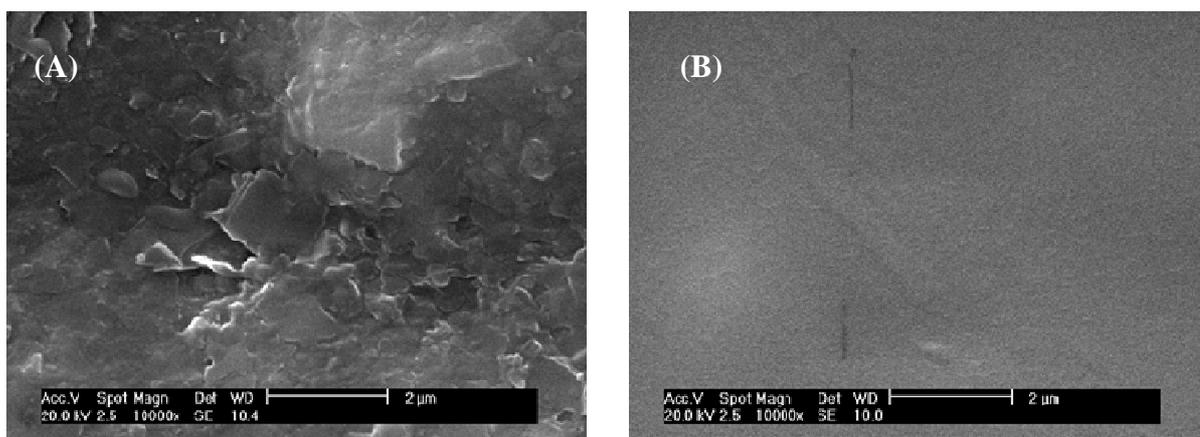


Figura 13. Morfologia do filme de Pd-(ImS3-14), (A) eletrodo de carbono sem o filme do surfactante e (B) eletrodo de carbono recoberto com o filme do surfactante.

4.3. MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO

O uso de complexos inorgânicos bioinspirados, que catalisam uma reação de transferência eletrônica ou então a formação de um intermediário eletroativo tem sido estudado na construção de sensores eletroquímicos (SANTHIAGO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2007, SOTOMAYOR *et al.*, 2002). O sítio catalítico mimetizado pode ser de uma enzima hidrolase, tais como as fosfatases, ou também sítios catalíticos de oxidoredutases, tais como as catecol oxidases, demonstrando o fenômeno de promiscuidade catalítica desses complexos (NEVES *et al.*, 2010). O uso de uma molécula inorgânica na construção desses sensores tem apresentado vantagens como a alta estabilidade, tendo em vista a origem sintética da molécula de bioreconhecimento, e baixo custo de produção, quando comparado a construção de biossensores que empregam enzimas purificadas como biocomponente.

A Figura 14-A mostra um esquema da proposta da reação que ocorre na superfície do sensor contendo um filme de Pd-(ImS3-14), onde o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ funciona como catalisador. Inicialmente, CC ou HQ em contato com o $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$, na presença de oxigênio molecular, é oxidada à sua respectiva *orto*-quinona e *para*-quinona. Então, estas quinonas são reduzidas eletroquimicamente na superfície do eletrodo a um potencial de 0,05 e -0,15 V vs. Ag/AgCl, respectivamente. A corrente de pico resultante obtida é diretamente proporcional à concentração dos analitos. Uma proposta mais detalhada para o mecanismo de oxidação do CC pelo complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ na superfície do eletrodo assim como a redução eletroquímica realizada pelo eletrodo é representada na Figura 14-B, sendo que o mecanismo para HQ é similar.

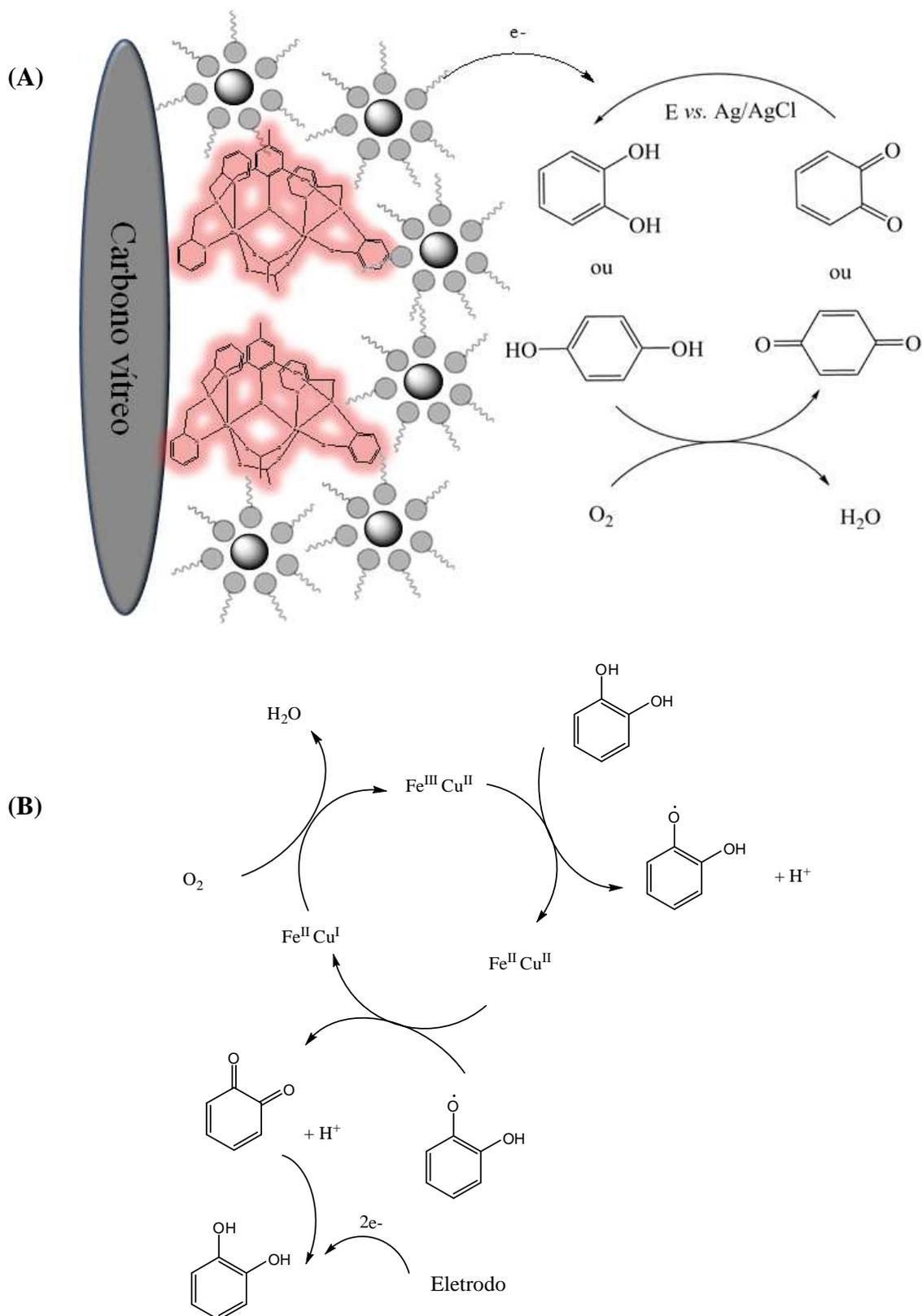


Figura 14. (A) Proposta para reação catalisada na superfície do eletrodo entre o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ e as moléculas de CC e/ou HQ, com a redução eletroquímica das quinonas formadas; (B) Mecanismo detalhado da reação redox para CC na superfície do sensor para o CC.

4.4. RESPOSTA ANALÍTICA PARA DIFERENTES SUBSTRATOS FENÓLICOS

O eletrodo Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/GCE foi testado frente a diferentes substratos fenólicos (catequina, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, catecol, ácido ferúlico, ácido gálico, hidroquinona e L-dopa). A Figura 15 mostra a resposta relativa obtida para cada substrato fenólico, a ordem de resposta encontrada foi à seguinte: CC (100%), HQ (79,7%), ácido clorogênico (21,1%), ácido cafeico (11,5%), catequina (7,7%), ácido ferúlico (3,1%), ácido cumárico (2,9%), L-dopa (1,5%) e ácido gálico (0,8%). Portanto, CC e HQ foram escolhidos devido a sua melhor resposta em comparação com outros substratos para o sensor proposto.

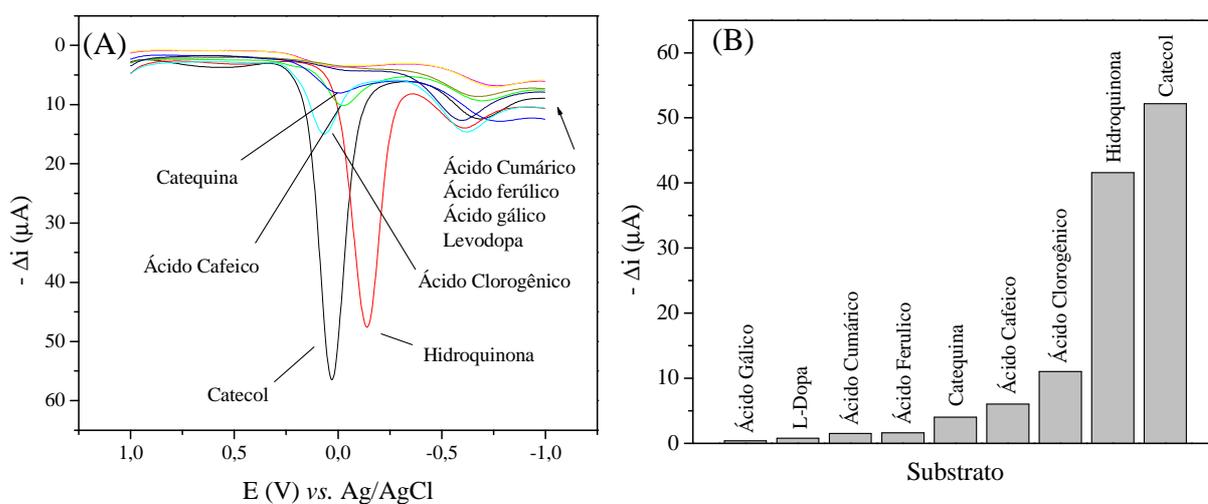


Figura 15. (A) Voltamogramas obtidos usando o eletrodo Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/GCE para diferentes compostos fenólicos utilizando $2,64 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de solução de cada analito em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0). (B) Resposta em corrente para os substratos analisados.

4.5. CINÉTICA DO COMPLEXO Fe^{III}Cu^{II}

Como demonstrado no item anterior, o sensor proposto mostrou melhor resposta quando em presença dos dois isômeros do difenol, *orto*-difenol (CC) e o *para*-difenol (HQ), portanto, avaliou-se o comportamento promíscuo do complexo bioinspirado usado ([Fe^{III}Cu^{II}(BPBPMP)(OAc)₂]ClO₄), tendo em vista que a função como fosfatase já está confirmada e elucidada na literatura (LANZNASTER *et al.*, 2005). A atividade promíscua do complexo usado foi avaliada com relação a sua função como um mimético funcional de uma catecol oxidase.

O estudo cinético para examinar a atividade do complexo Fe^{III}Cu^{II} como um modelo para catecol oxidase foi realizado sob condições de excesso de substrato (usando a CC ou o HQ como substrato) em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0). A dependência da taxa inicial (pico de corrente) sobre a concentração de CC ou HQ apresenta um comportamento tipo Michaelis-Menten. Para este estudo usou-se a versão eletroquímica da equação de Michaelis-Menten (Equação 2) (FRANZOI *et al.*, 2010).

$$i = i_{\text{máx}}[S]/(K_{\text{m}}^{\text{app}} + [S]) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde [S] é a concentração do substrato, $i_{\text{máx}}$ é a corrente máxima e $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ representa a constante aparente de Michaelis-Menten.

A linearização da versão eletroquímica de Lineweaver-Burk desses dados (pico de corrente e concentração CC e HQ) (Figura 16) oferece os seguintes parâmetros cinéticos: $K_{\text{m}}^{\text{app}} = 6,71 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (CC) e $K_{\text{m}}^{\text{app}} = 1,79 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (HQ). Estes resultados são da mesma ordem dos valores obtidos com outros complexos (NEVES *et al.*, 2010), que também mostraram atividade catalítica promíscua para catecol oxidase.

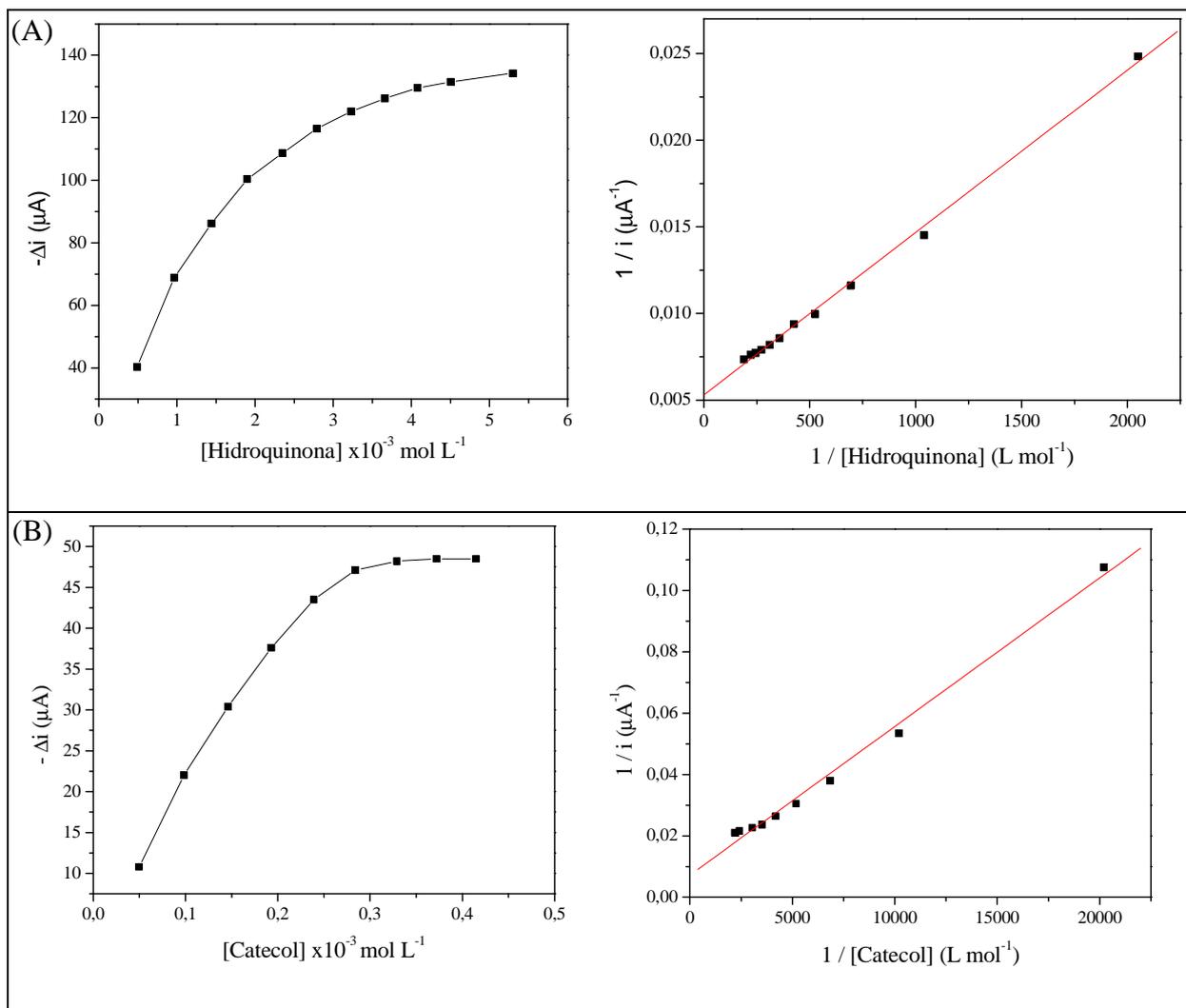


Figura 16. Cinética do complexo, atividade como catecol oxidase, utilizando solução de HQ (A) e CC (B) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

Os resultados obtidos demonstram que o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$, assim como outros complexos dinucleares, apresenta além da atividade catalítica como um mimético para enzimas hidrolases (LANZNASTER *et al.*, 2005), também apresenta excelente atividade como um modelo bioinspirado para uma catecol oxidase, mostrando assim que o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ também é um complexo promíscuo.

4.6. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARREDURA E MECANISMO ELETROQUÍMICO

A fim de determinar o grau de reversibilidade da reação e verificar se a difusão é o único fator que controla o processo na superfície do eletrodo, um estudo usando a variação da velocidade de varredura em CV foi realizado empregando a seguinte faixa de velocidades: 25–200 mV s^{-1} . O estudo foi realizado individualmente para CC e HQ em dois eletrodos diferentes, sendo um GCE sem modificação (resultados apresentados na Figura 18) e o sensor Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/GCE (Figura 19). A reversibilidade da reação foi avaliada através da relação entre as correntes de pico (i_{pa}/i_{pc}), em que um maior grau de reversibilidade é alcançado com uma maior tendência para o valor igual a 1,0. Tendo em vista a natureza reversível das reações eletroquímicas estudadas, a equação de Randles-Sevcik foi aplicada para avaliar o mecanismo de transporte de massa dominante nas medidas voltamétricas. Usou-se para isso o plote i_p vs. $v^{1/2}$, onde através da linearidade obtida é possível concluir que a reação eletroquímica é controlada pela difusão de CC e HQ na superfície do GCE e no sensor bioinspirado (Figura 17 e 18, respectivamente). Outra evidência de um processo controlado por difusão para ambos os analitos nestes eletrodos foi observada no gráfico de $\log i_p$ vs. $\log v$, que apresentou uma inclinação de 0,53 (GCE) e 0,55 (sensor bioinspirado), sendo estes valores muito próximos do valor teórico de 0,50, o que é esperado para um processo controlado por difusão. Em adição, a partir da equação de Randles-Sevcik e os resultados apresentados nos gráficos de i_p vs. $v^{1/2}$ foi possível obter os valores experimentais dos coeficientes de difusão de CC e HQ que são $3,95 \times 10^{-7}$ e $1,27 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, mostrando que as moléculas de HQ difundem-se mais rapidamente para superfície do eletrodo que as moléculas de CC. Os valores dos coeficientes de difusão obtidos usando o GCE permite calcular a área superficial ativa do eletrodo contendo o filme de Pd-(ImS3-14) que é

igual a $0,060 \text{ cm}^2$, quase o dobro da área do GCE não modificado ($0,034 \text{ cm}^2$), o que pela equação de Randles-Sevcik confere maiores valores de correntes de picos obtidos com o sensor modificado, aumentando a sensibilidade do sensor bioinspirado.

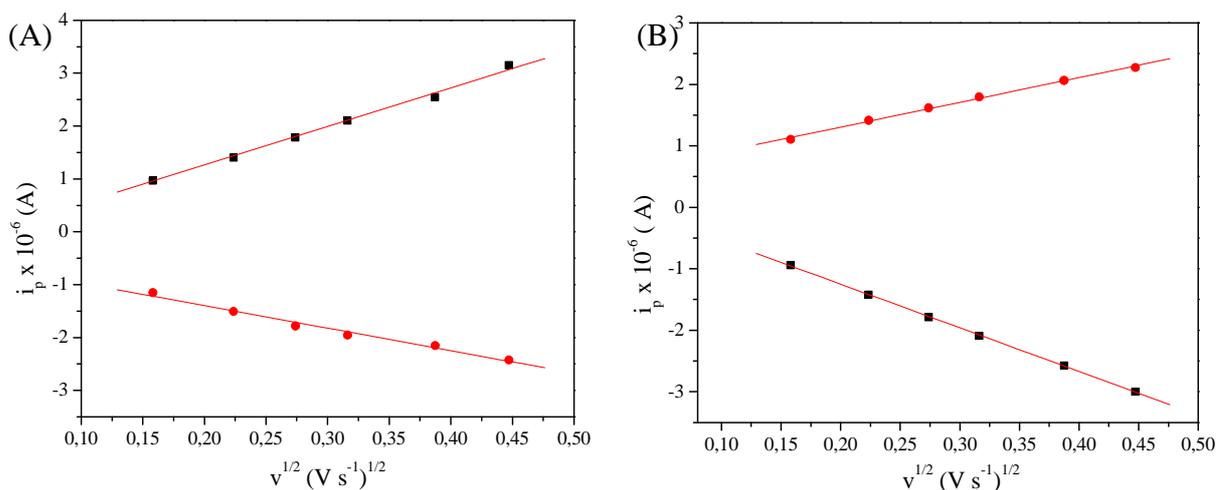


Figura 17. Efeito da velocidade de varredura no GCE não modificado em solução de (A) CC $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) HQ $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

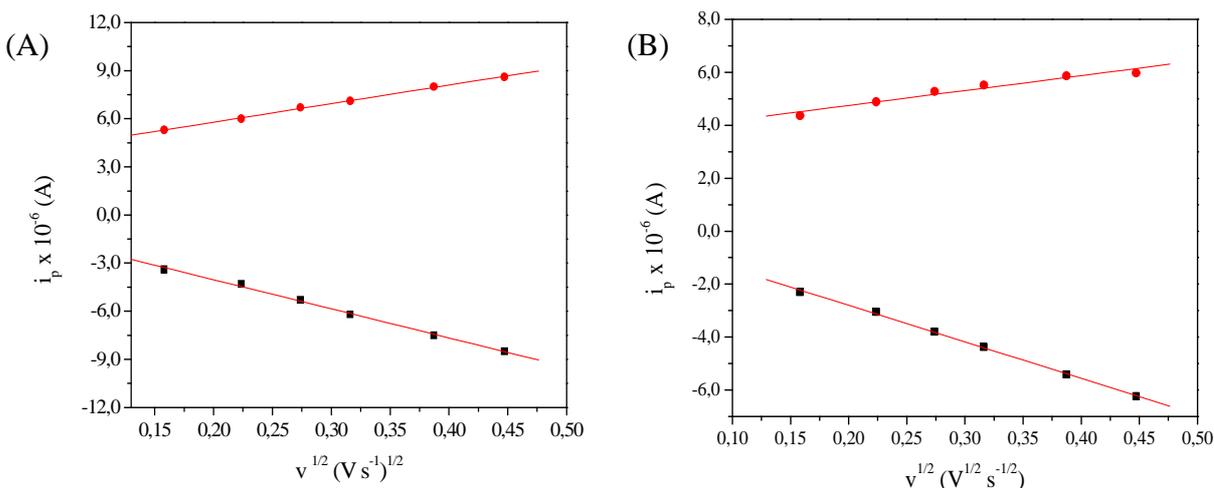


Figura 18. Efeito da velocidade de varredura no sensor bioinspirado em solução de (A) CC $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) HQ $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

4.7. TESTE DE COMPARAÇÃO PARA OS SENSORES MODIFICADOS

O comportamento eletroquímico de CC e HQ foi investigado por SWV (Figura 19) e CV (Figura 20) usando os seguintes eletrodos (a) GCE não modificado, (b) GCE modificado com surfactante e NPs de Pd (Pd-(ImS3-14)/GCE), (c) GCE modificado com o complexo bioinspirado e surfactante contendo NPs de Pd (Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/ GCE). Neste estudo, as medidas de CV foram obtidas varrendo o potencial entre 0,8 e -0,5 V vs. Ag/AgCl em uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹, e as medidas de SWV foram obtidas na faixa de potencial de 0,50 e -0,50 V vs. Ag/AgCl, frequência de 100 Hz, amplitude de 40 mV e incremento de 8 mV. Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) e 2,68x10⁻⁴ mol L⁻¹ de solução padrão de CC e HQ.

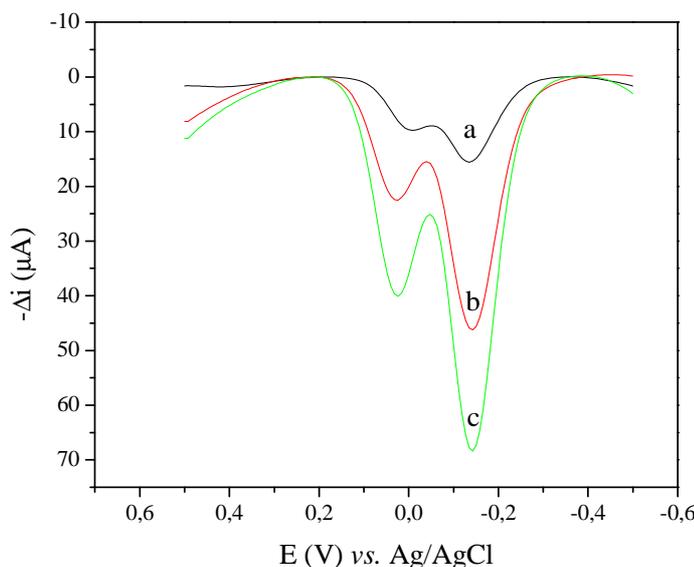


Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada para os eletrodos: (a) GCE não modificado, (b) sensor Pd-(ImS3-14)/GCE e (c) sensor Pd-(ImS3-14)/(Fe^{III}Cu^{II})/GCE, em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,0) contendo 2,68x10⁻⁴ mol L⁻¹ de cada difenol (CC e HQ).

Como pode ser observado na Figura 19 o sensor (c), em comparação com os demais eletrodos, apresentou uma resposta maior de corrente para hidroquinona e catecol. A corrente

de pico para CC e HQ usando o sensor (c) correspondeu a um aumento de 73% (CC) e 46,2% (HQ) da resposta em relação ao sensor contendo apenas Pd-(ImS3-14). Este ganho de resposta pode ser atribuído à adição do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ que atua como catalisador para oxidação de CC e HQ na superfície do sensor. O GCE não modificado (a) obteve uma resposta correspondendo a apenas 25,5% (CC) e 23,4% (HQ) da resposta do eletrodo selecionado, sensor (c).

Na Figura 19 ao contrário do que foi observado na Figura 15, o pico de corrente para HQ é maior do que para CC. Levando em consideração que existe uma competição entre HQ e CC pela área ativa do sensor, como, já citado anteriormente as moléculas de HQ difundem-se mais rapidamente para a superfície do sensor, e, portanto existe uma concentração superficial maior para HQ do que CC, fazendo com que o pico da HQ seja maior do que para o CC. Já no caso da Figura 15, como determinado na seção 4.5, existe uma maior afinidade do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ pelo CC do que pela HQ sendo que nesse caso o pico de corrente do CC é superior.

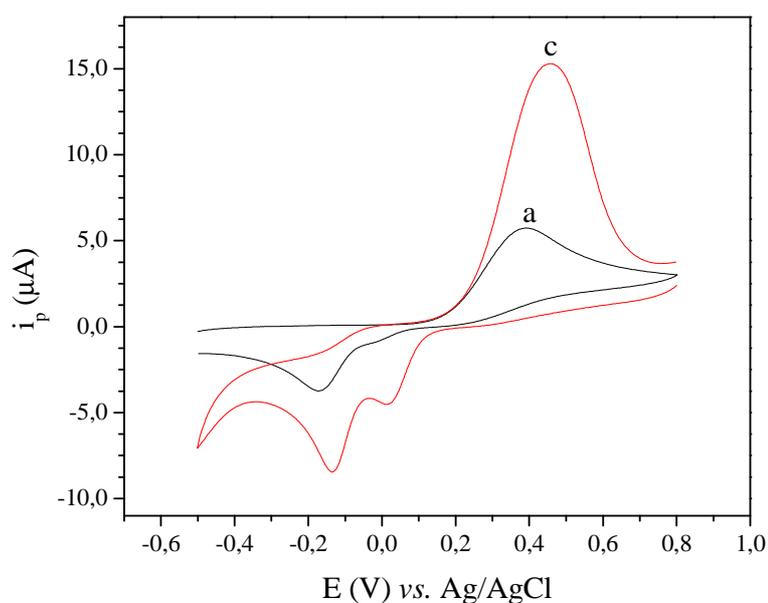


Figura 20. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos: (a) GCE não modificado e (c) sensor Pd-(ImS3-14)/($\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$)/GCE, em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ.

Em adição, a Figura 20 permite observar o poder da voltametria cíclica em auxiliar no estudo do mecanismo que ocorre na superfície dos eletrodos. Como é possível observar pelo voltamograma cíclico para os eletrodos (a) e (c), a oxidação das quinonas formadas ocorre no mesmo potencial, diferentemente da redução que pode ser distinguida. Esse comportamento justifica a escolha da varredura ser feita em direção aos potenciais mais negativos (sentido da redução) nos estudos de SWV, pois permite separar os picos dos dois analitos.

4.8. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

4.8.1. Efeito da quantidade de Pd-(ImS3-14) e do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ no filme

O efeito da quantidade de Pd-(ImS3-14) foi avaliado de 2 a 4 nmol e a do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ de 0,9 a 1,8 nmol na superfície do GCE. Como pode ser visto na Figura 21, a resposta analítica (pico de corrente resultante) para $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ aumentou até 3,0 nmol de Pd-(ImS3-14). A quantidade de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ que mostrou melhores resultados foi 1,3 nmol do complexo, apresentando um comportamento semelhante a Michaelis-Menten com um aumento inicial exponencial até atingir uma saturação em maiores quantidades.

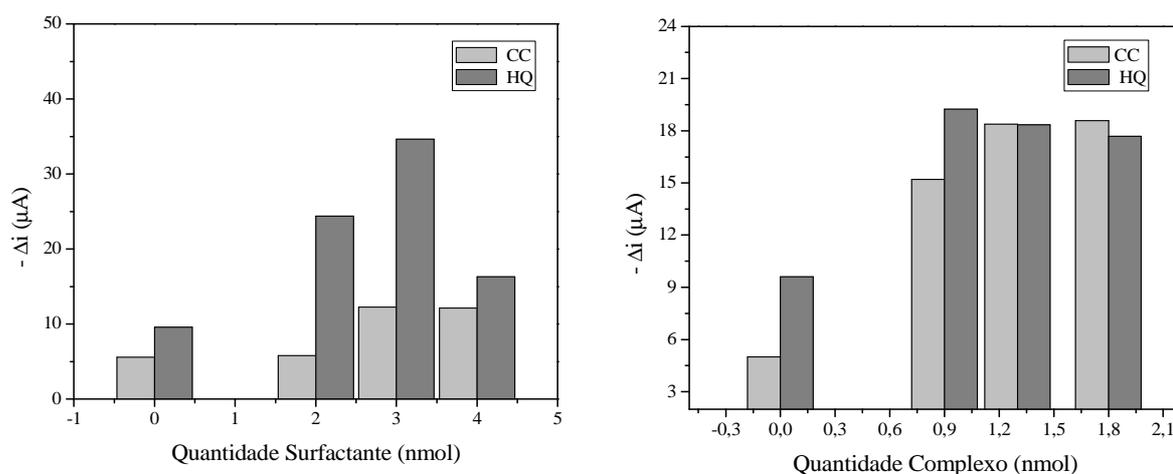


Figura 21. Influência da quantidade de Pd-(ImS3-14) e $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ na resposta do sensor utilizando solução contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

4.8.2. Efeito do pH do eletrólito suporte

O efeito do pH na faixa de 3,0-5,0 (tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 6,0-8,0 (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 9,0 (tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi estudado usando $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ. As respostas para diferentes valores de pH são mostradas na Figura 22, sendo que os critérios utilizados foram os mais altos valores de separação dos picos e maiores correntes de pico para CC e HQ. Como é possível observar na Figura 22-A, o tampão acetato assim como o tampão TRIS (Figura 22-C) em nenhum dos valores de pH testados apresentou separação adequada dos picos, além disso foram obtidas baixas correntes de pico se comparadas com as obtidas em tampão fosfato. O tampão fosfato (Figura 22-B) apresentou bons resultados para separação dos picos dos dois isômeros, além de oferecer ganhos em termos de resposta analítica se comparado aos outros tampões testados. O pH 7,0 apresentou melhor resultado, e, portanto, foi escolhido como o pH de trabalho. A Figura 22-D permite observar a distribuição total de respostas obtidas em diferentes valores de pH, o que contribui para seleção do melhor pH, tendo em vista uma relação em que ambos os analitos tivessem respostas adequadas e similares para que o método apresentasse a mesma eficiência tanto para CC quanto para HQ.

O valor ótimo de pH igual a 7,0 está em concordância com o estudo apresentado por Lanzaster e colaboradores (2005), sendo que este valor de pH está intimamente relacionado a atividade catalítica do complexo. Observando-se os valores de pKa do complexo obtidos por potenciometria ($\text{pK}_{a1} = 5,25$, $\text{pK}_{a2} = 6,20$ e $\text{pK}_{a3} = 7,82$) (LANZASTER *et al.*, 2005) é possível observar a influência que o valor de pH oferece em relação ao mecanismo de catálise. Portanto, em valores de pH igual a 7,0 ocorre a desprotonação de uma molécula de água que é um ligante do sítio de Fe^{III} atuando como um sítio de coordenação para catálise, já valores de $\text{pH} > 7,0$ prejudicam a atividade do complexo devido a desprotonação da molécula de água coordenada ao átomo de Cu^{II} (LANZASTER *et al.*, 2005).

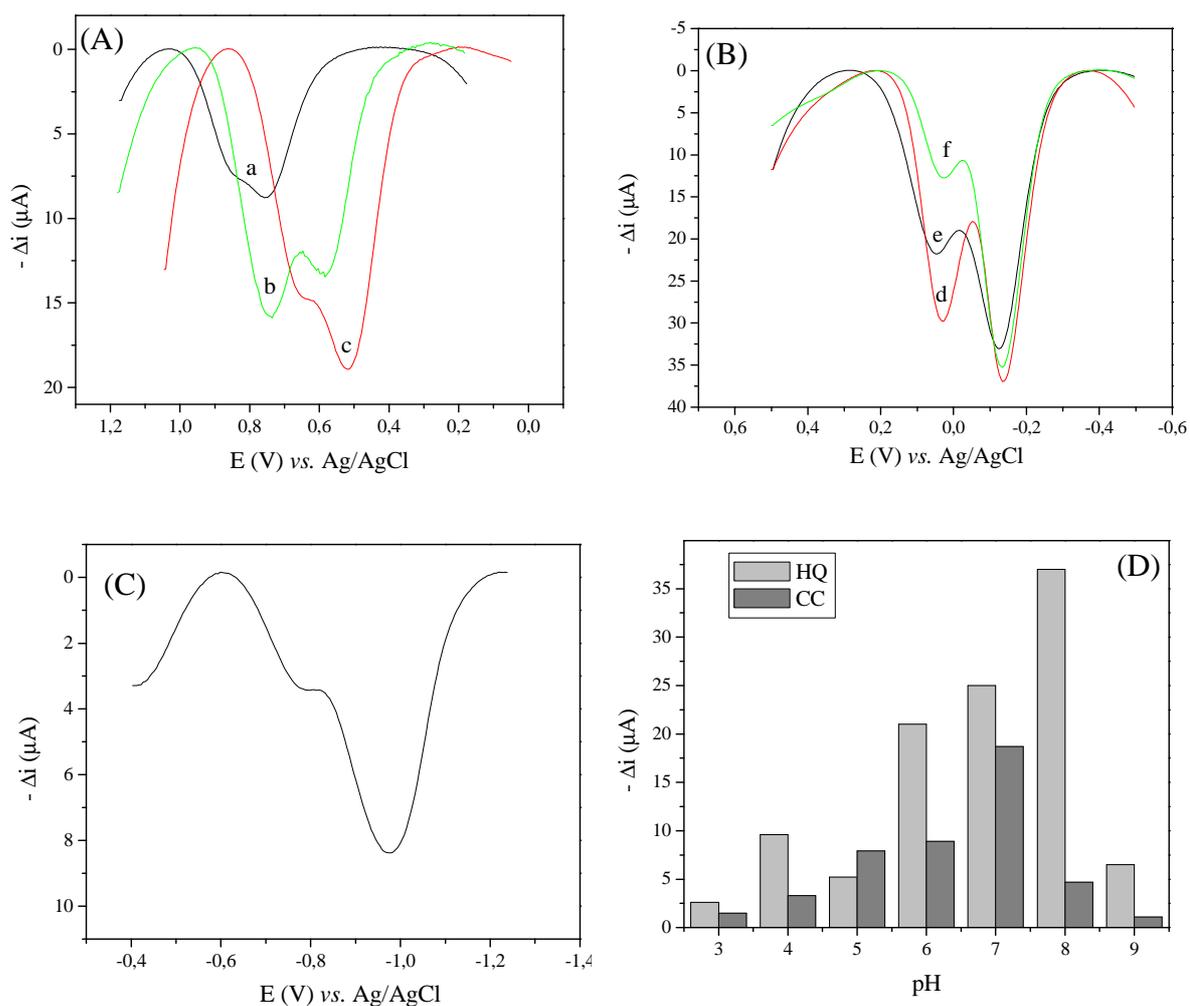


Figura 22. Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do sensor utilizando solução contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e HQ em tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) acetato: (a) pH 3,0; (b) pH 4,0 e (c) pH 5,0; (B) fosfato: (d) pH 6,0; (e) pH 7,0 e (f) pH 8,0; (C) TRIS pH 9,0 e (D) gráfico unificado das respostas.

4.8.3. Otimização dos parâmetros da SWV

O efeito dos parâmetros da SWV – frequência (10-100 Hz), amplitude (1-10 mV) e incremento (1-10 mV) – foram investigados em $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0). Para todas as medidas, avaliou-se simultaneamente as melhores respostas obtidas (corrente resultante), separação dos picos (potenciais de pico), e menor ruído nos voltamogramas.

O melhor perfil voltamétrico foi obtido em 100 Hz de frequência, 40 mV de amplitude e 8 mV de incremento (Figura 23), sendo estes valores selecionados para dar continuidade ao trabalho. A velocidade em SWV é obtida pelo produto da frequência e do incremento, sendo que o aumento dos valores de corrente obtidos em relação o aumento dos valores desses dois parâmetros já era um resultado esperado. Já para o estudo da amplitude de pulso existe a necessidade de avaliar o comportamento não apenas do sinal (corrente de pico), mas também da resolução dos dois picos. Para valores de amplitude acima de 40 mV os voltamogramas apresentaram baixa resolução (Figura 23-D), mesmo havendo um aumento na corrente de HQ com o aumento da amplitude, que é resultado da sobreposição dos picos.

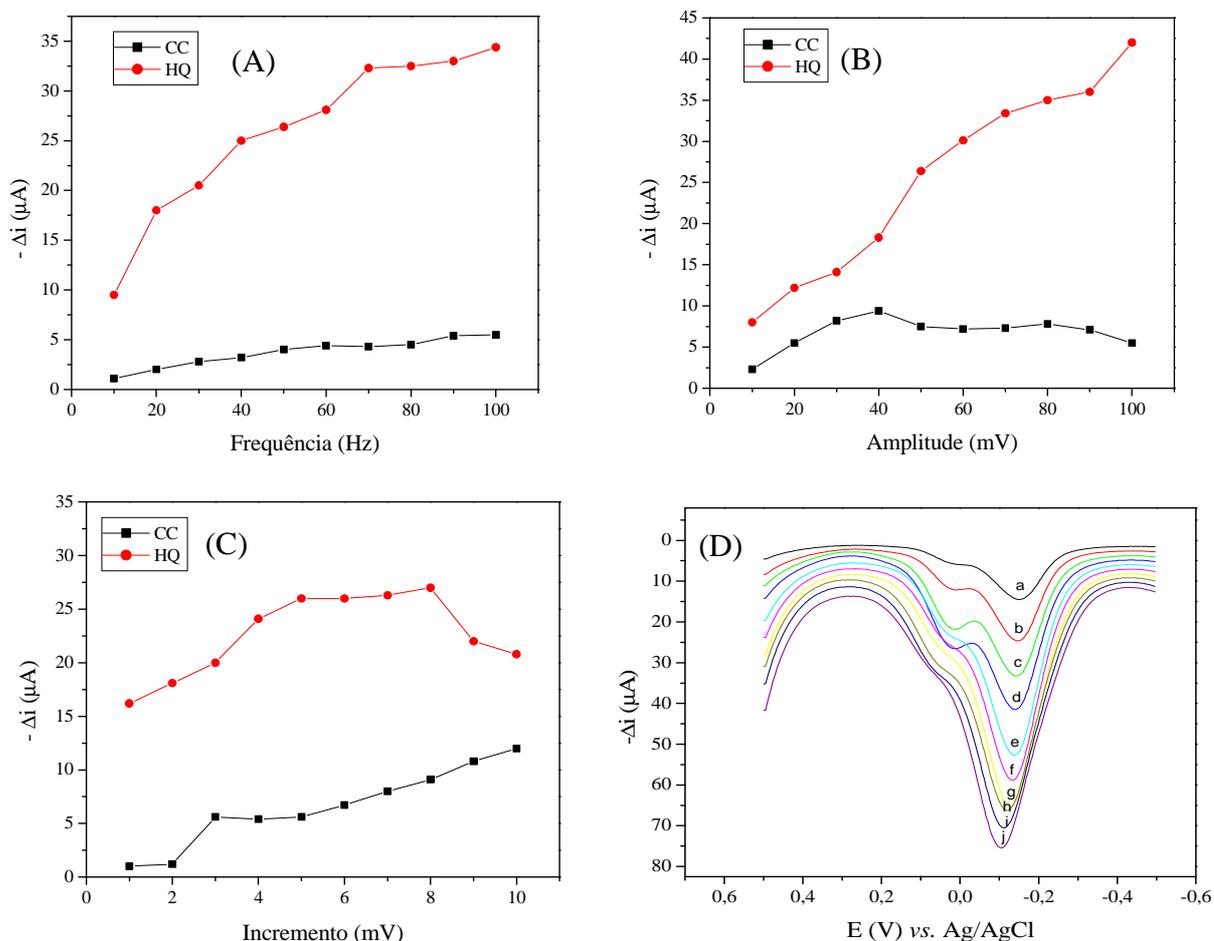


Figura 23. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do sensor utilizando solução contendo $2,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para cada difenol (CC e HQ) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0). (A) Estudo da frequência; (B) Estudo da amplitude; (C) Estudo do incremento.

A Tabela 2 contém um resumo de todos os parâmetros avaliados e também os melhores resultados obtidos na otimização do método proposto.

Tabela 2. Parâmetros de otimização do método proposto

Parâmetro	Faixa investigada	Melhor valor
Pd-(ImS3-14) (nmol/eletrodo)	2,0 – 4,0	3,0
Complexo Fe ^{III} Cu ^{II} (nmol/eletrodo)	0,9 – 1,8	1,3
Natureza do eletrólito suporte/pH	Acetato (pH 3,0 – 5,0)	Fosfato/7,0
	Fosfato (pH 6,0 – 8,0)	
	Tris (pH 9,0)	
Frequência (Hz)	10 – 100	100
Amplitude (mV)	10 – 100	40
Incremento (mV)	1 – 10	8

4.9. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Três diferentes curvas de calibração para CC e HQ foram obtidas utilizando o sensor nas condições experimentais previamente otimizadas, na faixa de potencial de 0,50 e –0,50 V vs. Ag/AgCl. As reduções eletroquímicas de CC e HQ foram obtidas em potenciais de aproximadamente +0,05 V e –0,150 V, respectivamente.

A Figura 24-A mostra a curva de calibração obtida para HQ individualmente. A corrente resultante para HQ teve um aumento linear na faixa de $4,99 \times 10^{-7}$ a $18,51 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. A curva de calibração apresenta a seguinte equação de regressão: $-\Delta i = 0,067 (\pm 0,050) + 3,21 \times 10^5 (\pm 4,40 \times 10^3) [HQ]$, com um coeficiente de correlação (R) de 0,999, onde Δi é o pico de corrente resultante (μA) e [HQ] é a concentração de hidroquinona (mol L⁻¹). A Figura 25-B

mostra a curva analítica obtida para CC, a qual apresentou uma faixa linear de $4,99 \times 10^{-7}$ a $18,51 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($-\Delta i = -0,008 (\pm 0,038) + 3,23 \times 10^5 (\pm 4,40 \times 10^3) [\text{CC}]$, $R = 0,999$), onde [CC] é a concentração de catecol (mol L^{-1}).

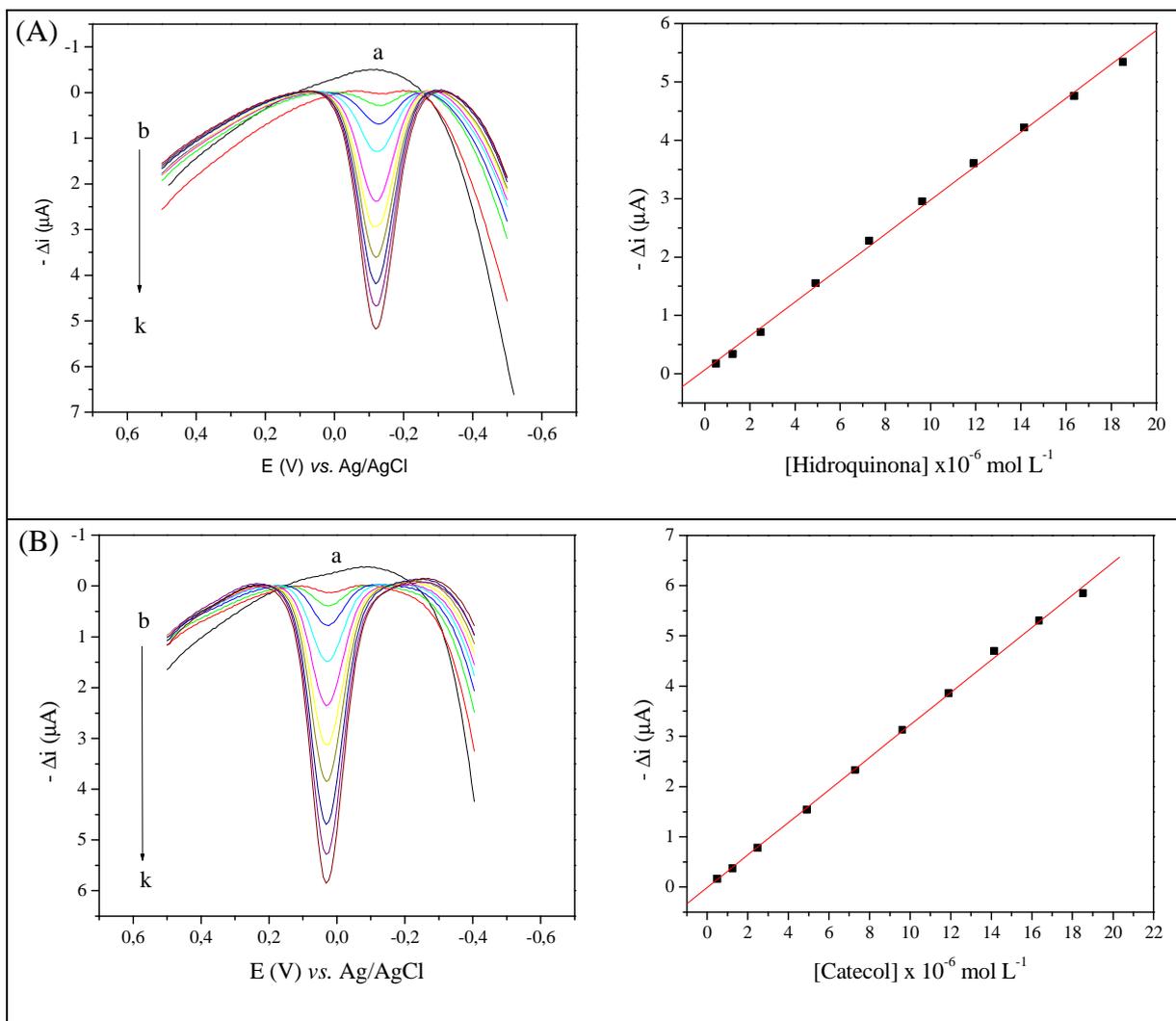


Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o sensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) e soluções de HQ (A) e CC (B) em concentrações de (b) $4,99 \times 10^{-7}$ a (k) $18,51 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Curvas de calibração para (A) HQ e (B) CC.

A Figura 25 mostra a curva de calibração para HQ e CC simultaneamente, a corrente resultante de ambos os substratos aumenta linearmente com o aumento das concentrações na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $9,09 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. As curvas de calibração apresentaram as seguintes equações de regressão para HQ e CC, respectivamente: $-\Delta i = 0,103 (\pm 0,020) + 2,61 \times 10^5 (\pm 3,3 \times 10^3)$ [HQ] (R = 0,999) e $-\Delta i = 0,265 (\pm 0,010) + 1,38 \times 10^5 (\pm 1,1 \times 10^3)$ [CC] (R = 0,999).

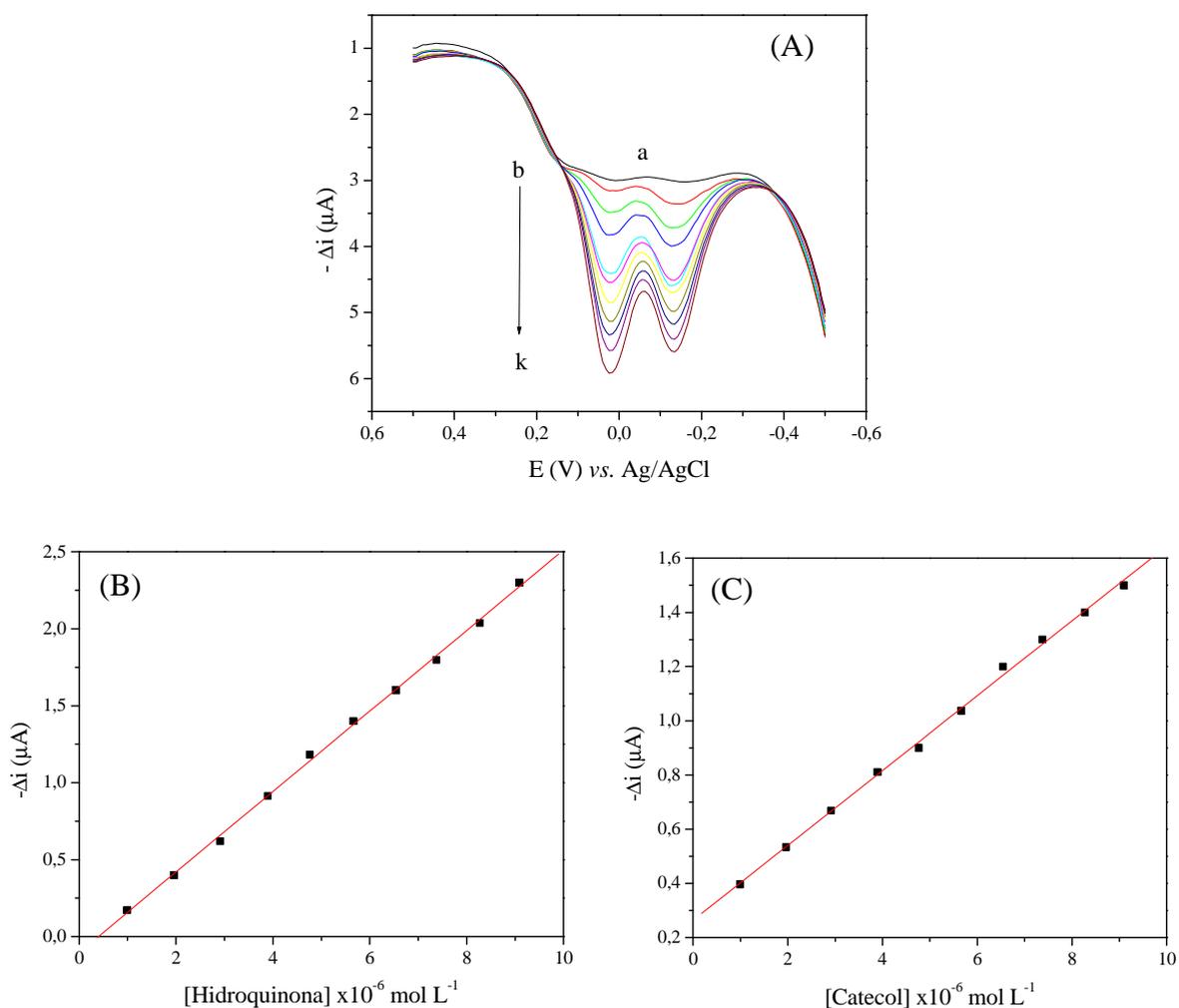


Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada (A) obtidos usando o sensor proposto em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) e soluções de HQ e CC em concentrações de (b) $9,90 \times 10^{-7}$ a (k) $9,09 \times 10^{-6} \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: curvas de calibração para (B) HQ e (C) CC.

4.9.1. Curva de calibração e interferência do isômero

Para avaliar uma possível interferência do isômero na determinação simultânea de HQ e CC, foram construídas duas curvas de calibração, a primeira em que a concentração de HQ foi mantida constante e foram realizadas sucessivas adições de CC, e a segunda curva mantendo-se uma concentração fixa de CC e aumentando-se a concentração de HQ.

A Figura 26 mostra a curva de calibração referente ao primeiro caso, a qual apresentou uma faixa linear de $9,90 \times 10^{-7}$ a $7,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($-\Delta i = -0,234 (\pm 0,039) + 5,13 \times 10^5 (\pm 8,2 \times 10^3) [\text{CC}]$, $R = 0,992$). Já a Figura 27 mostra a curva de calibração referente ao segundo caso, onde a concentração de HQ foi linear na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $7,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($-\Delta i = 0,224 (\pm 0,024) + 4,19 \times 10^5 (\pm 5,0 \times 10^3) [\text{HQ}]$, $R = 0,999$).

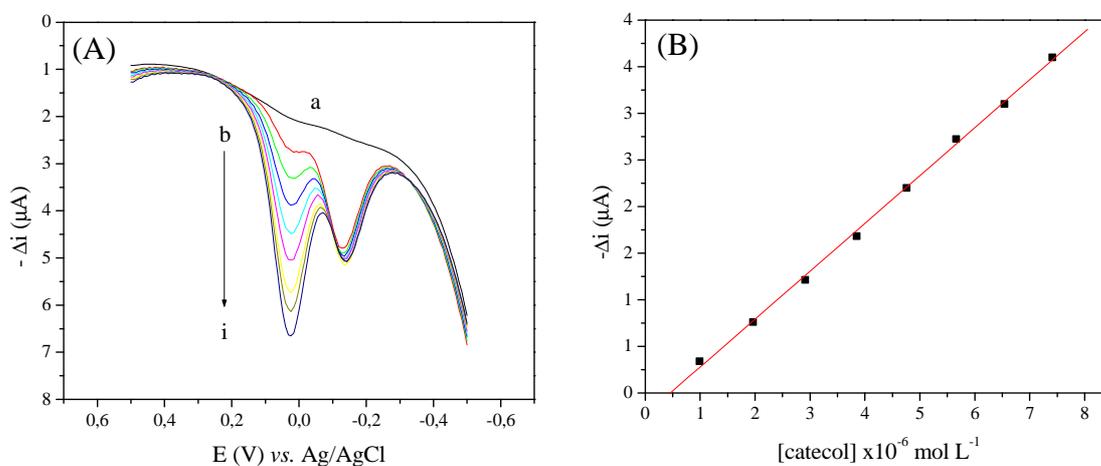


Figura 26. Voltamogramas de onda quadrada (A) obtidos usando o sensor em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ e soluções de CC em concentrações de (b) $9,90 \times 10^{-7}$ a (i) $7,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração para o CC.

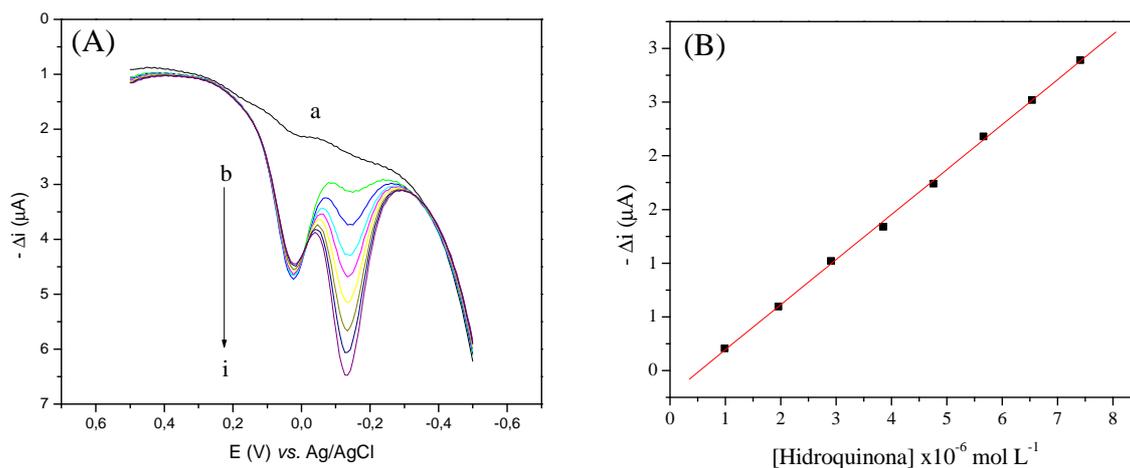


Figura 27. Voltamogramas de onda quadrada (A) obtidos usando o sensor em (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) contendo $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de CC e soluções de HQ em concentrações de (b) $9,90 \times 10^{-7}$ a (i) $7,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (B) curva de calibração para a HQ.

A Tabela 3 resume os dados obtidos na construção das diferentes curvas de calibração, contendo as faixas lineares e os coeficientes de correlação linear.

Tabela 3. Dados das curvas de calibração

Parâmetro	Curva	
	HQ	
Faixa linear ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	0,499 – 18,51	
Coefficiente de correlação (R)	0,999	
	CC	
Faixa linear ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	0,499 – 18,51	
Coefficiente de correlação (R)	0,999	
	Simultânea	
	CC	HQ
Faixa linear ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	0,990 – 9,09	0,990 – 9,09
Coefficiente de correlação (R)	0,999	0,999
	Isômero como interferente	
	CC em presença de HQ	HQ em presença de CC
Faixa linear ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	0,990 – 7,41	0,990 – 7,41
Coefficiente de correlação (R)	0,999	0,999

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) consideram como aceitáveis para os parâmetros de linearidade das curvas de calibração os valores de coeficiente de correlação de 0,90 e 0,99, respectivamente (RIBANI *et al.*, 2004), sendo que os resultados de todos os ensaios realizados satisfazem as exigências de ambos os órgãos.

Os resultados mostram que as curvas individuais são bastante úteis analiticamente, pois apresentam menores limites de concentrações para CC e HQ, pois não há uma competição dos analitos pela área ativa do eletrodo. Já as curvas simultâneas para CC e HQ, são vantajosas por possibilitar a detecção de ambos os analitos em uma única etapa de medida sem que exista interferência no sinal analítico individual dos difenóis, sendo apenas visível uma possível competição pela área ativa do eletrodo devido ao fato de que há um desproporcionamento no tamanho dos sinais obtidos em todos os estudos simultâneos.

4.9.2. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) para uma técnica analítica é definido como a menor concentração do analito detectável pelo sinal da técnica. Existem ao menos quatro diferentes formas de calcular o LOD para uma técnica analítica (MOCÁK *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2008), o primeiro e mais simples modelo é o LOD visual obtido por adições cada vez menores até o momento que não haja mais sinal detectável e distinguível entre o ruído e o sinal do analito (RIBEIRO *et al.*, 2008). A segunda forma de se obter o LOD é usando a razão sinal ruído (Equação 3), este método pode ser aplicado em procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base e é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco (ruído) (RIBEIRO *et al.*, 2008).

$$\frac{S}{N} = 3 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde “S” (signal) é o valor do sinal analítico e “N” (noise) é o valor do ruído (branco).

A terceira forma é usando os parâmetros da curva de calibração (equação 4), na qual o LOD é obtido usando o desvio do intercepto e a inclinação da curva de calibração (*slope*).

$$LOD = 3 \times \left(\frac{\sigma}{s} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde “ σ ” (sigma) é o valor do desvio do intercepto e “s” é o valor do slope da curva de calibração.

Uma quarta forma de se obter o LOD é usando o desvio das medidas do branco, e aplicando a equação 5. O LOD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos, entretanto, em relação à análise prática, esses valores são extremamente baixos e não representam a realidade.

$$LOD = 3 \times \left(\frac{s_B}{s} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde “ s_B ” é o valor do desvio para n medidas do branco e “s” é o valor do slope da curva de calibração.

As Tabelas 4, 5 e 6 mostram os resultados dos LOD obtidos para o presente trabalho para diferentes aplicações do sensor e também empregando diferentes abordagens de cálculo.

Tabela 4. Cálculo do LOD para as curvas de HQ e CC construídas individualmente

LOD (mol L ⁻¹)				
Analito	Visual	Parâmetros da curva	Medidas do branco	Sinal/Ruído
HQ	5,0x10 ⁻⁷	4,8x10 ⁻⁷	3,0x10 ⁻¹³	8,5x10 ⁻⁸
CC	5,0x10 ⁻⁷	3,5x10 ⁻⁷	2,7x10 ⁻¹³	8,5x10 ⁻⁸

Tabela 5. Cálculo do LOD para as curvas de HQ e CC construídas simultaneamente

LOD (mol L ⁻¹)				
Analito	Visual	Parâmetros da curva	Medidas do branco	Sinal/Ruído
HQ	1,0x10 ⁻⁶	2,2x10 ⁻⁷	3,5x10 ⁻¹³	8,5x10 ⁻⁸
CC	1,0x10 ⁻⁶	2,1x10 ⁻⁷	6,4x10 ⁻¹³	8,5x10 ⁻⁸

Tabela 6. Cálculo do LOD para as curvas de CC e HQ construídas na presença do isômero

LOD (mol L ⁻¹)				
Analito	Visual	Parâmetros da curva	Medidas do branco	Sinal/Ruído
HQ	1,0x10 ⁻⁶	1,7x10 ⁻⁷	2,1x10 ⁻¹³	8,5x10 ⁻⁸
CC	1,0x10 ⁻⁶	2,3x10 ⁻⁷	1,7x10 ⁻¹³	8,5x10 ⁻⁸

Esses valores de LOD obtidos experimentalmente mostram que para o método eletroanalítico desenvolvido, o método visual de determinação do LOD mostra-se mais apropriado dentre os aplicados, pois os valores de LOD corroboram com as reais concentrações usadas para construção da curva de calibração. O mesmo não ocorre quando os parâmetros da curva de calibração são usados, pois esse valor é apenas um valor estatístico teórico, o mesmo comportamento ainda mais pronunciado foi obtido com o uso do método das medidas do branco e razão sinal/ruído, pois as correntes de fundo são extremamente baixas assim como o ruído da linha base, o que torna os valores de LOD muito pequenos.

Os limites de quantificação (LOQ) foram calculados usando os parâmetros da curva de calibração, apenas substituindo o valor de 3 por 10 na equação do cálculo do LOD (equação 4). Os valores obtidos para as diferentes curvas estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Cálculo do LOQ para as curvas de CC e HQ

Curva	LOQ (mol L ⁻¹)
CC individual	1,7x10 ⁻⁶
HQ individual	1,6x10 ⁻⁶
CC simultânea	7,2x10 ⁻⁷
HQ simultânea	7,3x10 ⁻⁷
CC na presença de HQ	7,6x10 ⁻⁷
HQ na presença de CC	5,7x10 ⁻⁷

4.10. REPETIBILIDADE, REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE

A repetibilidade da corrente de resposta para o sensor em dez sucessivas medidas ($n = 10$) foi avaliada em uma solução contendo ambos os analitos (CC e HQ) em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0) (Figura 28). O desvio padrão relativo (RSD) foi 4,0% para o CC e 19,5% para a HQ, a queda do valor da corrente de HQ é devido a sua baixa estabilidade, havendo a degradação do composto, com isso a HQ oxida-se mais facilmente mantendo o CC mais estável em solução. A reprodutibilidade do sensor foi avaliada pela construção de três sensores bioinspirados, utilizando o mesmo procedimento, e estes foram usados para a detecção simultânea de HQ e CC, sendo que o RSD obtido foi de 5,3% (CC) e 6,1% (HQ). Também avaliou-se a estabilidade do sensor em diferentes dias, sendo que o mesmo manteve uma resposta superior a 80 % da resposta (corrente resultante) obtida no primeiro dia (dia de construção) avaliado ao longo de 30 dias.

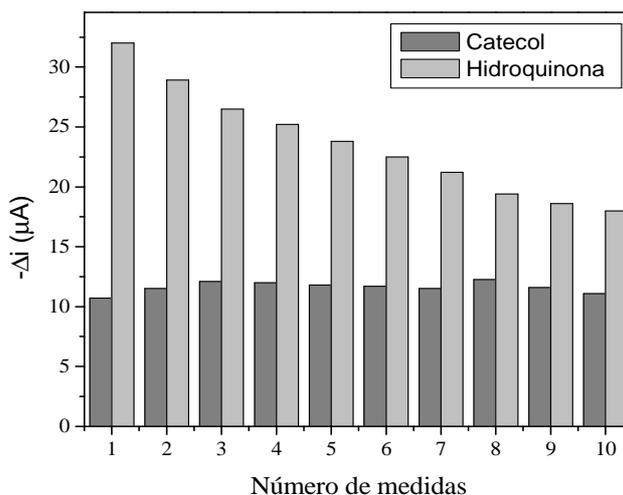


Figura 28. Investigação da repetibilidade da resposta analítica do sensor utilizando solução de CC e HQ em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,0).

4.11. DETERMINAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CC E HQ EM AMOSTRAS DE FILTRO DE CIGARRO

CC e HQ são dois isômeros do di-hidroxibenzeno e frequentemente coexistem nas amostras, fazendo-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação simultânea destes isômeros. Vários métodos têm sido explorados para a determinação de dihidroxibenzenos, incluindo os métodos eletroquímicos (LIU *et al.*, 2011). A determinação através destas técnicas apresenta algumas vantagens, tais como operação fácil e rápida, baixo custo e alta sensibilidade. No entanto, um grande problema observado com o uso de eletrodos não modificados é o potencial de pico de oxidação/redução dos isômeros ser muito próximo, o que resulta em sobreposição dos picos (LIU *et al.*, 2011), fator que foi contornado nesse trabalho pela modificação do GCE com o filme de Pd-(ImS3-14) e o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$.

As concentrações de CC e HQ em três diferentes marcas de cigarro foram determinados usando o sensor proposto nas condições experimentais otimizadas. As amostras

foram previamente preparadas como descrito anteriormente e quantificadas pelo método da adição de padrão. Os resultados das análises realizadas estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Determinação de CC e HQ nos extratos de filtro de cigarro

Amostra	CC (µg/extrato)	HQ (µg/extrato)	Polifenol total (µg de HQ/extrato)
A	18,88±2,91	47,79±0,77	66,67±2,53
B	27,75±0,77	60,01±0,61	87,76±0,61
C	21,20±0,55	30,64±0,27	51,84±0,27

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para avaliação de processos analíticos. O estudo da recuperação consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse, seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito que é recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (ou adicionada). A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas voltamétricas imprecisas, substâncias interferentes na amostra, entre outros problemas (BRITO *et al.*, 2003).

Estudos de recuperação de CC e HQ foram executados nas amostras de extratos dos filtros de cigarros queimados, com adição de três alíquotas de soluções padrão dos dois isômeros em diferentes concentrações ($1,87 \times 10^{-6}$; $3,70 \times 10^{-6}$ e $5,50 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Os resultados encontrados foram comparados com as concentrações adicionadas e apresentados de modo resumido na Tabela 9. A recuperação variou de 96,60±5,31 a 105,30±1,91% para CC e 91,67±5,40 a 105,55±3,17% para HQ. Estes resultados demonstram uma exatidão satisfatória do método desenvolvido.

Tabela 9. Recuperação de CC e HQ nos extratos de filtro de cigarro usando o sensor proposto

Amostra	CC ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)			HQ ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação (%) [*]	Adicionado	Recuperado	Recuperação (%) [*]
A	1,87	1,78 \pm 0,17	98,20 \pm 3,74	1,87	1,72 \pm 0,10	91,67 \pm 5,40
	3,70	3,92 \pm 0,13	105,90 \pm 3,53	3,70	4,09 \pm 0,15	99,42 \pm 4,09
	5,50	5,41 \pm 0,03	98,40 \pm 0,51	5,50	5,80 \pm 0,04	105,55 \pm 3,17
B	1,87	1,97 \pm 0,04	105,30 \pm 1,91	1,87	1,79 \pm 0,04	95,70 \pm 2,02
	3,70	3,88 \pm 0,12	104,80 \pm 3,34	3,70	3,60 \pm 0,05	97,30 \pm 1,29
	5,50	5,48 \pm 0,05	99,60 \pm 0,84	5,50	5,49 \pm 0,05	99,80 \pm 0,96
C	1,87	1,91 \pm 0,01	102,10 \pm 1,91	1,87	1,93 \pm 0,07	103,20 \pm 3,50
	3,70	3,83 \pm 0,06	103,50 \pm 3,83	3,70	3,73 \pm 0,21	100,80 \pm 0,96
	5,50	5,31 \pm 0,11	96,60 \pm 5,31	5,50	5,56 \pm 0,11	101,10 \pm 2,08

* n = 3.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido, avaliado e aplicado com sucesso um novo sensor bioinspirado para a determinação simultânea de CC e HQ através da SWV. O sensor construído empregou o surfactante 3-(1-tetradecil-3-imidazólio)propanosulfonato contendo nanopartículas de paládio (Pd-(ImS3-14)) e o complexo bioinspirado $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBPMP})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$.

Os resultados obtidos demonstram a vantagem da modificação do GCE com Pd-(ImS3-14) em relação à melhoria da sensibilidade do método, atribuído à capacidade das moléculas de surfactante de apresentarem um mecanismo adsorptivo em sinergismo ao processo difusional dos analitos na superfície do sensor, bem como pela presença das NPs de Pd que proporcionam um aumento na taxa de transferência de elétrons, fator de grande importância no mecanismo de funcionamento de sensores que operam com medidas eletroquímicas. O uso do surfactante em micelas reversas, além de apresentar as melhores respostas analíticas, também favorece a estabilidade do filme devido à compatibilidade das caudas hidrofóbicas do surfactante na adesão à superfície do GCE.

O complexo bioinspirado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}$ mostrou-se cataliticamente promíscuo, pois além de sua atividade já descrita como uma hidrolase, também apresentou com base no resultados obtidos, excelente atividade como um modelo para catecol oxidase.

Sob condições experimentais previamente otimizadas para o sensor desenvolvido, foram obtidas diferentes curvas de calibração a partir da corrente resultante vs. concentração de CC e/ou HQ. As duas primeiras curvas foram obtidas para HQ e CC individualmente. A corrente resultante para HQ teve um aumento linear na faixa de $4,99 \times 10^{-7}$ a $18,51 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, com LOD de $4,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e LOQ de $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (método dos parâmetros da curva). Já a curva de calibração para o CC apresentou

linearidade de $4,99 \times 10^{-7}$ a $18,51 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com LOD de $3,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LOQ de $1,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (método dos parâmetros da curva). A curva de calibração para HQ e CC obtida simultaneamente, apresentou linearidade para ambos os substratos na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $9,09 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com LOD de $2,2 \times 10^{-7}$ e $2,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LOQ de $7,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $7,2 \times 10^{-7}$ para HQ e CC, respectivamente (método dos parâmetros da curva). Também construiu-se duas curvas para avaliar uma possível interferência do isômero (HQ ou CC) na determinação. Construiu-se uma curva de calibração com uma concentração fixa HQ ($3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e adições sucessivas de CC. A curva mostrou-se linear na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $7,41 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com LOD de $2,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e LOQ de $7,6 \times 10^{-7}$ (método dos parâmetros da curva). E uma segunda curva com uma concentração fixa de CC ($3,85 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e aumento da concentração de HQ, a curva mostrou-se linear na faixa de $9,90 \times 10^{-7}$ a $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com LOD de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e LOQ de $5,7 \times 10^{-7}$ (método dos parâmetros da curva). As curvas de calibração construídas mostraram que é possível detectar e quantificar simultaneamente CC e HQ sem interferência mútua dos isômeros mostrando que o filme de surfactante e o complexo bioinspirado foram modificadores bem sucedidos.

A fim de avaliar o método proposto, o sensor foi empregado na quantificação de CC e HQ em filtros de cigarros fumados, apresentando teores de $18,88 \pm 2,91$ a $27,75 \pm 0,77$ µg/extrato de CC e $30,64 \pm 0,27$ a $60,01 \pm 0,61$ µg/extrato de HQ, com recuperações de $96,60 \pm 5,31$ a $105,30 \pm 1,91$ % para CC e $91,67 \pm 5,40$ a $105,55 \pm 3,17$ % para HQ, mostrando a exatidão do método proposto.

Portanto, através dos estudos realizados pode-se destacar que o sensor proposto exibiu alta sensibilidade, seletividade satisfatória, boa repetibilidade e reprodutibilidade, estabilidade e exatidão adequada, além da simplicidade e rapidez para a construção e aplicação dos sensores.

6. REFERÊNCIAS

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, 23, 1083–1100, 2008.

BOLLO, S.; FINGER, S.; STURM, J. C.; NÚÑEZ-VERGARA, J. A.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy studies of the heterogeneous electron transfer reaction of some nitrosoaromatic compounds. **Electrochim. Acta**, 52, 4892–4898, 2007.

BORGERDING, M.; KLUS, H. Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke. **Exp. Toxicol. Pathol.**, 57, 43–73, 2005.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente**, 13, 129–146, 2003.

BRUSCIOTTI, F.; DUBY, P. Cyclic voltammetry study of arsenic in acidic solutions. **Electrochim. Acta**, 52, 6644–6649, 2007.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, 2, 2007.

CAMPÀS, M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 26, 370–378, 2008.

CAO, X.; LUO, L.; DING, Y.; ZOU, X.; BIAN, R. Electrochemical methods for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using cetylpyridine bromide/chitosan composite film-modified glassy carbon electrode. **Sens. Actuators B**, 129, 941–946, 2008.

CHANG CHIEN, S. W.; CHEN, H. L.; WANG, M. C.; SESHIAH, K. Oxidative degradation and associated mineralization of catechol, hydroquinone and resorcinol catalyzed by birnessite. **Chemosphere**, 74, 1125–1133, 2009.

CHEN, C.-N.; HUANG, C.-T.; TSENG, W. J.; WEI, M.-H. Dispersion and rheology of surfactant-mediated silver nanoparticle suspensions. **Appl. Surf. Sci.**, 257, 650–655, 2010.

COUNTS, M. E.; MORTON, M. J.; LAFFOON, S. W.; COX, R. H.; LIPOWICZ, P. J. Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, 41, 185–227, 2005.

DINÇKAYA, E.; AKYILMAZ, E.; AKGÖL, S.; ÖNAL, S. T.; ZIHNIOĞLU, F.; TELEFONCU, A. A novel catechol oxidase enzyme electrode for the determination for the catechol. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 62, 2098–2100, 1998.

DUJARDIN, E.; MANN, S. Bio-inspired materials chemistry. **Adv. Mater.**, 14, 1–14, 2002.

EGUSA, S.; KITAOKA, T.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M.; GOTO, M.; WARIISHI, M. Preparation and enzymatic behavior of surfactant-enveloped enzymes or glycosynthesis in nonaqueous aprotic media. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 67, 225–230, 2010.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quim. Nova**, 15, 28–39, 1992.

FONSECA, R. A. S.; RAMOS-JESUS, J.; KUBOTA, L. T.; DUTRA, R. F. A. Nanostructured piezoelectric immunosensor for detection of human cardiac troponin T. **Sensors**, 11, 10785–10797, 2011.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Biosensors of laccase based on hydrophobic ionic liquids derived from imidazolium cation. **J. Braz. Chem. Soc.**, 21, 1451–1458, 2010.

FISHER, A. C. **Electrode Dynamics**. Oxford Chemistry Primers, Oxford, 1996. 96 p.

GILMARTIN, M. A. T.; HART, J. P. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrode. **Analyst**, 120, 1029–1045, 1995.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of avocado. **Food Chemistry**, 77, 163–169, 2002.

GONZALEZ-MACIA, L.; SMYTHA, M. R.; MORRIN, A.; KILLARD, A. J. Enhanced electrochemical reduction of hydrogen peroxide on silver paste electrodes modified with surfactant and salt. **Electrochim. Acta**, 56, 4146–4153, 2011.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HU, Y.; HU, N.; ZENG, Z. Electrochemistry and electrocatalysis with myoglobin in biomembrane-like surfactant-polymer $2C_{12}N^+PA^-$ composite films. **Talanta**, 50, 1183–1195, 2000.

JAGETIA, G. C.; MENON, K. S. L.; JAIN, V. Genotoxic effect of hydroquinone on the cultured mouse Spleenocytes. **Toxicol. Lett.**, 121, 15–20, 2001.

KHUN, K. K.; MAHAJAN, A.; BEDI, R. K. Effect of cationic/anionic organic surfactants on evaporation induced self assembled tin oxide nanostructured films. **Appl. Surf. Sci.**, 257, 2929–2934, 2011.

LANZMASTER, M.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; AIRES, V. V. E.; SZPOGANICZ, B.; TERENCE, H.; SEVERINO, P. C.; FULLER, J. M.; DREW, S. C.; GAHAN, L. R.; HANSON, G. R.; RILEY, M. J.; SCHENK, G. A. New heterobinuclear $Fe^{III}Cu^{II}$ complex with a single terminal $Fe^{III}-O(\text{phenolate})$ bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **J. Biol. Inorg. Chem.**, 10, 319–332, 2005.

LI, J.; ZHOU, L.; HAN, X.; LIU, H. Direct electrochemistry of hemoglobin based on Gemini surfactant protected gold nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Sens. Actuators B**, 135, 322–326, 2008.

LI, J.; LIU, C.-Y.; CHENG, C. Electrochemical detection of hydroquinone by graphene and Pt-graphene hybrid material synthesized through a microwave-assisted chemical reduction process. **Electrochim. Acta**, 56, 2712–2716, 2011.

LIU, Z.; WANG, Z.; CAO, Y.; JING, Y.; LIU, Y. High sensitive simultaneous determination of hydroquinone and catechol based on graphene/BMIMPF₆ nanocomposite modified electrode. **Sens. Actuators B**, 157, 540–546, 2011.

MAHMUD, I.; SAMED, A. J. F.; HAQUE, M. A.; SUSAN, M. A. B. H. Electrochemical behavior of anthraquinone in aqueous solution in presence of a non-ionic surfactant. **J. Saudi Chem. Soc.**, 15, 203–208, 2011.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, 77, 237–256, 2002.

MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MIMICA, D.; ZAGAL, J. H.; BEDIOUI, F. Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films. **J. Electroanal. Chem.**, 497, 106–113, 2001.

MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; CAMARGO, T. P.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Self-assembled monolayer of nickel(II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin. **Talanta**, 78, 1063–1068, 2009.

MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. 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. **Pure Appl. Chem.**, 69, 297–328, 1997.

MOUSTY, C. Sensors and biosensors based on clay-modified Electrodes—new trends. **Appl. Clay Sci.**, 27, 159–177, 2004.

NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; JOVITO, R.; PERALTA, R. A.; SOUZA, B.; SZPOGANICZ, B.; JOUSSEF, A. C.; TERENCEZI, H.; SEVERINO, P. C.; FISCHER, F. L.; SCHENK, G.; RILEY, M. J.; SMITH, S. J.; GAHAN, L. R. Catalytic promiscuity: catecholase-like activity and hydrolytic DNA cleavage promoted by a mixed-valence $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ complex. **J. Braz. Chem. Soc.**, 21, 1201–1212, 2010.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; OSÓRIO, R. E.-H. M. B.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on a novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. **Sens. Actuators B**, 122, 89–94, 2007.

OLIVEIRA, M. C. B.; MAZERA, D.; SCARPELLINI, M.; SEVERINO, P. C.; NEVES, A.; TERENCEZI, H. Mononuclear Cu^{II} -phenolate bioinspired complex is catalytically promiscuous: phosphodiester and peptide amide bond cleavage. **Inorg. Chem.**, 48, 2711–2713, 2009.

PEMBERTON, R. M.; XU, J.; PITTSON, R.; DRAGO, G. A.; GRIFFITHS, J.; JACKSON, S. K.; HART, J. P. A screen-printed microband glucose biosensor system for real-time monitoring of toxicity in cell culture. **Biosen. Bioelectron.**, 26, 2448–2453, 2011.

PERALTA, R. A.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; BRANDÃO, T. A. S.; CASTELLANO, E. E.; OLIVEIRA, M. B.; SEVERINO, P. C.; TERENCEZI, H.; NEVES, A. Catecholase and DNase activities of copper(II) complexes containing phenolate-type ligands. **J. Phys. Org. Chem.**, 23, 1000–1013, 2010.

PRAKASH, D.; PANDEY, J.; TIWARY, B. N.; JAIN, R. K. A process optimization for bio-catalytic production of substituted catechols (3-nitrocatechol and 3-methylcatechol. **BMC Biotechnol.**, 10, 1–9, 2010.

RAJBONGSHI, J.; DAS, D. K.; MAZUMDAR, S. Direct electrochemistry of dinuclear Cu_A fragment from cytochrome c oxidase of *Thermus thermophilus* at surfactant modified glassy carbon electrode. **Electrochim. Acta**, 55, 4174–4179, 2010.

RHIEU, S. Y.; LUDWIG, D. R.; SIU, V. S.; TAYHAS, G.; PALMORE, R. Direct electrochemistry of cytochrome P450 27B1 in surfactant films. **Electrochem. Commun.**, 11, 1857–1860, 2009.

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.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova.**, 31, 164–171, 2008.

RISNER, C. H.; CASH, S. L. A high-performance liquid chromatographic determination of major phenolic compounds in tobacco smoke. **J. Chromatogr. Sci.**, (28), 239–244, 1990.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; MARCO, M.-P.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. **Pure Appl. Chem.**, 76, 723–752, 2004.

RUSLING, J. F.; NASSAR, A.-E. F. Enhanced electron transfer for myoglobin in surfactant films on electrodes. **J. Am. Chem. Soc.**, 115, 11891–11897, 1993.

SANTHIAGO, M.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Rosmarinic acid determination using biomimetic sensor based on purple acid phosphatase mimetic. **Anal. Chim. Acta**, 613, 91–97, 2008.

SARKAR, A.; CHADHA, R.; BISWAS, N.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. Phase-transfer and film formation of silver nanoparticles. **J. Colloid Interface Sci.**, 332, 224–230, 2009.

SHAN, W.; LIU, H.; SHI, J.; YANG, L.; HU, N. Self-assembly of electroactive layer-by-layer films of heme proteins with anionic surfactant dihexadecyl phosphate. **Biophys. Chem.**, 134, 101–109, 2008.

SHRESTHA, R. G.; SHRESTHA, L. K.; ARAMAKI, K. Formation of wormlike micelle in a mixed amino-acid based anionic surfactant and cationic surfactant systems. **J. Colloid Interface Sci.**, 311, 276–284, 2007.

SILVA, J. S. Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I. T.; MATTOS, A. B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 1062–1067, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SMITH, M. T.; ZHANG, L.; JENG, M.; WANG, Y. GOU W.; DURAMAD, P.; HUBBARD, A. E.; HOFSTADLER, G.; HOLLAND, N. T. Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. **Carcinogenesis**, 21, 1485–1490, 2000.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a Nafion[®] membrane doped with copper dipyriddy complex as a biomimetic catalyst. **J. Electroanal. Chem.**, 536, 71, 2002.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, 26, 81–89, 2003.

SOUZA, B. S.; LEOPOLDINO, E. C.; TONDO, D. W.; DUPONT, J.; NOME, F. Imidazolium-based zwitterionic surfactant: a new amphiphilic pd nanoparticle stabilizing agent. **Langmuir**, 28, 833–840, 2012.

TELES, F. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J. L. electrochemical detection of a dengue-related oligonucleotide sequence using ferrocenium as a hybridization indicator. **Sensors**, 7, 2510-2518, 2007.

TONDO, D. W.; LEOPOLDINO, E. C.; SOUZA, B. S.; MICKE, G. A.; COSTA, A. C.O.; FIEDLER, H. D.; BUNTON, C. A.; NOME, F. Synthesis of a new zwitterionic surfactant containing an imidazolium ring. evaluating the chameleon-like behavior of zwitterionic micelles. **Langmuir**, 26, 15754-15760, 2010.

ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of hepatitis c virus using fractional factorial designs. **J. Braz. Chem. Soc.**, 19, 782-787, 2008.

VITTAL, R.; GOMATHI, H.; KIM, K.-J. Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes, **Adv. Colloid Interface Sci.**, 119, 55-68, 2006.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: J. Wiley, VCH, 1994. 108 p.

WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, 13, 983-988, 2001.

WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Chem. Rev.**, 108, 814-825, 2008.

WU, J.; FU, Q.; LU, B.; LI, H.; XU, Z. Surfactant-associated electrochemical properties of ferrocene adsorbed on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. **Thin Solid Films**, 518, 3240-3245, 2010.

XU, Y.; HU, C.; HU, S. Single-chain surfactant monolayer on carbon paste electrode and its application for the studies on the direct electron transfer of hemoglobin. **Bioelectrochemistry**, 74, 254-259, 2009.

YANG, G.-J.; QU, X.-L.; SHEN, M.; WANG, C.-Y.; QU, Q.-S.; HU, X.-Y. Preparation of glassy carbon electrode modified by hydrophobic gold nanoparticles and its application for the determination of ethamsylate in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. **Sens. Actuators B**, 128, 258-265, 2007 A.

YANG, D.-P.; JI, H.-F.; TANG, G.-Y.; REN, W.; Zhang, H.-Y. How many drugs are catecholics. **Molecules**, 12, 878-884, 2007 B.

YI, H.; WU, K.; HU, S. Adsorption stripping voltammetry of phenol at Nafion modified glassy carbon electrode in the presence of surfactants, **Talanta**, 55, 1205–1210, 2001.

YUAN, S.; CHEN, W.; HU, S. T. Fabrication of TiO₂ nanoparticles/surfactant polymer complex film on glassy carbon electrode and its application to sensing trace dopamine. **Mater. Sci. Eng. C**, 25, 479–485, 2005.