UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FERNANDO LUIS DE ALMEIDA

**Desenvolvimento de um sensor eletroquímico planar modificado
com 1-2 Diaminobenzeno (DAB) para monitoração de nitrito
por FIA-automatizada**

São Paulo
2009

FERNANDO LUIS DE ALMEIDA

**Desenvolvimento de um sensor eletroquímico planar modificado
com 1-2 Diaminobenzeno (DAB) para monitoração de nitrito
por FIA-automatizada**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Engenharia Elétrica.

São Paulo
2009

FERNANDO LUIS DE ALMEIDA

**Desenvolvimento de um sensor eletroquímico planar modificado
com 1-2 Diaminobenzeno (DAB) para monitoração de nitrito
por FIA-automatizada**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Elétrica.

Área de Concentração:
Engenharia Elétrica

Orientador:
Prof. Dr. Sebastião Gomes dos Santos Filho

São Paulo
2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pesquisadores e cientistas que notoriamente trabalham feito bicho-da-seda. Eles tecem o figurino com o qual a ciência se apresenta.

AGRADECIMENTOS

Depois dos dois anos e meio de dedicação a este trabalho científico, tenho muito a agradecer

Ao Prof. Dr. Marcelo Bariatto Andrade Fontes, pela contribuição na elaboração do projeto de mestrado e pela indicação do orientador.

Ao orientador Prof. Dr. Sebastião Gomes dos Santos Filho, pelo crédito que depositou em mim.

Ao Prof. Dr. Mario Ricardo Gongora-Rúbio, pelo projeto e pelos sensores utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes, pelas orientações no sistema em FIA, que contribuíram para a elaboração do sistema de medição (aparato extracorpóreo).

À doutoranda Juliana Lopes Cardoso, pela contribuição irrestrita na transferência de conhecimentos e no desenvolvimento dos *softwares* em Labview®.

Ao mestrando Massaki Igarashi, pelo projeto e pela verificação da funcionalidade da placa controladora das microválvulas.

Ao doutorando Sérgio Lopera Aristizábal, pelo intercâmbio de informações que permitiu aflorar novas idéias.

À doutoranda Zaíra Mendes da Rocha, pela colaboração acadêmica.

Ao doutorando César Augusto Alves de Souza, pela contribuição com as fotos MEV e experimentos com os eletrodos de referência.

À amiga Moira, que para a melhor compreensão deste trabalho, aos amigos Paulinho, Beto, Edson, Garcia, Dersu, Bruno Lima e Vinicius Heltai sempre presentes nas peripécias da espécie.

Aos amigos Vinicius de Souza, Tatiana, Giuliano Araújo, Daniela, Dani Avelar, Theo, Fernanda Borsatto, Andréia Cruz e Daniela Freitas.

À minha madrinha, Alzira Fermino de Souza, que a todo o momento me apoiou e continua apoiando-me no trajeto acadêmico e científico.

Ao Tio Guiné, pela presença em momentos em que eu deveria estar em ócio; faço votos pela recuperação de sua saúde.

Aos familiares, que apostaram ou denegriram a concepção deste trabalho científico.

Às amigas de minha madrinha de Monte Aprazível.

Ao Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da LSI-USP, pela infra-estrutura disponível, que tornou possível a realização deste trabalho.

À equipe técnica do laboratório, principalmente ao técnico Rubinho, Carlos (KLB) e Júlio, pelas gentilezas técnicas prestadas durante a realização deste trabalho.

À equipe de informática, em especial ao Alexandre e ao Renato, pelos trabalhos de configuração de *softwares*.

Às colegas do laboratório Vanessa Del Cacho, Marina, Carolina, Carol e Noemi.

Aos amores perdidos Emilia, Miriam, Dani e Lílian, que contribuíram para o descontrole sentimental; as consequências são as disciplinas com conceito B.

Aos amores de ocasião; não saberia dizer todos de cabeça, mas estou certo de que foram importantes para a manutenção do corpo e da alma.

À classe trabalhadora deste país que contribui com impostos, os quais são necessários para custear a infra-estrutura básica da universidade possibilitando meus estudos.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

Quero agradecer, novamente, a todos os nomes citados e desculpar-me pelos momentos de estresse, pois sem seriedade e desgaste físico não seria possível um trabalho científico de qualidade.

Além disso, tão importante quanto agradecer aos demais, gostaria de agradecer a todos os meus amigos que colaboraram voluntaria ou involuntariamente no desenvolvimento deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Diante da consciência individual, há as coisas que falamos, há as outras que escrevemos, e ainda outras que pensamos ou, por fim, as que devaneamos. A complexidade das coisas compõe o conhecimento coletivo, sendo o agente transformador no processo de evolução político-científica”.

(Fernando de Almeida, estudante de Ciências Sociais)

RESUMO

ALMEIDA, F. L. **Desenvolvimento de um sensor eletroquímico planar modificado com 1-2 Diaminobenzeno (DAB) para monitoração de nitrito por FIA-automatizada.** 2009. 171 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A presente dissertação de mestrado tem o propósito de relatar o desenvolvimento de um sensor planar eletroquímico com três eletrodos para o monitoramento de nitrito e seus interferentes (ácido úrico, ácido ascórbico e paracetamol). Para tal, no procedimento experimental é descrito o desenvolvimento do aparato extracorpóreo (mini-bomba compressora, válvulas solenóides e cela de análise). Esse é acoplado a um sistema de Análise por Injeção em Fluxo Automatizada (do inglês, *Flow-injection Analysis*) – FIA-automatizada. Este trabalho também descreve a fabricação dos sensores em substrato de alumina, o processo de limpeza padrão dos eletrodos, o processo de obtenção dos eletrodos de referência em HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e ativação eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho com H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida, é mostrada a estabilização dos eletrodos de referência Ag/AgCl em solução salina contendo cloretos, o estudo da secagem dos eletrodos em temperatura ambiente com exposição à luz e a caracterização dos mesmos por três métodos distintos, a saber: i) teste de reversibilidade (corrente redox vs. potencial); ii) variação do potencial com o tempo (coeficiente de degradação termodinâmica) e iii) variação do potencial com a concentração de cloretos. Também, apresenta-se a caracterização da área efetiva exposta do eletrodo de medição (trabalho) e os resultados da deposição de 1-2 Diaminobenzeno (DAB) como polímero seletivo. Além disso, são apresentados os resultados e discussões dos pseudo-eletrodos (recoberto ou não com Náfon[®] 117). Um ponto relacionado, a histerese associada à irreversibilidade dos eletrodos de referência resultou da ordem de $40 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl Náfon}^{\text{®}} 117}$. Os potenciais termodinâmicos observados foram da ordem de $100 \pm 6 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl Náfon}^{\text{®}} 117}$ para pseudo-eletrodo de referência sem e com Náfon[®] 117. Depois, foi realizado um estudo criterioso dos potenciais de resposta ao nitrito e aos interferentes por meio da técnica de DPV (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*). Para evitar degradação acelerada (corrosão) do polímero sobre o eletrodo de trabalho, optou-se por realizar as medições com potencial igual a $0,50 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfon}^{\text{®}} 117}$. Nessa condição, apresenta-se a monitoração de nitrito por FIA-automatizada na faixa de concentração de 50 a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados para a medição de nitrito mostraram que o sensor planar eletroquímico amperométrico desenvolvido é promissor, pois esse apresentou ótimo desempenho de reprodutividade (99,66%), sensibilidade ($90 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L mm}^{-2}$), seletividade (0,32%), repetitividade (91,28%) e estabilidade ($15 \pm 0,3 \text{ pA}$).

Palavras-chaves: nitrito, *screen-printed*, substrato de alumina, sensor eletroquímico planar, análise amperométrica, FIA-automatizada.

ABSTRACT

ALMEIDA, F. L. **Development of a planar electrochemical sensor modified with 1-2 Diaminobenzene (DAB) for nitrite measuring by automatic FIA.** 2009. 171 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In this Master of Science, it has been developed an electrochemical planar sensor defined with three electrodes for nitrite measuring and its interferences (uric acid, ascorbic acid and paracetamol). In the experimental procedure, it is shown the development of an extracorporis set up (mini-pump, solenoid valves and analysis cell) which is coupled to a system of Flow-injection Analysis (FIA). This work also describes the sensor fabrication using alumina substrates, the standard cleaning of the electrodes, the process to obtain Ag/AgCl reference electrodes in HCl (0.1 mol L^{-1}) and electrochemical activation of the working-electrode surface with H_2SO_4 (0.1 mol L^{-1}). Following, it is shown the study of drying for electrodes at room temperature with exposition to room light and their characterization using three different methods: i) reversibility test (redox current vs. potential); ii) variation of the potential with the time (thermodynamics degradation coefficient) and iii) variation of the potential with the chloride concentration. Also, it is presented the characterization of the effective exposed area of the working electrode and the results of the deposited 1-2 Diaminobenzene (DAB) is presented as a selective polymer. In addition, the results and discussions of the pseudo-reference (recovered or not with Nafion[®] 117) are presented. Related to irreversibility is the hysteresis associated to the reference electrodes which resulted in the order of $40 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl Nafion}^{\text{®}} 117}$. The observed thermodynamic potentials were of $(100 \pm 6) \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl Nafion}^{\text{®}} 117}$ for pseudo-electrodes recovered with Nafion[®] 117. Later on, a careful study of the response to nitrite and to its interferences was performed by means of the DPV technique (Differential Pulse Voltammetry). In order to avoid accelerated degradation (corrosion) of the polymer, measurements were performed at a potential of $0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}^{\text{®}} 117}$. In this condition, nitrite was monitored using the automatized-FIA (Flow Injection Analysis) for concentration in the range of 50 to $250 \mu\text{mol L}^{-1}$. The results have shown that the planar amperometric sensor for nitrite measuring is useful since it was observed excellent performance related to reproducibility (99.66%), sensitivity ($90 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L mm}^{-2}$), selectivity (0.32%), repetibility (91.28%) and stability ($15.0 \pm 0.3 \text{ pA}$).

Keywords: nitrite, *screen-printed*, alumina substrates, electrochemical planar sensor, amperometric analysis, automatized-FIA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo de um sistema de medição.....	33
Figura 2 – Processo de solvatação. a) angulação da molécula de água; b) cloreto de sódio dissociado em água [20].	38
Figura 3 – Vários eletrodos para uso in vitro [21].	39
Figura 4 – Junção eletrólito-eletródo. a) distribuição de cargas metal/eletrólito; b) representação das mesmas quando o potencial aplicado igual ($E=E_e$), maior ($E>E_e$) e menor ($E<E_e$) ao equilíbrio. (Adaptado do trabalho de Wolyneć [22] e de Fernandes [26]).	41
Figura 5 – Junção eletrólito-eletródo em eletrodos passivados com polímero [23]. .	41
Figura 6 – Sistema elétrico equivalente. Adaptado do trabalho de Emerson Giroto [23].	42
Figura 7 – Potenciostato BAS, cela de reação e sistema computadorizado de controle [31].	56
Figura 8 – Potenciostato PalmSens e conectores (controlado por computador, não mostrado).	56
Figura 9 – Fluxograma de medição para nitrito e seus interferentes.	70
Figura 10 – FIA-automatizada. Esquema da configuração de válvulas solenóides (V_{S1} , V_{S2} , V_{S3} e V_L) e válvulas de controle de fluxo (V_{FC} , V_{F1} , V_{F2} e V_{F3}) para injeção das soluções de análise (S_1 , S_2 e S_3), de limpeza (S_L) e de carregamento (S_C).	71
Figura 11 – Vista geral do aparato extracorpóreo para medição de nitrito por FIA-automatizada e seus interferentes.	73

Figura 12 – Detalhe da cela de análise. Conectores dos três eletrodos: amarelo para eletrodo de referência, preto para eletrodo de medição (trabalho) e vermelho para eletrodo auxiliar.	73
Figura 13 – Layout dos três sensores com geometrias distintas (cotas em mm) [17]	74
Figura 14 – Quatro tipos de sensores (MA, MB, MC e MD) apresentados em três diferentes geometrias.	76
Figura 15 – Representação do composto porfirinato de níquel: 3 metoxi - 4 hidroxifenil (NiTMHPP) [79]	83
Figura 16 – Deposição eletroquímica de porfirina de níquel sobre eletrodo de ouro do sensor “MA”: a) eletropolimerização; b) condicionamento.....	85
Figura 17 – LSV indicando a curva de oxidação na formação do filme espesso de AgCl, para a densidade de $0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ observa-se o potencial de deposição eletroquímico.....	89
Figura 18 – Curva típica da deposição eletroquímica de cloreto em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	91
Figura 19 – Para um mesmo eletrodo de referência, antes e após o acondicionamento do filme de AgCl durante 3 dias em soro fisiológico.....	93
Figura 20 – Observa-se o efeito da secagem e do acondicionamento em solução comercial Orion utilizando microscópio com aumento de 5x: a) campo claro; b) e c) campo escuro, sem e com acondicionamento, respectivamente [70].	94
Figura 21 – Diferentes estágios do filme de AgCl na fabricação de eletrodos de referência: a) recém-depositado; b) secado e acondicionado; c) recoberto com uma membrana de Náfon® 117 [85].	95
Figura 22 – Comparação da superfície do mesmo eletrodo de trabalho (ouro); a) antes da limpeza física e b) depois da limpeza física utilizando um pincel suave impregnado em alumina coloidal $0,05 \text{ }\mu\text{m}$	97

Figura 23 – Eletrodos sem limpeza: “a”, “b”, “c” – eletrodo de trabalho com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente; “d”, “e”, “f” – eletrodo de referência Ag/AgCl com Náfon[®] 117 com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente. “g”, “h”, “i” – eletrodo auxiliar com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente.98

Figura 24 – Eletrodos sem limpeza: “a”, “b”, “c” – eletrodo de trabalho com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente; “d”, “e”, “f” – eletrodo de referência Ag/AgCl com Náfon[®] 117 com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente. “g”, “h”, “i” – eletrodo auxiliar com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente.99

Figura 25 – EDS na superfície do eletrodo de medição de ouro. 100

Figura 26 – EDS na superfície do eletrodo de referência Ag/AgCl com Náfon[®] 117. 100

Figura 27 – EDS na superfície do eletrodo auxiliar de platina. 101

Figura 28 – Limpeza eletroquímica padrão do eletrodo de referência (prata/paládio) utilizando 90 ciclos com velocidade de varredura de $0,3 \text{ V s}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 101

Figura 29 – Limpeza eletroquímica padrão do eletrodo de trabalho (ouro), realizando 90 ciclos com velocidade de varredura de $0,3 \text{ V s}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 102

Figura 30 – Resultado do teste de reversibilidade quando não se conectou devidamente o eletrodo de referência curto-circuitado com a entrada do eletrodo auxiliar [70]. 104

Figura 31 – Curva padrão obtida para o teste de reversibilidade do eletrodo de referência Ag/AgCl fabricado em relação a um eletrodo de referência Ag/AgCl comercial BAS, foi realizado 6 ciclos com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em solução de NaCl 3 mol L^{-1} 106

Figura 32 – Resposta à concentração de íons cloreto em solução: a) tensão medida onde os degraus representam a variação do potencial com a variação da concentração de cloreto; b) potencial vs. pCl^-	108
Figura 33 – Medição realizada em soro fisiológico. a) filme de AgCl recém-depositado; b) filme de AgCl acondicionado em soro fisiológico e recoberto com membrana de Náfi [®] 117.	110
Figura 34 – a) curva experimental com cinco adições de $0,25 \mu mol L^{-1}$ de ferrocianeto de potássio em $KNO_3 0,1 mol L^{-1}$; b) curva da corrente vs. concentração de cloreto e os respectivos desvio padrão (SD) e regressão linear (R).	111
Figura 35 – Resposta padrão de 6 ciclos voltamétricos com velocidade de varredura de $0,1 V s^{-1}$ em ferrocianeto de potássio para cada sensores MA, MB, MC e MD sem limpeza-padrão, área efetiva indicada na Tabela 6.....	112
Figura 36 – Resposta padrão de 6 ciclos voltamétricos com velocidade de varredura de $0,1 V s^{-1}$ em ferrocianeto de potássio para cada sensores MA, MB, MC e MD após a limpeza-padrão, área efetiva apresentada na Tabela 7.	113
Figura 37 – Para eletrodeposição do filme de DAB foram realizados 50 voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de $0,1 V s^{-1}$ utilizando a solução de DAB $5 mmol L^{-1}$ em tampão fosfato $0,05 mol L^{-1}$ e $pH = 7,2$	117
Figura 38 – a) ouro limpo; b) ouro depositado DAB; c) DAB depositado com solução degradada; d) aparência do DAB após uma sequência de medições.....	117
Figura 39 – Eletrodo central de medição e eletrodo auxiliar inferior. a) eletrodo de medição sem DAB e auxiliar, com sinal de alta densidade de corrente; b) eletrodo de medição com DAB e alta densidade de corrente no eletrodo auxiliar; c) detalhe do eletrodo de medição com DAB degradado.....	118
Figura 40 – Curva DPV indica o potencial de oxidação para nitrito com pico a $0,82 V_{Ag/AgCl 3M KCl}$	119

Figura 41 – Curva CV indicando o potencial de oxidação do nitrito para sensor com eletrodo de medição com DAB, observa-se o pico de oxidação a $0,58 V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$	121
Figura 42 – Curva DPV indica as resposta de nitrito para as concentrações 2, 10 e 50 mmol L ⁻¹ ; a partir da degradação do polímero DAB tem-se os picos de cloreto.....	122
Figura 43 – Imagem de microscópio ótico do eletrodo de trabalho do sensor “MA”. a) Au limpo ; b) filme AuCl ₄ ⁻ ; detalhe do eletrodo de ouro com cloreto adsorvido. ...	124
Figura 44 – Medição de cloreto: a) picos de Cl ⁻ através da técnica eletroquímica DPV; b) curva de calibração do cloreto.	125
Figura 45 – Três DPV: indicação do potencial de resposta ao paracetamol próximo a $0,53 V_{Ag/AgCl}$	126
Figura 46 – Patamares formados a cada injeção de 0,17 mmol L ⁻¹ de paracetamol.....	127
Figura 47 – Patamares formados a cada injeção de 0,17 mmol L ⁻¹ de paracetamol.....	128
Figura 48 – Curva de calibração em função da concentração de paracetamol.	128
Figura 49 – Três DPV, apresenta-se o potencial de pico para ácido ascórbico próximo a $0,22 V_{Ag/AgCl}$	130
Figura 50 – Patamares formados a cada injeção de 0,11 mmol L ⁻¹ de ácido ascórbico.	131
Figura 51 – Curva de calibração em função da concentração de ácido ascórbico.	131
Figura 52 – Curvas obtidas por DPV, o potencial de pico para ácido úrico apresenta-se próximo a $0,4 V_{Ag/AgCl}$	132
Figura 53 – Patamares formados a cada injeção de ácido úrico 0,25 mmol L ⁻¹	133

Figura 54 – Curva de calibração (corrente vs. concentração) para ácido úrico a cada pico médio.	133
Figura 55 – Patamares formados a cada injeção de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito, sendo que os patamares maiores correspondem à adição de $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ do interferente paracetamol, sensor “MA” sem DAB	134
Figura 56 – Patamares formados a cada injeção de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em solução de soro fisiológico, com a concentração máxima dos interferentes. Sensor “MA” com porfirina	135
Figura 57 – Patamares formados a cada injeção de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em solução de soro fisiológico sem interferentes, detectados pelo mesmo sensor.	136
Figura 58 – Curvas de calibração obtidas para a espécie de nitrito com e sem interferentes.	136
Figura 59 – Patamares de injeção de nitrito $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ a cada 100 s para o sensor “MA” com e sem DAB.....	137
Figura 60 – Curvas de calibração obtidas para a espécie de nitrito, com e sem DAB.....	138
Figura 61 – Resposta à concentração de nitrito ($50, 250$ e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$) por FIA.	139
Figura 62 – Curva de corrente vs. concentração que indica aos valores de pico de resposta para nitrito a $50, 250$ e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$	140
Figura 63 – Resposta à concentração dos interferentes (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) em potencial $0,30 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117 utilizando FIA-automatizada..	142
Figura 64 – Resposta à concentração dos interferentes (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) em potencial $0,5 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117 utilizando FIA-automatizada....	142
Figura 65 – Representação gráfica dos picos médios obtidos para os interferentes na concentração máxima presente no sangue humano.....	143

Figura 66 – Resposta à concentração dos interferentes em conjunto (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) na concentração máxima presente no sangue humano. Potencial aplicado foi 0,3 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117} utilizando FIA-automatizada. 143

Figura 67 – Resposta à concentração dos interferentes em conjunto (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) na concentração máxima presente no sangue humano. Potencial aplicado foi 0,5 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117} utilizando FIA-automatizada. 144

Figura 68 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 µmol L⁻¹) utilizando o potencial 0,30 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 145

Figura 69 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 µmol L⁻¹) utilizando um sensor distinto; da mesma série “MC” aplicou-se o potencial 0,50 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 145

Figura 70 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 µmol L⁻¹) após três horas decorridas do final do experimento anterior utilizando o mesmo sensor “MC” com DAB, aplicou-se o potencial 0,50 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 146

Figura 71 – Curva de calibração (corrente vs. concentração) que corresponde aos valores de picos médios para resposta de nitrito a 50, 100 e 250 µmol L⁻¹ em potenciais 0,3 e 0,5 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 147

Figura 72 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 µmol L⁻¹) após uma seqüência de medições com os interferentes, observa-se os picos médios obtidos por FIA-automatizada aplicando o potencial 0,5 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 148

Figura 73 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 µmol L⁻¹) após duas horas de solução preparada utilizando FIA-automatizada com o potencial aplicado de 0,3 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 149

Figura 74 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 µmol L⁻¹) após o teste anterior, usando FIA-automatizada com o potencial aplicado de 0,5 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}. 149

Figura 75 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com os interferentes na concentração máxima presente no sangue de humanos obtidos por FIA-automatizada aplicando o potencial 0,5 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117.	150
Figura 76 – Curvas e equação de calibração do nitrito com interferentes na concentração máxima presente no sangue humano, as quais foram obtidas para os dois potenciais escolhidos.....	150
Figura 77 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com os interferentes na concentração máxima presente no sangue de humanos após 1 dia de solução preparada, aplicando o potencial 0,5 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117.	151
Figura 78 – Representação dos valores de $\Delta E(S)$ para as concentrações de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com e sem seus interferentes.	153
Figura 79 – Comparação das curvas de calibração do nitrito e seus interferentes.	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Série eletroquímica das principais reações redox a 25 °C e os respectivos E^0 .	43
Tabela 2 – Especificação da área geométrica de cada eletrodo do sensor.	76
Tabela 3 – Tempos estimados para obter espessuras de 0,5 a 5 μm de cloreto de prata, em relação com a carga elétrica integrada e a densidade de deposição eletroquímica.	87
Tabela 4 – Repetitividade para vários eletrodos de referência.	108
Tabela 5 – Parâmetros de caracterização extraídos para os três eletrodos de referência.	110
Tabela 6 – Especificação da área efetiva exposta de cada eletrodo dos sensores.	114
Tabela 7 – Parâmetros de caracterização extraídos para os três eletrodos de referência.	115
Tabela 8 – Sensibilidade do paracetamol obtida para o sensor “MA” com e sem porfirina.	129
Tabela 9 – Sensibilidade do nitrito obtida para o sensor “MA” com e sem DAB.	138
Tabela 10 – Sinal de resposta para os interferentes em dois potenciais.	144
Tabela 11 – Sinal de resposta para nitrito com e sem interferentes em dois potenciais e o cálculo da corrente de medição em $\Delta E(\text{S})$.	153
Tabela 12 – Resumo dos parâmetros-padrão para a média de sensores com ou sem DAB e medições a 0,5 $V_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{®}}$ 117.	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

BAS – do inglês, *Bionalytical System*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CV – do inglês, *Cyclic Voltammetric*

DAB – 1,2 - Diaminobenzeno

DAN – 1,5 - Diaminonaftaleno

DPV – do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*

EDS – *Energy Dispersive x-ray Spectrometer*

EPUSP – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo

FAPESP – Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo

FIA – do inglês, *Flow-Injection Analysis*

IUPAC – do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LSI – Laboratório de Sistemas Integráveis

LSV – do inglês, *Linear Sweep Voltammetry*

LTCC – do inglês, *Low Temperature Co-fired Ceramics*

MCT – Ministério de Ciência e Tecnologia

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

PANI – Polianilina

SAMUTI – Sensores Amperométricos para Monitoração em Unidades de Terapia Intensiva

SPE – do inglês, *Screen-Printed Electrodes*

TB – do inglês, *Single Potential Time Base*

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

A, α

A	Ampère
A_e	Área efetiva exposta de um eletrodo de trabalho.
a_{ox}	Atividade das espécies oxidadas.
a_{red}	Atividade das espécies reduzidas.
$a_{A^{n+}}^q$	Atividade de uma espécie iônica qualquer “A”, e “q” índice estequiométrico.
$a_{A(s)}^r = 1$	Atividade de uma espécie em estado sólido “A”, e “r” índice estequiométrico.

B, β

C

C	Concentração de uma espécie química.
C_d	Capacitância decorrente da distribuição de cargas.

D, Δ , δ

DI	Deionizada (água que passou por filtro de troca iônica para a remoção dos metais)
ΔG^0	Energia livre padrão
${}^0\Delta^+\Phi_M$	Diferença de potencial entre o metal e a solução
${}^+\Delta^0\Phi_M$	Diferença de potencial entre a solução e o metal
D_o	Difusividade da espécie química utilizada

E, ε , η

E	Potencial ou energia do feixe incidente
E^0	Potencial de eletrodo
E_0	Energia incidente
$E^{1/2}$	Potencial de meia onda
E	Potencial aplicado.
E_e	Potencial de equilíbrio termodinâmico
E_G^0	Potencial de eletrodo padrão para reação global
E_A	Potencial de meia-cela anódico.
E_C	Potencial de meia-cela catódico.
E_C^0	Potencial de eletrodo padrão para reação de meia-cela de redução.
E_A^0	Potencial de eletrodo padrão para reação de meia-cela de oxidação.
E^0	Potencial de eletrodo padrão.
E(0)	Potencial de referência.
E_{cela}	Potencial de cela eletrolítica.
η	Sobrepotencial ou sobretensão.
η^x	Sobrepotencial de cristalização de íons em sítios ativos
η^C	Sobrepotencial devido à concentração do analito.
η^A	Sobrepotencial correspondente ao analito.
η^R	Sobrepotencial de resistência entre o eletrólito e o eletrodo.

F, Φ

F	Constante de Faraday (96487 C mol ⁻¹)
Φ_{M^0}	Potencial do metal
Φ_M^+	Potencial num ponto arbitrário dentro da solução

G

g	Gramas
---	--------

H

I

I	Corrente
I_p	Corrente de pico em um voltamograma

J

K

K_e	Constante de equilíbrio termodinâmico
K	Temperatura absoluta em Kelvin

L, Λ , λ

L	Líquido (estado físico)
l	Índice do plano cristalino na direção z
log	Logaritmo
Λ	Número total de íons em solução
Λ^∞	Condutividade molar limitante em diluição infinita
λ	Comprimento de onda

M, μ

m	Metro
min	Minuto
μ	Notação de micro

N, ν

n	Elétrons transferidos em uma reação eletroquímica
---	---

v	Velocidade de varredura
n	Notação de nano

O, Ω

Ox	Espécie oxidada
Ω	Ohm

P, π

pH	Potencial hidrogênioônico
π	Constante pi (3,14159...)
p	Notação de pico

Q, $\square$

q	Carga elétrica
Q_c	Coeficiente de atividade que indica concentrações reais.

R

R	Constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
R_Ω	Resistência do eletrólito.
rpm	Rotações por minuto

S, σ

S	Sensibilidade de uma dada espécie química.
s	Segundo

T, θ

t	Tempo
T	Temperatura
t_h	Espessura teórica de um filme eletrodepositado

U

V

V	Volts
V_H	Potencial aplicado no eletrodo de trabalho com relação à referência do hidrogênio
$V_{Ag/AgCl}$	Potencial aplicado no eletrodo de trabalho com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl
$V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$	Potencial aplicado no eletrodo de trabalho com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl em 3 mol L ⁻¹ KCl
$V_{Ag/AgCl\ Nafion^{\circledR}\ 117}$	Potencial aplicado com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl recoberto com Náfion [®] 117

X

Z, ζ

Z_f	Impedância do eletrodo
-------	------------------------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
1.1 Objetivo Geral	30
1.2 Objetivos Específicos	31
1.3 Justificativa	31
1.4 Organização do Trabalho	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 Sistemas de Medição	33
2.2 Sensores e Biossensores Eletroquímicos Amperométricos	35
2.3 Sensores Eletroquímicos Planares em Alumina	36
2.4 Eletroquímica: Fundamentos Básicos	37
2.4.1 Eletrólito	37
2.4.2 Eletrodo	38
2.4.3 Junção Eletrólito-eletrodo	39
2.4.3.1 Potencial de Eletrodo ($\Delta\Phi_M$)	40
2.4.3.2 Potencial Padrão de Eletrodo (E^0)	42
2.4.3.3 Potencial de Equilíbrio (E_e)	44
2.4.3.4 Potencial de Meia-cela	45
2.4.3.5 Potencial de Referência Primário e Secundário	45
2.4.3.6 Sobrepotencial ou Sobretenção	47
2.5 Sensor Planar: Estrutura Geométrica e Materiais	48
2.5.1 Eletrodos de Referência	50
2.5.2 Eletrodos de Medição	53
2.5.3 Eletrodos Auxiliar ou Contra-eletrodo	54
2.6 Sistema Fluídico / Cella de Análise e Fluxo de Corrente Iônica	54
2.7 Potenciostatos e Técnicas Analíticas	55
2.8 Nitrito e seus Principais Interferentes (Cloreto, Sulfato, Nitrato, Ácido Úrico, Ácido Ascórbico, Dopamina e Paracetamol)	59
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	63
3.1 Estudo do Potencial de Cella Eletrolítica ou do Sistema de Medição	63
3.2 Lista de Materiais Utilizados neste Trabalho	67

3.2.1 Equipamentos Comerciais e Materiais Empregados	68
3.2.2 Equipamentos Desenvolvidos	68
3.2.3 Produtos Químicos	68
3.3 Projeto e Construção do Aparato Extracorpóreo para Sensores Planares	69
3.4 Sensor Eletroquímico Planar com Três Eletrodos	74
3.5 Limpeza-padrão da Superfície dos Eletrodos.....	77
3.5.1 Limpeza Física	78
3.5.2 Limpeza Química	78
3.5.3 Limpeza Eletroquímica	79
3.6 Caracterização do Eletrodo de Trabalho	80
3.6.1 Superfície Não-modificada	81
3.6.2 Superfície Modificada	82
3.6.2.1 Polímeros Seletivos: Incremento em Estabilidade, Seletividade, Repetitividade e Reprodutividade.....	82
3.6.2.2 Polímeros Eletrocatalisadores: Aumento em Sensibilidade	83
3.6.3 Estudo da Permissividade em Eletrodos de Trabalho Modificados	85
3.7 Obtenção do Filme de AgCl para Pseudo-eletrodo de Referência	85
3.7.1 Cálculo da Espessura do Filme de AgCl	86
3.7.2 Verificação do Potencial de Deposição Eletroquímica do Filme Espesso de AgCl	88
3.7.3 Deposição Eletroquímica do Filme de Cloreto de Prata	90
3.7.4 Secagem	92
3.7.5 Acondicionamento do Filme Espesso de AgCl.....	92
3.7.6 Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl com Membrana de Náfon® 117	95
3.8 Caracterização do Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl.....	96
3.8.1 Reversibilidade da Junção Ag/AgCl	96
3.8.2 Evolução do Potencial de Referência em Função da Concentração de Cloretos	96
3.8.3 Estabilidade Termodinâmica do Potencial de Referência em Função do Tempo	96
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	97
4.1 Da influência dos Procedimento de Limpeza-padrão na Superfície dos Eletrodos	97
4.2 Da Caracterização dos Pseudo-eletrodos de Referência.....	102

4.2.1 Estabilização e Teste de Reversibilidade do Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl em Solução de NaCl (3 mol L ⁻¹)	104
4.2.2 Variação do Potencial de Referência com Relação à Concentração de Cloreto	106
4.2.3 Verificação da Estabilidade Termodinâmica do Potencial de Referência ao Longo do Tempo em Soro Fisiológico	109
4.2.4 Aplicação do Pseudo-referência Ag/AgCl Fabricado em um Sistema Eletroquímico de Três Eletrodos	111
4.3 Da Caracterização dos Eletrodos de Trabalho	112
4.3.1 Etapa 1: Após o processo <i>Screen-printed</i>	112
4.3.2 Etapa 2: Depois da Limpeza Física	113
4.3.3 Comparação do Ganho de Área Efetiva Exposta a cada Etapa	114
4.3.4 Eletrodeposição de DAB e caracterização da superfície modificada.	115
4.4 Da Análise Eletroquímica do Nitrito e dos seus Principais Interferentes	118
4.4.1 Potencial de Resposta a Nitrito com Eletrodo de Medição Não-modificado..	119
4.4.2 Potencial de Resposta a Nitrito com Eletrodo de Trabalho Modificado	120
4.5 Do Estudo dos Principais Interferentes de Nitrito para Meio Bioquímico	123
4.5.1 Cloreto	123
4.5.2 Paracetamol	125
4.5.3 Ácido Ascórbico	129
4.5.4 Ácido Úrico	132
4.5.5 Testes Realizados para Nitrito	134
4.5.6 Monitoração de Nitrito por FIA-convencional	139
4.5.7 Monitoração de Nitrito por FIA-automatizada e a aplicação da técnica de dois pontos para cálculo da corrente de medição	140
4.6 Do Estudo dos Parâmetros-padrão em Sistema de Medição para o Sensor Desenvolvido para Nitrito	154
4.6.1 Seletividade	154
4.6.2 Sensibilidade	154
4.6.3 Estabilidade	155
4.6.4 Repetitividade	156
4.6.5 Reprodutividade	156
4.6.6 Permissividade	156
4.6.7 Resumo dos Parâmetros-padrão	157

4.7 Da Armazenagem do Sensor Fabricado	157
4.8 Da Vida Útil e Descarte do Sensor	158
5 TRABALHOS FUTUROS	159
6 CONCLUSÕES	160
7 REFERÊNCIAS	163
APÊNDICES	172
ANEXOS	174

1 INTRODUÇÃO

Com licença, leitor, antes que comece sua leitura, gostaria de lhe dar as boas-vindas e lhe desejar um ótimo transcorrer do trabalho adjacente, o qual foi elaborado com extremo afinho com o propósito de contribuir com a evolução do conhecimento científico. Aqui, o prezado leitor encontrará o desenvolvimento de um sensor eletroquímico amperométrico em substrato de alumina para monitoração de nitrito por FIA-automatizada (do inglês, *Flow-injection Analysis*).

O foco central deste trabalho está na obtenção e caracterização dos eletrodos do sensor e nos comentários a respeito dos parâmetros-padrão em sistemas de medição para nitrito (seletividade, estabilidade, repetitividade, reprodutividade, sensibilidade e permissividade). Por fim, apresenta-se a vida útil do sensor em meio bioquímico (soro fisiológico).

Este trabalho insere-se no Programa de Mestrado da Pós-graduação da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – EPUSP, é intitulado de *Desenvolvimento de um sensor eletroquímico planar modificado com 1-2 Diaminobenzeno (DAB) para monitoração de nitrito por FIA-automatizada*, e será delimitado pelo objetivo geral e norteado pelos objetivos específicos.

1.1 Objetivo Geral

Qualificar e quantificar as espécies de nitrito, correlacionando-as com os principais interferentes presentes no meio eletro-bioquímico do paciente. Desta forma, a contribuição do presente trabalho permitirá o desenvolvimento de novas políticas em prol da saúde pública.

1.2 Objetivos Específicos

1. Definir os materiais a serem utilizados nos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar do sensor, considerando menor taxa de adsorção de espécies iônicas e orgânicas indesejáveis;
2. Utilizar um potenciostato comercial para estudo dos potenciais de resposta ao nitrito e aos interferentes, e para medições das espécies em estudo;
3. Estudar de forma sistêmica os interferentes de nitrito (ácido úrico, ácido ascórbico, paracetamol e cloretos);
4. Desenvolver um aparato de medição integrado ao sensor planar e ao sistema FIA-automatizada.

1.3 Justificativa

A motivação central deste trabalho consiste no fato de que a monitoração de espécies de nitrito (NO_2^-) é de grande interesse na área ambiental, alimentícia, da construção civil e médica, pois, por meio do controle da concentração deste composto pode-se inferir sobre sua capacidade antibacteriana e antioxidante, e sobre seu nível poluente e tóxico [1].

1.4 Organização do Trabalho

Neste primeiro capítulo foi apresentado o objetivo geral, os objetivos específicos e a justificativa. Os capítulos seguintes estão organizados, a saber:

O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica dos principais tópicos relacionados ao tema da dissertação, incluindo a descrição de sistemas de medição, de sensores e biossensores amperométricos, de alguns fundamentos de eletroquímica e tipos de eletrodos, de sistemas fluídicos, de técnicas analíticas com potenciostatos e terminando com a descrição do nitrito e dos seus interferentes.

O capítulo 3 descreve os procedimentos experimentais empregados ao longo do trabalho, incluindo lista de materiais, equipamentos usados, projeto de construção do sensor, projeto e construção do aparato extracorpóreo, procedimentos de limpeza, de fabricação e de caracterização dos eletrodos fabricados.

O capítulo 4 apresenta os resultados e discussão, sobre a fabricação e caracterização dos eletrodos de trabalho e de referência, estudo do ganho de corrente em função do incremento de área efetiva exposta dos eletrodos por meio do procedimento de limpeza-padrão, análise eletroquímica do nitrito por FIA e estudos de seletividade, sensibilidade, estabilidade, reprodutividade, permissividade, repetitividade, vida útil, armazenamento e descarte do sensor.

Finalmente, os capítulos 5, 6 e 7 apresentam trabalhos futuros, conclusões e referências bibliográficas, respectivamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas de Medição

Normalmente, desenvolver um sistema de medição implica, *a priori*, delimitar o objeto de medição, ou seja, definir a natureza da espécie bioquímica, química ou física que se deseja qualificar e/ou quantificar [2]. Com esta informação, pode-se inferir as especificações a respeito do transdutor ou do (bios)sensor a ser utilizado para captar o sinal de entrada, o qual será processado por um instrumento eletrônico analógico ou analógico-digital.

O circuito eletrônico destes equipamentos integra filtros de ruído, amplificadores, inversores, comparadores, conversores analógico-digital, entre outros. Do processamento do sinal de entrada, tem-se o sinal de saída a ser analisado em um monitor ou impressora ou armazenado em um banco de dados (Figura 1).

Figura 1 – Esquema ilustrativo de um sistema de medição.

Os transdutores são dispositivos sensíveis a uma forma de energia que a transcrevem em outra compatível com o sinal de entrada [2], a ser endereçado ao instrumento eletrônico. Portanto, torna-se capaz de processar a informação inicial gerando o sinal de saída correspondente à energia transformada.

Por outro lado, os sensores são dispositivos que permitem medir diretamente a energia de interesse, sem a necessidade de transformá-la. Porém, um estudo mais

criterioso no âmbito dos sensores eletroquímicos revela que estes são compostos por eletrodos cujo papel, em seu conjunto, é medir a corrente iônica de uma dada espécie em solução que será expressa em corrente elétrica; em última instância, trata-se de um eletrodo transdutor.

Considerando os sistemas de medição com transdutores ou (bios)sensores, a estabilidade, repetitividade, reprodutividade, sensibilidade, permissividade e seletividade são parâmetros-padrão. O sucesso na qualificação e na quantificação de uma dada espécie química ou bioquímica está no desenvolvimento de transdutores e/ou (bios)sensores que otimizem estes parâmetros-padrão em seu conjunto. Diante disto, deve-se selecionar um transdutor ou (bios)sensor adequado à aplicação de acordo com sua classificação quanto ao tipo, à categoria e à análise.

Os sensores são dispositivos de medição classificados em dois tipos: os físicos e os químicos. Os sensores físicos mensuram grandezas de natureza física; por exemplo, são utilizados para medir pressão, temperatura, velocidade e deslocamento. Os sensores químicos são dispositivos capazes de medir - somente - espécies decorrentes de uma reação química ou eletroquímica.

No conjunto dos sensores químicos, há uma subdivisão na qual encontramos os sensores eletroquímicos. Estes são específicos para medir espécies advindas de uma reação eletroquímica de oxidação ou redução de espécies químicas ou bioquímicas. Estes sensores estão distribuídos em cinco categorias de análise: a dos (crono)potenciométricos¹, a dos (crono)amperométricos, a dos voltamétricos, a dos condutométricos e a dos coulométricos.

Os sistemas de medição com sensores eletroquímicos, geralmente, são divididos em três segmentos quanto à análise: 1) os de detecção, que possibilitam distinguir, qualitativamente, as espécies - porém não possibilitam quantificá-las; 2) os de determinação, que qualificam e quantificam as espécies em questão; e 3) os de monitoração, que, além de qualificarem e quantificarem, propiciam a realização de

¹**Cronopotenciométricos** corresponde aos sensores eletroquímicos com potencial nulo e constante em função do tempo. Para qualquer alteração da concentração do analito, é registrado o deslocamento do potencial em relação ao potencial nulo em função do tempo.

uma medição monitorada no tempo e *in situ*, possibilitando uma resposta rápida e confiável.

Dentre das diversas gamas de sensores, um destaque especial será dado para os sensores eletroquímicos amperométricos, objeto de estudo do presente trabalho. Esses se destacam devido à alta versatilidade na fabricação e na aplicação que permite uma ampla gama de utilização desde a análise eletroquímica para a determinação de pH [3] e quantificação de gases [4] até a análise eletro-bioquímica para determinação de patogêneses bacteriais e da existência de câncer [5], e monitoramento de glicose e de nitrito em amostras sanguíneas.

Os sensores eletroquímicos amperométricos são amplamente empregados em análises de monitoramento de espécies bioquímicas *in vitro* ou *in vivo*, devido à capacidade de fornecer um rápido sinal de saída das espécies em medição que possibilita uma tomada decisão imediata à resposta obtida. Isto é um requisito importante em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), pois nelas se deseja monitorar as espécies em tempo real. Os sensores eletroquímicos permitem obter um resultado direto tanto qualitativo como quantitativo das espécies bioquímicas que se deseja medir [2].

2.2 Sensores e Biossensores Eletroquímicos Amperométricos

Sensores eletroquímicos amperométricos são dispositivos que registram a corrente elétrica advinda de reações eletroquímicas geradas pela aplicação de um potencial elétrico. Permite qualificar e quantificar uma dada substância devido à proporcionalidade com a concentração das espécies bioquímicas presentes na solução de análise [6].

Estes sensores, geralmente, são compostos por um sistema de três eletrodos: trabalho, referência e auxiliar. Existem sistemas com dois eletrodos, nos quais, o eletrodo de referência acumula também a função do eletrodo auxiliar. Isto é possível

se o eletrodo de referência for grande o suficiente para drenar ou fornecer a corrente de reação necessária sem alterar, significativamente, o potencial de referência.

No caso dos biossensores a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define-os como um dispositivo que é capaz de realizar reações bioquímicas específicas por meio do isolamento de enzimas, sistemas imunológicos, tecido animal ou vegetal, organelas, microrganismos, antígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos, lectinas ou células inteiras imobilizadas em um transdutor adequado para analisar um composto químico, tanto por sinal elétrico como por térmico ou óptico [5][7][8]. As demais especificações de um biossensor eletroquímico amperométrico são similares ao funcionamento de um sensor eletroquímico amperométrico convencional.

As principais tecnologias para fabricação dos sensores e biossensores eletroquímicos, utilizando substrato de silício, de vidro, de alumina ou cateter são: microfabricação, microeletrônica, *screen-printed* e tubulares. Segundo Hiroaki Suzuki [9], nas décadas de 1970 e 1980, foram iniciados os principais trabalhos com as tecnologias de microfabricação e microeletrônica; porém, foi na década de 1990 que estas tecnologias ganharam expressivo destaque [9]. Nesta mesma época, a tecnologia baseada em *screen-printed* passa a ter relevância, principalmente na fabricação de dispositivos híbridos.

2.3 Sensores Eletroquímicos Planares em Alumina

A partir da década de 1990, os substratos de alumina passaram ser amplamente empregados para confecção de sensores eletroquímicos planares [10], por ter ótimas propriedades mecânicas (substrato rígido) e químicas (inerte). Os eletrodos são impressos (definidos) utilizando a tecnologia de SPE (do inglês, *Screen-Printed Electrodes*) que permite obter sensores em grande quantidade, reduzindo o custo de fabricação. No processo de serigrafia usa-se uma pasta compósita (matriz vítrea e material metálico em dispersão) com viscosidade adequada.

Atualmente, no Brasil, temos dois grandes grupos que trabalham com esta tecnologia. Gongora-Rúbio [11][12][13][14][15][16], no LSI-EPUSP (Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo) e no IPT-SP (Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo), desenvolve trabalhos definindo eletrodos compósitos sobre substrato de alumina e de LTCC (do inglês, *Low Temperature Co-fired Ceramics*) para medição ambiental. Ferreira [13][17][18][19], no Instituto de Química de Araraquara da UNESP (Universidade Estadual Paulista), aplica estes eletrodos para suporte na imobilização de biomoléculas, transformando-os em biossensores.

2.4 Eletroquímica: Fundamentos Básicos

Para melhor entendimento do funcionamento dos sistemas de medição com transdutores, biossensores ou com sensores eletroquímicos, exige-se um conhecimento mínimo dos fundamentos da eletroquímica básica, partindo das propriedades do eletrólito e do eletrodo até as propriedades da interface eletrólito-eletrodo.

2.4.1 Eletrólito

Os eletrólitos são soluções salinas nas quais, normalmente, o sal é dissolvido/solvatado em água. A angulação da molécula da água ($104,45^\circ$) permite a formação de um dipolo permanente à temperatura de 25°C (Figura 2a). Contudo, as espécies da água estabelecem uma reação de equilíbrio termodinâmico em que há a formação de uma água hydrogenizada, $(\text{H}_3\text{O})^+$ e de uma hidroxila, OH^- . Como se observa na reação I, a seguir [2]:

As espécies iônicas dissociadas (Figura 2b) de acordo com a reação II se ligam por forças de Wan der Valls, os cátions associam-se ao pólo negativo da

molécula de água e os ânions ao pólo positivo. Deste modo, ocorre o transporte de íons (íons solvatados), que dependerá da densidade, do tipo, da carga e da mobilidade dos íons presentes [2]. A reação II demonstra a dissociação salina do cloreto de sódio.

A Figura 2 ilustra um exemplo do fenômeno de dissociação salina e associação dos íons com a molécula da água.

Figura 2 – Processo de solvatação. a) angulação da molécula de água; b) cloreto de sódio dissociado em água [20].

O sal cloreto de sódio, em contato com a água, dissolve-se (dissocia-se) e ao associar-se a ela ganha mobilidade iônica, caracterizando uma corrente iônica em solução salina. Além disso, observa-se que a magnitude desta corrente depende, entre diversos fatores, do coeficiente de solubilidade do sal [20].

2.4.2 Eletrodo

A princípio, todo material metálico, compósito, polimérico condutor ou semicondutor em contato com um eletrólito gera um potencial característico da diferença entre os níveis de Fermi do material e da solução; a esta ocorrência definimos os eletrodos. Em análises bioquímicas, estes materiais devem ser

biocompatíveis e inertes, ou seja, serem estáveis, não-reativos e não-tóxicos quando em contato com o material biológico. Os eletrodos inertes mais comuns são de: platina, ouro, prata, prata cloretada, carbono vítreo e polímeros condutores biocompatíveis.

Figura 3 – Vários eletrodos para uso *in vitro* [21].

A Figura 3 mostra vários eletrodos utilizados para medição *in vitro*, utilizados em laboratório para análise experimental. Da esquerda para direita, dois microeletrodos de ouro, dois macroeletrodos de ouro, dois eletrodos de referência Ag/AgCl e, abaixo, um eletrodo flexível.

2.4.3 Junção Eletrólito-eletródo

Um eletrodo em contato com eletrólito gera o que chamamos de junção eletrólito-eletródo. Nas próximas subseções serão abordados os fenômenos correspondentes à mesma.

2.4.3.1 Potencial de Eletrodo ($\Delta\Phi_M$)

Praticamente, todo material metálico [22], polimérico condutor [23], semicondutor [24] ou compósito [25], em contato com uma solução aquosa, imediatamente, inicia a reação de dissolução anódica. Com isso, há formação de íons dentro da solução e elétrons no interior do material. Os elétrons carregam eletricamente o material estabelecendo um campo elétrico que atrai os íons positivos para a interface material-solução [22].

Após um tempo relativamente curto (fração de segundo), estabelece-se uma situação de equilíbrio ou estado estacionário [22], que pode ser caracterizada pela formação da dupla camada elétrica e modelável por um capacitor, uma impedância e uma fonte de corrente [23]. Observa-se que, sendo os eletrodos confeccionados com materiais inertes, a dissolução anódica pode ser minimizada, efeito desejável para evitar a alteração da área efetiva exposta e conseqüentemente, para manter sensibilidade, repetitividade e reprodutividade.

A partir de uma análise mais efetiva da dupla camada elétrica e considerando a distribuição de cargas na solução pode-se obter a diferença de potencial entre o material de eletrodo e a solução. Seja Φ_{M^0} o potencial do metal e Φ_M^+ o potencial num ponto arbitrário dentro da solução, a diferença de potencial através da dupla camada elétrica será [22]:

$${}^0\Delta^+\Phi_M = \Phi_{M^0} - \Phi_M^+ \quad (1)$$

ou

$${}^+\Delta^0\Phi_M = \Phi_M^+ - \Phi_{M^0} \quad (2)$$

Sendo:

$${}^0\Delta^+\Phi_M = -{}^+\Delta^0\Phi_M \quad (3)$$

Por meio da modelagem proposta por Helmholtz da dupla camada elétrica (cargas negativas na interface do eletrodo e cargas positivas paralelas formadas por íons solvatados) e por Gouy-Chapman (camada de cargas em solução) [22][26], pode-se determinar a distribuição de potencial ao longo da distância (Figura 4a).

Figura 4 – Junção eletrólito-eletrodo. a) distribuição de cargas metal/eletrólito; b) representação das mesmas quando o potencial aplicado igual ($E=E_e$), maior ($E>E_e$) e menor ($E<E_e$) ao equilíbrio. (Adaptado do trabalho de Wolynec [22] e de Fernandes [26]).

Na situação de potencial aplicado igual ao potencial de equilíbrio (Figura 4b), tem-se o equilíbrio termodinâmico. Já em sobrepotenciais catódico acima do E_e , o eletrodo encontra-se em processo de adsorção catódica (eletrodeposição) e abaixo do E_e , temos sobrepotenciais anódicos, ou seja, ocorre uma dissolução anódica do material (corrosão).

Figura 5 – Junção eletrólito-eletrodo em eletrodos passivados com polímero [23].

Em boa parte dos desenvolvimentos de eletrodos é vantajoso depositar um filme polimérico sobre o metal. Esse filme pode reduzir a reatividade da superfície metálica minimizando os efeitos de interferentes e de adsorção e, conseqüentemente, permite maximizar a sensibilidade e a seletividade. Nesse caso, há uma interação de um potencial extra devido à membrana que apresenta uma distribuição de cargas (Figura 5). A seguir, apresenta-se, na Figura 6, o circuito elétrico equivalente para eletrodos modificados com polímero condutor.

Figura 6 – Sistema elétrico equivalente. Adaptado do trabalho de Emerson Giroto [23].

O sistema elétrico equivalente da interface eletrodo/eletrólito considera um capacitor de distribuição de cargas (C_d), uma impedância de eletrodo (Z_f), uma resistência do eletrólito (R_{Ω}), duas componentes de corrente: uma que flui pelo capacitor (i_c) e outra pela impedância (i_f) e, por fim, um potencial elétrico (E) indicado no sentido real do fluxo dos elétrons.

2.4.3.2 Potencial Padrão de Eletrodo (E^0)

A medição do potencial absoluto de um eletrodo é inviável [22] devido à introdução de outro potencial em série com a ponta de prova; comumente fabricada com um metal que quando em solução, também fornece um potencial de eletrodo

característico. Diante disso, o que se costuma ter é a medição indireta dos potenciais de eletrodo que depende do material (metálicos, semicondutores, compósitos ou poliméricos condutores). O potencial padrão de eletrodo depende do material característico da superfície do eletrodo [22].

Tabela 1 – Série eletroquímica das principais reações redox a 25 °C e os respectivos E^0 .

Reação redox	E^0 Potencial de Redução (V_H)
$Zn^{2+} + 2e^- \rightleftharpoons Zn$	-0,76
$NO_2^- + H_2O + e^- \rightleftharpoons NO + 2OH^-$	-0,46
$Fe^{2+} - 2e^- \rightleftharpoons Fe$	-0,44
$Ni^{2+} + 2e^- \rightleftharpoons Ni$	-0,25
$2NO_2^- + 2H_2O + 4e^- \rightleftharpoons N_2O_2 + 4OH^-$	-0,18
$Sn^{2+} + 2e^- \rightleftharpoons Sn$	-0,13
$H^+ + e^- \rightleftharpoons \frac{1}{2} H_2$	0,00
$Cu^{2+} + e^- \rightleftharpoons Cu^+$	+0,16
$2NO_2^- + 3H_2O + 4e^- \rightleftharpoons N_2O + 6OH^-$	+0,15
$SO_4^{2-} + 4H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2SO_3 + H_2O$	+0,20
$AgCl + e^- \rightleftharpoons Ag^+ + Cl^-(aq)$	+0,22
$Cu^{2+} + 2e^- \rightleftharpoons Cu$	+0,34
$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightleftharpoons 4OH^-$	+0,40
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$	+0,68
$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$	+0,77
$Ag^+ + e^- \rightleftharpoons Ag$	+0,80
$NO_3^- + 2H^+ + e^- \rightleftharpoons NO_2 + H_2O$	+0,81
$NO_3^- + 3H^+ + 2e^- \rightleftharpoons HNO_2 + H_2O$	+0,94
$NO_3^- + 4H^+ + 3e^- \rightleftharpoons NO + 2H_2O$	+0,96
$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	+1,22
$Cl_2 + 2e^- \rightleftharpoons 2Cl^-$	+1,35
$Au^{3+} + 3e^- \rightleftharpoons Au$	+1,42
$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	+1,77

A medição do potencial de eletrodo é sempre feita em relação ao eletrodo de referência primário de hidrogênio (posteriormente, serão dados mais detalhes), sob condições experimentais fixas, com temperatura de 25 °C (298 K), atividade iônica unitária e pressão igual a 1 atm. A seguir, na Tabela 1, apresentam-se os potenciais

de eletrodo padrão (E^0) para os principais materiais empregados no presente trabalho. Todos os potenciais estão indicados no sentido da redução e referenciados em relação ao eletrodo de referência primário de hidrogênio [22].

Observação importante: como, no presente trabalho, todos os experimentos estão referenciados ao eletrodo de referência Ag/AgCl, dos potenciais apresentados deve ter subtraído o potencial correspondente ao eletrodo secundário Ag/AgCl KCl 3 mol L⁻¹ (+0,198 V_H). Mais tarde é possível converte-los aos potenciais referentes aos das espécies em redução, tendo como referência o eletrodo de referência primário de hidrogênio.

2.4.3.3 Potencial de Equilíbrio (E_e)

O potencial de equilíbrio pode ser compreendido quando um eletrodo é inserido em solução, pois há a formação da dupla camada elétrica que depende das espécies iônicas em solução. Se este eletrodo não estiver ligado eletricamente a nenhum outro eletrodo ou fonte elétrica, o mesmo fica em equilíbrio termodinâmico [22]. Isto é, a velocidade da reação no sentido da oxidação e da redução será idêntica, estabelecendo-se a situação de equilíbrio, neste caso, também conhecido como estado estacionário da reação redox.

O potencial da reação pode ser calculado por meio do equacionamento de Nernst, que considera a temperatura do sistema e a concentração das espécies a serem oxidadas e reduzidas. Uma reação redox generalizada nas condições de equilíbrio termodinâmico, pode ser apresentada por [22]:

Escrevendo a equação de Nernst [22]:

$$E_e = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \quad (4)$$

2.4.3.4 Potencial de Meia-cela

O potencial de meia-cela pode ser compreendido pelas espécies que compõem o analito, as quais são reduzidas ou oxidadas, no catodo e ânodo, respectivamente [27]. Ao inserir um eletrodo no eletrólito (analito) tem-se a formação de uma junção eletrólito-eletrodo com um potencial padrão de eletrodo (E^0) característico [27] e um potencial de correção, função das concentrações [22]. Com a união das duas parcelas tem-se o potencial de meia-cela, em muitos casos é o próprio potencial de equilíbrio ou potencial estacionário.

2.4.3.5 Potencial de Referência Primário e Secundário

É importante destacar que os estudos de equilíbrio termodinâmico estão baseados no eletrodo de referência primário. O eletrodo de referência primário é definido através da reação redox do hidrogênio (reação IV), em que uma dada concentração de hidrogênio está dissolvido em solução junto ao eletrodo de platina, com atividade iônica e pressão atmosférica unitárias [28][29][2].

A esta reação foi atribuído potencial de eletrodo nulo, à temperatura de 25 °C, sendo que os potenciais de eletrodos de outras reações são considerados como eletrodos de referência secundários relacionados ao eletrodo de referência primário.

O potencial de referência $E(0)$, na prática, é um potencial de equilíbrio de um eletrodo não-polarizável. Esse eletrodo tem característica de uma reação redox reversível (as espécies oxidadas e reduzidas ao mesmo potencial, sem histerese associada). O potencial do eletrodo de referência pode ser corrigido quanto ao efeito da temperatura, da concentração das espécies iônicas oxidadas ou reduzidas, do pH (reação catódica do hidrogênio e oxigênio), das membranas porosas (ponte salina) e

dos filmes poliméricos sobre o metal (função de reduzir eletrólise e/ou aumentar eletrocatalise) [26].

Em sistemas de medição, o potencial de referência é normalmente descrito pela equação de Nernst [27].

$$E(0) = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{red}}{a_{ox}} \right) \quad (5)$$

Na qual: potencial de referência, $E(0)$; potencial de eletrodo padrão, E^0 ; constante dos gases, R ; temperatura absoluta (K), T ; número de elétrons, n ; constante de Faraday, F e $\ln$ da razão das atividade das espécies em oxidação (a_{ox}) e redução (a_{red}).

O efeito do pH em soluções eletrolíticas dá-se através da contribuição da reação catódica do hidrogênio e oxigênio na dissolução anódica do material [22] que compõe a junção eletrólito-eletrodo do referência. Da reação I (ver a seção 2.4.1), a água tem produto iônico igual a 10^{-14} . Portanto, tem-se:

$a_{H^+} \cdot a_{OH^-} = 10^{-14}$, aplicando o log, resulta:

$\log a_{H^+} + \log a_{OH^-} = -14$. Sendo $pH = -\log a_{H^+}$, temos:

$$\log a_{OH^-} = pH - 14 \quad (6)$$

A influência do H^+ a partir da reação simplificada abaixo, à temperatura de 298 K e E_H^0 é nulo por definição.

Convencionando a equação do hidrogênio no sentido da redução e usando a equação de Nernst, resulta: $E_{H_2/H^+} = \frac{0,059}{2} \log \frac{a_{H^+}^2}{p_{H_2}}$, onde p_{H_2} é a pressão parcial de

hidrogênio, na maioria dos casos desprezível [22], pois o valor é próximo a 1 atm e, como $pH = -\log a_{H^+}$, temos:

$$E_{H_2/H^+} = -0,059 pH \text{ (V}_H\text{)} \quad (7)$$

A influência do OH^- a partir da reação abaixo, à temperatura de 298 K e E_{O_2/OH^-}^0 igual a +0,401 V_H.

Convencionando a equação no sentido da redução do oxigênio e usando a equação de Nernst, resulta: $E_{O_2/OH^-} = 0,401 - \frac{0,059}{4} \log \frac{a_{OH^-}^4}{p_{O_2}}$, onde p_{O_2} é a pressão parcial de oxigênio, na maioria dos casos é desprezível, pois o valor é próximo a 1 atm e, como $\log a_{OH^-} = pH - 14$, temos:

$$E_{O_2/OH^-} = 1,227 - 0,059 pH \text{ (V}_H\text{)} \quad (8)$$

Esse caso, é semelhante à contribuição do hidrogênio, porém com potencial acrescido de 1,227 V_H.

2.4.3.6 Sobrepotencial ou Sobretensão

Sensores eletroquímicos são dispositivos de medição que utilizam reações eletroquímicas geradas pela aplicação de um sobrepotencial elétrico “ η ” para qualificar e quantificar uma dada substância. O sobrepotencial é definido pela diferença entre o potencial aplicado no sistema, $E(S)$, e o potencial de equilíbrio termodinâmico do eletrodo de referência, $E(0)$. Nesse caso, o potencial de cela atribuído às espécies químicas está incorporado no potencial do sistema $E(S)$. Portanto, o sobrepotencial é dado por [2][22]:

$$\eta = E(S) - E(0) \quad (9)$$

O sobrepotencial é composto pela polarização da ativação da reação correspondente ao analito η^A , pela polarização devido à concentração do analito η^C , pela polarização de cristalização decorrente ao efeito relacionado à migração dos íons nos sítios ativos η^X e pela polarização de resistência entre o eletrólito e o eletrodo η^R . Assim, pode-se dizer que a sobrepotencial é dado por [22]:

$$\eta = \eta^A + \eta^C + \eta^X + \eta^R \quad (10)$$

Isso significa que o sobrepotencial obedece à fundamentação da distribuição de cargas no modelo junção eletrólito-eletrodo.

2.5 Sensor Planar: Estrutura Geométrica e Materiais

Além de classificar o sensor de interesse quanto ao tipo, à categoria e à análise, faz-se necessário definir qual é o formato ou estrutura geométrica e quais são os materiais a serem utilizados na fabricação. Em sistemas de medição, variar o formato, a configuração e os materiais dos eletrodos pode contribuir, consideravelmente, para otimizar os parâmetros-padrão do sensor.

Estes requisitos combinados são necessários aos sensores e biossensores eletroquímicos a serem utilizados em monitoramento ao longo do tempo. Isto significa reduzir as dimensões e, conseqüentemente, o volume da amostra. O monitoramento extracorpóreo mostra-se menos traumático para o paciente, pois um pequeno volume de amostra é extraído e analisado. Nessa situação, os sensores planares apresentam os melhores resultados no monitoramento ao longo do tempo, devido à facilidade de fabricação e de reprodução a baixo custo, possibilitando inclusive que sejam descartáveis.

Em sistemas de medição existem duas opções para configuração dos eletrodos no sensor: de dois ou de três eletrodos. Essa última apresenta algumas

vantagens no funcionamento do sensor [30], tais como: evita a eletrólise do eletrodo de referência - que poderia degradá-lo - e propicia medidas mais adequadas em soluções diluídas. O sistema de três eletrodos pode ser usado em soluções de alta impedância (solução salina com compostos orgânicos) e favorece a polarização correta do eletrodo de trabalho onde ocorre a reação química ou bioquímica de interesse.

Concomitantemente, com o advento dos microprocessadores, a tecnologia de materiais e de processos evoluiu, possibilitando obter materiais com alto grau de pureza e processos altamente controlados. Com isso, foi possível desenvolver sistemas microeletrônicos de alto desempenho, também aplicados aos sistemas de medição [31][32] baseados em sensores ou biossensores eletroquímicos.

Todo projeto de um sensor deve considerar a estrutura geométrica do eletrodo de trabalho, pois é conhecido que a sensibilidade está diretamente relacionada com a área efetiva exposta do mesmo [31]. Como o formato e a configuração dos eletrodos influenciam a dinâmica eletroquímica do sensor, faz-se necessário realizar inúmeros ensaios a fim de encontrar a forma adequada para a aplicação desejada. Até construir um sensor eficiente, é possível que o percurso dos ensaios seja longo, passando por formas circulares, retangulares, cilíndricas e muitas outras.

Juntamente com o projeto da forma, costuma-se testar os materiais que compõem os eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar do sensor, por exemplo há opção de ouro, platina, carbono vítreo, prata e aço inox. Também são considerados os materiais de suporte, por exemplo, substrato de silício, alumina ou sobre um cateter suporte.

Comumente, os sensores e os biossensores eletroquímicos são definidos em um sistema de medição eletroquímica composto por três eletrodos: 1) trabalho: onde ocorrem as reações químicas de oxidação ou de redução das espécies a serem medidas; 2) referência: apresenta um potencial redox reversível capaz de manter o potencial do eletrodo de trabalho referenciado a um valor fixo e conhecido; 3) auxiliar ou contra-eletrodo: possibilita drenar ou fornecer a corrente elétrica a uma dada

reação química no eletrodo de trabalho, evitando a eletrólise do eletrodo de referência que alteraria o seu potencial de eletrodo. Detalhes destes eletrodos serão apresentados nos itens 2.5.1, 2.5.2 e 2.5.3.

2.5.1 Eletrodos de Referência

Em sistemas de medição com dois ou três eletrodos é fundamental a utilização de um eletrodo de referência com potencial estável para garantir uma medição confiável pelo eletrodo de trabalho [28]. Os eletrodos de referência são bem conhecidos por proverem um potencial de referência fixo, conhecido e independente da solução de análise [28]. Isso possibilita aplicar um potencial no eletrodo de trabalho que será referenciado ao potencial de referência [28].

O princípio de funcionamento de um eletrodo de referência baseia-se no equilíbrio termodinâmico dos materiais que formam a junção redox [22]. Tradicionalmente, o eletrodo de referência é constituído por uma junção-líquida. Esta consiste, geralmente, em fio do metal não-polarizável ou semi-polarizável, o qual é confinado em um tubo com uma solução salina contendo alta concentração de íons, por exemplo, de KCl (3 mol L^{-1}). Na extremidade desse tubo há uma membrana porosa que permite o contato iônico e mantém inalterada a concentração iônica na solução interna do tubo, possibilitando um potencial de eletrodo conhecido, fixo e independente da solução de análise.

Os eletrodos de referência secundários mais conhecidos são [27]: Hg/Hg₂Cl₂ saturado em KCl (SCE), Hg/Hg₂Cl₂ (1 mol L^{-1}) de KCl (Calomel), Hg/Hg₂SO₄, Hg/HgO e Ag/AgCl. Estes são exemplos de eletrodos de referência secundários mais comuns encontrados na literatura, sendo o eletrodo de referência primário o eletrodo de referência de hidrogênio [32][33].

Entre os eletrodos de referência secundários mais comuns, destaca-se o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), pois oferecem diversas vantagens em relação a outros eletrodos de referência [28][32][33]. Eles são mais robustos e homogêneos,

apresentam alta estabilidade em solução de análise (sal praticamente insolúvel em água), são de fácil construção, apresentam custo reduzido de fabricação e implicam em baixa contaminação ambiental ou bioquímica (adequado para aplicação médica). Isso propicia integrá-los em sensores de monitoramento em tempo real e *in situ*, possibilitando uma resposta rápida e confiável.

Hiroaki Suzuki [34] propõe que a estabilidade do potencial do eletrodo de referência Ag/AgCl está relacionada com a formação e com a dissolução do filme de AgCl, devido à adsorção ou dissociação de cloretos [34]. Portanto, constitui diferentes íons de prata complexados no filme, de acordo com: $AgCl_n^{-(n-1)}$ ($n = 2-4$).

Observam-se as reações:

O potencial de eletrodo é determinado pela capacidade de oxidação da prata (reação VII) e pela atividade inalterada dos íons cloreto em solução. O filme AgCl formado na reação VIII é sólido e transparente, a tonalidade branca visualizada deve-se à difração da luz na superfície da prata. Porém, com a adsorção de cloretos, são formados íons complexados no filme (reações IX a XI). Esses íons são solvatados (aquosos) e apresentam coloração que pode variar de cinza claro, cinza escuro, marrom escuro a preto, dependendo do arranjo estrutural dos íons complexados dominantes, que varia com a concentração de cloreto em solução.

O tipo de processo para obtenção do filme AgCl sobre a prata é fundamental para intensificar ou amenizar a adsorção dos íons cloreto. O processo permite controlar a adesão, a rugosidade, a densidade e a homogeneidade do filme. Isto é, quanto mais rugoso e menos homogêneo, denso e aderente, maior será a adsorção dos íons cloretos. O inverso é válido para reduzir esse efeito; consequentemente,

tem-se filmes de AgCl mais densos, aderidos e homogêneos e menos rugosos. Existem, basicamente, dois tipos de obtenção deste filme, sendo: a) sal de AgCl fundido depositado sobre um metal, por exemplo: Ag ou Pt; e b) deposição eletroquímica de Cl^- sobre uma superfície de prata.

O processo em que se utiliza AgCl fundido é trivial, sem grandes controvérsias; trata-se de filmes de fácil obtenção, muito densos e homogêneos, com baixa rugosidade e de aderência intermediária (dependendo do procedimento de limpeza do metal). Por outro lado, os filmes de AgCl obtidos por deposição eletroquímica, que parecem ser tão notórios, carecem da otimização de todos os parâmetros em conjunto. Obter filmes mais densos e homogêneos com menor rugosidade e maior adesão implica em depositar íons minimamente solvatados [34] e com baixa densidade de corrente [28].

Atualmente, há grande interesse em desenvolver eletrodos de referência em estado sólido com a tecnologia convencional de Ag/AgCl, devido às características apresentadas [35]. Diversos estudos propõem o uso desses eletrodos integrados o que simplificaria ainda mais a construção e aplicação em sensores eletroquímicos amperométricos planares com o propósito de aplicação em meio biocompatível [35].

Os eletrodos de referência de Ag/AgCl em estado sólido se baseiam-se no mesmo princípio dos eletrodos de líquido-junção, com uma diferença substancial: substituir a junção líquida por um material com características sólidas e com capacidade redox. Geralmente, esse material é chamado de hidrogel, constituído de um polímero que apresenta em seus interstícios a fase líquida (eletrólito) aprisionada [36].

O desafio da pesquisa para a obtenção de um eletrodo de referência completo em estado sólido está em: a) depositar eletroquimicamente filmes finos de cloreto que sejam estáveis, homogêneos e com boa aderência no substrato; b) aplicar um material como membrana de troca iônica sobre o hidrogel que, normalmente, não permite boa sustentabilidade mecânica e incompatibilidade com um dado processo de fabricação.

Diante disso, surge outra vertente de eletrodos de referência em estado sólido, conhecidos como pseudo-eletrodo de referência secundário Ag/AgCl. Os pseudo-eletrodos de referência de Ag/AgCl consistem no contato direto do filme de cloreto com a solução de análise, sem a necessidade do eletrólito e da membrana de troca iônica. Esse tipo de eletrodo apresenta dois inconvenientes em relação os eletrodos de referência completos: alta sensibilidade a cloreto e corrosão acelerada do filme cloreto. Para amenizar essas ocorrências, utilize-se uma membrana de náfon que permite difundir somente os íons positivos, proporcionando contato iônico sem degradar o filme de cloreto [36][37].

2.5.2 Eletrodos de Medição

As características do material empregado no eletrodo de medição (trabalho) são fundamentais para que as análises químicas ou bioquímicas sejam realizadas de acordo com os parâmetros-padrão: alta seletividade, para reduzir ao máximo a influência dos interferentes; alta sensibilidade, para viabilizar medições de baixas concentrações [38]; alta estabilidade, para minimizar a variação em relação à linha base; alta repetitividade, para permitir a obtenção de medidas idênticas para um mesmo sensor e alta reprodutividade, para possibilitar a fabricação de sensores com características semelhantes [39].

Para tanto, as investigações são voltadas para a modificação da superfície do eletrodo de medição (trabalho) permitindo controlar esses parâmetros-padrão seja pela deposição química ou eletroquímica de substâncias que facilitem a transferência eletrônica (eletrocatalise) ou pela deposição física de substâncias que promovam o fenômeno de difusão seletiva e a variação de área efetiva exposta deste eletrodo. Eventualmente, um mesmo material busca associar simultaneamente todas estas características.

Costuma ser no eletrodo de medição o local em que são observadas as reações eletroquímicas de interesse. Essas reações são possíveis por meio da aplicação de um potencial elétrico, cujo valor é função do referencial de potencial

dentro do ambiente de medição (solução de análise). Esse referencial é fornecido por um segundo eletrodo, chamado justamente de eletrodo de referência, cujo valor de potencial é idealmente fixo, independente da solução de análise [28][27][36]. Finalmente, o terceiro eletrodo, denominado auxiliar ou contra-eletrodo para drenar ou fornecer toda a corrente necessária à reação química que ocorre no eletrodo de medição.

2.5.3 Eletrodos Auxiliar ou Contra-eletrodo

O eletrodo auxiliar também conhecido como contra-eletrodo, é o terceiro eletrodo de um sistema baseado em três eletrodos. Ele deve ter área de contato grande o suficiente para, como já mencionado, drenar ou fornecer toda corrente elétrica necessária à reação química, que ocorre no eletrodo de medição. Em sensores planares, o eletrodo auxiliar costuma ter área minimamente igual ou superior à do eletrodo de trabalho [40]. Os materiais inertes geralmente empregados na confecção dos eletrodos auxiliares são: platina, ouro, carbono vítreo e aço inox [40].

2.6 Sistema Fluídico / Cella de Análise e Fluxo de Corrente Iônica

O sistema fluídico, cela de análise e fluxo de corrente iônica de reação, merece um estudo conjunto considerando dois fatores: o primeiro diz respeito à modelagem do sistema, sendo necessário estimar a indutância e complacência da tubulação, das bombas e válvulas, da cela de análise, do injetor-comutador e das conexões; o segundo remete-se à configuração do sistema a fim de reduzir a impedância de solução no interior da cela de análise. Isso significa direcionar e propagar o fluxo de corrente iônica, evitando que passe pelo eletrodo de referência e reduzir a contribuição da força iônica no sinal medido.

Parte da otimização do sistema fluídico está em reduzir o volume morto e a densidade de corrente iônica dentro da cela de análise [9]. Para tal, torna-se

importantíssimo desenvolver um projeto do geométrico adequado que garanta um excelente desempenho da medição e do sistema de limpeza. Desta forma, a influência da força iônica, a concentração residual de analito (presente no volume morto) e a densidade de corrente elétrica terão pouca influência no resultado da medição [23].

2.7 Potenciostatos e Técnicas Analíticas

Os potenciostatos são equipamentos normalmente controlados por computador que amplificam e controlam o sinal do potencial no eletrodo medido em relação ao eletrodo de referência [41]. Esses equipamentos possuem módulos de filtros para reduzir ruídos; de amplificadores que proporcionam ganho no sinal de saída e de conversores analógico-digital transformam o sinal de entrada seja físico ou químico recolhido pelo sensor em algoritmo binário, informação compatível com a linguagem computacional [39].

Nesses equipamentos tem-se a opção de usar um terceiro eletrodo, o eletrodo auxiliar. Os potenciostatos são comumente usados para a determinação experimental da curva de polarização do eletrodo de trabalho [41], que constitui o sensor eletroquímico.

Os potenciostatos da *Bionalytical System* (BAS), modelo CV-50 W, e os da Ivium, PalmSens, são utilizados para realizar testes comparativos neste trabalho. (ver Figura 7 e 8). Os equipamento BAS e PalmSens oferecem diversas técnicas potenciométricas com fácil integração entre o usuário e *software*. As mais notórias técnicas são: Voltametria Cíclica, Voltametria por Pulso Diferencial e Amperometria [31]. Para medição de correntes muito baixas há um módulo amplificador da BAS que permite a medição de corrente da ordem de pA, enquanto que o PalmSens já tem um sistema integrado de amplificação e tratamento de ruídos.

Figura 7 – Potenciostato BAS, cela de reação e sistema computadorizado de controle [31].

Figura 8 – Potenciostato PalmSens e conectores (controlado por computador, não mostrado).

A maioria das técnicas de análises tem a opção de realizar conjuntamente dois tipos de análises, como descrito a seguir.

Análises qualitativas: permitem a determinação da presença de uma dada substância que é oxidada ou reduzida no eletrodo de trabalho [27] por meio do potencial de meia-onda ($E^{1/2}$) característico do material. Portanto, pode-se usar esse parâmetro para determinar o analito de interesse. O valor de $E^{1/2}$ depende da natureza da solução eletrólito-suporte; por isso, os interferentes serão estudados em relação à substância de análise desejada no soro fisiológico. As principais técnicas de análises associadas são: Voltametria Cíclica e Voltametria por Pulso Diferencial.

Análises quantitativas: permitem, utilizando a técnica de Voltametria Cíclica, calcular a área efetiva (A) do eletrodo de medição do sensor eletroquímico por meio do valor da corrente de pico (I_p) e uma concentração identificada. Porém, se a área é conhecida pode-se obter a concentração do analito em estudo. Para tal, usa-se o equacionamento de Randles-Sevcik [3][31][42] (equação 11), relacionado com a concentração (C) das espécies que oxida ou reduz, com a área efetiva do eletrodo e com a corrente de pico advinda da reação redox.

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C v^{1/2} \quad (11)$$

Sendo, na expressão; n o número de elétrons transferidos na reação redox (redução e oxidação), D_o representa a difusividade da espécie química utilizada (sendo $7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as espécies de ferrocianeto de potássio) e v (V s^{-1}) é a velocidade de varredura.

Entre as diversas técnicas voltamétricas e amperométricas, foram selecionadas seis técnicas para caracterizar o eletrodo de trabalho e de referência ou analisar o analito de interesse, a saber: Voltametria Linear, Voltametria Cíclica, Voltametria por Pulso Diferencial, Amperometria, Análise por Injeção em Fluxo amperométrica e Cronopotenciometria. Essas técnicas foram escolhidas por apresentar alta versatilidade no estudo de espécies eletroativas, possibilitando análises eletroquímicas de substâncias orgânicas, inorgânicas e bioquímicas [43].

Voltametria linear (LSV, do inglês, *Linear Sweep Voltammetry*): essa técnica consiste em aplicar um potencial que varia linearmente no eletrodo imerso em eletrólito, registrando a corrente em função do potencial [44]. É uma técnica

utilizada para verificar o potencial de uma dada reação, considerando somente o sentido de oxidação ou redução das espécies químicas ou bioquímicas.

Voltametria Cíclica (CV, do inglês, *Cyclic Voltammetry*): nessa técnica, obtém-se a corrente no eletrodo de trabalho em relação ao potencial aplicado (forma de onda triangular) que varia linearmente tanto no sentido anódico como no catódico [41]. Por meio dela é possível realizar análises quantitativas e qualitativas no estudo de mecanismos de oxidação e redução para a limpeza eletroquímica, ativação e caracterização do eletrodo de trabalho e para a fabricação e caracterização do eletrodo de referência.

Voltametria por Pulso Diferencial (DPV, do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*): nessa técnica, a corrente é amostrada em dois intervalos de tempo; primeiramente, antes da aplicação do pulso e, em seguida, na amplitude máxima do pulso. Registra-se, então, a diferença entre essas duas correntes contra o potencial aplicado; o voltamograma resultante tem a forma de picos cuja altura é proporcional à concentração do analito [45]. Portanto, através dessa técnica, pode-se facilmente determinar o potencial que o analito responde para uma dada solução eletrólito-suporte.

Amperometria (TB, do inglês, *Single Potential Time Base*): aplica-se um potencial constante em função do tempo e mede-se a corrente gerada pela reação na superfície do eletrodo de trabalho [45]. É uma técnica utilizada para a realização de medições em função do tempo, a fim de traçar as curvas de calibração para os interferentes.

A técnica amperométrica pode ser associada à **Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês, *Flow-injection Analysis*)**, que é adequada para simular o fluxo sanguíneo, interesse fundamental deste trabalho. Por meio da FIA, é possível controlar parâmetros como: aspectos cinéticos, gradientes de concentração, dispersão por convecção e por difusão radial e axial, garantindo melhor precisão de medida em ambiente simulado. A FIA é fundamentada por medição amperométrica em que a sensibilidade do pulso é diretamente proporcional à concentração injetada.

Cronopotenciometria: baseia-se no potencial elétrico gerado na interface solução/eletrodo. O potencial aplicado pela técnica é nulo e constante, pois com a variação da concentração das espécies a serem medidas ocorre um deslocamento de potencial na superfície do eletrodo de trabalho, o qual é registrado.

2.8 Nitrito e seus Principais Interferentes (Cloreto, Sulfato, Nitrato, Ácido Úrico, Ácido Ascórbico, Dopamina e Paracetamol)

O nitrito (NO_2^-) é um íon inorgânico bem conhecido, encontrado nos alimentos, nos sistemas fisiológicos dos seres vivos e no meio-ambiente como poluente. Na natureza, participa do ciclo do nitrogênio, na degradação da amônia (plantas e animais mortos) tendo-se a síntese para nitrito pelas bactérias nitrossomonas e para nitrato pelas nitrobacter [46], ambas estão presentes no solo e na água. Tanto em ambiente intra como extracorpóreo, o nitrito, em altas concentrações torna-se tóxico no corpo de humanos e de animais.

A presença de sais de nitrito nos alimentos, principalmente nas carnes, tem função de preservar a cor e o sabor desses produtos alimentícios. Segundo Melo Filho [47], pesquisas relatam que essas espécies atuam como antimicrobianos e antioxidantes, contribuem para reduzir ou inibir a proliferação de toxinas do complexo *Clostridium*. O uso desses sais acima do limite máximo pode causar sérios danos à saúde humana. A seguir, apresentam-se as implicações da alta concentração desta espécie no organismo humano.

O nitrito é convertido a carcinogênio N-nitrosaminas no estômago [1][48]. Uma vez presente no sistema sanguíneo, realiza reações irreversíveis com a hemoglobina produzindo meta-hemoglobina, que é incapaz de combinar-se com o oxigênio (reação XII) [49][50]. Também pode reagir com a deoxi-hemoglobina ou ser reduzido (reação XIII), contribuindo para formação de óxido nítrico (NO) que participa dos processos de vasodilatação sanguínea [51], aumentando o risco de uma fissão vascular.

O nitrito é um dos principais subprodutos que pode ser encontrados na urina, porém quando o paciente padece de injeção do trato urinário (ITU) sua ocorrência na urina é reduzida. Essa infecção é comum na clínica médica, sendo definida como uma invasão microbiana a qualquer órgão do trato urinário desde a uretra até os rins [52]. O processo infeccioso pode afetar também a pelve renal, os ureteres, a bexiga e a uretra, bem como as estruturas adjacentes, incluindo próstata e epidídimo. O teste de nitrito urinário positivo requer a presença do nitrato, pois as microbacterias (por ex. bacilos gram-negativos e *Escherichia coli*) realizam a conversão de nitrito para nitrato.

A análise eletroquímica do nitrito (NO_2^-), geralmente, é preferida em potenciais de oxidação para evitar a interferência da redução de nitratos e do oxigênio molecular [53]. Na natureza, o nitrito costuma ser oxidado evoluindo para nitrato (NO_3^-) (reação XIV) [54] pela ação dos microorganismos nitrito oxidantes do tipo Nitrobacter [55], enquanto que, na redução do nitrito costuma agir a enzima nitrito redutase, representada parcialmente pela reação XV [53].

No intuito de desenvolver sensores e biossensores eletroquímicos para a análise amperométrica de nitrito a ser aplicado no monitoramento de sinais bioquímicos *in vitro*, é importante verificar a evolução da influência dos interferentes na análise de nitrito como ácido úrico, ácido ascórbico, paracetamol, dopamina, sulfatos, nitratos e cloretos. Para tal, devem-se considerar as doses terapêuticas destas espécies no sangue do paciente na ordem de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ [56]; $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ [57]; $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$; $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e 90 mmol L^{-1} [58], respectivamente.

Na literatura existe um conhecimento diverso sobre a influência dos interferentes na medição quantitativa do nitrito. A seguir, busca-se descrever e

identificar a relação dos interferentes do nitrito, comentando sobre a interferência analítica ou metabólica e, com isso, será mostrado a complexidade da medição de nitrito quando os interferentes estão presentes, a seguir esses são comentados.

Ácido ascórbico (vitamina C): é um agente antioxidante encontrado em alimentos, frutas, vegetais, bebidas e fármacos [59][60][61]. Esse composto realiza importantes reações enzimáticas aliviando o estresse oxidativo no metabolismo humano, úteis para prevenção ou tratamento de enfermidades. Recentemente, foi utilizado para doenças mentais, infertilidade, cânceres, diabetes mellitus e AIDS [60]. O ácido ascórbico também é empregado na conservação de carnes processadas, promovendo a formação de compostos carcinogênicos e na redução de nitrito [61].

Ácido úrico: está presente em fluídos humanos como na urina e no plasma. Este composto é o produto final do metabolismo da purina. Níveis anormais de ácido úrico podem causar doenças como hiperuricaemia e síndrome de Lesch/Nyhan [62]. Concentrações bem elevadas de ácido úrico podem fazer evoluir doenças cardiovasculares. Os níveis normais no plasma e na urina [62] são 240 a 520 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,4 a 4,4 mmol L^{-1} , respectivamente.

Paracetamol (acetoaminofenol): é um analgésico antipirético derivado da fenacetina. Seu uso inadequado pode causar lesões nas células hepáticas, sendo evitado seu uso em casos de dengue, principalmente na forma hemorrágica [63]. No metabolismo primário, o paracetamol é combinado com o “*endogenous glucuronide*” e com sulfatos [64].

Cloridrato de dopamina ou cloridrato de 3-hidroxitiramina: é o precursor químico da norepinefrina, que estimula receptores dopaminérgicos, beta 1-adrenérgicos e alfaadrenérgicos, dependendo da dose [65]. Doses baixas de dopamina (1 a 2 $\mu\text{g/kg/min}$) estimulam os receptores dopaminérgicos a provocar vasodilatação cerebral, renal e mesentérica, mas o tônus venoso é aumentado em decorrência da estimulação alfaadrenérgica. Na dose de 2 a 10 $\mu\text{g/kg/min}$, a dopamina estimula os receptores beta-1 e alfaadrenérgicos.

Lewis (1950), do Laboratório de Bioquímica da Universidade de *Cambridge*, realizou estudos para verificar a toxicidade de nitratos e nitritos no metabolismo de ovelhas e constatou que 1g de nitrato de potássio por 1 Kg de massa corporal do animal pode ser considerado dose letal [66]. Observa-se que nesta concentração, 70 a 80% da hemoglobina é convertida em meta-hemoglobina, um composto que reage irreversivelmente com nitritos e nitratos impossibilitando o transporte de oxigênio.

Os principais métodos de análises de nitrito e nitrato encontrados na literatura são: espectrofotométricos, polarográficos, voltamétricos e amperométricos. Esse último ganhou reconhecida expressão a partir da década de 1990, devido a algumas vantagens; não necessita de reagente para medição [67], a medição é direta e precisa e os sensores fabricados são de baixo custo.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Nos tópicos que se seguem serão apresentados os procedimentos experimentais. Primeiramente, aborda-se o estudo do potencial de cela eletrolítica ou do sistema de medição, partindo dos potenciais de meia-cela, dos sobrepotenciais do sistema e do potencial de referência. Isso permite escolher os potenciais de medição mais adequados à resposta do analito. Depois, são listados os materiais e equipamentos necessários para reproduzir esse trabalho. Em seguida, comenta-se o projeto e construção do aparato extracorpóreo e do sensor eletroquímico amperométrico de medição, a limpeza padrão dos eletrodos e o processo de obtenção e caracterização dos eletrodos de trabalho e referência. Por fim, realiza-se um estudo da sensibilidade, seletividade, estabilidade, repetitividade, reprodutividade e permissividade do sensor para medição de nitrito e seus principais interferentes. Com esses resultados, inferiu-se sobre a vida útil do sensor.

3.1 Estudo do Potencial de Cela Eletrolítica ou do Sistema de Medição

O potencial de cela eletrolítica (E_{cela}) consiste em considerar todo o sistema de medição, ou seja, contabilizar as duas meias-celas (apresentadas no item 2.4.3.4), isto é, a reação de oxidação e de redução das espécies que fornece a reação global redox. Um dos eletrodos é definido como ânodo; é onde ocorre a reação de oxidação, com transferência de elétrons das espécies reduzidas. O outro eletrodo é chamado de cátodo; é onde ocorre a reação de redução, em que os elétrons são transferidos para as espécies oxidadas [27]. O eletrólito tem função primordial em conduzir a corrente iônica; sendo que através do circuito elétrico, fluem elétrons do ânodo para o cátodo (sentido real).

Partindo do exemplo de Galen Ewing [27], apresenta-se um modelo adaptado de uma reação redox (redução e oxidação) generalizada para infinitas espécies, utilizando dois eletrodos inertes:

Catodo - meia-cela de redução: $r.A^{n+}(aq) + \dots + n.e^- \rightleftharpoons q.A(s) + \dots$ $E^0 = E_C^0$ (XVI)

Ânodo - meia-cela de oxidação: $s.B(s) + \dots \rightleftharpoons t.B^{m+}(aq) + \dots + n.e^-$ $E^0 = -E_A^0$ (XVII)

Cela eletrolítica redox: $r.A^{n+}(aq) + \dots + s.B(s) \rightleftharpoons t.B^{m+}(aq) + \dots + q.A(s)$
 $E_G^0 = E_C^0 + (-E_A^0)$ (XVIII)

Sendo A e B espécies a serem oxidadas ou reduzidas; r, q, s e t índices estequiométricos e n é o número de elétrons transferidos na reação redox; E^0 é o potencial de eletrodo-padrão; $-E_A^0$ é o potencial de eletrodo-padrão para reação de meia-cela de oxidação; E_C^0 é o potencial de eletrodo padrão da reação de meia-cela de redução; E_G^0 é o potencial de eletrodo padrão para a reação global redox.

Indicou-se o potencial de eletrodo padrão no equilíbrio termodinâmico para as meias-celas, porém há necessidade de atribuir a esses potenciais os efeitos de temperatura, de atividade iônica e de pH.

Define-se constante de equilíbrio químico (K_e) como:

$$K_e = \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{eq} (a_{A(s)}^q)_{eq} \dots}{(a_{A^{n+}}^r)_{eq} (a_{B(s)}^s)_{eq} \dots} \quad (12)$$

A constante de equilíbrio químico é válida somente para a temperatura de 25 °C e atividade iônica unitária, sem influência do pH. Alterando esses parâmetros, devemos atribuir um coeficiente de atividade (Q_c) para indicar as concentrações reais das espécies em solução.

$$Q_c = \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{real} (a_{A(s)}^q)_{real} \dots}{(a_{A^{n+}}^r)_{real} (a_{B(s)}^s)_{real} \dots} \quad (13)$$

Por considerações termodinâmicas, pode-se mostrar que a variação da energia livre de Gibbs (trabalho máximo à pressão e à temperatura constantes) é dada por [27]:

$$\Delta G = RT \ln Q_c - RT \ln K_e \quad (14)$$

Na expressão acima, R é a constante universal dos gases (8,316 J) e T é a temperatura em Kelvin.

Nas reações eletroquímicas, a variação da energia de Gibbs (ΔG) relaciona-se às quantidades elétricas através da expressão:

$$\Delta G = -nFE_{cela} \quad (15)$$

Na equação 15, E_{cela} é o potencial da cela eletrolítica em Volts (V); F é a constante de Faraday, aproximadamente 96,500 C; n é o número de elétrons transferidos na reação redox global (n-m). Então, substituindo 15 em 14, tem-se:

$$E_{cela} = -\frac{\Delta G}{nF} = -\frac{RT}{nF} \ln Q + \frac{RT}{nF} \ln K \quad (16)$$

Substituindo os valores de K e Q, resulta:

$$\begin{aligned} E_{cela} &= -\left[\frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{real} (a_{A(s)}^q)_{real} \dots}{(a_{A^{n+}}^r)_{real} (a_{B(s')}^s)_{real} \dots} \right] + \left[\frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{eq} (a_{A(s)}^q)_{eq} \dots}{(a_{A^{n+}}^r)_{eq} (a_{B(s')}^s)_{eq} \dots} \right] \\ &= -\left[\frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{A(s)}^q)_{real}}{(a_{A^{n+}}^r)_{real}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{real}}{(a_{B(s')}^s)_{real}} \right] + \left[\frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{A(s)}^q)_{eq}}{(a_{A^{n+}}^r)_{eq}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{eq}}{(a_{B(s')}^s)_{eq}} \right] \end{aligned} \quad (17)$$

Definimos o potencial de eletrodo padrão $E_C^0 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{A(s)}^q)_{eq}}{(a_{A^{n+}}^r)_{eq}}$ e $E_A^0 = \frac{RT}{nF} \ln \frac{(a_{B^{m+}}^t)_{eq}}{(a_{B(s')}^s)_{eq}}$. Considerando que as concentrações reais são concentrações

efetivas, pode-se abandonar a notação real da equação e temos, então, a equação para as duas meias-celas eletrolíticas, sendo E_C potencial de meia-cela no eletrodo cátodo e E_A potencial de meia-cela no eletrodo ânodo.

$$E_C = E_C^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{A(s)}^q}{a_{A^{n+}}^r} \text{ e } E_A = E_A^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{B^{m+}}^t}{a_{B(s')}^s}; \text{ sabendo que } a_{A(s)}^q = a_{B(s')}^s = 1,$$

resulta nas equações:

$$E_C = E_C^0 + \frac{RT}{nF} \ln a_{A^{n+}}^r \quad (18)$$

$$E_A = E_A^0 - \frac{RT}{nF} \ln a_{B^{m+}}^t \quad (19)$$

O potencial de cela eletrolítica é igual a:

$$E_{cela} = E_C - E_A \quad (20)$$

Geralmente, nos sistemas de medição há preferência por uma cela de reação. Nesse caso, aplica-se sobrepotenciais adequados no eletrodo de trabalho da cela potenciostática com três eletrodos. Nessa cela, tem-se um eletrodo com características não-polarizáveis (eletrodo de referência) ou com polaridade reduzida (pseudo-eletrodo de referência). O outro, um eletrodo de medição, confeccionado com material inerte ou pouco reativo, é onde ocorre à oxidação ou redução das espécies que se deseja medir. E, por fim, um terceiro eletrodo inerte (eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo) que deve somente drenar ou fornecer a corrente de reação, sem participar do potencial de cela.

O potencial de cela depende da natureza e da concentração da solução de análise, dos materiais com que os eletrodos são fabricados, das características físicas (tamanho e espaçamento dos eletrodos têm efeito na variação da impedância), da presença ou ausência de agitação, da temperatura, das propriedades do circuito elétrico (tipo de filtros, amplificadores e conversores) e da direção e do sentido do fluxo de corrente [27].

Com a adição do eletrodo de referência tem-se um incremento do potencial redox de referência $E(0)$ que minimiza os efeitos da polarização devido à resistência de solução, à energia de ativação e outros. Ao conjunto dessas polarizações denomeamos de sobrepotencial (η). Nesse caso, o potencial corrigido do sistema de medição $E(S)$ é dado por:

$$E(S) = E_{cela} + \eta + E(0) \quad (21)$$

A cela eletrolítica tem eletrodos confeccionados com material inerte (trabalho e auxiliar), portanto as reações de oxidação e de redução ficam restritas às espécies químicas de análise. Essas serão referenciadas a um potencial de referência, cujo eletrodo é não-polarizável, com potencial fixo conhecido que independente da solução de análise.

3.2 Lista de Materiais Utilizados neste Trabalho

A seguir, é apresentada a lista de equipamentos e produtos químicos que foram utilizados neste trabalho. Antes da descrição, duas observações:

- todas as soluções químicas foram preparadas no mesmo dia de seu uso, para evitar degradação;
- para evitar contaminação, cada solução preparada foi utilizada somente uma vez.

3.2.1 Equipamentos Comerciais e Materiais Empregados

- a) Estação de trabalho CV-50W *Bionalytical System* (BAS);
- b) PalmSens PC – Ivium;
- c) Agitador magnético;
- d) *Hot Plate*;
- e) *Spinner*;
- f) 5 béqueres de vidro de 25 ml;
- g) 5 béqueres de plástico de 25 ml;
- h) Pincel suave;
- i) Eletrodo de referência comercial BAS RE-5B;
- j) Eletrodo auxiliar de platina fabricado;
- k) Bomba peristáltica;
- l) Injetor-comutador;
- m) 4 válvulas solenóides NR de 3 vias;
- n) Compressor de ar para 30 L.

3.2.2 Equipamentos Desenvolvidos

- a) Aparato extracorpóreo (FIA-automatizada, sistema fluídico, injetor-comutador, cela eletroquímica, circuito controlador de válvulas e *software* em LabView[®]);
- b) Sensor eletroquímico planar em substrato de alumina.

3.2.3 Produtos Químicos

- a) Álcool isopropílico, grau VLSI (IPA);
- b) Acetona, grau VLSI;
- c) 25 ml solução comercial Orion para eletrólito interno Eletrodo de Referência;
- d) 25 ml de HCl 1,0 mol L⁻¹;

- e) 25 ml de NaCl 3,0 mol L⁻¹;
- f) 25 ml de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹;
- g) 25 ml de KCl 3,0 mol L⁻¹;
- h) 25 ml de HCl 0,1 mol L⁻¹;
- i) 25 ml de cada concentração de solução de NaNO₂ diluída em soro fisiológico (50, 100, 250 e 500 µmol L⁻¹);
- j) 2000 ml de soro fisiológico (pH = 7,3 e 0,9 % NaCl);
- k) 20 ml de paracetamol 50 mmol L⁻¹ em soro fisiológico;
- l) 20 ml de ácido ascórbico 50 mmol L⁻¹ em soro fisiológico;
- m) 20 ml de ácido úrico 50 mmol L⁻¹ diluído em NaOH 0,1 mol L⁻¹ de soro fisiológico;
- n) 20 ml de NaCl 1 mol L⁻¹;
- o) 20 ml de NaNO₃ 50 mmol L⁻¹;
- p) 25 ml de Ferrocianeto de Potássio (0,01 mol L⁻¹) em KNO₃ (0,1 mol L⁻¹);
- q) Alumina coloidal 0,05 µm;
- r) Pasta de ouro DuPont® 5142;
- s) Pasta prata/paládio DuPont® 6146;
- t) Pasta de platina ESL 5545-LS;
- u) Pasta dielétrica DuPont® 9615.

3.3 Projeto e Construção do Aparato Extracorpóreo para Sensores Planares

As figuras 9 e 10 mostraram o fluxograma para medição do nitrito e o sistema FIA-automatizado, respectivamente do aparato extracorpóreo empregado no presente trabalho. Alguns requisitos foram observados na construção: a) o aparato deve ser construído de modo a facilitar a limpeza do sensor e do sistema; b) deve apresentar reduzido volume morto da cela de análise; c) a cela deve possuir mínima indutância e complacência tanto nas conexões como nos tubos, d) os materiais devem ser cuidadosamente limpos para eliminar impurezas; e) o sistema deve ser flexível de forma a permitir a troca de sensores com facilidade (sistema descartável);

f) deve ser um sistema altamente integrado (sensor, célula de análise, fluídica, analisador voltamétrico e aquisição de dados).

Figura 9 – Fluxograma de medição para nitrito e seus interferentes.

Figura 10 – FIA-automatizada. Esquema da configuração de válvulas solenóides (V_{S1} , V_{S2} , V_{S3} e V_L) e válvulas de controle de fluxo (V_{FC} , V_{F1} , V_{F2} e V_{F3}) para injeção das soluções de análise (S_1 , S_2 e S_3), de limpeza (S_L) e de carregamento (S_C).

Descrição do esquema de funcionamento proposto para FIA-automatizada:

a, b, c, d: Pontos de confluência de ar.

S_C : Solução de Carregamento.

S_L : Solução de Limpeza.

S_1 : Solução de Análise 1.

S_2 : Solução de Análise 2.

S_3 : Solução de Análise 3.

V_{S1} , V_{S2} , V_{S3} e V_L : Desacionadas flui S_C .

V_{S1} : Válvula Solenóide acionada injeta S_1 .

V_{S2} : Válvula Solenóide acionada injeta S_2 .

V_{S3} : Válvula Solenóide acionada injeta S_3 .

V_L : Válvula Solenóide acionada flui S_L .

V_{FC} : Válvula para regular fluxo de S_C .

V_{FL} : Válvula para regular fluxo de S_L .

V_{F1} : Válvula para regular fluxo de S_1 .

V_{F2} : Válvula para regular fluxo de S_2 .

V_{F3} : Válvula para regular fluxo de S_3 .

V_{FA} : Válvula para regular fluxo de ar permite escape de ar excedente.

CA: Compressor de ar utilizado para bombeamento de ar que transporta solução por pressão.

Observação: S_L é bombeado pela ação da força gravitacional devido à pressão atmosférica exercida.

Os requisitos descritos constam do fluxograma e do esquema para a configuração do sistema de FIA-automatizada foram testados. Na Figura 9, o fluxograma indica, do início ao fim, o procedimento de medição, em que se pode escolher quantas vezes se deseja realizar cada medição. Na Figura 10, observa-se o esquema com válvulas solenóides e válvulas de fluxo para injeção das soluções de análise, de limpeza e de carregamento.

A seguir, na Figura 11, apresenta-se o protótipo construído do aparato extracorpóreo para medição de nitrito e seus interferentes. Cada parte do sistema e sua função estão identificadas. Na Figura 12, observa-se o detalhe da cela de análise, que foi desenvolvida respeitando os parâmetros-padrão para otimização do sistema fluídico, e do modo de medição que foi de acordo com o projeto elaborado para construção da mesma.

Figura 11 – Vista geral do aparato extracorpóreo para medição de nitrito por FIA-automatizada e seus interferentes.

Figura 12 – Detalhe da cela de análise. Conectores dos três eletrodos: amarelo para eletrodo de referência, preto para eletrodo de medição (trabalho) e vermelho para eletrodo auxiliar.

O aparato extracorpóreo é configurado com bomba compressor e microválvulas, que garantem autonomia do sistema de medição, além de permitir a redução do tamanho do aparato e facilitar a limpeza do sistema (Figuras 11 e 12).

3.4 Sensor Eletroquímico Planar com Três Eletrodos

Os sensores eletroquímicos planares utilizados neste trabalho foram adquiridos do grupo orientado por Gongora-Rúbio. O *layout* do sensor (Figura 13) foi desenvolvido por Yamanaka [14] e fabricado por Peppe [15]. Bonette [13] e Gómez [16] contribuíram com procedimentos de testes que viabilizaram a escolha das pastas compósitas adequadas na confecção dos eletrodos do sensor. Os trabalhos do grupo de Ferreira, que consistiram na caracterização de diversas versões de sensores, foram responsáveis para selecionar as configurações de sensores com melhor desempenho.

Figura 13 – *Layout* dos três sensores com geometrias distintas (cotas em mm) [17].

A escolha do sensor eletroquímico planar partiu das seguintes premissas: reduzir volume de análise, minimizar efeitos da solução e da cela de análise (impedância, complacência, indutância, densidade de corrente elétrica e ruídos),

facilitar a conexão do sensor no aparato de análise, otimizar a limpeza do sistema, evitando a oclusão do sensor, e proporcionar o máximo de integração possível [28].

O sensor eletroquímico planar foi projetado baseado em um sistema padrão de análise eletroquímica com três eletrodos sobre alumina, definidos por técnica de *screen-printed*, a saber (Figura 14):

- 1) eletrodo de detecção, medição ou trabalho (pasta de ouro DuPont® 5142);
- 2) eletrodo de referência (pasta prata/paládio DuPont® 6146 modificada por eletrodeposição de cloreto, para formar a junção Ag/AgCl);
- 3) eletrodo auxiliar de pasta de platina ESL 5545-LS ou de ouro DuPont® 5142.

Os contatos e interconexões foram confeccionados com a pasta de ouro e na passivação para isolamento elétrica, utilizou-se a pasta dielétrica DuPont® 9615.

A Figura 14 representa três diferentes geometrias para o sensor eletroquímico planar, contendo três eletrodos sobre um substrato de alumina retangular de 17,0 mm de largura e 43,0 mm de comprimento.

Figura 14 – Quatro tipos de sensores (MA, MB, MC e MD) apresentados em três diferentes geometrias.

Tabela 2 – Especificação da área geométrica de cada eletrodo do sensor.

Séries	Área dos eletrodos (mm ²)		
	Trabalho	Referência	Auxiliar
MA	4,5 ± 0,2	4,2 ± 0,7	59,8 ± 0,7
MB	1,5 ± 0,2	3,3 ± 0,7	25,5 ± 0,7
MC	1,1 ± 0,2	3,5 ± 0,7	22,8 ± 0,7
MD	1,5 ± 0,2	3,3 ± 0,7	25,5 ± 0,7

Os sensores das séries MA, MB, MC e MD foram definidos por tecnologia *screen-printed*, com diferentes geometrias dos eletrodos de medição (trabalho), de referência e auxiliar, cujas áreas são especificadas, em mm², na Tabela 2. O eletrodo auxiliar dos sensores da série MD foi confeccionado com pasta de ouro.

3.5 Limpeza-padrão da Superfície dos Eletrodos.

Após a definição dos eletrodos no sensor, é necessário ativar a superfície dos eletrodos, ou seja, eliminar todos os tipos de partículas aderidas (resíduos orgânicos, contaminantes iônicos, óxidos, hidróxidos ou metais) [68]. A limpeza da superfície dos eletrodos é importante tanto para eletrodos, a serem utilizados para eletrodeposição de filmes (obtenção de eletrodo de referência), como para eletrodos definidos com o material metálico exposto ou recoberto com polímero condutor, a serem utilizados para a análise (obtenção do eletrodo de trabalho).

Observa-se que as características elétricas dos filmes eletrodepositados estão diretamente relacionados com a boa qualidade da superfície em que o material será depositado, portanto, essa qualidade é fundamental para evitar possíveis defeitos no filme depositado. Além disso, os parâmetros-padrão em medição estão diretamente relacionados com uma limpeza efetiva da área exposta, processo também conhecido por ativação da superfície do eletrodo de trabalho [68].

A funcionalidade dos sensores depende do bom desempenho dos eletrodos de referência e de trabalho. Para tal, foi adotado um procedimento padrão de limpeza em três etapas, descritas nos itens 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3: limpeza física através de polimento mecânico com partículas de alumina visando remover material incrustado; limpeza química com álcool e acetona para eliminar compostos orgânicos e limpeza eletroquímica, processo que provê incremento extra de área efetiva exposta do eletrodo.

3.5.1 Limpeza Física

A limpeza física permite eliminar particulados grandes que estão aderidos sobre o filme espesso, seja pela manipulação ou pela exposição ao ambiente. Essa limpeza consistiu na seguinte sequência de etapas:

- Enxágue em água DI durante 5 min;
- Remoção das imperfeições (homogeneíza-se o filme de ouro serigrafado) com lixa 2500;
- Polimento mecânico utilizando um feltro impregnado em alumina coloidal 0,05 μm [69], por meio de 30 movimentos em forma de 8 ou até observar superfície brilhante e homogênea;
- Enxágue em água DI durante 1 min.

3.5.2 Limpeza Química

Esse tipo de limpeza foi realizado com álcool e acetona que possibilitam eliminar a contaminação orgânica (gorduras, óleos e outros), resíduos que atuariam como isolantes [68][70]. O álcool isopropílico (IPA) também promove a remoção de particulados de alumina remanescente da etapa de limpeza física que são ejetadas para a solução [71]. Em seguida, foi realizada uma limpeza em H_2SO_4 (1 mol L^{-1}) para remover partículas metálicas indesejadas sem retirar o ouro, platina e prata-paládio.

A seguir, descreve-se a sequência completa empregada na limpeza química:

- Imersão dos eletrodos em um béquer com acetona, durante 5 min, com agitação constante de 400 rpm;
- Enxágue em água DI, durante 1 min;
- Imersão dos eletrodos em álcool isopropílico (IPA) na temperatura de 80°C , durante 2 min, com agitação constante de 400 rpm;
- Enxágue em água DI, durante 1 min;

- Imersão dos eletrodos em um béquer com H_2SO_4 1 mol L^{-1} , durante 1 min, com agitação constante de 400 rpm;
- Enxágue em água DI, durante 1 min;

Observação: o sucesso dessa etapa de limpeza está em utilizar béqueres completamente limpos, pois, do contrário, as impurezas contidas no béquer poderão aderir na a superfície dos eletrodos [71].

3.5.3 Limpeza Eletroquímica

A limpeza eletroquímica tem um destaque importante no procedimento de limpeza, pois permite a eliminação de materiais adsorvidos na superfície do eletrodo e também possibilita aumentar a rugosidade dessa superfície, proporcionando mais aderência para a deposição de filmes e/ou maior área efetiva exposta, aumentando, conseqüentemente, o sinal de resposta das espécies que se deseja medir.

Geralmente, essa limpeza é realizada em meio básico ou ácido. Neste trabalho, escolheu-se utilizar soluções ácidas para evitar a formação de complexos da hidroxila com o ouro, no caso do uso de soluções básicas e preservar polímeros utilizados sobre o eletrodo de referência. O ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} foi escolhido por ser um ácido forte, isto é, com alta capacidade de dissociação e formação de íons de hidrogênio; além disso, a ação complexante do sulfato auxilia no processo de limpeza.

Esse tipo de limpeza costuma estar associada a dois processos [72]:

- Oxidação eletroquímica (corrosão) de uma fina camada de ouro, a potenciais maiores do que +0,8 $V_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$ 3M KCl;
- Formação de hidrogênio na superfície do eletrodo em potenciais negativos.

Devido a isso, escolheu-se a janela de potencial de limpeza entre +0,9 e -0,9 $V_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$ 3M KCl (em potenciais maiores do que +0,9 $V_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$ 3M KCl pode danificar a

superfície dos eletrodos). Utilizaram-se a técnica CV e a solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os parâmetros de entrada foram:

Potencial inicial = $+0,9 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial final = $-0,9 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial segundo vértice = $-0,9 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Velocidade de varredura = $0,3 \text{ V s}^{-1}$

Número de ciclos = 90

Potencial de repouso = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial de condicionamento = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Intervalo de tempo = 1 s

Ao final dos ciclos voltamétricos, a célula de análise foi desligada automaticamente via *software* e em seguida, foi realizado um enxágue em água DI durante 1 min e, depois, fez-se uma secagem com nitrogênio gasoso.

A obtenção de um eletrodo perfeitamente limpo significou estabelecer um compromisso entre o número de ciclos realizados e a maior janela possível de potencial varrido (ver nos resultados e discussões). O procedimento de limpeza eletroquímica, quando realizado para os eletrodos de trabalho, recebe o nome de ativação da superfície [68], pois, ao eliminar os particulados absorvidos, promove maior área efetiva exposta e, conseqüentemente, maior sensibilidade.

3.6 Caracterização do Eletrodo de Trabalho

A caracterização do eletrodo de trabalho permite obter sua área efetiva, ou seja, quantificar a área exposta em solução de análise. Isso possibilita calcular a sensibilidade e assegurar a reprodutibilidade do sensor. A partir da curva obtida pela técnica de análise eletroquímica CV, obtém-se a corrente de pico (**Ip**) e calcula-se a área efetiva exposta, pela equação 22 de Randles-Sevcik [31][3][42]:

$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C v^{1/2} \quad (22)$$

Nesta expressão, n é o número de elétrons transferidos, D_0 é a difusividade ($7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as espécies de ferricianeto de potássio), A (cm^2) é a área do eletrodo, C (mol cm^{-3}) é a concentração e v (V s^{-1}) é a velocidade de varredura.

Após a limpeza eletroquímica, realiza-se o procedimento de caracterização para mensurar a área efetiva exposta do eletrodo de trabalho em solução de ferrocianeto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Foi utilizado CV com os seguintes parâmetros de entrada:

Potencial inicial = $+0,6 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial final = $-0,2 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial segundo vértice = $-0,2 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Velocidade de varredura = $0,1 \text{ V s}^{-1}$

Número ciclos = 6

Potencial de repouso = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial de acondicionamento = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Intervalo de tempo = 1 s

Em seguida a célula de análise foi desligada automaticamente e, depois, foi realizado enxágue em água DI durante 1 min, seguido de secagem com nitrogênio gasoso ultra puro.

A caracterização permite obter a área efetiva exposta que será utilizada como variável para determinar a sensibilidade do eletrodo de trabalho. Com isso, pode-se estabelecer uma sequência de etapas para garantir a reprodutividade das unidades.

3.6.1 Superfície Não-modificada

Eletrodos com material metálico diretamente exposto ao meio de análise são altamente vulneráveis e reativos, pois o metal em contato com a solução gera um alto potencial de meia-cela e está mais propício a oclusão da superfície ativa por

impurezas e oxidação eletroquímica (corrosão do metal). Então, observa-se que esses eletrodos são altamente reativos mesmo quando fabricado com material inerte. Por exemplo em amostras bioquímicas, com a presença de cloreto na solução de análise ocorre a adsorção de íons Cl^- na superfície do ouro e da platina [73][74][75][76][77], elevando os níveis de corrente de base.

3.6.2 Superfície Modificada

Reduzir a reatividade da superfície dos eletrodos passou a ser um desafio para o avanço da tecnologia de sensores eletroquímicos, a partir da década de 1990. Nesse mesmo período, foram realizadas diferentes pesquisas de materiais para realizar a modificação de eletrodos. Os polímeros condutores ganharam expressivo destaque, pois são de fácil obtenção, tanto por eletrodeposição como por deposição física, utilizando, geralmente, um *dispenser*, são de boa reprodutividade e proporcionam maior estabilidade ao sensor.

Na literatura, encontra-se uma ampla gama de polímeros condutores, sendo os mais notáveis: PANI, DAB, DAN, Polipirrole, Pírol e Porfirinas [78]. Os polímeros estão distribuídos em dois grandes grupos de acordo com a função que desempenha no sensor. No primeiro é o dos polímeros seletivos capazes de otimizar ou proporcionar a medição de uma dada espécie eletroativa presente em um analito com interferentes; também permitem maior estabilidade, repetitividade e reprodutividade do sinal medido. No segundo, o dos polímeros eletrocatalíticos têm como característica amplificar (ganho) o sinal de medição e reduzir o potencial de medição, devido à oxidação concorrente do analito e polímero [79].

3.6.2.1 Polímeros Seletivos: Incremento em Estabilidade, Seletividade, Repetitividade e Reprodutividade

A modificação da superfície dos eletrodos de trabalho com materiais poliméricos condutores é uma alternativa para reduzir a influência dos interferentes e

a reatividade da superfície do metal, tornando esses eletrodos seletivos. Neste trabalho científico, o filme de 1-2 Diaminobenzeno (DAB) sobre a superfície do ouro puro é um exemplo de polímero seletivo empregado na análise de glicose e de nitrito. A principal característica desse polímero está em produzir uma membrana de boa reprodutividade e de fácil deposição. Este eletrodo de ouro revestido mostra-se interessante para medir uma ampla faixa de baixas concentrações de nitrito, reduzindo a influência dos interferentes abaixo do nível de concentração $0,18 \text{ mmol L}^{-1}$ [80].

3.6.2.2 Polímeros Eletrocatalisadores: Aumento em Sensibilidade

A porfirina de níquel 3 Metoxi - 4 Hidroxifenil NiTMHPP (MidCentury) foi utilizada com finalidade de proporcionar eletrocatalise pelo eletrodo de trabalho para amplificar a corrente elétrica, aumentando a sensibilidade. A Figura 15 mostra a estrutura química do composto [79].

Figura 15 – Representação do composto porfirinato de níquel: 3 metoxi - 4 hidroxifenil (NiTMHPP) [79].

O eletrodo de trabalho foi modificado através da polimerização do composto sobre a superfície por deposição eletroquímica utilizando a técnica de voltametria cíclica, na configuração do sistema de deposição com três eletrodos: eletrodo auxiliar de platina, o eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de (medição) trabalho (onde realizará a deposição do composto). A eletrodeposição foi realizada em duas etapas: a primeira para eletropolimerização da porfirina sobre a superfície do eletrodo, e a segunda para o condicionamento do filme depositado. As condições de entrada foram [79]:

a) Eletropolimerização;

Potencial inicial = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial final = +1,1 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de segundo vértice = +1,1 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Velocidade de varredura = 0,1 V s⁻¹

Número ciclos = 100

Potencial de repouso = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de acondicionamento = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Intervalo de tempo = 2 s

Célula desligada automaticamente, via *software*, após a eletropolimerização.

b) Condicionamento;

Potencial inicial = +0,4 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial final = +0,9 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de segundo vértice = +0,9 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Velocidade de varredura = 0,1 V s⁻¹

Número ciclos = 10

Potencial de repouso = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de acondicionamento = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Intervalo de tempo = 2 s

Célula desligada automaticamente, via *software*, após o condicionamento. Na sequência, foi feito o um enxágue em água DI, durante 1 min, seguido de secagem com nitrogênio gasoso.

A solução para a eletrodeposição das porfirinas foi preparada dissolvendo-se 9 mg do composto (NiTMPP, MidCentury) em 6 ml de NaOH (0,1 mol L⁻¹). A Figura 16 mostra os resultados obtidos na eletropolimerização e condicionamento.

Figura 16 – Deposição eletroquímica de porfirina de níquel sobre eletrodo de ouro do sensor “MA”: a) eletropolimerização; b) condicionamento.

Observa-se, na Figura 16a, que para cada varredura de potencial, a altura dos picos referentes ao processo de oxi-redução do níquel foi aumentando continuamente, sendo a cada altura do pico proporcional ao incremento de filme depositado.

3.6.3 Estudo da Permissividade em Eletrodos de Trabalho Modificados

A permissividade do sensor indica o quanto o polímero sobre o eletrodo de trabalho permite obter o sinal de medição do analito de interesse [81]. Calcula-se esse valor por meio do sinal medido no eletrodo com polímero dividido pelo sinal medido no mesmo eletrodo com metal exposto.

3.7 Obtenção do Filme de AgCl para Pseudo-eletrodo de Referência

O potencial do eletrodo de referência está relacionado com a estabilidade do sensor. Para verificar isso, é importante observar que o potencial de referência deve estar diretamente relacionado com a reversibilidade do filme de AgCl e, conseqüentemente, com as características de homogeneidade, aderência e estabilidade química do mesmo. Esse potencial deve ser conhecido e permanecer

estável e independente da solução em análise. Por outro lado, esse potencial pode ser conhecido através do equilíbrio termodinâmico reversível das reações redox (reação XVII).

Observa-se, da reação química de deposição de cloreto de prata (reação XI) que, para cada átomo de cloreto de prata depositado, é necessário um elétron que provém da oxidação da prata de estado sólido para estado iônico (reação X).

O potencial de referência apresentado depende da concentração das espécies de cloreto no eletrólito, por exemplo, devido a inserção de sais orgânicos como NaCl e KCl e das características do filme de cloreto depositado para formar o filme espesso de Ag/AgCl. Estas características são otimizadas com o decréscimo da densidade de corrente de eletrodeposição [82], seja por eletrodeposição potenciometria ou amperométrica.

3.7.1 Cálculo da Espessura do Filme de AgCl

Teoricamente, é possível determinar a espessura do filme de AgCl mediante a equação 23, abaixo. Essa equação descreve a relação da carga elétrica (Q) necessária para que se deposite uma espessura determinada (th) conhecendo-se a carga elétrica do elétron ($q = 1,602 \cdot 10^{-19}$ C) e o número de Avogrado ($6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), fatores estruturais do eletrodo: a área a ser depositada e fatores relativos à espécie a depositar; a massa molecular ($M_{AgCl} = 143,32 \text{ g mol}^{-1}$) e a densidade ($d_{AgCl} = 5,56 \text{ g cm}^{-3}$):

$$th = \frac{Q \cdot M}{q \cdot N_0 \cdot d \cdot A} \quad (23)$$

A deposição eletroquímica de cloreto de prata foi realizada utilizando um sistema amperométrico com três eletrodos; de trabalho, onde se aplica o potencial; de referência, que possui um potencial estável a ser referenciado; o auxiliar, que fecha o circuito elétrico em solução. Esse último drena ou fornece elétrons necessários para a reação do analito ocorrer na superfície do eletrodo de trabalho. A deposição eletroquímica foi realizada por TB, onde se aplica um potencial constante e observa-se a corrente elétrica em função do tempo.

Tabela 3 – Tempos estimados para obter espessuras de 0,5 a 5 μm de cloreto de prata, em relação com a carga elétrica integrada e a densidade de deposição eletroquímica.

Espessura (μm) ==>		5	2,5	1,25	0,5
Carga (C) ==>		$7,48 \cdot 10^{-2}$	$3,74 \cdot 10^{-2}$	$1,87 \cdot 10^{-2}$	$7,8 \cdot 10^{-3}$
j (Densidade) (mA cm^{-2})	Corrente verificada para área de $4 \cdot 10^{-2}$ cm^2 (A)	Tempo estimado de deposição eletroquímica de Cloreto 1/4 da espessura de Ag (s)			
10	$4,00 \cdot 10^{-4}$	187,07	93,53	46,77	18,71
9,5	$3,80 \cdot 10^{-4}$	196,91	98,46	49,23	19,69
9	$3,60 \cdot 10^{-4}$	207,85	103,93	51,96	20,79
8,5	$3,40 \cdot 10^{-4}$	220,08	110,04	55,02	22,01
8	$3,20 \cdot 10^{-4}$	233,83	116,92	58,46	23,38
7,5	$3,00 \cdot 10^{-4}$	249,42	124,71	62,36	24,94
7	$2,80 \cdot 10^{-4}$	267,24	133,62	66,81	26,72
6,5	$2,60 \cdot 10^{-4}$	287,80	143,90	71,95	28,78
6	$2,40 \cdot 10^{-4}$	311,78	155,89	77,94	31,18
5,5	$2,20 \cdot 10^{-4}$	340,12	170,06	85,03	34,01
5	$2,00 \cdot 10^{-4}$	374,13	187,07	93,53	37,41
4,5	$1,80 \cdot 10^{-4}$	415,70	207,85	103,93	41,57
4	$1,60 \cdot 10^{-4}$	467,67	233,83	116,92	46,77
3,5	$1,40 \cdot 10^{-4}$	534,48	267,24	133,62	53,45
3	$1,20 \cdot 10^{-4}$	623,56	311,78	155,89	62,36
2,5	$1,00 \cdot 10^{-4}$	748,27	374,13	187,07	74,83
2	$8,00 \cdot 10^{-5}$	935,33	467,67	233,83	93,53
1,5	$6,00 \cdot 10^{-5}$	1247,11	623,56	311,78	124,71
1	$4,00 \cdot 10^{-5}$	1870,67	935,33	467,67	187,07
0,5	$2,00 \cdot 10^{-5}$	3741,34	1870,67	935,33	374,13
0,4	$1,60 \cdot 10^{-5}$	4676,67	2338,34	1169,17	467,67
0,3	$1,20 \cdot 10^{-5}$	6235,56	3117,78	1558,89	623,56
0,2	$8,00 \cdot 10^{-6}$	9353,35	4676,67	2338,34	935,33
0,1	$4,00 \cdot 10^{-6}$	18706,69	9353,35	4676,67	1870,67
0,05	$2,00 \cdot 10^{-6}$	37413,38	18706,69	9353,35	3741,34
0,025	$1,00 \cdot 10^{-6}$	74826,77	37413,38	18706,69	7482,68

É importante notar que a espessura do cloreto de prata está necessariamente relacionada com a espessura de prata remanescente, pois, para depositar o filme espesso de AgCl, deve-se consumir prata na taxa de 1/3 [28][83]. De acordo com a literatura, um valor mínimo de espessura de cloreto de prata está na ordem de ¼ da espessura total de prata [28].

A Tabela 3 indica o tempo estimado de deposição eletroquímica para cloreto de prata, relacionando-o com a densidade e com a carga integrada para espessuras de 0,5 a 5 μm . Observa-se que os cálculos foram realizados para eletrodos com área igual de $4 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$. Neste trabalho, foi corrigido o valor de corrente de deposição de cloreto de prata para cada eletrodo especificado.

Observação: neste trabalho, foi utilizada pasta compósita de prata-paládio para definir os eletrodos de referência. Logo, espera-se um relativo desvio da espessura obtida em relação à espessura teórica. Sabe-se que a porcentagem em massa de paládio está entre 4 a 5 % comprovada pela técnica semi-quantitativa EDS (do inglês, *Energy Dispersive x-ray Spectrometer*).

3.7.2 Verificação do Potencial de Deposição Eletroquímica do Filme Espesso de AgCl

Para verificar o potencial de deposição eletroquímica de cloreto sobre prata/paládio, utilizou-se a técnica LSV com velocidade de varredura 1 mV s^{-1} (mínima possível que possibilita obter potenciais de deposição próximos de um método estacionário). A janela de potencial aplicada foi de 0 a $1 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$.

Neste estudo, obter filmes de AgCl com características adequadas implica considerar a espessura do filme depositado em função da carga iônica integrada e da densidade de deposição. Esse compromisso proporciona boa qualidade do filme espesso de AgCl. A verificação do potencial de deposição eletroquímica de cloreto foi realizada em solução HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As condições experimentais de entrada foram:

Potencial inicial = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial final = 1 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Velocidade de varredura = 1 mV s⁻¹

Potencial de repouso = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de condicionamento = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}.

Intervalo de tempo = 1 s

Célula desligada automaticamente, via *software*, após o término do ciclo.

A Figura 17 ilustra o voltamograma linear para determinar o potencial de eletrodeposição de cloreto de prata.

Figura 17 – LSV indicando a curva de oxidação na formação do filme espesso de AgCl, para a densidade de 0,5 mA cm⁻² observa-se o potencial de deposição eletroquímico.

O gráfico LSV, experimentalmente obtido, indica o potencial de deposição igual a 0,86 V_{Ag/AgCl 3M KCl} para uma densidade de 0,5 mA cm⁻², que corresponde a uma corrente elétrica de 20 µA. Esse potencial pode variar de acordo com as características da superfície do eletrodo e com a degradação da solução de HCl.

3.7.3 Deposição Eletroquímica do Filme de Cloreto de Prata.

A deposição eletroquímica do filme espesso de cloreto de prata mostrou-se como uma etapa crítica no processo de fabricação de completo ou de pseudo-eletrodos de referência. Após verificar o potencial de eletrodeposição, por meio da técnica LSV, observa-se que o início da ocorrência da oxidação da prata está compreendido a uma densidade de corrente elétrica entre 0,1 a 0,5 mA cm⁻², sendo que Janz considera, em seus estudos, excelente a densidade de eletrodeposição de 0,4 mA cm⁻² para filme fino de AgCl [28]. Porém, para os testes realizados, neste trabalho, o melhor resultado foi para a densidade de corrente de 0,5 mA cm⁻², a qual promove boas características do filme espesso de cloreto de prata no potencial de 0,86 V_{Ag/AgCl 3M KCl}.

Todos os filmes de cloreto de prata foram depositados utilizando TB, onde o potencial de deposição eletroquímica de cloreto foi de 0,86 V_{Ag/AgCl 3M KCl}. Fixou-se este potencial por aproximadamente 34 min para obter uma carga integrada de 935 mC que corresponde a uma espessura da ordem de 5 µm de AgCl (espessura considerada mais adequada para manter a relação de ¼ da camada de AgPd, na ordem de 20 µm, com o filme de AgCl) [28].

A fim de garantir boa qualidade de deposição eletroquímica de cloreto de prata utilizando a solução HCl 0,1 mol L⁻¹, seguiram-se exatamente os seguintes passos:

- i) utilizou-se um béquer limpo em água DI;
- ii) fez-se a deposição eletroquímica em agitação constante de 400 rpm;
- iii) utilizou-se sempre a solução preparada no mesmo dia e substituída a cada novo processo.

Todas as deposições eletroquímicas de cloreto de prata foram realizadas utilizando a técnica eletroquímica TB. Essa técnica fixa um potencial constante em função do tempo.

As condições experimentais empregadas foram:

Potencial = 0,86 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de repouso = 0,86 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de condicionamento = 0,86 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Intervalo de tempo = 1 s

Tempo = 2000 s

Agitação = 400 rpm

Célula desligada automaticamente, via *software*, após o término dos ciclos.

Figura 18 – Curva típica da deposição eletroquímica de cloreto em HCl 0,1 mol L⁻¹.

A Figura 18 mostra a curva de deposição eletroquímica por TB para formar o filme de cloreto de prata de 5 µm de espessura. Inicialmente, com uma alta corrente devido à dupla camada elétrica do eletrodo em solução, que tende à estabilização, de acordo com a formação do filme espesso de AgCl. Com o passar do tempo, a corrente tende a um comportamento, praticamente, constante em que assume a densidade de carga de 0,5 mA cm⁻².

3.7.4 Secagem

Concomitantemente com a formação do filme de AgCl em baixa densidade de corrente, acontece a solvatação do mesmo, adsorvendo cloretos [34]. Com a ação da luz, o filme passa por diferentes estágios de cor [28]. Neste trabalho de mestrado foi observado que a tonalidade escura (preta) indica melhor estabilidade química e física do filme de cloreto de prata.

Durante a deposição do AgCl observa-se uma cor cinza escuro (depende da baixa densidade de corrente que fornece homogeneidade, aderência e dureza adequada e do tempo de deposição eletroquímica que permite o controle da espessura). Após deixar o eletrodo secar por um dia, à temperatura ambiente (20 a 25 °C) e exposto à luz, o filme assume características estáveis, porém há a necessidade de acondicionar o filme para obter as condições mais profícuas.

3.7.5 Acondicionamento do Filme Espesso de AgCl

Neste trabalho, foi descrito o processo de obtenção do eletrodo de referência por deposição eletroquímica de cloreto sobre AgPd formando o filme espesso de AgCl. Durante a deposição, podem ocorrer efeitos indesejáveis, a saber [84]: pontos de ausência do filme de AgCl, devido a resquícios de material adsorvido, orgânicos ou particulados; regiões com formação de nódulos de AgCl (deposição desuniforme do filme); alta rugosidade; limitada aderência do filme de AgCl recém-depositado.

Realizou-se três testes de acondicionamento: a) uma solução salina distinta NaCl e KCl (3 mol L^{-1}): b) solução comercial Orion de KCl com AgCl; c) soro fisiológico. Em todos os casos, houve uma melhora significativa das características do filme de cloreto depositado sobre a prata, proporcionando maior homogeneidade e aderência. Porém, o soro fisiológico apresentou o melhor resultado comparado com as soluções de NaCl e KCl (3 mol L^{-1}) e de KCl com AgCl (solução comercial Orion).

Após o acondicionamento do filme de AgCl, foi possível obter uma curva de reversibilidade do Ag/AgCl com mínima histerese; consequentemente, obteve-se eletrodos de referência com potencial de eletrodo mais estável e confiável em função do tempo. Dessa forma, será possível integrá-los a sensores de monitoramento em tempo real e *in situ*, adequados para serem utilizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI).

Objetivando eliminar defeitos pontuais e regiões de nódulos [31][33], e reduzir a rugosidade, visando obter maior homogeneidade e aderência do filme espesso de AgCl, acondicionou-se o pseudo-eletrodo de referência, logo após a clorinização, para analisar quatro diferentes soluções: de KCl (3 mol L^{-1}), de NaCl (3 mol L^{-1}), soro fisiológico e solução comercial Orion de KCl com AgCl. A Figura 19 mostra fotos obtidas a partir de um microscópio óptico para as amostras de AgCl acondicionadas em soro fisiológico durante 3 dias.

Figura 19 – Para um mesmo eletrodo de referência, antes e após o acondicionamento do filme de AgCl durante 3 dias em soro fisiológico.

Das soluções utilizadas para acondicionamento, verificou-se que melhor procedimento foi obtido com soro fisiológico [31]. Esse atacou muito pouco o AgCl e proporcionou alta homogeneização do filme espesso de AgCl. Com isso, obteve-se filmes com mais aderência e estabilidade [84]. Para soluções salinas concentradas, a alta concentração de cloreto aumenta a taxa de corrosão do filme de AgCl, expondo a camada de prata. A solução comercial Orion de KCl com AgCl apresentou resultados similares aos do soro fisiológico, porém, é inadequada para

uso em eletrodos em integração, pois se observa-se uma fina camada de prata depositada sobre os eletrodos de trabalho e auxiliar de ouro.

De acordo com a literatura [31][70][84], é melhor, após a clorinização, deixar o eletrodo de referência secar e, em seguida, acondicioná-lo em solução de cloreto [31]. Em nossos testes considerou-se satisfatório secar o filme de AgCl, em temperatura entre 20 a 25 °C, durante um dia e, em seguida, mantê-la em solução durante três dias e então secar novamente por um dia, na mesma faixa de temperatura [70]. Esse procedimento resultou em eletrodos com melhor uniformidade do filme de cloreto de prata (Figura 20) e, conseqüentemente, com um potencial estável ao longo do tempo, em relação a um eletrodo de referência comercial.

Figura 20 – Observa-se o efeito da secagem e do acondicionamento em solução comercial Orion utilizando microscópio com aumento de 5x: a) campo claro; b) e c) campo escuro, sem e com acondicionamento, respectivamente [70].

O procedimento de secagem e de acondicionamento mostrou um considerável aumento da densidade do filme espesso de cloreto de prata, o que possibilita reduzir efeitos indesejáveis, melhorando a uniformidade do mesmo [70]. Com isso, obteve-se pseudo-eletrodos de referência de Ag/AgCl com potenciais estáveis e com baixa degradação ao longo do tempo, sendo, portanto, indicados para integração em sensores planares.

3.7.6 Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl com Membrana de Náfion[®] 117

A grande vantagem dos pseudo-eletrodos de referência é a ausência de uma membrana porosa para contato iônico entre o eletrólito e o analito. Por outro lado, o filme de AgCl fica exposto à solução de análise e isso acarreta dois fatos negativos: a) intensifica a corrosão desse filme pela ação do cloreto nos defeitos pontuais e nas regiões de nódulos (AgCl depositado desuniformemente); b) torna o potencial de referência dependente da concentração de cloreto.

Para minimizar a corrosão do AgCl, optou-se pelo acondicionamento do filme de AgCl em solução salina (soro fisiológico). A presença do cloreto, em baixas concentrações, permite otimizar a homogeneidade e a aderência, aumentando a estabilidade do potencial do eletrodo. Recentemente, publicamos um trabalho [85], sobre a utilização da membrana de Náfion[®] 117 sobre o filme acondicionado, onde foi observado a redução da sensibilidade à concentração de cloreto, resultando em um eletrodo de referência mais estável.

Figura 21 – Diferentes estágios do filme de AgCl na fabricação de eletrodos de referência: a) recém-depositado; b) secado e acondicionado; c) recoberto com uma membrana de Náfion[®] 117 [85].

A Figura 21 mostra visualmente o resultado qualitativo nas diversas etapas, desde a recém-depositação até o recobrimento com uma membrana de Náfion[®] 117. Nas imagens, observou-se três grupos: 1) filme de AgCl recém-depositado (Figura 21a); 2) filme espesso de AgCl secado durante 1 dia, acondicionado em soro fisiológico durante 3 dias e secado novamente durante 1 dia (Figura 21b); 3) filme de AgCl recoberto com uma membrana de Náfion[®] 117 (Figura 21c).

3.8 Caracterização do Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl

A caracterização do eletrodo de referência é fundamental para obter medições confiáveis no eletrodo de trabalho. O processo de caracterização foi feito de maneira padronizada em três etapas.

3.8.1 Reversibilidade da Junção Ag/AgCl

Primeira etapa da caracterização do eletrodo de referência: verifica-se o teste de reversibilidade do eletrodo fabricado com relação a um referência comercial. O resultado esperado é uma resposta linear entre a corrente de oxidação e redução em relação ao mesmo potencial aplicado.

3.8.2 Evolução do Potencial de Referência em Função da Concentração de Cloretos

Segunda etapa da caracterização do eletrodo de referência: observa-se a evolução do potencial de referência em função da concentração de cloreto com relação a um referência comercial. O resultado esperado deve indicar uma linearidade entre o potencial e a concentração com $59 \text{ mV p}^{-1} \text{ Cl}^-$ de declive.

3.8.3 Estabilidade Termodinâmica do Potencial de Referência em Função do Tempo

Terceira etapa da caracterização do eletrodo de referência: é feito um teste de estabilidade termodinâmica do potencial de referência em função do tempo com relação a um referência comercial. Espera-se que ocorra mínima degradação possível, ou seja, um potencial estável em função do tempo. Nessa etapa, calculou-se a pendente de degradação do eletrodo de referência fabricado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões que conduziram à qualificação e quantificação das espécies de nitrito, incluindo a influência do procedimento de limpeza, fabricação e caracterização dos eletrodos de trabalho e de referência, análise do ganho em função da área efetiva exposta dos eletrodos, análise eletroquímica do nitrito e dos seus interferentes, monitoração do nitrito por FIA-automatizada e estudos de seletividade, sensibilidade, estabilidade, vida útil, armazenamento e descarte do sensor.

4.1 Da influência dos Procedimento de Limpeza-padrão na Superfície dos Eletrodos

Os eletrodos recém definidos e sinterizados apresentaram uma superfície do metal com resquícios de impurezas e materiais residuais presentes na pasta compósita (vidro e metal). A Figura 22 mostra as imagens obtidas por microscopia óptica de um mesmo eletrodo de trabalho antes da limpeza física em (Figura 22a) e após a limpeza física em (Figura 22b).

Figura 22 – Comparação da superfície do mesmo eletrodo de trabalho (ouro); a) antes da limpeza física e b) depois da limpeza física utilizando um pincel suave impregnado em alumina coloidal 0,05 µm.

Nota-se antes da limpeza filme mais rugoso e pontos escuros que indicam presença de material particulado grosseiro. Depois da limpeza física com pincel

suave impregnado em alumina coloidal 0,05 μm , o material particulado grosseiro foi removido.

A Figura 23 mostra uma sequência de imagens realizadas por MEV (Microscopia Eletrônica por Varredura) do eletrodo sem qualquer limpeza: em todos os eletrodos, a pasta compósita sinterizada uma morfologia superficial com asperezas e material particulado de alguns microns de tamanho como observado no maior aumento de (10000x).

Figura 23 – Eletrodos sem limpeza: “a”, “b”, “c” – eletrodo de trabalho com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente; “d”, “e”, “f” – eletrodo de referência Ag/AgCl com Náfion® 117 com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente. “g”, “h”, “i” – eletrodo auxiliar com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente.

Sabe-se que a área efetiva exposta está diretamente relacionada com a resposta em corrente do sensor. Também é conhecido que impurezas adsorvidas nas superfícies dos eletrodos podem causar oclusão de área efetiva exposta

reduzindo a corrente medida. Na Figura 24, observa-se a superfície logo após o processo de limpeza física e química dos eletrodos do sensor. Identificou-se uma maior homogeneidade da superfície da pasta compósita, principalmente, no eletrodo de medição o que é indicativo de menor rugosidade, comparando com a amostra sem limpeza.

Figura 24 – Eletrodos sem limpeza: “a”, “b”, “c” – eletrodo de trabalho com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente; “d”, “e”, “f” – eletrodo de referência Ag/AgCl com Náfon[®] 117 com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente. “g”, “h”, “i” – eletrodo auxiliar com ampliações de 1000x, 5000x e 10000x, respectivamente.

As figuras 25, 26 e 27 mostraram as análises EDS (do inglês, *Energy Dispersive x-ray Spectrometer*) correspondentes a cada eletrodo. Como era esperado, no eletrodo de trabalho foi detectado apenas sinais de ouro (Figura 25); no eletrodo de referência Ag/AgCl recoberto com Náfon[®] 117 só foi detectar Ag, F e Cl (Figura 26) e no eletrodo auxiliar foi detectado platina. Dessa forma, foi

confirmada a presença majoritária dos metais correspondentes às pastas empregadas na fabricação dos eletrodos conforme especificado no item 3.2.3.

Em particular, o eletrodo de referência encontrou-se a porcentagem em massa de flúor, cloreto, prata e paládio igual a 41,21; 12,67; 41,82 e 4,30 %, respectivamente. O flúor é devido à camada de Náfion[®] 117 empregada no recobrimento do eletrodo, sendo que as porcentagens obtidas para Ag/AgCl são compatíveis com o filme AgCl.

Figura 25 – EDS na superfície do eletrodo de medição de ouro.

Figura 26 – EDS na superfície do eletrodo de referência Ag/AgCl com Náfion[®] 117.

Figura 27 – EDS na superfície do eletrodo auxiliar de platina.

A Figura 28 e 29 mostra o gráfico obtido durante o processo de limpeza eletroquímica do filme espesso de prata/paládio (eletrodo de referência) e ouro, respectivamente. Após as limpezas eletroquímicas, não foi observado mudanças substanciais na morfologia superficial comparado às imagens já apresentadas na Figura 24.

Figura 28 – Limpeza eletroquímica padrão do eletrodo de referência (prata/paládio), realizando 90 ciclos com velocidade de varredura de $0,3 \text{ V s}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 29 – Limpeza eletroquímica padrão do eletrodo de trabalho (ouro), realizando 90 ciclos com velocidade de varredura de $0,3 \text{ V s}^{-1}$ em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

No final da limpeza-padrão (física, química e eletroquímica) tem-se o eletrodo com mínima impureza superficial, reduzindo a oclusão da superfície dos eletrodos de medição (trabalho) e garantindo máximo incremento de corrente de medição para as espécies a serem analisadas.

4.2 Da Caracterização dos Pseudo-eletrodos de Referência

Depois de acondicionar e secar o eletrodo de referência, esse foi caracterizado quanto ao teste de reversibilidade, à estabilidade termodinâmica do potencial em função do tempo e da concentração de cloreto; e quanto à estabilidade eletroquímica em um sistema de três eletrodos. O resultado dessas caracterizações depende das condições de acondicionamento em solução salina, na qual, com o decorrer do tempo em solução, o eletrodo de referência deve estabilizar-se convergindo para valores próximos, em módulo, entre corrente de oxidação e de redução relacionados com o potencial aplicado.

Um eletrodo de referência é considerado eficiente quando se obtém a mesma corrente de oxidação e de redução para um mesmo potencial redox aplicado. Qualquer anomalia da corrente redox indica uma alteração do potencial de eletrodo, ou seja, ocorre uma discrepância devido ao efeito de histerese que indica irreversibilidade da reação redox [31]. A curva esperada deve apresentar um comportamento linear da corrente em função do potencial[6].

A irreversibilidade da reação redox significa uma disfunção do eletrodo de referência relacionado com a qualidade da deposição eletroquímica do filme espesso de cloreto de prata que pode estar associado às propriedades de aderência, de homogeneidade e de dureza [28]. O teste de reversibilidade foi realizado corriqueiramente no presente trabalho utilizando a técnica de Voltametria Cíclica, em que se levanta o comportamento do potencial em função da corrente de oxidação e de redução [6].

A histerese relacionada ao potencial medido pode ser obtida pela diferença entre potenciais de intersecção com o eixo da abscissa (no potencial nulo). Por outro lado, histerese com relação à corrente de corrosão é mensurada pela diferença entre os valores de corrente de oxidação e de redução na intersecção com o eixo da ordenada (para a corrente nula).

Todos os processos de caracterização dos eletrodos de referência fabricados foram realizados com relação a um eletrodo de referência comercial Ag/AgCl, o qual é conectado na entrada correspondente ao de referência mantida curto-circuitada com a entrada do auxiliar no equipamento BAS².

² Entrada do eletrodo de referência curto-circuitada com a do eletrodo auxiliar significa procedimento adequado para realização do teste de reversibilidade. Esse teste quando realizado utilizando as três entradas (trabalho, referência e auxiliar) há rompimento do filme AgCl.

Figura 30 – Resultado do teste de reversibilidade quando não se conectou devidamente o eletrodo de referência curto-circuitado com a entrada do eletrodo auxiliar [70].

A Figura 30 indica o rompimento do filme de AgCl quando se conectou indevidamente o sistema de eletrodos. Observa-se que a corrente elétrica em excesso, fluindo pelo filme, provoca uma corrosão acelerada em alguns pontos do mesmo, expondo a superfície de prata.

4.2.1 Estabilização e Teste de Reversibilidade do Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl em Solução de NaCl (3 mol L⁻¹)

A caracterização do eletrodo de referência permite assegurar estabilidade, repetitividade e reprodutividade da medição a ser realizada pelo sensor (eletrodo de trabalho). Após o acondicionamento, é necessário caracterizar o eletrodo de referência para obter a curva de reversibilidade e extrair a histerese associada ao potencial e à taxa de corrosão.

Para obter a curva de reversibilidade, inicialmente é feito um processo de estabilização do filme espesso de AgCl do eletrodo de referência. Para tanto, faz-se um CV em solução agitada a 400 rpm de NaCl (3 mol L⁻¹) com uma rampa de

potencial entre o eletrodo de referência fabricado e o comercial, de acordo com as especificações de entrada, a saber:

Potencial inicial = $-0,3 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial final = $+0,3 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial segundo vértice = $-0,3 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Velocidade de varredura = $0,3 \text{ V s}^{-1}$

Potencial de repouso = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial de condicionamento = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Intervalo de tempo = 1 s

50 ciclos;

Célula desligada automaticamente, via *software*, após o término dos ciclos.

A curva de estabilização de imediato apresenta uma histerese tal que, no decorrer da estabilização, a corrente de oxidação e de redução tendem a um potencial aproximadamente igual. Essa redução de histerese significa irreversibilidade aceitável, cujo resultado após estabilização está em $\Delta V = 6 \text{ mV}$ e $\Delta I = 4 \text{ }\mu\text{A}$, compatível com trabalhos publicados recentemente [6][31][33][70][84][85].

Em seguida, realiza-se o teste final de reversibilidade, também por CV e em solução de NaCl (3 mol L^{-1}), agitada a 400 rpm, através de uma rampa de potencial entre o eletrodo de referência fabricado e o comercial, de acordo com as especificações de entrada a seguir:

Potencial inicial = $-0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial final = $+0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial segundo vértice = $-0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Velocidade de varredura = $0,1 \text{ V s}^{-1}$

Potencial de repouso = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Potencial de condicionamento = $0 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$

Intervalo de tempo = 1 s

6 ciclos;

Célula desligada automaticamente, via *software*, após os ciclos de varreduras. A histerese final apresentada para os eletrodos de referência ficaram na ordem de

$\Delta V = 4 \text{ mV}$; $\Delta I = 3 \text{ }\mu\text{A}$, (Figura 31). Esse resultado é compatível com o que é apresentado por Horwood [29] para estabelecimento da reversibilidade.

Figura 31 – Curva padrão obtida para o teste de reversibilidade do eletrodo de referência Ag/AgCl fabricado em relação a um eletrodo de referência Ag/AgCl comercial BAS, foi realizado 6 ciclos com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em solução de NaCl 3 mol L^{-1} .

Por outro lado, é importante destacar que a resposta da reação redox reversível (Figura 31) indica um filme homogêneo de AgCl, com boa aderência e com um efeito de histerese discreto, ou seja, mínima irreversibilidade da ordem de $4 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ [31][29].

4.2.2 Variação do Potencial de Referência com Relação à Concentração de Cloreto

A resposta do potencial de eletrodo em função da variação da concentração de cloreto em solução possibilita verificar a estabilidade do filme espesso de AgCl. A curva da estabilidade termodinâmica do potencial de eletrodo em função da concentração de cloreto permite calcular o coeficiente de Nernst, que estabelece a variação do potencial com a concentração de cloreto (equação 24).

Na prática, o eletrodo de cloreto de prata é sensível à concentração de cloreto para uma faixa $2 \cdot 10^{-4}$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ [86]. O potencial de equilíbrio do eletrodo de referência está associado com a capacidade redox da reação química (reação XVII) que se relaciona com a atividade dos íons de cloreto em solução, como previsto pela equação de Nernst.

$$E(0) = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln a_{\text{Cl}^-} \quad (24)$$

Na expressão acima:

$E(0)$ = potencial de referência

E^0 = potencial padrão de eletrodo

R = constante universal dos gases; $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

T = temperatura absoluta

n = número de elétrons na reação redox

F = constante de Faraday; $9,648 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$

a_{Cl^-} = atividade dos íons de cloreto em solução, sendo $a = \gamma \cdot [\text{Cl}^-]$

Para temperatura de 25°C , o potencial do eletrodo é dado por:

$$E_{\text{Ag/AgCl}} = +0,2224 - \frac{0,0592}{n} \log a_{\text{Cl}^-} = +0,2224 + 0,0592 \text{pCl}^- \quad (25)$$

Mantendo constante a concentração de íons cloreto em solução, a temperatura e o pH, resulta em um potencial de eletrodo invariável [87]. Esse é um fundamento básico para eletrodos de referência, mas os pseudo-eletrodos de referência são sensíveis à concentração de cloreto o que está relacionado com a funcionalidade do filme espesso de AgCl. A seguir, mostramos a influência da variação da concentração de cloreto (Figura 32).

Figura 32 – Resposta à concentração de íons cloreto em solução: a) tensão medida onde os degraus representam a variação do potencial com a variação da concentração de cloreto; b) potencial vs. pCl^- .

A cada adição de cloreto, há um incremento na resposta do eletrodo (Figura 32a); o declive de Nernst ($59 \text{ mV } pCl^-^{-1}$) indica ausência de degradação do eletrodo de referência [86]. Um valor distinto deste representaria baixa performance do filme espesso de AgCl.

Tabela 4 – Repetitividade para vários eletrodos de referência.

Séries	Origem Ordenada [V]	Declive [$V \text{ } pCl^-^{-1}$]	Linearidade
MA	-0,043	0,058	0,999
MB	-0,044	0,059	0,999
MC	-0,042	0,059	0,999
MD	-0,043	0,059	0,999

Os resultados indicados na Tabela 4 mostraram uma boa qualidade do filme espesso de AgCl, apresentando um declive de $59 \text{ mV } pCl^-^{-1}$ e um coeficiente de linearidade aceitável (próximo a 1), demonstrando um ótimo desempenho do eletrodo de referência fabricado.

4.2.3 Verificação da Estabilidade Termodinâmica do Potencial de Referência ao Longo do Tempo em Soro Fisiológico

A análise da estabilidade termodinâmica do potencial do eletrodo de referência em função do tempo foi obtida pela comparação com um eletrodo de referência comercial de potencial estável e conhecido. A seguir, apresentamos os resultados da evolução do potencial de referência em função do tempo para os dois grupos de eletrodos: filme AgCl recém-depositado e filme AgCl acondicionado em soro fisiológico e recoberto com membrana de Náfon[®] 117.

i) No caso do filme de AgCl recém-depositado, observa-se que o filme após a deposição eletroquímica pode apresentar alguns defeitos pontuais, ou seja, ausência do filme de AgCl devido a resquícios de material adsorvido, orgânicos ou particulados. Algumas regiões apresentam formação de nódulos de AgCl (deposição desuniforme do filme) e, eventualmente, devido a moléculas de água e microbolhas de ar aprisionados na estrutura do filme. Esses fatores contribuem para um processo de desestabilização em que se verifica o decaimento do potencial medido em relação a um eletrodo de referência comercial ao longo do tempo em soro fisiológico. Observou-se um potencial relativamente constante a partir da 15^a hora, da ordem de $150 \pm 6 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl}}$ (Figura 33a).

ii) Para o filme de AgCl acondicionado em soro fisiológico e recoberto com uma membrana de Náfon[®] 117, a adsorção do cloreto reduz efeitos indesejáveis (defeitos pontuais, regiões de nódulos) e remove material orgânico e particulado adsorvido. Isso possibilita potencial mais estável ao longo do tempo e independente dos íons cloreto presentes na solução. O potencial medido em relação a um eletrodo de referência comercial foi da ordem de $100 \pm 6 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl}}$ (Figura 33b).

Figura 33 – Medição realizada em soro fisiológico. a) filme de AgCl recém-depositado; b) filme de AgCl acondicionado em soro fisiológico e recoberto com membrana de Náfon[®] 117.

Os testes realizados para pseudo-eletrodos de referência foram satisfatórios, quando recoberto com Náfon[®] 117 observou-se uma estabilidade sem degradação da membrana. A Tabela 5, a seguir, resume os valores dos parâmetros extraídos do procedimento de caracterização.

Tabela 5 – Parâmetros de caracterização extraídos para os três eletrodos de referência.

Séries	Histerese - Irreversibilidade (mV)	Declive [Cl ⁻] (mV p ⁻¹ Cl ⁻)	Potencial Termodinâmico (mV _{Ag/AgCl Náfon[®] 117})
MA	3,8	58	100 ± 6
MB	3,6	59	102 ± 6
MC	3,9	59	104 ± 6
MD	3,8	59	98 ± 6

A irreversibilidade, ou seja, histerese associada ao teste de reversibilidade denota o quanto a reação redox é irreversível. O declive relacionado com a concentração de cloreto indica um coeficiente de Nernst que permite inferir sobre as características da superfície do filme espesso depositado. A deriva do mesmo fornece a informação de estabilidade e quanto o eletrodo degrada em função do tempo [87].

4.2.4 Aplicação do Pseudo-referência Ag/AgCl Fabricado em um Sistema Eletroquímico de Três Eletrodos

Neste tópico, são apresentados os resultados dos sistemas eletroquímicos de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ouro), eletrodo de referência Ag/AgCl fabricado e eletrodo auxiliar (platina). Por meio de um sistema amperométrico utilizando a técnica TB, aplicou-se um potencial fixo de $0,75 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$ e realizou-se cinco medições de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ferrocianeto de potássio em $\text{KNO}_3 \text{ } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, obtendo uma curva linear da corrente vs. a concentração de Fe(II) sem descontar o sinal de linha base (Figura 34).

Figura 34 – a) curva experimental com cinco adições de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ferrocianeto de potássio em $\text{KNO}_3 \text{ } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; b) curva da corrente vs. concentração de cloreto e os respectivos desvio padrão (SD) e regressão linear (R).

Os resultados demonstram uma regressão linear com coeficiente de correlação com três noves após a vírgula, portanto uma indicação de estabilidade eletroquímica do eletrodo de referencia fabricado. Esse teste permitiu verificar o funcionamento do eletrodo de referência fabricado em um sistema eletroquímico de três eletrodos. Qualquer variação inesperada pode ser atribuída ao eletrodo de referência, pois os eletrodos de trabalho e auxiliar de platina são inertes.

4.3 Da Caracterização dos Eletrodos de Trabalho

A caracterização eletroquímica dos eletrodos de medição permite quantificar a área efetiva exposta, a qual corresponde à área ativa que influi diretamente na resposta eletroquímica das espécies em oxi-redução. Neste trabalho, para cálculo da área efetiva exposta optou-se pela inserção do valor de pico médio na equação 11, ou seja, a média dos valores de pico anódico e catódico. Portanto, o procedimento apresentado possibilitou a obtenção do valor de área mais fidedigno.

4.3.1 Etapa 1: Após o processo *Screen-printed*

No processo de caracterização; verificar a área efetiva exposta antes da ativação da superfície por meio da limpeza padrão permite obter a informação do grau de passivação dos eletrodos de medição. E, posteriormente, após a limpeza, permite calcular o ganho de área efetiva exposta, consequentemente, o incremento de corrente no sinal de medição.

Figura 35 – Resposta padrão de 6 ciclos voltamétricos com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em ferrocianeto de potássio para cada sensores MA, MB, MC e MD sem limpeza-padrão, área efetiva indicada na Tabela 6.

A Figura 35 indica os voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de +0,80 a -0,20 V_{Ag/AgCl 3M KCl} com velocidade de varredura 0,1 V s⁻¹ em 0,1 mol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio em 0,5 mol L⁻¹ KCl para cálculo da área efetiva exposta de acordo com a equação 11 de Randles-Sevcik.

4.3.2 Etapa 2: Depois da Limpeza Física

A Figura 36 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para os quatro tipos de sensores. Os voltamogramas cíclicos correspondem às respostas eletroquímicas dos sensores após a limpeza padrão. A partir desses voltamogramas, obteve-se a corrente de pico anódica e catódica para o cálculo da corrente média de pico e, posteriormente, da área efetiva exposta utilizando a equação 11. Como esperado, observou-se que os eletrodos de medições com maiores áreas planas também possuem maiores áreas efetivas expostas.

Figura 36 – Resposta padrão de 6 ciclos voltamétricos com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹ em ferrocianeto de potássio para cada sensores MA, MB, MC e MD após a limpeza-padrão, área efetiva apresentada na Tabela 7.

Os voltamogramas cíclicos antes da limpeza indicaram correntes reduzidas em comparação com os voltamogramas cíclicos após a limpeza, indicando reduzida área efetiva exposta devido à passividade de superfície, provavelmente, por impurezas adsorvidas superfície e materiais vítreos remanescentes do processo de sinterização da pasta compósita. A Figura 36 apresenta voltamogramas com excelentes características eletroquímicas entre eletrodo e solução, ou seja, ocorreu um incremento expressivo de corrente.

A Tabela 6, a seguir, apresenta os valores de área efetiva exposta, mostrando o erro percentual dessas áreas em relação à área plana geométrica.

Tabela 6 – Especificação da área efetiva exposta de cada eletrodo dos sensores.

Séries	Eletrodo de trabalho	
	Área efetiva exposta dos eletrodos (mm ²)	Erro percentual com relação à área plana (%)
MA	4,33	-3,70
MB	1,59	6,31
MC	0,79	-2,82
MD	1,68	1,19

Nota-se que existem erros percentuais negativos indicando menor área efetiva exposta com relação à área geométrica e outros positivos que correspondem ao incremento de rugosidade e, conseqüentemente, de área efetiva exposta. Sabe-se que a sensibilidade e o tempo de vida área útil do eletrodo de medição estão diretamente relacionados com melhor grau de passivação da superfície do eletrodo. Logo, idealmente, o procedimento de limpeza padrão deve ser altamente reproduzível com mínima dispersão dos erros percentuais entre as áreas.

4.3.3 Comparação do Ganho de Área Efetiva Exposta a cada Etapa

Partindo da premissa, que a limpeza dos eletrodos de medição permite remover impurezas aderidas na superfície do eletrodo que provocam a passivação

da mesma reduzindo o valor de corrente de medição. Com a limpeza-padrão ocorre a ativação da superfície do eletrodo (remoção de impurezas e material vítreo), ou seja, há um ganho de área efetiva exposta que se traduzirá em um incremento da corrente de medição. A Tabela 7 mostra a comparação entre as áreas efetivas expostas antes e após limpeza-padrão, indicando a eficiência da limpeza através do ganho de área efetiva.

Tabela 7 – Parâmetros de caracterização extraídos para os três eletrodos de referência.

Séries	Comparação da Área Efetiva Exposta do Eletrodo de Medição (mm ²)		
	Antes da Limpeza Padrão	Após a Limpeza Padrão	Ganho de Área Efetiva (%)
MA	1,28	4,33	338,62
MB	0,51	1,59	310,34
MC	0,28	0,79	279,41
MD	0,51	1,68	326,79

Observa-se que, no geral, área efetiva exposta triplica com o procedimento de limpeza padrão utilizado neste trabalho. Sendo que todos os percentuais de ganho de área efetiva exposta estão acima de 280%, apresentando uma dispersão relativa ao processo.

4.3.4 Eletrodeposição de DAB e caracterização da superfície modificada.

A fim de reduzir a degradação do eletrodo de trabalho de ouro do sensor e aumentar a seletividade a nitrito depositou-se DAB sobre esse eletrodo [61]. A solução para eletrodeposição foi preparada com 1-2 Diaminobenzeno (DAB) a 5 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ e pH = 7,2. Essa solução foi desairada em N₂ durante 30 min.

As eletrodeposições foram realizadas utilizando a técnica de voltametria cíclica. Aplica-se uma faixa de potencial e registra-se a corrente, de acordo com os parâmetros de entrada.

As condições experimentais empregadas foram:

Potencial inicial = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial final = +0,65 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial segundo vértice = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Velocidade de varredura = 0,1 V s⁻¹

Potencial de repouso = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Potencial de acondicionamento = 0 V_{Ag/AgCl 3M KCl}

Intervalo de tempo = 1 s

50 ciclos;

Agitação = 400 rpm

A Figura 37 mostra a curva característica para eletrodeposição de DAB. Depois, observa-se as imagens obtidas por microscopia óptica da pasta compósita de ouro; após a limpeza (Figura 38a), da superfície de ouro com filme de DAB recém-depositado (Figura b) e após uma sequência de medições realizadas para nitrito (Figura 38d).

Figura 37 – Para eletrodeposição do filme de DAB foram realizados 50 voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ utilizando a solução de DAB 5 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,2$.

Figura 38 – a) ouro limpo; b) ouro depositado DAB; c) DAB depositado com solução degradada; d) aparência do DAB após uma sequência de medições.

A Figura 38c mostra um eletrodo com filme de DAB degradado devido à oxidação da solução de deposição pela ação do oxigênio, portanto, não apresentam sinal de resposta ao nitrito. Constata-se que a degradação da solução de deposição está em função da difusão de oxigênio e do processo de deposição do DAB; logo, para evitar o problema, não se utiliza a solução de deposição por mais de duas vezes.

4.4 Da Análise Eletroquímica do Nitrito e dos seus Principais Interferentes

Abaixo, são descritos os sensores eletroquímicos amperométricos baseados em tecnologia *screen-printed* sobre substrato de alumina para monitoramento eletroquímico, por FIA (*Flow-injection Analysis*), de nitrito e seus interferentes: paracetamol, ácido ascórbico e ácido úrico. Para reduzir a influência destes, modificou-se a superfície do eletrodo de trabalho (ouro) pela eletrodeposição de 1-2 Diaminobenzeno (DAB).

Figura 39 – Eletrodo central de medição e eletrodo auxiliar inferior. a) eletrodo de medição sem DAB e auxiliar, com sinal de alta densidade de corrente; b) eletrodo de medição com DAB e alta densidade de corrente no eletrodo auxiliar; c) detalhe do eletrodo de medição com DAB degradado.

Durante os testes para nitrito, foram experimentados diversas configurações para a cela de análise e materiais para sensores. A conclusão obtida foi de que ambas contribuem para a densidade de corrente sobre o eletrodo auxiliar. Como o meio de uso contém cloretos em solução com alta densidade de corrente, há mais adsorção nesta área.

Quando o eletrodo auxiliar é de ouro, há degradação do eletrodo de trabalho com ou sem DAB a qualquer potencial acima de $0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ (Figuras 39a e 39b, respectivamente). Porém, não se observou essa ocorrência para eletrodos auxiliares confeccionados com platina até potenciais $0,60 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$. Por isso, concluímos os eletrodos auxiliares de platina são mais adequados para a medição de nitrito a potencial $0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfon}^{\text{®}} 117}$.

4.4.1 Potencial de Resposta a Nitrito com Eletrodo de Medição Não-modificado

O sensor com eletrodo de trabalho de ouro não-modificado foi introduzido em uma solução de nitrito 1 mol L^{-1} em soro fisiológico ($\text{pH} = 7,3$ e $0,9 \%$ de NaCl). Por meio da técnica de análise eletroquímica DPV. Observou-se a resposta das espécies eletroativas na faixa de potencial de 0 a $1 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, com velocidade de varredura 20 mV s^{-1} . A Figura 40, a seguir, ilustra o gráfico DPV para a solução de nitrito em soro fisiológico.

Figura 40 – Curva DPV indica o potencial de oxidação para nitrito com pico a $0,82 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$.

O gráfico indica quadro respostas de espécies eletroativas. A reação I, ao redor de $0,40 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, corresponde ao potencial de redução do nitrito solvatado [88]. Há um sinal em $0,62 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ que condiz com a redução do oxigênio. O sinal em $0,82 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, identifica-se o pico de redução de nitrito. Por fim, com o potencial acima de $0,90 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, corresponde à oxidação eletroquímica do ouro (corrosão). A identificação dos apresentados foi baseada na tabela dos potenciais de redução eletroquímica (ver Tabela 1) [22][88].

Considerando o potencial de resposta do nitrito em relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl igual a $0,82 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ e admitindo-se que a reação de corrosão do ouro inicia-se a partir de $0,80 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ em solução contendo cloretos [77], optou-se por utilizar um potencial de análise padrão de $0,75 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ por ser compatível com a referência. Esse permite preservar o eletrodo de trabalho de ouro não-modificado, reduzindo a oclusão por adsorção de interferentes e impurezas; ao mesmo tempo evita a degradação do eletrodo, prolongando sua vida útil.

4.4.2 Potencial de Resposta a Nitrito com Eletrodo de Trabalho Modificado

O sensor com eletrodo de superfície modificada com DAB foi introduzido em uma solução de nitrito 1 mol L^{-1} em soro fisiológico ($\text{pH} = 7,3$ e $0,9 \text{ \% NaCl}$). Utilizando a técnica de análise eletroquímica CV obteve-se a resposta das espécies eletroativas na faixa de potencial de 0 a $0,65 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, com velocidade de varredura 20 mV s^{-1} . A Figura 41 ilustra o gráfico CV para a solução de nitrito em soro fisiológico.

Figura 41 – Curva CV indicando o potencial de oxidação do nitrito para sensor com eletrodo de medição com DAB, observa-se o pico de oxidação a 0,58 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$.

O gráfico da Figura 41 acima indica duas respostas de espécies eletroativas em oxidação e duas em redução. A reação I de oxidação ao redor de 0,18 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$ corresponde ao potencial de redução do nitrito solvatado [88]. Em seguida, a reação II, em 0,58 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$, identifica o pico de oxidação de nitrito. Observa-se o início da oxidação do polímero DAB, para potenciais acima de 0,65 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$ ocorrendo a remoção completa do mesmo. No voltamograma de volta tem-se os picos de redução em 0,50 e 0,15 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ KCl}$ reação II e I, respectivamente.

Figura 42 – Curva DPV indica as resposta de nitrito para as concentrações 2, 10 e 50 mmol L⁻¹; a partir da degradação do polímero DAB tem-se os picos de cloreto.

Na Figura 42, o gráfico DPV indica a resposta de nitrito para uma ampla faixa de potencial aplicado (0 a 1,1 V_{Ag/AgCl 3M KCl}). No primeiro voltamograma (2 mmol L⁻¹), não se observa a ocorrência da resposta de cloreto e nem sinal de nitrito ao redor de 0,4 V_{Ag/AgCl 3M KCl}. Porém, o sinal de nitrito para o eletrodo com o DAB está mascarado pelo sinal de degradação (oxidação do DAB) e só se observa o sinal corresponde a nitrito com eletrodo sem DAB ao redor de 0,80 V_{Ag/AgCl 3M KCl}.

No segundo voltamograma (10 mmol L⁻¹), nota-se o sinal de cloreto próximo ao potencial de 0,13 V_{Ag/AgCl 3M KCl} e também um sinal de nitrito a 0,4 V_{Ag/AgCl 3M KCl}. O sinal de cloreto aparece reduzido porque ainda não há adsorção total de Cl⁻ sobre a superfície de ouro. Por outro lado, é possível observar o sinal de nitrito próximo a 0,83 V_{Ag/AgCl 3M KCl} e, por fim, a corrosão eletroquímica do ouro e a adsorção de Cl⁻. No último voltamograma (50 mmol L⁻¹), o sinal de cloreto está mais pronunciado e aparece também o sinal de nitrito para potenciais próximos a 0,4 V_{Ag/AgCl 3M KCl}, mas

não aparece o sinal de nitrito a potenciais da ordem de $0,83 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$; isso ocorre porque o ouro está todo passivado pela adsorção de cloretos.

A conclusão para esses testes está no fato de não ser possível a utilização dos potenciais de medição acima de $0,60 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, pois isso danifica o eletrodo de medição com a degradação do DAB concomitante a oxidação do ouro. Nessas condições, o sensor passa a ter pouca sensibilidade ao nitrito.

4.5 Do Estudo dos Principais Interferentes de Nitrito para Meio Bioquímico

Após verificar o potencial de resposta de nitrito para eletrodos com e sem DAB, uma sequência de testes foram realizados para obter os potenciais de resposta e as concentrações limite para cada interferente proposto. Por DPV (Voltametria por Pulso Diferencial) obteve-se o potencial de pico correspondente aos principais interferentes do nitrito. Utilizando a técnica amperométrica (TB), com potencial fixo a $0,75 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$, injetou-se diversas concentrações, partindo do limite inferior ao limite superior, determinando as curvas de calibração e das respectivas sensibilidades para os interferentes em questão.

Observação: é importante destacar que foram desconsiderados os volumes injetados no cálculo das concentrações, pois o erro significativo aparece na terceira casa decimal, sem prejuízo na confiabilidade na medição.

4.5.1 Cloreto

A adsorção de cloretos sobre eletrodos de ouro é de grande interesse nas áreas química, ambiental e médica [76][77]. Este haleto presente na solução de análise pode ser um elemento interferente ou uma espécie a ser medida. Neste trabalho será investigado o efeito de interferência do mesmo na medição de nitrito.

Por meio de técnicas eletroquímicas convencionais, é possível observar e analisar o processo de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho [73].

O experimento realizado para verificar a resposta do cloreto utilizando o sensor “MA” sem DAB (no caso do eletrodo de medição com ouro exposto) foi realizado em soro fisiológico (pH = 7,3; NaCl 0,9%) como eletrólito suporte. A técnica DPV foi utilizada para analisar o comportamento eletroquímico do cloreto na faixa de potencial entre $-1,1$ a $+1,1$ $V_{Ag/AgCl}$ 3M KCl. A Figura 44a mostra a resposta de cloreto próximo de $0,22$ $V_{Ag/AgCl}$ 3M KCl que ocorre devido a rápida adsorção sobre o ouro, formando o composto $AuCl_4^-$ em potenciais positivos (ver Figura 43b). Em potenciais negativos abaixo de $-1,0$ $V_{Ag/AgCl}$ 3M KCl tem-se a evolução de hidrogênio e corrosão eletroquímica do filme de $AuCl_4^-$, ou do Au, a potenciais acima de $0,80$ $V_{Ag/AgCl}$ 3M KCl.

A curva de calibração; corrente vs. concentração de cloreto (sem a correção do valor de linha base) apresenta-se com excelente coeficiente de linearidade (Figura 44b) para a faixa de concentração de 0 a $0,1$ $mol\ L^{-1}$, com incrementos de $10\ mmol\ L^{-1}$. Como resultado, abaixo observa-se a equação 26 de calibração correspondente à concentração de cloreto, utilizando o sensor “MA” com eletrodo de trabalho sem DAB (ouro exposto).

$$I = 1,42 \cdot 10^{-6} [\text{Cloreto}] + 231,66\ (\mu A) \quad (26)$$

Figura 43 – Imagem de microscópio ótico do eletrodo de trabalho do sensor “MA”. a) Au limpo ; b) filme $AuCl_4^-$; detalhe do eletrodo de ouro com cloreto adsorvido.

Figura 44 – Medição de cloreto: a) picos de Cl^- através da técnica eletroquímica DPV; b) curva de calibração do cloreto.

O cloreto é um interferente direto quando o eletrodo de trabalho está sem modificação (ouro exposto) e em potenciais acima de $0,60 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$ acelera a corrosão do ouro [73]. Também, o mesmo é interferente na situação de pseudo-eletrodo de referência com Ag/AgCl exposto em solução. Para reduzir e/ou eliminar a influência desse interferente no eletrodo de trabalho depositou-se DAB que possibilita realizar medições de nitrito a potenciais inferiores de $0,60 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$ e, além disso, o eletrodo de referência foi recoberto com Náfon[®] 117.

4.5.2 Paracetamol

A técnica de DPV possibilitou obter o potencial de resposta das espécies de paracetamol pelo sensor “MA” sem DAB. Foram realizadas três varreduras na faixa de potencial $-0,80$ a $+0,80 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$ com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . A primeira, para obter o sinal de base, em seguida, uma segunda varredura em solução contendo $0,34 \text{ mmol L}^{-1}$ de paracetamol e a terceira $0,68 \text{ mmol L}^{-1}$. O pico que corresponde ao potencial de análise para o paracetamol aparece próximo de $0,53 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$ (Figura 45).

Figura 45 – Três DPV: indicação do potencial de resposta ao paracetamol próximo a $0,53 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$.

Para determinar a curva de calibração (corrente vs. concentração) do paracetamol, utilizou-se o sensor “MA” sem DAB e a técnica de análise amperométrica TB com potencial constante de $0,75 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$. Realizou-se 10 injeções de $17 \mu\text{l}$ de solução de paracetamol (50 mmol L^{-1} em soro fisiológico) em uma cela de volume igual a 5 ml de soro fisiológico, deste modo a cada injeção corresponder a $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$, totalizando $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 46).

Figura 46 – Patamares formados a cada injeção de $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ de paracetamol.

Nas mesmas condições experimentais foram realizadas nove injeções em intervalos de 100 s. A cada injeção foi adicionado $17 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de paracetamol 50 mmol L^{-1} em 5 mL de soro fisiológico, correspondendo $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$, totalizando $1,53 \text{ mmol L}^{-1}$ para o sensor “MA” com porfirina. Não foi possível fazer a décima injeção devido ao fundo de escala utilizada de $100 \text{ }\mu\text{A V}^{-1}$ (Figura 47). O resultado obtido indica um incremento na resposta do sensor e, conseqüentemente, o aumento de sensibilidade para a espécie medida (Figura 48).

Figura 47 – Patamares formados a cada injeção de $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ de paracetamol.

Figura 48 – Curva de calibração em função da concentração de paracetamol.

A curva de calibração em função da concentração de paracetamol permitiu o cálculo do coeficiente angular e, consequentemente, da sensibilidade do sensor, ou

seja, ($S = \Delta I / \Delta C \cdot A$ onde, ΔI : variação da corrente, ΔC : variação da concentração e A : área efetiva exposta). A seguir, a equação da curva de calibração para o sensor “MA” sem e com porfirina (equação 27 e 28, respectivamente) e a Tabela 8 indica as sensibilidades obtidas para o sensor em ambos os casos.

$$A - \text{sem porfirina: } I = 1,88 \cdot 10^{-1} [\text{paracetamol}] + 1,67 \cdot 10^{-6} \text{ (}\mu\text{A)} \quad (27)$$

$$B - \text{com porfirina: } I = 6,33 \cdot 10^{-1} [\text{paracetamol}] + 2,23 \cdot 10^{-6} \text{ (}\mu\text{A)} \quad (28)$$

Tabela 8 – Sensibilidade do paracetamol obtida para o sensor “MA” com e sem porfirina.

Unidade	Sensibilidade ($\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L mm}^{-2}$)
Sensor “MA” sem porfirina	2,59
Sensor “MA” com porfirina	8,72

A eletrodeposição de porfirina faz aumentar a sensibilidade para a espécie de paracetamol. Testes feitos para esse interferente indicaram que o aumento de sensibilidade foi de 3,36 vezes em relação ao eletrodo sem porfirina. Porém, o estudo com porfirina foi descartado, pois quanto à análise de nitrito, apresenta sinal de resposta atenuado ao nível de ruído do equipamento BAS. A deposição de porfirina foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.2.2.

4.5.3 Ácido Ascórbico

Também utilizando a técnica de DPV, foi possível obter o potencial de resposta a ácido ascórbico pelo sensor “MA” sem DAB. Realizou-se uma varredura para registrar o sinal de base e, em seguida, uma segunda varredura em solução contendo $0,22 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ascórbico e uma terceira a $0,44 \text{ mmol L}^{-1}$, todas na faixa de potencial $-0,80$ a $+0,80 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$ com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . O pico que corresponde ao potencial de análise medido para o ácido ascórbico ficou próximo de $0,22 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$ (Figura 49).

Figura 49 – Três DPV, apresenta-se o potencial de pico para ácido ascórbico próximo a $0,22 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$.

Como no caso do paracetamol, utilizou-se o sensor “MA” com porfirina e a técnica de análise amperométrica TB com potencial constante de $0,75 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$. Realizaram-se 10 injeções de $11 \mu\text{L}$ de solução de ácido ascórbico ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em soro fisiológico) em uma cela de volume igual a 5 mL de soro fisiológico; deste modo cada injeção corresponde a $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$ totalizando $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 50 – Patamares formados a cada injeção de $0,11 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ascórbico.

Figura 51 – Curva de calibração em função da concentração de ácido ascórbico.

A equação da curva de calibração foi obtida para as espécies de ácido ascórbico (equação 29) resultando em uma sensibilidade de $7,34 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L mm}^{-2}$.

$$I = 5,33 \cdot 10^{-1} [\text{ácido ascórbico}] + 1,89 \cdot 10^{-6} (\mu\text{A}) \quad (29)$$

4.5.4 Ácido Úrico

Na Figura 52, são apresentadas as curvas obtidas pela técnica de DPV, que permitiu obter o potencial de resposta ao ácido úrico pelo sensor “MA”. Foi realizada uma varredura para obter o sinal de base, depois uma segunda varredura em solução contendo 1 mmol L^{-1} de ácido úrico e uma terceira a 2 mmol L^{-1} . O pico correspondente ao potencial de análise do ácido úrico aparece próximo de $0,40 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$.

Figura 52 – Curvas obtidas por DPV, o potencial de pico para ácido úrico apresenta-se próximo a $0,4 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$.

A Figura 53 observa-se o sinal de resposta para as injeções de ácido úrico ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$) em 5 ml soro fisiológico ($\text{pH} = 7,3$ e $0,9 \%$ de NaCl), a partir da quarta injeção o sinal de resposta e o ruído estão em mesmo patamar dificultando a distinção dos pontos médios de patamar. A curva de calibração com a representação

dos valores médios de patamar e a equação de calibração é apresentada na Figura 54.

Figura 53 – Patamares formados a cada injeção de ácido úrico 0,25 mmol L⁻¹.

Figura 54 – Curva de calibração (corrente vs. concentração) para ácido úrico a cada pico médio.

A equação de calibração foi obtida para as espécies de ácido úrico (equação 30).

$$I = 2,95 \cdot 10^1 [\text{ácido úrico}] + 5,50 \cdot 10^{-1} \quad (\mu\text{A}) \quad (30)$$

A sensibilidade calculada para ácido úrico foi de $6,81 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L mm}^{-2}$.

4.5.5 Testes Realizados para Nitrito

Nesta secção, apresentam-se os resultados para as espécies de nitrito com e sem interferentes. A Figura 55 indica 15 patamares formados pela injeção de nitrito a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e duas injeções de paracetamol a $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo o primeiro patamar e o sétimo patamar correspondente à injeção do paracetamol. Verificou-se que, para altas concentrações de paracetamol ($0,34 \text{ mmol L}^{-1}$), a partir da segunda injeção, o sinal de nitrito tem maior influência desse interferente, que passa a ser crítico a partir de 1 mmol L^{-1} de nitrito.

Figura 55 – Patamares formados a cada injeção de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito, sendo que os patamares maiores correspondem à adição de $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ do interferente paracetamol, sensor “MA” sem DAB

A Figura 56, a seguir, mostra a resposta de nitrito com os três principais interferentes, paracetamol, ácido ascórbico e ácido úrico. Após a estabilização do sensor “MA” sem DAB, no tempo de 800 s, foram feitas 20 injeções de nitrito a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, totalizando 2 mmol L^{-1} em um recipiente contendo 10 mL de soro fisiológico agitado a 400 rpm. A adição dos interferentes (concentração máxima presente no sangue humano) na análise de nitrito deixa o sinal de base ruidoso, mesmo nessas condições foi possível distinguir os patamares até a concentração de $400 \mu\text{mol L}^{-1}$. Desse modo, foi demonstrado, como previsto, que os interferentes são críticos para as medições de nitrito quando utilizando o eletrodo de trabalho estiver diretamente exposto em solução de análise.

Figura 56 – Patamares formados a cada injeção de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em solução de soro fisiológico, com a concentração máxima dos interferentes. Sensor “MA” com porfirina.

A fim de aferir a veracidade dos resultados acima descritos, repetiu-se o teste para nitrito, agora sem interferentes. Aplicou-se por TB o potencial fixo de $0,75 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$, após a estabilização do sensor “MA” sem DAB, no tempo de 500 s. Foram realizadas 20 injeções de nitrito a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, totalizando 2 mmol L^{-1} em um recipiente contendo 10 mL de soro fisiológico, agitado a 400 rpm. Na Figura 57, que mostra os patamares definidos, observa-se que, a partir do décimo patamar

(concentração de 1 mmol L^{-1} de nitrito), a resposta tende à oclusão da superfície do eletrodo, limite máximo de medição na região linear.

Figura 57 – Patamares formados a cada injeção de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em solução de soro fisiológico sem interferentes, detectados pelo mesmo sensor.

Figura 58 – Curvas de calibração obtidas para a espécie de nitrito com e sem interferentes.

Na Figura 58, foram mostradas as curvas de calibração (corrente vs. concentração) traçadas a partir dos valores médios dos patamares para nitrito nos dois casos distintos, com e sem interferente.

Nos dois casos, as curvas de calibração para altas concentrações de nitrito (entre 1 a 2 mmol L⁻¹) têm linearidade pobre. Este desvio de linearidade pode ser explicado devido à interação direta do analito com a superfície do eletrodo de trabalho de ouro sem modificação. Portanto, nota-se alto ruído no sinal de base e oclusão da superfície do eletrodo.

Os resultados obtidos indicam a importância da modificação da superfície do eletrodo de medição. Neste trabalho, optou-se por eletrodepositar DAB por ser um polímero condutor eficaz na atenuação dos interferentes significativos no monitoramento de nitrito em meio bioquímico. A seguir, observa-se o resultado comparativo da análise de nitrito com e sem DAB, mediante a técnica TB aplicou-se o potencial de 0,75 V_{Ag/AgCl} e realizaram-se 10 injeções de nitrito a 25 µmol L⁻¹, totalizando 250 µmol L⁻¹.

Figura 59 – Patamares de injeção de nitrito 25 µmol L⁻¹ a cada 100 s para o sensor “MA” com e sem DAB.

Os resultados obtidos com o eletrodo de medição modificado com DAB apresentam menor corrente de base (ordem nA) e ruído (ordem pA), proporcionando melhor distinção dos patamares de nitrito. Isso foi possível porque o DAB contribui para evitar a oclusão da superfície do eletrodo de medição.

Figura 60 – Curvas de calibração obtidas para a espécie de nitrito, com e sem DAB.

Observam-se as equações de calibração para as espécies de nitrito analisadas utilizando o sensor “MA”, com e sem DAB e a Tabela 9 com as respectivas sensibilidades.

$$\text{A - sem DAB} \quad I = 1,56 \cdot 10^{-7} [\text{nitrito}] + 9,214 \cdot 10^{-6} \text{ (}\mu\text{A)} \quad (31)$$

$$\text{B - com DAB} \quad I = 4,23 \cdot 10^{-6} [\text{nitrito}] + 6,72 \cdot 10^{-8} \text{ (}\mu\text{A)} \quad (32)$$

Tabela 9 – Sensibilidade do nitrito obtida para o sensor “MA” com e sem DAB.

Unidade	Sensibilidade ($\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L mm}^{-2}$)
Sensor “MA” sem DAB	310,00
Sensor “MA” com DAB	90,00

Na sequência, foi realizado o estudo de monitoração de nitrito, utilizando a Análise por Injeção em Fluxo (FIA) convencional com injetor-comutador e bomba peristáltica.

4.5.6 Monitoração de Nitrito por FIA-convencional

A monitoração por FIA-convencional (Figura 61) foi realizada utilizando o sensor “MA” sem DAB (ouro exposto), no qual se aplicou $0,75 V_{Ag/AgCl}$ através da técnica amperométrica TB. Foi fixado o potencial constante e registrou a corrente de reação. A cada 120 s foi adicionado uma alíquota de 50 μL a um fluxo de 1 ml min^{-1} totalizando 29 medições em 1 h de análise.

Figura 61 – Resposta à concentração de nitrito (50 , 250 e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$) por FIA.

Através dos valores médios dos picos obtidos na monitoração por FIA, foi plotado a curva de calibração (ver Figura 62).

Figura 62 – Curva de corrente vs. concentração que indica aos valores de pico de resposta para nitrito a 50, 250 e 500 μmol L⁻¹.

Os resultados obtidos têm linearidade satisfatória em baixas e altas concentrações de nitrito (Figura 62), denotando alta sensibilidade e seletividade a nitrito (livre de interferentes). Também, observou-se que os sinais têm boa repetitividade e reprodutividade.

4.5.7 Monitoração de Nitrito por FIA-automatizada e a aplicação da técnica de dois pontos para cálculo da corrente de medição.

Obter o sinal de resposta de nitrito livre dos principais interferentes (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) implica no estudo da resposta à concentração dos interferentes. Neste trabalho foi aplicado o tratamento matemático de dois pontos, ou seja, aplicam-se dois potenciais distintos, registra-se o sinal de resposta (sinal de saída) para ambos os casos. Sendo assim, primeiro, analisa-se a resposta dos interferentes sem nitrito; depois, analisa-se a resposta do nitrito sem interferentes e, por fim, analisa-se a resposta do nitrito com interferentes.

Os próximos experimentos referem-se à monitoração de nitrito/interferentes por FIA-automatizada. Essa técnica tem vantagem em relação à FIA convencional, pois há ganho de autonomia no sistema de medição. Deste modo, o aparato extracorpóreo proposto foi configurado para o fluxo $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, que permite monitoração contínua de até 7,5 h com injeção de até 150 alíquotas de analito a $400 \text{ }\mu\text{L}$, usando um intervalo entre medições de 3 min. Esse intervalo que corresponde ao tempo necessário para injeção e resposta do analito (realizar a medição), limpeza e reestabilização retornando ao sinal de base.

Diversos experimentos foram realizados utilizando sensor com e sem DAB para identificar os potenciais mais eficazes para monitoração de nitrito. O primeiro potencial escolhido ($0,30 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$) mede majoritariamente o sinal de resposta dos interferentes e infimamente o sinal de resposta do nitrito. O segundo potencial ($0,50 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$) mede o sinal de resposta conjugado do nitrito mais interferentes na ordem de $E^{1/2}$. Através do tratamento matemático de dois pontos, calcula-se a corrente de medição correspondente ao nitrito livre de interferentes.

A fim de observar os sinais de respostas para os interferentes, foram realizados dois experimentos por FIA-automatizada: usando o sensor “MC” com DAB. Aplicou-se, por TB, o potencial de 0,30 e de $0,50 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$. As Figuras 63 e 64 mostram os resultados obtidos para os dois potenciais aplicados, respectivamente. Em seguida, a Figura 65 apresenta a representação gráfica dos picos médios dos interferentes na concentração máxima presente no sangue de humanos.

Figura 63 – Resposta à concentração dos interferentes (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) em potencial 0,30 V_{Ag/AgCl} Náfion[®] 117 utilizando FIA-automatizada.

Figura 64 – Resposta à concentração dos interferentes (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) em potencial 0,5 V_{Ag/AgCl} Náfion[®] 117 utilizando FIA-automatizada.

Figura 65 – Representação gráfica dos picos médios obtidos para os interferentes na concentração máxima presente no sangue humano.

Figura 66 – Resposta à concentração dos interferentes em conjunto (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) na concentração máxima presente no sangue humano. Potencial aplicado foi $0,3 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}^{\text{®}} 117}$ utilizando FIA-automatizada.

Figura 67 – Resposta à concentração dos interferentes em conjunto (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico) na concentração máxima presente no sangue humano. Potencial aplicado foi 0,5 V_{Ag/AgCl Náíon[®] 117} utilizando FIA-automatizada.

Os valores médios dos picos obtidos das Figuras 63, 64, 66, 67 e 68 estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10 – Sinal de resposta para os interferentes em dois potenciais.

Potencial do Sistema de Medição – E(S) (V _{Ag/AgCl Náíon[®] 117})	Corrente de Medição (nA)			
	Interferentes			
Concentração ==> (µmol L ⁻¹)	Paracetamol 170	Ácido Úrico 550	Ácido Ascórbico 110	Paracetamol 170 Ácido Úrico 550 Ácido Ascórbico 110
0,3	0,75	0,31	0,69	112,75
0,5	2,73	1,54	0,51	1600,00

Após o estudo dos interferentes sem nitrito, foram realizados experimentos com nitrito sem interferentes. Ver as Figuras 68, 69 e 70.

Figura 68 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando o potencial 0,30 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117.

Figura 69 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando um sensor distinto; da mesma série “MC” aplicou-se o potencial 0,50 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117.

Figura 70 – Resposta à concentração de nitrito (50 , 100 e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$) após três horas decorridas do final do experimento anterior utilizando o mesmo sensor “MC” com DAB, aplicou-se o potencial $0,50 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117.

As respostas acima foram obtidas por FIA-automatizada usando o sensor “MC” com DAB e, por meio, da técnica amperométrica TB, foram aplicados os mesmos potenciais de $0,30$ e $0,50 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117. Pode-se observar que o sinal de resposta ao nitrito no potencial $0,30 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}}$ 117 está na faixa de ruído da linha de base $8,20 \pm 6,30 \text{ pA}$. Isto significa que os sinais obtidos para nitrito estão a um erro de $55,75 \%$, e, portanto; pode assumir valores ínfimos.

As Figuras 69 e 70 indicam o registro do sinal correspondente ao nitrito sem interferentes em dois momentos. Primeiramente, logo após a preparação das soluções de análise e o segundo após três horas decorridas do final do primeiro experimento (guardado em soro fisiológico). O segundo experimento foi realizado com outro sensor da mesma série de sensor “MC” com DAB, que tem por objetivo o estudo do parâmetro-padrão de reprodutividade (a ser discutido no item 4.6.5).

A seguir, são apresentadas as curvas de calibração (corrente vs. concentração) para as espécies de nitrito. Estas correspondem aos valores de picos médios para a resposta da concentração de nitrito (50 , 100 e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$) aplicando

os potenciais 0,3 e 0,5 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$, de acordo com o resultados obtidos nas Figuras 68, 69 e 70.

Na Figura 71 pode ser observado que o sinal de resposta para todas as concentrações de nitrito no potencial 0,3 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$ estão na faixa de corrente nula, confirmando a contribuição desprezível da corrente na medição de nitrito neste potencial. Outros resultados foram obtidos para nitrito utilizando FIA-automatizada. Após uma sequência de medições de interferentes foi realizado um experimento para nitrito sem interferentes (Figura 72).

Figura 71 – Curva de calibração (corrente vs. concentração) que corresponde aos valores de picos médios para resposta de nitrito a 50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em potenciais 0,3 e 0,5 $V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$.

Utilizando o sensor “MC” com DAB, abaixo podem ser observadas as equações de calibração para as espécies de nitrito analisadas em dois potenciais sugeridos, a saber:

$$\text{Em } 0,3 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}: \quad I = 2,86 \cdot 10^{-5} [\text{nitrito}] + 1,94 \cdot 10^{-5} \text{ (nA)} \quad (33)$$

$$\text{Em } 0,5 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}: \quad I = 0,03 [\text{nitrito}] - 0,83 \text{ (nA)} \quad (34)$$

O experimento seguinte foi realizado sem aguardar o tempo de estabilização de 1800 s, pois a intenção é observar após uma sequência de medições de interferentes qual o comportamento do sensor. Então, a Figura 72 mostra que para as primeiras medições o sinal de resposta do nitrito tem um ganho de corrente quando comparado com os valores de corrente no final para uma mesma concentração (ver concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Figura 72 – Resposta à concentração de nitrito (50 , 100 e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$) após uma sequência de medições com os interferentes, observa-se os picos médios obtidos por FIA-automatizada aplicando o potencial $0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfon}}^{\text{®}}$ 117

Depois mais dois experimentos foram realizados com nitrito e interferentes na concentração máxima presente no sangue de humanos nos dois potenciais em estudo (ver Figura 73 e 74). Por último, outros dois experimentos foram feitos para verificar a influência do tempo de degradação da solução, então realiza uma medição logo após a preparação da solução (Figura 75) e outra um dia após solução preparada de nitrito com interferentes (Figura 76).

Figura 73 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após duas horas de solução preparada utilizando FIA-automatizada com o potencial aplicado de 0,3 V_{Ag/AgCl Náfon[®] 117}

Figura 74 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após o teste anterior, usando FIA-automatizada com o potencial aplicado de 0,5 V_{Ag/AgCl Náfon[®] 117}.

Figura 75 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com os interferentes na concentração máxima presente no sangue de humanos obtidos por FIA-automatizada aplicando o potencial 0,5 V_{Ag/AgCl Náfon® 117}.

Figura 76 – Curvas e equação de calibração do nitrito com interferentes na concentração máxima presente no sangue humano, as quais foram obtidas para os dois potenciais escolhidos.

A Figura 76 mostra as curvas e as equações de calibração para medição do nitrito com interferentes para os dois potenciais, utilizando o sensor “MC” com DAB. Na sequência, mostram-se as equações detalhadas:

$$\text{Em } 0,3 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}} 117: \quad I = 6,31 \cdot 10^{-4} [\text{nitrito}] + 1,43 \text{ (nA)} \quad (35)$$

$$\text{Em } 0,5 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}} 117: \quad I = 2,29 [\text{nitrito}] + 7,67 \cdot 10^{-2} \text{ (nA)} \quad (36)$$

A Figura 77 apresenta os valores de pico médios para nitrito sem e com interferentes. A curva em preto com quadrados indica medições realizadas com solução somente com nitrito e a curva em vermelho com esferas corresponde as resposta de nitrito mais as dos três interferentes estudados.

Figura 77 – Resposta à concentração de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com os interferentes na concentração máxima presente no sangue de humanos após 1 dia de solução preparada, aplicando o potencial 0,5 $\text{V}_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{®}} 117$.

De acordo com a literatura, as espécies de nitrito em meio bioquímico (plasma sanguíneo) degradam em 6 a 8 h. A fim de averiguar o descrito, foi realizado um experimento para nitrito com interferentes no segundo dia de solução preparada (nitrito em soro fisiológico - pH = 7,3 e 0,9 % NaCl - contendo paracetamol 0,17 mmol L^{-1} , ácido úrico 0,55 mmol L^{-1} e ácido ascórbico 0,11 mmol L^{-1}). O resultado observado indica um sinal de resposta praticamente contínuo (Figura 76)

que na média foi $2,24 \pm 0,05$ (μA), indicando que o nitrito degradou após um dia de solução preparada.

Os valores médios dos picos obtidos e representados nas Figuras 63, 64, 65, 68 e 69 estão sistematizados na Tabela 11. A partir desses dados, foram calculadas as correntes de medições para nitrito sem e com interferentes utilizando a expressão de $\Delta E(S)$. Para definir $\Delta E(S)$ utilizou-se as equações de calibração (com as respectivas linhas de base) para solução com nitrito somente nos dois potenciais (equações 33 e 34) e para solução de nitrito com seus interferentes (equações 35 e 36).

Então, o cálculo de $\Delta E(S)$ foi realizado, em três etapas: i) primeiro, fixa-se um valor de concentração utilizado em ambas as medições com os potenciais escolhidos; ii) segundo, faz-se a diferença entre as equações calibração, sendo referente ao potencial $0,5 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$ menos do potencial $0,3 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}$; iii) terceiro, insere-se o valor de concentração na equação obtida e calcula o valor de $\Delta E(S)$.

Logo a expressão é dada por:

$$\Delta E(S) = I_{0,5 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}} - I_{0,3 V_{\text{Ag/AgCl Náfion}}^{\text{® 117}}} \quad (37)$$

Sendo $\Delta E(S)$ igual à diferença entre a equação 34 e 33 para as espécies de nitrito analisadas sem interferentes, temos:

$$\Delta E(S) = 0,0299 [\text{nitrito}] - 0,8300 (\text{nA}) \quad (38)$$

E o $\Delta E(S)$ igual à diferença entre a equação 36 e 35 para as espécies de nitrito analisadas com interferentes, temos:

$$\Delta E(S) = 0,2894 [\text{nitrito}] + 7,6557 \cdot 10^2 (\text{nA}) \quad (39)$$

A Tabela 11 indica a sumarização dos valores de corrente medidos ou calculados.

Tabela 11 – Sinal de resposta para nitrito com e sem interferentes em dois potenciais e o cálculo da corrente de medição em $\Delta E(S)$.

Corrente de Medição (nA)						
Potencial do Sistema de Medição – E(S) (VAg/AgCl Náfion® 117)	Nitrito sem interferentes			Nitrito com interferentes		
Concentração ==> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	50	100	250	50	100	250
0,3	0,021 $\pm$ 0,010	0,018 $\pm$ 0,005	0,026 $\pm$ 0,002	112,750 $\pm$ 0,021	112,750 $\pm$ 0,021	112,7500 $\pm$ 0,021
0,5	0,847 $\pm$ 0,090	1,762 $\pm$ 0,020	6,508 $\pm$ 0,151	810,500 $\pm$ 32,959	1092,500 $\pm$ 28,723	1317,500 $\pm$ 20,529
$\Delta E(S)$	0,665 $\pm$ 0,072	2,159 $\pm$ 0,018	6,645 $\pm$ 0,150	780,040 $\pm$ 32,920	794,510 $\pm$ 28,672	837,920 $\pm$ 20,304

** valores não calculados ou medidos.

Figura 78 – Representação dos valores de $\Delta E(S)$ para as concentrações de nitrito (50, 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com e sem seus interferentes.

Os resultados apresentados, no decorrer dessa seção e principalmente na Figura 78, indicam um incremento de corrente na medição de nitrito com seus interferentes (curva em vermelho, no gráfico). Por meio do tratamento matemático foi realizado o estudo nos dois pontos para os potenciais escolhidos, utilizando as equações de calibração respectivas. Desse modo, permitiu calcular $\Delta E(S)$ da

corrente de medição do nitrito com e sem interferentes, obtendo um sinal de resposta de nitrito com influência atenuada de interferentes.

4.6 Do Estudo dos Parâmetros-padrão em Sistema de Medição para o Sensor Desenvolvido para Nitrito

Em sistemas de medição, a parte que corresponde ao sensor deve ser exaustivamente estudada considerando os parâmetros-padrão referentes à medição. Sabe-se que uma medida confiável implica desenvolver um sensor eletroquímico amperométrico capaz de maximizar as seletividades, sensibilidades, estabilidades, repetitividades, reprodutividades e permissividades das medições realizadas. Então, nos próximos itens, apresentam-se as discussões sobre as medições realizadas inferindo a respeito a cada parâmetro-padrão.

4.6.1 Seletividade

Neste trabalho, para incrementar seletividade do sensor a nitrito, modificou-se o eletrodo de medição com a eletrodeposição de DAB por voltametria cíclica (VC) em 50 ciclos. Esse procedimento permitiu obter um eletrodo altamente seletivo a nitrito e minimamente seletivo aos interferentes. Isso foi possível devido à característica da técnica VC, que realiza a oxidação e redução do filme depositado a cada ciclo. Portanto, tem-se um filme relativamente reticulado, que corresponde ao nitrito e evita a ocorrência dos interferentes.

4.6.2 Sensibilidade

O estudo de sensibilidade foi realizado para nitrito e seus interferentes. Utilizando o coeficiente angular da reta, dividido pela área efetiva exposta do eletrodo de medição, calculou-se o índice de sensibilidade do sensor para a sequência de todas as espécies bioquímicas envolvidas neste trabalho.

Quantificar as sensibilidades das espécies presentes na solução de análise possibilitou relacioná-las, estabelecendo um paralelo da resposta do nitrito com a de seus interferentes. Observou-se medição de nitrito sem influência direta do nitrito até a concentração de $0,18 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizando o sensor “MA” sem DAB (Figura 79).

Figura 79 – Comparação das curvas de calibração do nitrito e seus interferentes.

A resposta obtida para os principais interferentes foi abaixo daquela do nitrito, exceto o paracetamol, abaixo de até a concentração de $0,18 \text{ mmol L}^{-1}$. Isso é aceitável, pois no organismo humano a concentração máxima de paracetamol é da ordem de $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$. Os resultados indicam uma redução dos interferentes, usando o eletrodo de trabalho (ouro) modificado com DAB.

4.6.3 Estabilidade

A estabilidade na medição do sensor está relacionada com o sinal base, isto é, com a capacidade do sensor atingir uma linha base abaixo de nA, em um rápido intervalo de tempo. Neste trabalho com a modificação com DAB chegou-se na linha base entre nA e pA com intervalo de estabilização na ordem de 1800 s. A

estabilidade também está no retorno a linha base no mesmo valor antes de uma medição por FIA.

Neste trabalho, toda medição foi baseada no descrito acima, que possibilitou resultados com grande confiabilidade, pois a variação da linha base implica em uma diferença relativa entre o pico da medição com o retorno a linha base inicial. Esse fenômeno é conhecido por degradação do sensor que pode ocorrer na forma de incremento ou decaimento de corrente. No primeiro caso, testes revelam problemas no eletrodo de referência ou rompimento do filme de DAB e no segundo, o decaimento está normalmente relacionado com a oclusão do eletrodo de medição (trabalho), ou seja, a adsorção de materiais indesejados na superfície do eletrodo.

4.6.4 Repetitividade

A repetitividade das medições de nitrito e dos interferentes foi calculada através do complemento para 100 % do desvio-padrão em porcentagem.

4.6.5 Reprodutividade

A reprodutividade das medições de nitrito e dos interferentes foi calculada através do erro percentual da repetitividade em porcentagem. A observação deste parâmetro-padrão requer sensores diferentes de uma mesma série.

4.6.6 Permissividade

A permissividade foi calculada somente para a medição de nitrito utilizando sensores com DAB. Não foi possível calcular a permissividade dos interferentes, pois não foram realizadas as curvas de calibração para os interferentes utilizando o sensor com DAB. A permissividade indica a porcentagem em relação ao sinal de resposta do nitrito com sensor sem DAB em relação ao eletrodo com DAB.

4.6.7 Resumo dos Parâmetros-padrão

A Tabela 12 indica a síntese dos parâmetros-padrão.

Tabela 12 – Resumo dos parâmetros-padrão para a média de sensores com ou sem DAB e medições a 0,5 V_{Ag/AgCl Náfion[®] 117}.

Parâmetros-padrão	Espécies eletro-bioquímicas estudadas				
	Nitrito	Paracetamol	Ácido úrico	Ácido ascórbico	Nitrito com Interferentes
Seletividade Interferentes/Nitrito (%)	**	2,88	7,57	8,15	0,32
Sensibilidade ($\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L mm}^{-2}$)	90,00	2,59*	6,81*	7,34*	0,23
Repetitividade (%)	91,28	87,12	84,48	87,91	97,26
Estabilidade ($\text{pA} \pm 6\text{pA}$)	$0,4 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$	$13,0 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,1$	$15,0 \pm 0,3$
Reprodutividade (%)	99,66	**	**	**	**
Permissividade (%)	6,57	**	**	**	**

* sensor com eletrodo de medição sem DAB, ** não calculado

Os resultados apresentados na Tabela 12 indicam mais seletividade aos interferentes que ao nitrito, porém a sensibilidade é maior para o nitrito. Em todos os casos apresenta boa repetitividade de medições entre 84 a 97 % e a reprodutividade na medição na ordem de 99,66 %. Observa-se excelente estabilidade, possível devido à combinação do eletrodo de referência com Náfion e o eletrodo de medição com DAB. A permissividade do DAB é baixa para nitrito, porém quando nitrito com interferentes a corrente passa para o ordem de μA .

4.7 Da Armazenagem do Sensor Fabricado

Os testes realizados neste trabalho indicaram que armazenar os sensores em soro fisiológico garante a preservação das características iniciais dos eletrodos, sem apresentar variações significativas nas medições.

4.8 Da Vida Útil e Descarte do Sensor

Com os resultados obtidos neste trabalho, os quais foram sistematicamente embasados na avaliação dos parâmetros-padrão, pode-se inferir que o tempo de vida mínimo que assegura as condições iniciais do sensor está na ordem de três dias. Com isso, pode-se medir nitrito e seus interferentes durante esse tempo sem qualquer desgaste significativo do sensor. Após esse tempo de uso os sensores devem ser descartados em sacos plásticos vedados.

5 TRABALHOS FUTUROS

A presente dissertação pode ter diversos desdobramentos futuros, entre os quais podemos destacar:

1^a – Realizar as adequações necessárias no sistema do aparato extracorpóreo, possibilitando integrar todas as partes. A análise por Injeção em Fluxo Automatizada (uso de bomba compressora de ar e microválvulas), analisador amperostato e sistema fluídico (tubos, conexões e cela de análise), neste caso será otimizada;

2^a – Estudar a utilização de novas membranas seletivas que permitirão aumentar a sensibilidade e seletividade do sensor para nitrito.

3^a – Fabricar um lote de sensores, para intensificar os estudos quanto aos parâmetros-padrão. Desse modo, será possível calcular as curvas de calibração do sensor para nitrito, considerando a mínima influência dos interferentes. Por meio dessas curvas será possível a realização de um tratamento matemático e estatístico, relacionando a resposta de nitrito com a dos interferentes.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentado o aparato extracorpóreo para monitoramento de nitrito através da Análise por Injeção em Fluxo Automatizada. O sensor eletroquímico planar definido com três eletrodos acoplado à cela eletroquímica. O projeto desse aparato permitiu uma configuração que visa obter um sistema de análise com as seguintes características: mínimo volume morto, pequena quantidade de solução de análise, menor tempo de resposta do sensor, reduzida oclusão do eletrodo de trabalho, máximo ganho em repetitividade, reprodutividade, sensibilidade, seletividade, estabilidade e procedimento de limpeza.

Foi apresentado o projeto e a construção dos sensores, baseando-se em um sistema eletroquímico de três eletrodos definidos por técnica de *screen-printed* sobre um substrato de alumina. Os sensores eletroquímicos são de fácil obtenção e de alta reprodutividade, são produzidos em grandes lotes, apresentam baixo custo de fabricação e são adequados para o monitoramento em Unidades de Terapia Intensiva de espécies bioquímicas a serem analisadas *in vitro*.

Depois dos eletrodos definidos no sensor realizou-se uma limpeza padrão para eliminar particulados, orgânicos, óxidos, hidróxidos e metais. A limpeza mais eficaz proporcionou um sistema de medição com ativação da superfície dos eletrodos de trabalho e um referência estável com potencial conhecido. Consequentemente, obteve-se sucesso na análise de nitrito e na obtenção de filmes de cloreto de prata com boa homogeneidade, aderência e rugosidade. O procedimento de limpeza foi realizado em três etapas, a saber: I) limpeza física: polimento com alumina gel 0,05 μm ; II) limpeza química: álcool, acetona, ácido clorídrico e ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} ; III) limpeza eletroquímica: ácido sulfúrico diluído.

Neste trabalho foi apresentado o processo para obtenção, secagem, acondicionamento e caracterização do filme espesso de AgCl utilizado na fabricação de pseudo-eletrodos de referência. Considerando que durante a deposição

eletroquímica podem ocorrer defeitos pontuais e regiões de nódulos (AgCl não homogêneo) no filme em questão, o estudo de secagem e de acondicionamento em soluções salinas permitiu demonstrar a minimização dos defeitos e dos nódulos. Isso proporcionou um filme de AgCl com melhor homogeneidade, aderência e com baixa rugosidade.

A verificação do potencial de deposição eletroquímico para a densidade de corrente de $0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ obtido pela técnica LSV e a deposição amperométrica pela técnica TB também contribuiu para obter filmes espessos de AgCl com homogeneidade, aderência, rugosidade e estabilidade adequada. Isso permitiu eletrodos de referência com bom desempenho e baixa histerese.

A caracterização dos eletrodos de referência foi realizada em três etapas (i) teste de reversibilidade do Ag/AgCl, (ii) variação do potencial de eletrodo com a concentração de cloreto e (iii) variação do potencial de eletrodo com o tempo. Com a caracterização, verificou-se que os eletrodos de referência possuíam boa estabilidade quando recobertos com Náfon[®] 117, traduzindo em uma linha base com mínimo declive.

O pseudo-eletrodo de referência Ag/AgCl recoberto com Náfon[®] 117 apresentou a melhor performance devido à ação deste polímero que é capaz de selecionar a permeabilidade de íons positivos, evitando a difusão de íons negativos. Isto indicou melhor estabilidade do potencial de referência, pois o pseudo-eletrodo de referência passa a ter menor influência da concentração de cloreto no filme AgCl, pois estão recobertos com Náfon[®] 117.

Também foram descritas a ativação e a caracterização dos eletrodos de trabalhos para monitoramento de nitrito e seus interferentes (paracetamol, ácido úrico e ácido ascórbico). Observa-se que a membrana de 1-2 Diaminobenzeno (DAB) reduz, significativamente, a influência dos interferentes na análise eletroquímica de nitrito, deixando o sinal de resposta da mesma ordem (nA) da medição do nitrito.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que os sensores eletroquímicos planares são adequados para a análise por FIA-automatizada de nitrito e de seus interferentes na faixa de 50 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O baixo custo de fabricação dos sensores, a alta reprodutibilidade e mínima contaminação os tornam atraentes para aplicação em ambiente bioquímico de biocompatibilidade controlada. Também são adequados para integração em sistemas de medição com a cela de análise, a fluídica e a aquisição de dados em um mesmo sistema extracorpóreo.

7 REFERÊNCIAS

- [1] MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, p. 785–803, 2001.
- [2] COBBOLD, R. S. C. **Transducers for Biomedical Measurements**. 1974.
- [3] SEYAMA, T. Chemical Sensor Technology. vol. 1, chap. 1. Elsevier, 1988.
- [4] MENDELSON, Y. IEEE Engineering in Medicine and Biology, June/July 1994.
- [5] The National Cancer Institutes Rockville MD 20852- USA, Biosensor technologies. **Methods** vol. 37, pp 1–3, 2005.
- [6] ALMEIDA, F. L.; FONTES, M. B. A. Catheter Based Biosensor: Assembling and Characterization In: Chip on the Mountains - 6th Microelectronic Students Forum, 2006, Ouro Preto. **Chip on the Mountains - 6th Microelectronic Students Forum**. Ouro Preto / MG, 2006.
- [7] RICCARDI, C. S.; COSTA P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química. Nova**, v. 25, nº. 2, p. 316-320, 2002.
- [8] IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997). (1992) International Union of Pure and Applied Chemistry Research Triangle Park, NC, USA.
- [9] SUZUKI, H.; TAURA, T. Advances in the microfabrication of sensors electrochemical and systems. **J. Electrochem. Soc.**, v. 12, p. 468-474, 2001.
- [10] LASCHI, S., MASCINI, M., Planar electrochemical sensors for biomedical applications, **Medical Engineering & Physics**, nº. 28, p. 934–943, 2006.
- [11] ROCHA, Z. M. Desenvolvimento de dispositivos de um Meso-Sistema FIA para Análise de Metais Pesados em Água, Usando a Tecnologia LTCC. 2005. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica, Universidade de São Paulo - USP), São Paulo, 2008.

- [12] ROCHA, Z. M. et al. Fabrication of Reference Electrodes for LTCC Miniaturized Chemical Sensors. **5th Ibero-American Congress on Sensors (IBERSENSOR)**, 2006. 2008, Montivideo/Uruguai. Proceedings of the Ibersensor 2006, CD-ROM, 2006.
- [13] BONETTE, M. L. M. **Desenvolvimento de Biossensores usando Técnicas Serigráficas**. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Sistema Integráveis da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005 e apresentado na Universidade Estadual Paulista Instituto de Química – UNESP Campus de Araraquara, 2005 (Relatório de pesquisa).
- [14] YAMANAKA, L. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Sistema Integráveis da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006 (Relatório de pesquisa).
- [15] PEPPE, F. **Descrição da Construção dos Eletrodos Planares**. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Sistema Integráveis da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006 (Relatório de pesquisa).
- [16] GÓMEZ, C. H. **Sensores Electroquimicos de Tres Electroodos**. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Sistema Integráveis da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009 (Relatório de pesquisa).
- [17] FERREIRA, A. A. P. et al. Caracterização Eletroquímica de Eletrodos Impressos Fabricados com Tecnologia de Filme Espesso. In: **6th Ibero-American Congress on Sensors (IBERSENSOR)**, 2008, São Paulo/Brasil. Proceedings of the Ibersensor 2008, CD-ROM, 2008.
- [18] FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S. ; SUEGAMA, P. H. ; BENEDETTI, A. V. Electrochemical and spectroscopic characterization of the SAMs on screen-printed electrodes. In: **59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)**, 2008, Seville/Spain. Book of Abstracts 59th Annual Meeting of the ISE, p. 74, s01-P-008, 2008.
- [19] FERREIRA, A. A. P. ; BENEDETTI, A. V. ; FERTONANI, F L ; YAMANAKA, H. . Investigações voltamétricas do sistema H₂O₂/KI em eletrodos de Pt, Au e impresso AuPd. In: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina-PR. **Anais do XV SIBEE**, 2005. p. 350-352.
- [20] http://daanvanalten.nl/quimica/images_bestanden/naclemagua2.jpg e <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/69/Watermolecule.png>, acesso em 29/11/08.

- [21] www.esainc.com, acesso em 07/10/08.
- [22] WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão**. São Paulo, 2003.
- [23] GIROTTO, E. M.; DE PAOLI, M.A. Transporte de Massa em Polímeros Intrinsecamente Condutores: Importância, Técnicas e Modelos Teóricos. **Química Nova**, v. 22, nº 3, p. 358-368, 1999.
- [24] SCAFF, R. **Caracterização elétrica de dispositivos tipo ISFET com estrutura Si/SiO₂/Si₃N₄ para medição de pH utilizando pseudoeletrodos de Pt, Ag e Au**, 2008. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Elétrica, Universidade de São Paulo - USP), São Paulo, 2008.
- [25] GUO, J.; GUO, J.; XU, Z.. Recycling of non-metallic fractions from waste printed circuit boards: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 567–590, 2009.
- [26] FERNANDES, J. C. B.; OLIVEIRA NETO; L. T. K. G. Eletrodos Íons-seletivos: Histórico, Mecanismo de Resposta, Seletividade e Revisão dos Conceitos. **Química Nova**, v. 24, nº. 1, p. 120-130, 2001.
- [27] EWING, G. W. **Introdução aos métodos eletroquímicos**. v. 1, cap. 11. 1977.
- [28] JANZ, G. J.; IVES, D. J. G. **Reference Electrodes: Theory and Practice**, chap 4, Academic Press, 1961.
- [29] HORWOOD, E. **Instrumental methods in Electrochemistry**. Southampton Electrochemistry Group, University of Southampton, Physical Chemistry, pp. 360, 2001.
- [30] ALEIXO, L. M. **Voltametria: conceitos e técnicas**. www.chemkeys.com, mar. 2003, acesso em 14/05/2006.
- [31] ALMEIDA, F. L. **Montagem e Caracterização de sensores eletroquímicos em cateteres**, 2006. (Trabalho de Graduação: Materiais, Processos e Componentes Eletrônicos), Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC-SP), São Paulo, 2006.

- [32] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. Electrochemistry - Principles, Methods, and Applications. **Oxford University Press**, 1994.
- [33] ALMEIDA, F. L.; Fontes, M. B. A.; Jimenez, C. and Burdallo, I. Secondary Ag/AgCl Pseudo-Reference Electrode on Silicon Substrate. **ECStranactions Microelectronics Technology and Devices - SBMicro 2008**, v. 14, n. 1, p.73-82, 2008.
- [34] SUZUKI, H.; TAURA, T. Thin-Film Ag/AgCl Structure and Operational Modes to Realize Long-Term Storage. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 12, n. 148, p. 468-474, 2001.
- [35] RASOOLY, A. Biosensor Technologies. **Methods**, v. 37, p. 1–3, 2005.
- [36] KWON, N-H.; LEE, K-S; WON, M-S.; SHIM, Y-B. An all-solid-state reference electrode based on the layer-by-layer polymer coating. **Analyst**, v. 132, p. 906–912, 2007.
- [37] FULGARO, D. A.; BRETT, C. M. A. Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: Aplicação em análise ambientais. **Química Nova**, v. 23, nº 6, 2000.
- [38] BERTOTTI, M. Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos. Editorial 1. **Jornal Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP)**, São Paulo, ago., 2004.
- [39] WEBSTER, J. G. **Medical Instrumentation: Application and Design**, 1995.
- [40] COFFEY, G. W.; et al. Fabrication and characterization of a novel Luggin capillary reference electrode for use in solid state electrolytes. **Solid State Ionics**, v. 178, p. 827–832, 2007.
- [41] CARDOSO, J. L. **Desenvolvimento de um instrumento virtual aplicado a um potenciostato para detecção eletroquímica**. 2003. Dissertação (Trabalho de Graduação: Materiais, Processos e Componentes Eletrônicos), Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC-SP), São Paulo, 2003.
- [42] MABBOTT, G. A. An Introduction to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemicals Education**, v. 60, nº. 9, p. 697-701, 1983.

- [43] KISSINGER, P. T.; HEINEMAM, W. R. Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemicals Education**, v. 60, nº. 9, p. 702-706, 1983.
- [44] BUFFLE, J.; TERCIER-WAEBER, M.-L. Voltammetric environmental tracemetal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Analytical Chemistry**, v. 24, nº. 3, 2005.
- [45] CARDOSO, J. L. São Paulo: LSI-USP, 2005. (Relatório Técnico DTI CNPq).
- [46] TESKE, A.; ALM, E.; REGAN, J. M.; TOZE, S.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bactéria. **Journal of Bacteriology**, v. 176, nº. 21, p. 6623-6630, 1994.
- [47] MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B. Níveis de Nitrito e Nitrato em Salsichas Comercializadas na Região Metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologias de Alimentos**, Campinas, v. 24, nº. 3, p. 390-392, jul./set., 2004.
- [48] RAJESHWAR, K.; IBANEZ, J. G. Environmental Electrochemistry. **Academic press**, California, p. 29, 1997.
- [49] GREENBERG, L. A.; LESTER, D.; HAGGAR, H. W. The Reaction of Hemoglobin With Nitrite. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 665-673, 1943.
- [50] TOMODA, A.; TSUJIT, A.; YONEYAMA, Y. Involvement of superoxide anion in the reaction mechanism of haemoglobin oxidation by nitrite. **Journal Biochemical**. v. 193, p. 169-179, 1981.
- [51] DEJAM, A.; et al. Schechter Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. **Blood**, v. 106, nº. 2, 2005.
- [52] SATO, A. F. et al. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **Jour Bras Patol Med Lab**, v. 41, nº. 6, p. 397-404, 2005.
- [53] QUAN, D.; et al. Electrochemical characterization of biosensor based on nitrite reductase and methyl viologen co-immobilized glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 69, p. 267-275, 2006.

- [54] EES, H.; SIMPSON, J. R. The Biochemistry of the Nitrifying Organisms. **Biochemical**, v. 65, 1957.
- [55] OKADA, T.; KARUBE, I.; SUZUKI, S. NO₂ Sensor which Uses Immobilized Nitrite Oxidizing Bactéria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 1641-1651, 1983.
- [56] MATTOS, I. L.; Gorton, L. Filmes de Metal-Hexacianoferrato: Uma Ferramenta em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, nº. 2, p. 200-205, 2001.
- [57] LifeSan Healthcare Inc. 1998.
- [58] http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_human_blood_components, acesso em 20/05/09.
- [59] NASSEF, H. M.; RADI, A-E.; O'SULLIVAN, Ciara. Simultaneous detection of ascorbate and uric acid using a selectively catalytic surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p.182–189, 2007.
- [60] PAIXÃO, T. R. L. C.; BERTOTTI, M. FIA determination of ascorbic acid at low potential using a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 528–533, 2008.
- [61] IZUMI, K.; CASSENS, R. G. M.; GREASER, L. Reaction of Nitrite with Ascorbic Acid and its Significant Role in Nitrite-cured Food. **Meat Science**, v. 26, p. 141-153, 1989.
- [62] RAJ, C. R.; OHSAKA, T. Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 540, p. 69-77, 2003.
- [63] SUAREZ, W. T.; VIEIRA, H. J., FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos empregando um sistema de análise por injeção em fluxo com geração de ácido nitroso. **Ecl. Química**, v. 30, p. 21-28, 2005.
- [64] HEITMEIER S.; BLASCHKE, G. Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet

and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 721, p. 93–108, 1999.

- [65] <http://www.uniaoquimica.com.br/Bulas/cloridratodedopamina.pdf>, acesso 09/08/09.
- [66] LEWIS, D. The Metabolism of Nitrate and Nitrite in the Sheep. Biochemical Laboratory University of Cambridge, v. 48, 1950.
- [67] BADEA, M. et al. New electrochemical sensors for detection of nitrites and nitrates. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 509, p. 66–72, 2001.
- [68] OROZCO, J. Informe de caracterización de microelectrodos de 4 barras de platino por CV. **CNM – Espanha**, 2006.
- [69] JIN, X.; LU, J.; LIU, P.; TONG, H. The electrochemical formation and reduction of a thick AgCl deposition layer on a silver substrate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 542, p. 85-96, 2003.
- [70] ALMEIDA, F. L.; BURDALLO, I. **Fabricación y Caracterización de Electroodos de Referencia sobre una Capa de Oro**. Projeto SENSAME, Centro Nacional de Microeletrônica (CNM), Barcelona, Espanha, 2008. (Relatório de pesquisa).
- [71] SANTOS FILHO, S. G.; HASENACK, C. M.; SALAY, L. C.; MERTENS, P. W. A Less Critical Cleaning Procedure for Silicon Wafers Using Diluted HF Dip and Boiling in Isopropyl Alcohol as Final Steps. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 142, n. 3, p. 902-907, 1995.
- [72] OLIVEIRA, L. M. **Caracterização de um Microssensor Eletroquímico**. 2000. (Trabalho de Graduação: Materiais, Processos e Componentes Eletrônicos), Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC-SP), São Paulo, 2000.
- [73] ZOLFAGHARI, A.; CONWAY, B. E.; JERKIEWICZ, G. Elucidation of the effects of competitive adsorption of Cl^- and Br^- ions on the initial stages of Pt surface oxidation by means of electrochemical nanogravimetry. **Electrochimica Acta**, v. 47, p. 1173–1187, 2002.

- [74] LI, N.; LIPKOWSKI, J. Chronocoulometric studies of chloride adsorption at the Pt(111) electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 491, p. 95–102, 2000.
- [75] SHI, Z.; LIPKOWSKI, J. Chloride adsorption at the Au(111) electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 403, p. 225-239, 1996.
- [76] CUESTA, A.; KOLB, D. M. The structure of bromide and chloride adlayers on Au(100) electrodes: an in situ STM study. **Surface Science**, v. 465, p. 310-316, 2000.
- [77] GAO, W. et al. Chlorine Adsorption on Au(111): Chlorine Overlayer or Surface Chloride?. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 3560-3565, 2008.
- [78] ADHIKAR, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 29, p. 699–766, 2004.
- [79] FONTES, M. B. A. **Desenvolvimento de um Sensor de Óxido Nítrico baseado na Tecnologia Planar de Silício**. 1999. cap. 5. (Tese de Doutorado), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1999.
- [80] ALMEIDA, F. L.; FONTES, M. B. A. Influence of the Interferers in the Nitrite Detection by Using Planar Electrochemical Sensors. **ECStranactions Microelectronics Technology and Devices - SBMicro2007**, v. 9, n. 1, p. 545-551, 2007.
- [81] BIAGIOTTI, V. et al. Synthesis and characterization of polymeric films and nanotubule nets used to assemble selective sensors for nitrite detection in drinking water. **Sensors and Actuators B**, v. 122, p. 236–242, 2007.
- [82] SUZUKI, H.; OZAWA, H.; SASAKI, S.; KARUBE, I. A novel thin-film Ag/AgCl anode structure for microfabricated Clark-type oxygen electrodes. **Sensors and Actuators B**, v. 53, p. 140–146, 1998.
- [83] SUZUKI, H.; HIRATSUKA, A.; SASAKI, S.; KARUBE, I. Problems associated with the thin-film Ag/AgCl reference electrode and novel structure with improved durability. **Sensors and actuators B chemical**, v. 46, p. 104-113, 1998.

- 4] ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. **Pseudo-Eletrodo de Referência Ag/AgCl sobre Substrato Planar de Alumina: Eletrodeposição, Acondicionamento e Caracterização do Filme de Cloreto**. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE. Fortaleza / CE, 2009.
- [85] ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. **Pseudo-eletrodo de Referência Ag/AgCl Recoberto com Náfon® 117: Aumento da Estabilidade, Redução da Corrosão e da Sensibilidade ao Cloreto**. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE. Fortaleza / CE, 2009.
- [86] BAKKER, E. Hydrophobic membranes as liquid Junction-Free Reference Electrodes. **Electroanalysis**, v. 11, nº. 10-11, 1999.
- [87] ALMEIDA, F. L.; BURDALLO, I.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C.; FONTES, M. B. A. **Desarrollo de un Pseudo-electrodo de Referencia de Ag/AgCl Integrado en un Microsensor de Silicio**, 2008. (VI Congresso Ibersensor 2008, São Paulo - Brasil, Apresentação de Trabalho).
- [88] VANÝSEK, P. Electrochemical Series CRC. <http://www.nmsl.chem.ccu.edu.tw/pdf/CRC%20Handbook>, acesso em 15/05/2008.
- [89] JEDLICKOVA, V.; PALUCH, Z.; ALUSIK, S. Determination of nitrate and nitrite by high-performance liquid chromatography in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 780, p. 193–197, 2002.
- [90] ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. Eletrodos de Referência em Estado Sólido Integrados sobre Substrato de Alumina. **Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo**, v. 25, 2008.

APÊNDICE A – Lista de publicações produzidas durante a realização deste trabalho.

1. ALMEIDA, F. L.; FONTES, M. B. A. Influence of the Interferers in the Nitrite Detection by Using Planar Electrochemical Sensors. **ECStranactions Microelectronics Technology and Devices - SBMicro2007**, v. 9, n. 1, p. 545-551, 2007.
2. ALMEIDA, F. L.; BURDALLO, I. **Fabricación y Caracterización de Electrodo de Referencia sobre una Capa de Oro**. Projeto SENSAME, Centro Nacional de Microeletrônica (CNM), Barcelona, Espanha, 2008. (Relatório de pesquisa).
3. ALMEIDA, F. L.; BURDALLO, I.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C.; FONTES, M. B. A. **Desarrollo de un Pseudo-electrodo de Referencia de Ag/AgCl Integrado en un Microsensor de Silicio**, 2008. (VI Congresso Ibersensor 2008, São Paulo - Brasil, Apresentação de Trabalho).
4. ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. Eletrodos de Referência em Estado Sólido Integrados sobre Substrato de Alumina. **Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo**, v. 25, 2008.
5. ALMEIDA, F. L.; FONTES, M. B. A.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C. and Burdallo, I. Secondary Ag/AgCl Pseudo-Reference Electrode on Silicon Substrate. **ECStranactions Microelectronics Technology and Devices - SBMicro 2008**, v. 14, n. 1, p.73-82, 2008.
6. LEMINSKI, R. E. B.; SIMÕES, E. W.; BERALDO, F. P.; ALMEIDA, F. L.; SILVA, M. L. P. **Biosensors development: Manufacturing and simulation of meso-impactors for blood manipulation**. VII Encontro da SBPMat. Guarujá / SP, 2008.
7. ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. **Pseudo-Eletrodo de Referência Ag/AgCl sobre Substrato Planar de Alumina: Eletrodeposição, Acondicionamento e Caracterização do Filme de Cloreto**. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE. Fortaleza / CE, 2009.
8. ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. **Pseudo-eletrodo de Referência Ag/Agcl Recoberto com Náfion® 117: Aumento da Estabilidade, Redução**

- da Corrosão e da Sensibilidade ao Cloreto.** XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE. Fortaleza / CE, 2009.
9. IGARASHI, M. O.; SOUZA, R. F. B.; ALMEIDA, F. L. et al. **Interação de Polianilina em Ouro com Sulfito de Sódio: um Estudo Eletroquímico.** XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE. Fortaleza / CE, 2009.
10. IGARASHI, M. O.; ALMEIDA, F. L. et al. **Desenvolvimento de um Galvanostato para deposição eletroquímica aplicado à formação de pseudo-eletrodos de referência Ag/AgCl.** 32 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Fortaleza / CE, 2009.
11. ALMEIDA, F. L.; IGARASHI, M. O.; SANTOS FILHO, S. G.; **Deposição Galvânica de filme Ag/AgCl espesso para obtenção de pseudo-eletrodos de referência.** 32 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Fortaleza / CE, 2009.
12. ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Chloride Adsorption over Gold Surface: An Amperometric Sensor of Cl^- . 11th International Conference on Advanced Materials – ICAM 2009, Rio de Janeiro / RJ, 2009.
13. ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. Flow-injection Analysis Technique Used to Electrochemically Measure Nitrite through a Gold Working Electrode Modified with 1-2 Diaminobenzene (DAB). **ECStranactions Microelectronics Technology and Devices – SBMicro**, v.23, 2009.
14. ALMEIDA, F. L.; CARDOSO, J.; IGARASHI, M.O.; SANTOS FILHO, S. G.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C.; FONTES, M. B. A. Marcelo Fabrication Process of Ag/AgCl Reference Pseudo-Electrode Based on Electrodeposition of Au on Pt Surfaces from Formaldehyde Baths: Chemical Stability and Adherence. **ECStranactions Microelectronics Technology and Devices – SBMicro**, v.23, 2009.

ANEXO A – *Layout do Software desenvolvido, em LabView[®], por CARDOSO, J. 2009 para operação das microválvulas, controlando o tempo de injeção, ciclos (números de medição) e tempo de limpeza.*

ANEXO B – *Layout do Software desenvolvido, em LabView[®], por CARDOSO, J. 2009 para caracterização de até 10 eletrodos de referência em função do tempo.*

ANEXO C – *Layout* do circuito desenvolvido por IGARASHI, M. para confecção a placa controladora das microválvulas.