UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Química

NATHÁLIA FLORENCIA BARROS AZEREDO

**Desenvolvimento de (bio)sensores
(nano)estruturados visando a determinação de
analitos em amostras farmacêuticas e fluidos
biológicos.**

Versão corrigida da Tese apresentada conforme Resolução CopGr 5890

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo
Data de depósito
10/08/2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Química

NATHÁLIA FLORENCIA BARROS AZEREDO

**Desenvolvimento de (bio)sensores
(nano)estruturados visando a determinação de
analitos em amostras farmacêuticas e fluidos
biológicos.**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutora em Ciências (Química).

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A993d AZEREDO, NATHALIA FLORENCIA BARROS
Desenvolvimento de (bio)sensores
(nano)estruturados visando a determinações de
analitos em amostras farmacêuticas e fluidos
biológicos / NATHALIA FLORENCIA BARROS AZEREDO. -
São Paulo, 2021.
159 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.
Orientador: Angnes, Lucio

1. (Bio)Sensores eletroquímicos. 2. Sistemas em
fluxo. 3. Nanocatalisadores. 4. Fluidos biológicos.
5. Hidróxidos bimetálicos e trimetálicos de níquel.
I. T. II. Angnes, Lucio, orientador.

"Desenvolvimento de (bio)sensores (nano)estruturados visando a determinação de analitos em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos"

NATHÁLIA FLORÊNCIA BARROS AZEREDO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - no Programa de Química.

Prof. Dr. Lucio Angnes
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Prof. Dr. Mauro Bertotti
IQ - USP

Prof. Dr. Almir Oliveira Neto
IPEN

Prof. Dr. William Reis de Araujo
IQ - UNICAMP

SÃO PAULO
13 de setembro de 2021

DEDICATÓRIA

*À minha querida mãe Maria Emília
por todo amor, carinho, afeto,
cuidado e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Ao todo poderoso Deus, que pela sua graça e misericórdia me deu condição de chegar até aqui. Pois tudo é para sua honra e glória.

À minha família (meus pais Carlos Augusto e Maria Emília e meu irmão Gustavo) pelo amor e apoio incondicional.

Ao Prof Lúcio, pela oportunidade, orientação e toda sua contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Aos membros da banca, Professores Almir, Mauro e William por aceitarem o convite em contribuir com esse trabalho.

Aos meus colegas do Laia (Laboratório de automação e instrumentação analítica) pelas boas conversas, cafés e ajudas sempre bem-vindas. Agradeço a todos (Anabel, Berlane, Diego, Eleilton, Eric (Pop), Irlan, Josué, Mauro, Meissan, Pamela, Zuzana) pela amizade e por terem sido bons companheiros para mim.

Aos demais companheiros do Instituto de Química da USP (Adriana, Andressa, Camila, Cleia, Denise, Eliomar, Fabian, Ian, Leandro, Leonnan, Renato, Roberta e Vanessa) que também foram muito importantes na construção dessa história.

A todos os técnicos de laboratório do IQ-USP, especialmente o Fernando e Daniel, sempre bem-dispostos e com boa vontade para ajudar.

Aos funcionários administrativos do Programa de Pós-graduação do IQ-USP, Milton e Vanderlei por todo suporte.

Aos Prof Claudimir e Ivano, com os quais dividi o espaço do laboratório e compartilhei bons momentos e experiências.

Ao Prof Koiti, pela sua valiosa colaboração em diversos trabalhos.

À Prof Ana Maria, pela boa recepção durante o ano que trabalhamos juntas.

Ao Prof Joseph Wang, que me abriu as portas do seu laboratório por 14 meses na Universidade da Califórnia em San Diego para eu desenvolver parte da minha pesquisa e com quem aprendi muito.

A todos os amigos que fiz durante o doutorado sanduíche, período de muito amadurecimento pessoal e profissional, pelo aprendizado e companheirismo.

Aos meus maravilhosos amigos da CCB que tornaram o meu tempo em São Paulo memorável e às amigas que levo para a vida: Bianca, Camila, Helen e Mayumi.

À Capes, pelas bolsas de doutorado no país, doutorado sanduíche (PDSE) e capacitação de doutorandos no exterior (edital Capes-Print).

*Eu me lembro, eu me lembro, eu era moço
Trabalhava com fervor. O ar fedia.
De vez em quando um frasco explodia,
Cobrindo de sujeira o meu almoço.*

*Dizia ao professor nesses momentos:
“Que dura orquestra, que terríveis danos!
Será que aguento isso muitos anos?
A fúria singular dos elementos?”*

*O professor sorria com clemência:
“Se trabalhares como dez camelos,
Se perderes todos os teus cabelos,
poderás então saber o que é ciência!”*

Sigrid Bandel

Química pela USP em 1960

Resumo

Azeredo, N.F.B., Desenvolvimento de (bio)sensores (nano)estruturados visando a determinação de analitos em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos. 2021. 159 p. Tese de doutorado - Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O uso de nanopartículas (NPs) e de enzimas no desenvolvimento de (bio)sensores eletroquímicos tem se intensificado, visando a determinação de analitos de interesse farmacológico e biológico. Os (bio)sensores preparados apresentam uma maior sensibilidade, melhor eletrocatalise e limites de detecção mais baixos em relação aos eletrodos sem modificação. As NPs propiciam um aumento de área superficial, que possibilita um maior acesso dos analitos estudados (passíveis de oxidação ou redução), aos sítios eletroativos na superfície dos eletrodos. Neste sentido, novos (bio)sensores (nano)estruturados foram preparados a partir de hidróxidos duplos de níquel e de enzimas. Os materiais nanoestruturados obtidos foram caracterizados por técnicas como difratometria de raios-X (DRX), análises térmicas (TG e DTA), microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (TEM e SEM, respectivamente), espectrometria ótica de emissão por plasma acoplado (ICP-OES) e espectroscopia de fotoelétrons excitado por raios-X (XPS). Células eletroquímicas para análise por injeção em batelada (BIA) foram confeccionadas para a aplicação dos eletrodos na análise de fármacos, enxaguante bucal e fluidos biológicos (suor e saliva). A modificação dos eletrodos de FTO (óxido de estanho dopado com flúor), impressos (SPE) e pasta de carbono (CPE) baseada em NPs de hidróxidos bi- e trimetálicos de níquel (dopado com metais como Pt, Zn, Ce e Ce/V) e/ou enzimas mostrou-se eficiente para determinação de diversos analitos (hidralazina, ácido úrico, acetaminofeno, peróxido de hidrogênio, glicose e lactato), especialmente em meio biológico. Os eletrodos desenvolvidos foram avaliados via métodos voltamétricos e amperométricos associados ao BIA, sendo possível trabalhar em condições mais favoráveis de pHs (meios neutros e/ou levemente ácidos) com esses hidróxidos. Além disso, um biossensor vestível para determinação de glicose no suor e uma célula biocombustível baseada em CPE modificada com lactato oxidase foram desenvolvidos.

Palavras-chave: (Bio)Sensores eletroquímicos, sistemas em fluxo, nanocatalisadores, amostras farmacêuticas, fluidos biológicos, hidróxidos duplos de níquel.

Abstract

Azeredo, N.F.B., Development of (nano)structured (bio)sensors targeting the determination of analytes in pharmaceutical samples and biological fluids. 2021. 159 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo.

The application of nanoparticles (NPs) and enzyme for the development of electrochemical (bio)sensors has been growing for the determination of analytes in pharmacological and biological. Such (bio)sensors revealed a better sensitivity and electrocatalysis, as well as lower limits of detection (micro and nanomolar) compared to the sensors without modification. These nanoparticles promote an increase of the active surface area, which allows greater access of the investigated analytes (liable to oxidation and reduction) to the electroactive sites on the electrode. In this work, new (nano)structured electrochemical (bio)sensors were developed based on nickel double hydroxides and enzymes. The nanostructured materials synthesized were characterized by x-ray diffraction (DRX), thermal analysis (TG and DTA), transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM, respectively), inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-OES) and x-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS). BIA (Batch Injection Analysis) cells were manufactured for the application of the electrodes in the analysis of pharmaceuticals, mouthwash and biological fluids (sweat and saliva). The modification of FTO (fluorine doped tin oxide doped), screen-printed electrodes (SPE) and carbon paste electrodes (CPE) based on bi- and trimetallic nickel hydroxide (doped with metals such as Pt, Zn, Ce and Ce/V) and/or enzymes proved to be efficient for the determination of many analytes (hydralazine, uric acid, acetaminophen, hydrogen peroxide, glucose and lactate), especially in biological medium. The developed sensors were evaluated via electrochemical techniques (such as voltammetry and amperometry) and also associated with BIA in more favorable biological pHs (neutral and/or acidic medium). Furthermore, a wearable biosensor was developed for the determination of glucose in sweat and a stable CPE biofuel cell based on lactate oxidase was demonstrated under the rapid and irreversible pH variations between neutral and acidic media.

Keywords: Electrochemical (bio)sensors, flow systems, nanocatalysts, pharmaceutical samples, biological fluids, double nickel hydroxides.

Lista de abreviaturas e siglas

AAP Acetaminofeno

AM Após a refeição (do inglês *after meal*)

APRL Apresolina

BFC células biocombustíveis

BIA Análise por Injeção em Batelada

BM Antes da refeição (do inglês *before meal*)

C Contra-eletrodo

CPE Eletrodo de pasta de carbono

DRX Difractometria de raios-X

ΔE Diferença de potencial de pico anódico e catódico

E_i Potencial inicial

E_f Potencial final

E_{pa} Potencial de pico anódico

E_{pc} Potencial de pico catódico

EQM Eletrodo quimicamente modificado

FIA Análise por Injeção em Fluxo

FTO Eletrodos de óxido de estanho dopado com flúor (do inglês *fluorine doped thin oxide*)

HRTEM Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

Hy Hidralazina

ICP-OES Espectrômetro ótico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

I_{pa} Corrente de pico anódico

I_{pc} Corrente de pico catódico

IP Iontoforese

LDH hidróxido duplo lamelar (do inglês *layered double hydroxides*)

LOD Limite de detecção (do inglês *limit of detection*)

LOQ Limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*)

LOx Lactato oxidase

NPs Nanopartículas

OCV Potencial de circuito aberto (do inglês *open circuit voltage*)

PD Densidade de potência (do inglês *power density*)

PDMS Polidimetilsiloxano

PET Polietileno tereftalato

PVA Álcool polivinílico

R Eletrodo de referência

RSD Desvio padrão relativo

SEM Microscopia Eletrônica de Varredura (do inglês *Scanning electron microscopy*)

SPE Eletrodos impressos (do inglês *screen-printed electrodes*)

STEM Microscopia eletrônica de transmissão por varredura (do inglês *Scanning transmission electron microscopy*)

TEM Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês *Transmission electron microscopy*)

UA ácido úrico (do inglês *uric acid*)

UV-VIS Espectroscopia Eletrônica no Ultravioleta-Visível

v Velocidade de varredura

W Eletrodo de trabalho (do inglês *working electrode*)

Lista das fórmulas dos diversos analitos estudados

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de modificadores da superfície de eletrodos e um gráfico genérico de uma resposta eletroquímica melhorada para o eletrodo modificado.....	28
Figura 2. Principais procedimentos para modificação de eletrodos com nanomateriais.....	29
Figura 3. A) Ilustração esquemática do processo de fabricação de SPEs, em um substrato usando um estêncil contendo o desenho do eletrodo e um rodo para espalhar a tinta na superfície. B) Eletrodos impressos resultantes, onde C é o contra-eletrodo, W o eletrodo de trabalho e R o eletrodo de referência.....	31
Figura 4. Representação de um eletrodo de pasta de carbono.....	33
Figura 5. Conversões eletroquímicas do hidróxido de níquel em meio alcalino.....	35
Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos para os filmes de α - e β -Ni(OH) ₂ (linha contínua e pontilhada, respectivamente) precipitados na superfície de um cristal de quartzo.....	36
Figura 7. Distribuição das publicações em função dos íons metálicos adicionados à rede de hidróxido de níquel, para aplicação como sensores analíticos.....	38
Figura 8. Classificação das técnicas eletroquímicas com potencial controlado.....	42
Figura 9. Representação de um voltamograma cíclico.....	43
Figura 10. Ilustração do sistema BIA, composto pela pipeta automática, célula eletroquímica e o conjunto de três eletrodos (referência, trabalho e contra-eletrodo).....	45
Figura 11. Ilustração esquemática de um sistema BIA. (A) Sistema eletroquímico BIA contendo a mi-cropipeta na parte superior, a célula no meio e o eletrodo na parte inferior. (B) célula montada e seção transversal mostrando a entrega da amostra e o sinal correspondente registrado. (C) Esquema mostrando o transporte de massa na superfície do eletrodo após uma injeção de amostra e o respectivo sinal obtido. 1) antes da injeção, 2) transporte do material durante a injeção, 3) final da injeção, 4) dispersão, 5) equilíbrio final.....	46
Figura 12. Ilustração dos diferentes sistemas BIA desenvolvido ao longo dos anos...	47
Figura 13. Síntese das nanopartículas dos hidróxidos de níquel.....	52
Figura 14. Modificação dos eletrodos de FTO com as nanopartículas de Ni(OH) ₂	57

Figura 15. A) Representação do processo de impressão de um eletrodo SPE. B) Ilustração das camadas que compõe um SPE.....	58
Figura 16. Análises térmicas (curvas TG em preto e DTA em azul). A) α -Ni(OH) ₂ , B) α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂	61
Figura 17. Difrátogramas de raios-X do A) α -Ni(OH) ₂ , B) α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂ . Radiação de Cu α (1,541 Å, 30 kV, 15 mA).....	62
Figura 18. A) Imagens de TEM convencional do nanomaterial sintetizado. B) e C) Imagens de TEM com alta resolução de α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂	63
Figura 19. Voltametrias cíclicas obtidas para hidralazina na faixa de concentração entre 0,1 e 5 mmol L ⁻¹ com os eletrodos de A) FTO, e B) Carbono vítreo. V = 50 mV s ⁻¹ . Eletrólito: KOH 1,0 mol L ⁻¹	63
Figura 20. Voltamogramas obtidos para adições de 0,05 mmol L ⁻¹ Hy utilizando eletrodos de FTO modificados com: A) α -Ni(OH) ₂ , B) α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂ . A curva de calibração apresenta a variação da corrente em função da concentração do analito. v = 50 mV s ⁻¹ . Eletrólito: KOH 1,0 mol L ⁻¹	64
Figura 21. Amperometria hidrodinâmica obtida para Hy em KOH 1,0 mol L ⁻¹ , utilizando eletrodo de FTO modificados com: A) α -Ni(OH) ₂ , B) α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂ . As respectivas curvas de calibração foram obtidas no potencial fixo de 0,45 V.....	65
Figura 22. BIAgramas obtidos para 45 injeções sucessivas de Hy 50 μ mol L ⁻¹ em KOH 1,0 mol L ⁻¹ no eletrodo de α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂ . O potencial aplicado foi 400 mV vs Ag/AgCl(KCl 3 mol L ⁻¹), a velocidade de injeção de 274 μ L s ⁻¹ e o volume de amostra de 20 μ L.....	66
Figura 23. BIAgramas em triplicata para diferentes concentrações de Hy em KOH 1,0 mol L ⁻¹ no eletrodo de α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂ . O potencial aplicado foi 400 mV vs. Ag/AgCl(KCl 3 mol L ⁻¹), a velocidade de injeção de 274 μ L s ⁻¹ e o volume de amostragem de 20 μ L.....	67
Figura 24. BIAgramas em quadruplicata obtido em KOH 1 mol L ⁻¹ com o eletrodo de α -Ni _{0,98} Pt _{0,02} (OH) ₂ da faixa de 2,0 $\times$ 10 ⁻⁴ a 1,6 $\times$ 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de Hy. O potencial aplicado foi 400 mV vs. Ag/AgCl(KCl 3 mol L ⁻¹), a velocidade de injeção foi 274 μ L s ⁻¹ e o volume de amostragem de 20 μ L.....	68

Figura 25. Determinação de hidralazina em comprimidos de apresolina por UV-VIS. Os pontos foram plotados para a banda observada em 260 nm. A linha tracejada representa a absorbância exibida pelo fármaco APRL.....69

Figura 26. Análises térmicas (curvas TG em preto e DTA em azul). A) α -Ni(OH)₂, B) α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂.....71

Figura 27. Difração de raios-X de ZnO, α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂, α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂ e α -Ni(OH)₂.....72

Figura 28. Imagens de TEM de uma unidade de camada densamente compactada de nanopartículas depositados em folhas de óxido de grafeno e imagens HRTEM correspondentes após uma reação de desidroxilação induzida pelo feixe de elétrons gerando os respectivos óxidos mistos, respectivamente para (A-B) α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ e (C-D) ZnO.....74

Figura 29. (A) Espectro de fotoelétrons de raios X de α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂; (B) Porcentagem atômica determinada a partir do espectro; (C) Ni2p e (D) Espectro de alta resolução do Zn2p.....76

Figura 30. Espectro comparativo de fotoelétrons de raios X de (A) α -Ni(OH)₂ (B) Zn(OH)₂, e (C) α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂.....77

Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de FTO sem modificação, para determinação de UA em solução de KOH 1,0 mol L⁻¹ (v = 50 mV s⁻¹). A reta de corrente em função da [UA] foi plotada referente ao potencial 0,5 V.....78

Figura 32. Voltamogramas cíclicos do (a) α -Ni(OH)₂ (b) α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂, (c) α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂ e (d) α -Zn(OH)₂ NPs modificaram eletrodos FTO, usando eletrodo de referência Ag/AgCl(KCl 3 mol L⁻¹), em concentrações crescentes de UA em solução de KOH 1,0 mol L⁻¹ (v = 50 mV s⁻¹). As inserções mostram os gráficos de corrente em função da concentração [UA].....79

Figura 33. Amperometria hidrodinâmica obtida para um eletrodo FTO modificado por α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ após adições consecutivas de 20 μ L de UA (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹), com um potencial fixo de 0,1 V vs Ag/AgCl(KCl 3 mol L⁻¹). Os valores de corrente vs [UA] e as respectivas regressões lineares são mostradas nas inserções das figuras.....81

- Figura 34. BIAgramas obtidos para 30 injeções sucessivas de UA $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ FTO. O potencial aplicado foi $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})}$, a velocidade de injeção de $274 \mu\text{L s}^{-1}$ e o volume de amostra de $20 \mu\text{L}$82
- Figura 35. BIAgramas obtidos para soluções de $0,1$ a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ UA (usados para a preparação de uma curva padrão) e da amostra real de saliva diluída a 50% com eletrólito de KOH a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, sob as condições otimizadas. Os valores de corrente vs [UA] e as respectivas regressões lineares são mostradas nas inserções das figuras....83
- Figura 36. SPEs impressos em polímero PET utilizando a mistura de 75% NPs e 25% tinta de grafite para os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo.....85
- Figura 37. Voltamogramas cíclicos registrados para adições de ácido úrico na faixa de concentração entre $0,01$ e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$) usando um SPE sem modificação ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....86
- Figura 38. Voltamogramas cíclicos ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) obtidos para concentrações crescentes de UA em PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$) usando SPE preparado com (A) 10% em massa, (B) 25% em massa e (C) 50% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ NPs; (D) Curvas de calibração da corrente vs [UA] para o SPE modificado com 10% em massa de NPs (A), 25% em massa de NPs (B), e 50% em massa de NPs em (C).....87
- Figura 39. Voltamogramas cíclicos de concentrações crescentes de UA no suor artificial ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) em (A) $\text{pH} = 3$ e (B) $\text{pH} = 5$88
- Figura 40. Amperometrias registradas para concentrações crescentes de UA, de 20 a $170 \mu\text{M}$, em suor artificial ($\text{pH} = 5,0$) como eletrólito no potencial de $0,3 \text{ V}$, usando SPE com (A) 25% em massa e, (B) 50% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$89
- Figura 41. Amperometrias obtidas para as espécies interferentes no potencial aplicado $0,3 \text{ V}$, utilizando suor artificial ($\text{pH} = 5,0$) com SPE modificado por 50% em massa de NPs e 50% de tinta. (A) Linha base. (B) primeira adição de UA $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguida de injeções de (C) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ácido ascórbico (D) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ acetaminofeno (E) 5 mmol L^{-1} lactato (F) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ glicose. (G) segunda injeção de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA.....90
- Figura 42. Amperometrias obtidas para adições padrão de UA (entre as concentrações de 25 a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$), usando suor humano como eletrólito e a curva analítica correspondente. A seta indica a linha base (apenas a solução de suor), antes das adições de padrão.....91

- Figura 43. Voltamogramas cíclicos registrados para uma série de adições subsequentes da solução padrão UA de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , respectivamente em: (A) saliva artificial. (B) saliva humana.....92
- Figura 44. Difrátogramas de raios-X de nanopartículas de $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2$ depositadas em um substrato de lamínulas de vidro.....93
- Figura 45. Imagens de SEM de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2/\text{SPEs}$ (A-B) antes de qualquer procedimento eletroquímico; e após 10 ciclos de voltametria (entre 0,2 a 0,8 V (vs Ag/AgCl, 50 mV s^{-1}) em (C-D) PBS (pH = 7,4) e (E-F) saliva artificial (pH = 6,0).....95
- Figura 46. Imagens de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2$: (A) TEM, (B) HRTEM (C) imagem de campo claro mostrando as NPs (pontos escuros) dispersas na superfície de óxido de grafeno e a mesma imagem de campo escuro (D), onde os NPs aparecem como pontos brilhantes.....96
- Figura 47. Representação dos processos redox faradaicos que ocorrem na estrutura de hidróxido duplo de camada $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2$ presente na superfície do SPE utilizado para a determinação de AAP.....97
- Figura 48. Voltamogramas cíclicos obtidos para os SPEs sem modificação utilizando como eletrólitos: (A) Saliva artificial (pH = 6,0) e (B) Suor artificial (pH = 5,0), a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (vs Ag/AgCl), em adições crescentes de acetaminofeno $0,1 \text{ mol L}^{-1}$98
- Figura 49. Voltamogramas cíclicos de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2$ SPE em (A) Suor artificial (pH = 5,0) e (B) Saliva artificial (pH = 6,0), a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrodo de referência Ag/AgCl, e adição de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de [AAP] (até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). As inserções mostram os gráficos de corrente em função da concentração de AAP.....99
- Figura 50. Voltamogramas cíclicos obtidos para $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2$ SPE em KOH $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH = 13), a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrodo de referência Ag/AgCl. As inserções mostram os gráficos de corrente em função de adições crescentes de concentração de AAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A curva de calibração foi plotada no potencial de -45 mV.....100
- Figura 51. Esquema descrevendo o funcionamento do $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}\text{(OH)}_2$ SPE para a determinação de AAP em suor e saliva.....101
- Figura 52. Voltamogramas cíclicos registrados (50 mV s^{-1}) para avaliar o efeito de espécies interferentes vs tinta Ag/AgCl. (A). Suor humano (pH = 5,0) (B) Saliva artificial (pH = 6,2). (a) Linha base em preto, (b) adição de ácido ascórbico em vermelho, (c)

- adição de glicose em azul claro, (d) adição de lactato em ciano, (e) adição de ácido úrico em rosa magenta e (f-h) adições de acetaminofeno.....102
- Figura 53. Voltamogramas cíclicos registrados para adições de AA 0,1 mmol L⁻¹ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$), respectivamente em amostras reais de: (A) Saliva. (B) Suor. As barras de erros foram plotadas baseadas nas medidas de três voltamogramas.....103
- Figura 54. Determinação de AAP em uma amostra de saliva diluída utilizando espectrofotometria UV-VIS. A curva de calibração foi plotada na absorbância de 245 nm em função da concentração de AAP (de $2,9 \times 10^{-5}$ – $6,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).....105
- Figura 55. (A) Representação da estrutura lamelar esperada para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$. (B) Difrátogramas de raios-X obtidos para o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$107
- Figura 56. (A-B) Imagens de TEM para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$, com aumento do grau de ampliação da esquerda para direita. (C) Imagem de HRTEM mostrando o diâmetro médio da nanopartícula, após a reação de desidroxilação / desidratação induzida pelo feixe de elétrons. (D) Imagem STEM de campo claro mostrando as NPs dispersas na superfície do óxido de grafeno. (E) Mesma imagem STEM obtida em campo escuro. (F) Imagem STEM obtida em campo escuro com uma ampliação maior.....108
- Figura 57. Sobreposição dos voltamogramas antes (linha preta) e após (linha vermelha) o tratamento eletroquímico com NaOH 0,5 mol L⁻¹ dos eletrodos de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ na presença de 15 mmol L⁻¹ de H₂O₂ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ vs Ag/AgCl) em KCl 0,1 mol L⁻¹).....109
- Figura 58. Voltametria Hidrodinâmica do $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE após ativação eletroquímica com NaOH 0,5 mol L⁻¹ para otimização do melhor potencial de trabalho na determinação de H₂O₂ 10 mmol L⁻¹. Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹. Eletrólito: KCl 0,1 mol L⁻¹.....110
- Figura 59. Otimização do volume e velocidade de injeção na técnica BIA para determinação de 20 mmol L⁻¹ H₂O₂ utilizando o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE tratado com NaOH 0,5 mol L⁻¹. Eletrólito: KCl 0,1 mol L⁻¹.....111
- Figura 60. BIAgramas obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹, utilizando o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE tratado nas condições otimizadas (Potencial aplicado: -0,8 V; Volume de injeção: 150 $\mu\text{L/s}$). Concentrações de H₂O₂: A) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, B) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, C) $1,0 \times$

$10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, D) $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, E) $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, F) $6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Os gráficos atuais vs $[\text{H}_2\text{O}_2]$ e as linhas de regressão linear são mostrados nas respectivas inserções.....112

Figura 61. A) (a) Representação do dispositivo fluídico com sensor eletroquímico colocado no braço do voluntário. (b) Sistema de eletrodos iontoforéticos com a placa eletrônica capaz de realizar transmissão de sinal sem fio (i) Cátodo e (ii) ânodo. (c) Resposta eletroquímica típica do dispositivo fluídico: (i) Inicialmente, a corrente zero é medida durante o tempo de aplicação da corrente iontoforética devido à ausência de suor. (ii) Suor em contato com o detector. (iii) Resposta eletroquímica do biossensor na presença de glicose no suor. B) Esquema mostrando as camadas do dispositivo de cima para baixo. C) Esquema mostrando os compartimentos do ânodo e do cátodo para a administração da pilocarpina e geração de suor. Uma gota do gel de agarose com Pilocarpina é aplicado no topo do ânodo. O suor é gerado e coletado na área de entrada situada nos micropilares do PDMS, o suor coletado flui pelos canais e é detectado na área do reservatório. (a) Vista frontal do dispositivo mostrando a direção do fluxo. (b) Vista posterior do dispositivo mostrando o ânodo com o eletrodo dourado.....121

Figura 62. A) Estudo da resiliência mecânica do dispositivo fluídico IP (a) antes das deformações. (b) Flexão. (c) Alongamento. (d) torção e (e) após deformações. B) Representação mostrando o dispositivo antes da transferência para a pele (a) com as entradas para cima. (b) Após a transferência para a pele e (c) após a estimulação do suor. (d) Dispositivo preenchido removido da pele após operação.....123

Figura 63. Otimização de dispositivo microfluídico: A) Otimização de densidade de corrente IP de acordo com a área do eletrodo de $0,368 \text{ cm}^2$: (a) Esquema do sistema usado para medir o volume total de suor gerado após diferentes densidades de corrente iontoforese (IP) aplicadas. (b) Gráfico correspondente ao volume de suor coletado com o dispositivo microfluídico após 5 minutos de IP versus as várias densidades de corrente estudadas. (B) Otimização do tempo IP aplicando a densidade de corrente de $0,4 \text{ mA cm}^{-2}$: (a) Gráfico mostrando o tempo IP vs. tempo de preenchimento do dispositivo com 3 entradas. (b) Testes corporais com dispositivo de 3 entradas após 5 min, 10 min e 20 min de IP. As fotos foram tiradas 15 minutos após o término de cada IP. c) Otimização do número de entradas aplicando a densidade de

corrente de $0,4 \text{ mA cm}^{-2}$ e 10 minutos de IP para diferentes números de entradas. Gráfico mostrando o tempo medido para encher o dispositivo para os dispositivos com diferentes números de entradas de suor. (d) Testes corporais com dispositivo de 2, 3 e 4 entradas.....125

Figura 64. Linha do tempo explicando o experimento realizado. A) O sinal eletroquímico da glicose é obtido após 10 min de iontoforese para estimulação do suor, tanto quando o indivíduo está em jejum como após a ingestão da refeição. B) Representação esquemática do princípio de funcionamento do dispositivo microfluídico. O suor foi colorido com tinta azul para melhor visualização. Primeiro, o suor entra no dispositivo por meio de pequenos orifícios nas entradas. Após 10 a 15 min, o suor começa a encher o reservatório. Em seguida, a corrente aumenta devido ao registro do sinal da medição de glicose e estabiliza após 20 min.....127

Figura 65. Experimentos no corpo para detecção de glicose no suor, usando o dispositivo microfluídico e aplicando uma corrente constante de $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$. As amperometrias foram obtidas para diferentes voluntários antes (B.M.) e depois (A.M.) de uma refeição. No lado direito, um gráfico de barra mostra a correlação obtida entre a corrente gerada para a glicose no suor e os valores de glicose no sangue. Antes e depois da refeição, a glicose no sangue foi medida com um glucosímetro comercial para correlação com a glicose no suor.....128

Figura 66. A) (a) Célula a biocombustível de lactato onde o substrato (S) é oxidado ao produto (P) no ânodo e a reação complementar de redução da água em oxigênio acontece no cátodo. Em destaque está apresentada a composição do ânodo e do cátodo. B) Reação redox desejada no ânodo de conversão de lactato em piruvato gerando energia.....131

Figura 67. Gráficos de densidade de potência vs. potencial obtidos para CPE (A) e SPE (B) em pH 7,5 (a), 6,5 (b), 5,5 (c) e 4,0 (d) em PBS 1 mol L^{-1} (linha preta tracejada) contendo lactato 30 mmol L^{-1} (linha vermelha sólida). (e) Variação da densidade de potência vs. pH.....132

Figura 68. A) Curvas de potência para CPE-BFC (vermelho) e SPE-BFC (azul) em pH 7,5, 6,5 e 5,5. A densidade de potência foi registrada por 12h com intervalo de 60 min em solução tampão de fosfato 1 mol L^{-1} contendo 30 mmol L^{-1} de lactato. B) Retenção

de energia em % para CPE (em vermelho) e SPE (em azul) durante 12h de atividade em pH 7,5 (a), 6,5 (b), 5,5 (c). Os dados correspondem ao estudo de estabilidade apresentado em A.....133

Figura 69. Curvas de densidade de potência obtidas para (A) CPE e (B) SPE em solução de PBS 1 mol L⁻¹ contendo lactato 30 mmol L⁻¹ alternando entre os pHs 6,8 e 4,0 durante 6h (a). Curvas de potência máxima correspondente vs. tempo (b).....135

Figura 70. A) Fotografia da BFC vestível no braço do indivíduo e o passos de fabricação do dispositivo que inclui o empacotamento da pasta nos canais microfluídicos. B) Esquema mostrando a montagem das camadas do dispositivo.....136

Lista de Tabelas

Tabela 1. Reagentes utilizados, procedência, grau de pureza e fórmula molecular....	50
Tabela 2. Otimização dos parâmetros para análise por injeção em batelada.....	66
Tabela 3. Determinação de hidralazina em comprimidos de apresolina.....	68
Tabela 4. Parâmetros analíticos obtidos para determinação de ácido úrico por voltametria cíclica, utilizando os eletrodos de FTO modificados com diferentes hidróxidos.....	80
Tabela 5. Otimização dos parâmetros para análise por injeção em batelada.....	81
Tabela 6. Limites de detecção e respectivos métodos analíticos utilizados para determinação da UA em fluidos corporais relatados recentemente na literatura.....	84
Tabela 7. Potenciais de oxidação observados para determinação de UA em diferentes eletrólitos, utilizando eletrodos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$	88
Tabela 8. Variáveis e valores analíticos obtidos para a determinação de acetaminofeno por voltametria cíclica em diferentes eletrólitos.....	104
Tabela 9. Parâmetros analíticos obtidos para determinação de H_2O_2 por BIA-amperometria em amostras de enxaguante bucal.....	113

Sumário

1.	Introdução.....	26
1.1	Eletrodos quimicamente modificados	27
1.2	Tipos de eletrodos.....	30
1.2.1	Eletrodos impressos (SPEs).....	30
1.2.2	Eletrodos de óxido de estanho dopado com flúor (FTO).....	31
1.2.3	Eletrodos de pasta de carbono (CPE).....	32
1.3	Comportamento eletroquímico do hidróxido de níquel.....	33
1.3.1	Sensores de hidróxidos duplos de níquel.....	37
1.3.2	Sensores de hidróxidos trimetálicos de níquel.....	40
1.4	Técnicas Eletroquímicas.....	41
1.5	Análise por Injeção em Batelada (BIA)	45
2.	Objetivos	49
2.1	Objetivos Gerais.....	49
2.2	Objetivos Específicos.....	49
3.	Materiais e Métodos	50
3.1	Reagentes e soluções.....	50
3.2	Síntese dos hidróxidos bi- e trimetálicos de níquel	51
3.3	Métodos de Caracterização.....	52
3.3.1	Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	52
3.3.2	Difratometria de Raios-X (DRX).....	53
3.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	54
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	54
3.3.5	Espectrometria Ótica de Emissão por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).....	55
3.3.6	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).....	55
3.3.7	Espectroscopia Eletrônica no Ultravioleta-Visível (UV-VIS).....	56
3.4	Preparo dos eletrodos de FTO modificados.....	56
3.5	Preparo dos eletrodos impressos (SPEs) modificados	57

3.6 Medidas eletroquímicas	59
3.7 Preparo da solução artificial de suor	59
3.8 Preparo da solução artificial de saliva	59
3.9 Coleta das amostras de suor e saliva.....	59
4. Resultados e discussão.....	60
4.1 Eletrodo de FTO modificado com nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$	60
4.1.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	60
4.1.2 Difractometria de Raios-X.....	61
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	62
4.1.4 Estudos analíticos com o FTO modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$	63
4.1.5 Associação do eletrodo de FTO modificado ao sistema BIA.....	65
4.1.6 Estudo analítico da hidralazina em fármacos pela técnica BIA.....	67
4.1.7 Estudo analítico da hidralazina em fármacos pela técnica UV-VIS.....	68
4.2 Eletrodo de FTO modificado com nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2$	70
4.2.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	70
4.2.2 Difractometria de Raios-X.....	72
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	73
4.2.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).....	74
4.2.5 Estudos analíticos com o FTO modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$	78
4.2.6 Associação do eletrodo de FTO modificado ao sistema BIA.....	81
4.3 Eletrodos impressos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$	84
4.4 Eletrodos impressos (SPEs) modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$	92
4.4.1 Difractometria de Raios-X.....	93
4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	93
4.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	95
4.4.4 Estudos analíticos com os SPEs modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$	97
4.4.5 Determinação de acetaminofeno em fluidos biológicos.....	100
4.4.6 Estudo analítico do acetaminofeno em fluídos biológicos por UV-VIS...104	
4.5 Eletrodos impressos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$	105
4.5.1 Difractometria de Raios-X.....	106
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	107
4.5.3 Estudos analíticos realizados para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE.....	108

5. Conclusões.....	113
6. Perspectivas.....	115
7. Dispositivo microfluídico eletroquímico vestível integrado com iontoforese (IP) para monitoramento em fluxo e em tempo real de suor em estado sedentário.....	115
7.1 Resumo.....	115
7.2 Parte experimental.....	116
7.2.1 Fabricação do dispositivo microfluídico flexível.....	116
7.2.2 Fabricação e modificação química dos biossensores eletroquímicos....	117
7.2.3 Fabricação dos eletrodos de iontoforesis.....	118
7.2.4 Montagem do dispositivo microfluídico.....	118
7.2.5 Operação do dispositivo de microfluídica com seres humanos.....	118
7.2.6 Monitoramento de glicose em tempo real no corpo.....	119
7.3 Resultados e discussão.....	120
7.3.1 Princípio do biossensor microfluídico epidérmico integrado por IP.....	120
7.3.2 Estudos de deformação mecânica de dispositivo microfluídico.....	122
7.3.3 Otimização do dispositivo microfluídico para extração de suor.....	123
7.3.4 Determinação de glicose diretamente no suor humano.....	126
7.4 Conclusões.....	129
8. Células de biocombustíveis enzimáticas baseadas em eletrodos de pasta de carbono hidrofóbico protetor: Coleta de bioenergia epidérmica no suor ácido.....	129
8.1. Resumo.....	129
8.2 Resultados e discussão.....	130
8.3 Conclusões.....	135
8.4 Perspectivas.....	136
9. Referências Bibliográficas.....	137
Súmula Curricular.....	149
Apêndice A (Trabalhos publicados referentes à tese de doutorado).....	154

1. Introdução

Os sensores químicos apresentam grande importância para a detecção e quantificação de espécies de interesse analítico e seu uso tem aumentado de forma expressiva devido à sua fácil utilização, elevada sensibilidade, respostas rápidas, baixo custo e por poderem ser descartáveis [1]. Um sensor químico é um dispositivo que convertem uma propriedade química ou física de um analito específico em um sinal mensurável, cuja magnitude é normalmente proporcional à concentração do analito [2]. Dentre os sensores químicos, há várias classificações possíveis as quais podem se basear no tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. Entre estes destacam-se os sensores eletroquímicos, que são dispositivos contendo um transdutor eletroquímico, capaz de converter a resposta obtida pela interação entre o analito e o elemento sensor em um sinal mensurável correspondente à concentração do analito [3].

Biossensores são dispositivos constituídos de um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas, ácidos nucleicos, organelas e células) que interagem seletivamente com a substância a ser analisada e reconhecem o analito de interesse. A significativa atenção dada aos (bio)sensores eletroquímicos nos últimos anos deve-se a diversos fatores, cabendo destacar a instrumentação cada vez mais compacta, com software flexível e de fácil utilização e a miniaturização de eletrodos e células eletroquímicas. Além disso, o desenvolvimento na área de “(bio)sensores vestíveis” permitiu trabalhar com volumes e tempo extremamente reduzidos [4].

As aplicações desses (bio)sensores na área clínica, em processos industriais e no monitoramento ambiental, foram ampliadas drasticamente com o desenvolvimento de possibilidades quase infinitas de modificação de suas superfícies, resultando em significativos benefícios econômicos e sociais [5]. Dentre estas, a utilização de materiais eletrocatalíticos para a modificação da superfície de eletrodos tem sido amplamente estudada e a obtenção de novos materiais e suas aplicações tem sido buscada por inúmeros grupos de pesquisa [6]. Entre as espécies utilizadas para modificar a superfície de eletrodos, destaca-se o uso de enzimas, grafeno, metais eletrodepositados, seus óxidos e hidróxidos, porfirinas e muitas outras espécies que possam atuar mediando reações redox na superfície do eletrodo [7].

Vários estudos reportaram a utilização de modificadores moleculares para a superfície de eletrodos, como porfirinas [8] e ftalocianinas [9], macromoléculas enzimáticas [10] e polímeros condutores [11]. Mais recentemente, nanomateriais eletrocatalíticos e híbridos nanoestruturados foram introduzidos como novos materiais para modificação de eletrodo. Sensibilidades mais altas e limites de detecção mais baixos podem ser alcançados nas medições analíticas com estes novos materiais, devido às suas áreas de superfície melhoradas nos eletrodos modificados [12]. Um avanço significativo se deu com os eletrodos modificados com materiais de carbono, principalmente baseados em fulerenos [13], nanotubos de carbono [14] e grafenos [15]. Além disso, metais eletrodepositados [16], seus óxidos [17] e hidróxidos [18,19] foram intensamente reportados como excelentes modificadores para eletrodos sólidos.

A síntese de nanopartículas (NPs) de hidróxidos duplos de níquel (bi- e trimetálicos) tem sido explorada, buscando não apenas o desenvolvimento de sensores mais seletivos, como também uma maior estabilização desses hidróxidos na fase alfa [20]. Além disso, diferentes proporções dos metais nas NPs sintetizadas para modificar a superfície do sensor permitem antecipar o potencial onde a espécie de interesse é oxidada (ou reduzida) [21]. Assim na primeira parte deste trabalho foi explorada a preparação e aplicação de novos sensores eletroquímicos modificados com NPs.

1.1 Eletrodos quimicamente modificados

O termo Eletrodo Quimicamente Modificado (EQM) surgiu para identificar um conjunto de dispositivos que possuem espécies quimicamente ativas (condutoras ou semicondutoras) imobilizadas na superfície de eletrodos [22]. As espécies geradas eletroquimicamente na superfície do substrato irão facilitar os processos de oxidação e/ou redução do analito de interesse [23]. EQMs preparados a partir de metais ativos, seus complexos, seus óxidos e hidróxidos foram empregados com sucesso como sensores para determinação de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos [24].

Como a atividade eletroquímica de um eletrodo é totalmente dependente da composição química e física do agente modificador, o uso de EQMs tem favorecido a superação dos problemas relacionados aos processos que ocorrem em potenciais

extremos [25] e de sensibilidade [23]. Os EQMs, têm vantagens importantes que eliminam (ou minimizam) as limitações dos eletrodos convencionais (como os eletrodos de carbono e metais nobres) em termos de atividade catalítica, seletividade e antecipação do potencial de oxidação [26]. A habilidade de manipular as propriedades dos EQMs pode produzir várias características interessantes, dentre as quais se destacam a eletrocatalise e a seletividade [27].

Um aspecto importante na preparação de um EQM é a escolha do modificador [28]. Este material deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e ser adequado para o método de modificação selecionado [29]. Entre os materiais convencionais estão: grafeno, metais, fulereno, nanotubos de carbono, pontos quânticos de carbono (CQDs), polímeros, estruturas metálicas orgânicas (MOFs) e compósitos [23]. Na Figura 1 são apresentados diferentes agentes modificadores comumente usados e um gráfico genérico que mostra a melhora da resposta eletroquímica do eletrodo após a modificação da sua superfície, em termos do aumento da intensidade do sinal de corrente.

Figura 1. Exemplos de modificadores da superfície de eletrodos e um gráfico genérico de uma resposta eletroquímica melhorada para o eletrodo modificado [23].

A manipulação da matéria ao nível de átomos e de moléculas abriu as portas à produção de novos materiais, com propriedades muito distintas, ampliando significativamente as possibilidades anteriormente conhecidas [30]. Nesse sentido, é importante selecionar a melhor técnica entre os diferentes procedimentos disponíveis para a fabricação e caracterização de eletrodos de modo a obter melhores resultados de análise. A escolha de uma abordagem depende de diversos fatores, dentre os

quais das possibilidades econômicas, requisitos analíticos, tipo de eletrodo e natureza do modificador [29].

A modificação dos sensores eletroquímicos com nanomateriais pode ser realizada por diferentes técnicas, conforme esquematizado na Figura 2. O procedimento de modificação mais simples e difundido é o *drop-casting*, que consiste na deposição de uma suspensão de nanomaterial na superfície do eletrodo, seguida pela evaporação do solvente, para formar um filme fino e (desejavelmente) uniforme do soluto [31]. Outra abordagem para a modificação do eletrodo é a deposição eletroquímica (eletrodeposição) a partir de uma junção de eletrodo/eletrólito contendo nanomateriais suspensos na fase aquosa. Este método é amplamente utilizado para modificar eletrodos utilizando nanomateriais como nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas metálicas, polímeros condutores, e seus compósitos [32].

Figura 2. Principais procedimentos para modificação de eletrodos com nanomateriais [23].

A polimerização eletroquímica (eletro-polimerização) é outro método eficiente para produzir de forma controlada filmes de polímeros na superfície do eletrodo. A modificação com filmes poliméricos consiste no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e ao analito de interesse. A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de várias monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, maximizando a

resposta eletroquímica [33]. Outro método prático para a modificação dos eletrodos é a utilização de pasta de carbono que consiste na simples mistura do modificador com a pasta de carbono usando um ligante adequado [34]. Estas são as formas mais utilizadas, havendo ainda uma infinidade de outros métodos de modificação menos comuns.

Com relação ao uso de nanopartículas, materiais metálicos foram as primeiras espécies empregadas na modificação da superfícies de eletrodos [35]. Mais recentemente, a formação de óxidos e hidróxidos em escala nanométrica passou a ser explorada intensamente [36]. Eletrodos modificados com nanomateriais têm mostrado resultados notáveis, sensibilidade superior, amplas faixas de trabalho, baixos limites de detecção e boa estabilidade [37]. Na próxima seção serão apresentados alguns dos diferentes tipos de eletrodos que podem ser modificados com NPs de modo a aumentar sua área superficial, e o número de sítios ativos presentes em sua superfície.

1.2 – Tipos de eletrodos

Na maioria dos (bio)sensores eletroquímicos, as reações ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho. Assim, o analito de interesse sofre redução ou oxidação dependendo do potencial aplicado nesse eletrodo. A corrente produzida a partir da reação é monitorada e usada para calcular dados importantes, como a concentração do analito na amostra [38]. Nesse sentido, existem diversos tipos de eletrodos comumente encontrados na literatura para aplicações eletroanalíticas. Neste trabalho foram estudados os três que serão apresentados a seguir.

1.2.1. Eletrodos impressos (SPEs)

Eletrodos impressos (SPEs) são dispositivos eletroquímicos fabricados a partir da impressão de diferentes tipos de tinta em substratos plásticos ou cerâmicos, permitindo análises rápidas com alta reprodutibilidade, sensibilidade e precisão. A composição das diferentes tintas (carbono, prata, ouro, platina) utilizadas na fabricação do eletrodo determina sua seletividade para diversos analitos. Esse fato permite projetar o dispositivo mais ideal, com tamanhos reduzidos, de acordo com sua finalidade [39].

A necessidade de reduzir o tamanho dos dispositivos possibilita a diminuição do volume de amostra e reagentes necessários em cada experimento, bem como minimiza a geração de resíduos das análises. Nesse sentido, o desenvolvimento de SPEs tem permitido minimizar os custos de produção. Além disso, uma das principais vantagens dos SPEs é a alta variedade da composição de suas tintas, às quais podem ser modificadas pela adição de diferentes metais, enzimas, complexantes, polímeros, entre outros, resultando em diversas possibilidades de eletrodos imprimíveis [40].

Os SPEs são comercializados em diferentes formatos e tamanhos por diversas empresas, tais como a DropSens, a Gamry, a PalmSens, a BVT, a Micrux, entre outras. Estes eletrodos são fabricados em impressoras comerciais a partir do depósito de uma combinação de camadas sobre um substrato plano (Figura 3A), sendo portáteis e robustos devido a integração de todos os eletrodos (trabalho, referência e contra-eletrodo) no mesmo substrato (Figura 3B). Tais processos de impressão oferecem versatilidade em termos de design dos eletrodos, compatibilidade de materiais e modificações, com a vantagem de poderem ser produzidos em massa e serem acessíveis para aplicações rápidas [41]. Além disso, os SPEs comercializados são apresentados com diferentes tipos de eletrodos de trabalho não modificados (tais como carbono, ouro, platina, prata, cobre, níquel, bismuto, alumínio, paládio e rutênio) e/ou modificados (com azul da prússia, nanopartículas de ouro, ftalocianinas, nanotubos de carbono, grafeno, estreptavidina, polianilina, acetilcolinesterase, glicose oxidase (GOx), entre outros) [42].

Figura 3. A) Ilustração esquemática do processo de fabricação de SPEs, em um substrato usando um estêncil contendo o desenho do eletrodo e um rodo para

espalhar a tinta na superfície. B) Eletrodos impressos resultantes, onde C é o contra-eletrodo, W o eletrodo de trabalho e R o eletrodo de referência [42].

1.2.2. Eletrodos de óxido de estanho dopado com flúor (FTO)

O vidro revestido com óxido de estanho dopado com flúor (FTO) é eletricamente condutor e ideal para uso em uma ampla gama de dispositivos, incluindo aplicações como optoeletrônicos, eletrodos condutivos, telas de toque, dispositivos fotovoltaicos de filme fino, janelas de economia de energia, entre outras. O FTO foi reconhecido como um material muito promissor porque é relativamente estável sob condições atmosféricas, mecanicamente duro, resistente a altas temperaturas, tem uma alta tolerância à abrasão física e custa menos do que o óxido de estanho dopado com índio [43].

O FTO é um dos óxidos condutores transparentes mais populares, cuja baixa resistividade depende da vacância de oxigênio e da quantidade de flúor de substituição. A dopagem do ânion flúor no óxido de estanho desempenha um papel fundamental na formação de um agente complexante para melhorar a condutividade elétrica e suprimir os processos de dissolução eletroquímica. O fluoreto é complexante em solução, mas no filme fino de FTO deve estar coordenado gerando as vacâncias de oxigênio [44].

1.2.3. Eletrodos de pasta de carbono (CPE)

Os eletrodos de pasta de carbono (CPE) são compostos por uma pasta feita de pó de carbono (grafite) e um aglutinante inerte (geralmente um óleo mineral) (Figura 4). Esses eletrodos são simples de preparar e oferecem uma superfície facilmente renovável. Para melhorar a homogeneização, é possível utilizar uma substância orgânica volátil que não altera as propriedades químicas e físicas da pasta. Em geral, os CPEs são facilmente obtidos a custos mínimos e especialmente adequados para preparar um eletrodo modificado com misturas de diferentes compostos, visando obter propriedades predeterminadas [34].

A maior desvantagem dos CPEs, que limita sua aplicabilidade na análise prática, é que o sucesso no trabalho depende da experiência do indivíduo. Em contraste com os eletrodos sólidos comercialmente disponíveis para os quais as

características eletroquímicas básicas são comparáveis para quase todos os produtos de cada fabricante, cada unidade de pasta de carbono é “um indivíduo”, onde as propriedades físicas, químicas e eletroquímicas podem diferir de uma preparação para outra. Embora isso possa não ser um problema em um ambiente de pesquisa, seria inviável considerando um serviço de produção em larga escala [45].

Figura 4. Representação de um eletrodo de pasta de carbono.

1.3 – Comportamento eletroquímico do hidróxido de níquel

O hidróxido de níquel – $\text{Ni}(\text{OH})_2$ pertence a um conjunto de sólidos inorgânicos cristalinos, caracterizados pela sobreposição das camadas lamelares ao longo do eixo cristalográfico c [46]. Ligações covalentes unem os átomos de uma mesma lamela e forças eletrostáticas de van de Waals e ligações de hidrogênio conectam as lamelas adjacentes. A distância entre lamelas adjacentes é denominada distância interlamelar, espaçamento interlamelar ou espaçamento basal, e é calculada através da equação de Bragg. Um composto lamelar apresenta picos de difração de raios-X bem definidos, característicos da estrutura em camadas (picos em baixos ângulos) [47].

Os hidróxidos duplos lamelares (LDH) são estruturas semelhantes a brucita, contendo íons metálicos divalentes (Ni^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) coordenados a seis grupos hidroxilas (OH^-). Nesta estrutura, íons M^{2+} (nesse caso $\text{M}^{2+} = \text{Ni}^{2+}$) podem ser parcialmente substituídos por cátions trivalentes (Ce^{3+} , Fe^{3+} , V^{+3}). Assim, o excesso de carga positiva gerada é neutralizada através da incorporação de ânions no espaço interlamelar. O novo material é representado pela fórmula $[\text{M}^{2+}_{1-x}\text{M}^{3+}_x(\text{OH})_2]^{x+}(\text{A}^{m-})_{x/m} \cdot \text{H}_2\text{O}$, onde A^{m-} representa o ânion (NO_3^- , SO_4^{2-} e CH_3COO^-) e x exibe a relação molar $\text{M}^{3+}/(\text{M}^{2+} + \text{M}^{3+})$ [48].

O $\text{Ni}(\text{OH})_2$, em particular, apresenta polimorfismo, sendo geralmente encontrado nas formas alfa e beta (α e β) no estado reduzido ($\alpha\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$ e $\beta\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$), e assumindo as formas gama e beta ($\gamma\text{-Ni}^{\text{III}}\text{OOH}$ e $\beta\text{-Ni}^{\text{III}}\text{OOH}$) no estado oxidado. A principal diferença encontrada entre as duas formas no estado reduzido é quanto ao grau de empacotamento das suas lamelas ao longo do eixo cristalográfico, bem como, das suas respectivas distâncias basais lamelares. Na fase beta, observa-se o comportamento homogêneo das camadas distribuídas ao longo do eixo cristalográfico e uma distância basal lamelar de $c = 4,6 \text{ \AA}$. Por outro lado, a fase alfa apresenta camadas distribuídas aleatoriamente ao longo do eixo cristalográfico, e em consequência disso e da intercalação de ânions, as distâncias basais encontradas podem apresentar valores igual ou superior a $8,0 \text{ \AA}$ [49].

Adicionalmente, a fase $\alpha\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$ apresenta uma deficiência de íons hidroxilas $[\text{OH}]^-$, resultando em lamelas carregadas positivamente. Este excesso de cargas positivas é neutralizado por ânions hidratados localizados na região interlamelar [18]. Estas duas fases podem ser facilmente diferenciadas utilizando diversas técnicas de caracterização, sendo a mais citada na literatura a difratometria de raios-X (DRX) [46]. O hidróxido em sua fase alfa apresenta atividade eletroquímica e difusão iônica excelentes, porém após poucos ciclos de carga e descarga, em meio alcalino, o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ é convertido a $\beta\text{-Ni}(\text{OH})_2$, revelando a instabilidade termodinâmica do material [46].

A Figura 5 apresenta as conversões entre as formas polimórficas do $\text{Ni}(\text{OH})_2$ por processos eletroquímicos. Quando é submetido a processos de carga, o $\alpha\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$ se oxida ao oxi-hidróxido de níquel(III) ($\gamma\text{-Ni}^{\text{III}}\text{OOH}$). Por outro lado, é observado que a estrutura $\beta\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$ se oxida para a forma $\beta\text{-Ni}^{\text{III}}\text{OOH}$. Porém, o $\beta\text{-Ni}^{\text{III}}\text{OOH}$ pode ser convertido em $\gamma\text{-Ni}^{\text{III}}\text{OOH}$, causando assim um grande estresse mecânico ao material, devido ao aumento do distanciamento basal lamelar. Já a fase $\alpha\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$ pode ser convertida a fase $\beta\text{-Ni}^{\text{II}}(\text{OH})_2$ por processos de envelhecimento do material em meio alcalino [50].

Figura 5. Conversões eletroquímicas do hidróxido de níquel em meio alcalino [50].

O comportamento eletroquímico dos eletrodos de Ni(OH)₂ também é bem definido para ambas fases polimórficas α e β . A Figura 6 mostra dois voltamogramas cíclicos, um do α -Ni^{II}(OH)₂ (linha contínua) e outro do β -Ni^{II}(OH)₂ (linha pontilhada). Verifica-se que a corrente do pico anódico do α -Ni^{II}(OH)₂ ocorre em um potencial mais baixo do que o observado para o β -Ni^{II}(OH)₂, além de cerca de três vezes mais intensa. Este último apresenta o processo de oxidação Ni^{II/III} em 0,50 V, muito próximo ao potencial de evolução de oxigênio (a partir de +0,55 V), que é caracterizado pelo aumento exponencial da corrente anódica [51].

Apesar da diferença entre o potencial de pico anódico e catódico da fase α ser menor do que o da fase β , o que representa uma melhor reversibilidade da reação eletroquímica para a fase α , após alguns ciclos eletroquímicos esta transforma-se na fase β (termodinamicamente instável). Para evitar esta instabilidade, umas das principais estratégias que vem sendo empregadas é a incorporação de um ou mais íons metálicos, resultando na formação dos hidróxidos duplos lamelares [52]. Outra estratégia para estabilizar a fase alfa foi proposta por Araki e colaboradores, baseado na obtenção do Ni(OH)₂ nanoestruturado, utilizando a metodologia sol-gel. O Ni(OH)₂ obtido permanece na

fase alfa por mais de 1000 ciclos eletroquímicos, sem haver a conversão para a fase beta [53].

Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos para os filmes de α - e β -Ni(OH)₂ (linha contínua e pontilhada, respectivamente) precipitados na superfície de um cristal de quartzo [16].

A fim de obter uma fase alfa com maior estabilidade e produzir materiais com melhor desempenho eletroquímico, uma série de estratégias têm sido utilizadas, tais como: (a) a substituição isomórfica de cátions metálicos (o sítio que normalmente contém um cátion de formação de rede cristalina é ocupado por outro cátion, igualmente formador de rede, e com um tamanho similar), (b) intercalação de ânions (inserção de ânions nos materiais lamelares aumentando o espaçamento e diminuindo o acoplamento entre as células unitárias) e (c) a formação de compósitos [54]. Além disso, combinações dessas metodologias podem produzir materiais nanoestruturados ainda mais estáveis. A substituição isomórfica de cátions metálicos na estrutura polimórfica do α -Ni(OH)₂ tem o objetivo de aumentar a condutividade elétrica, melhorando assim o desempenho eletroquímico, catalítico e eletrocatalítico, bem como as propriedades mecânicas do material [55].

As características marcantes dos nanomateriais têm uma relação estreita com o tamanho, forma e morfologia das partículas, e conseqüentemente são determinantes para as aplicações que podem ser alcançadas [56]. Nos últimos anos, tem aumentado a utilização de nanopartículas de hidróxido de níquel visando a

modificação da superfície de eletrodos para fins eletroanalíticos [57]. Assim, nas próximas sessões serão apresentados alguns estudos sobre a adição dos cátions metálicos ao α -Ni(OH)₂ que resultaram em propriedades aprimoradas, especialmente quando os hidróxidos foram preparados de modo a serem nanoestruturados.

1.3.1 – Sensores de hidróxidos duplos de níquel.

Os óxidos e hidróxidos de níquel, em comparação com as partículas metálicas puras, têm sido intensamente estudados como espécie modificadora da superfície de eletrodos, devido à sua melhor estabilidade no contato com o ar ou em solução [36, 55]. O material na forma de oxi-hidróxido, por exemplo, é conhecido por ser um catalisador muito bom para a oxidação de pequenas moléculas orgânicas, como álcoois e açúcares [58]. A associação de níquel com outros metais (como cobalto, ferro e alumínio) também tem sido frequentemente usada para melhorar as características catalíticas, expandindo a aplicabilidade desses materiais [50].

No início dos anos 80, sensores modificados com hidróxido duplos lamelares foram preparados com o objetivo de investigar o comportamento eletroquímico do material após a adição de um segundo íon metálico em sua estrutura [59]. De acordo com a literatura, Ni/Co foi o primeiro filme de hidróxido duplo à base de níquel explorado para sensores [50]. Pickett e Maloy investigaram o efeito da adição de íons cobalto na estrutura do Ni(OH)₂, usando voltametria cíclica, amperometria e coulometria. Esses autores mostraram que a presença de cobalto torna a reação de carga-descarga de hidróxido de níquel mais reversível, permitindo que a carga ocorra com potenciais menos positivos. Essa observação sugere que a eficiência da carga aumenta com a diminuição da reação simultânea de evolução do oxigênio [60].

Nos anos posteriores, o Ferro (Fe) se tornou o segundo metal a ser estudado em associação ao Ni(OH)₂ [61]. Uma vez demonstrado o potencial do Fe para modificar a estrutura do Ni(OH)₂, o comportamento eletrocatalítico dos centros de Ni no interior do hidróxido duplo lamelar começou a ser investigado associado ao alumínio (Al) [62]. No início dos anos 2000, o Al³⁺ tornou-se o principal metal a ser usado com hidróxidos duplos à base de níquel, uma vez que as fontes naturais mais comuns são constituídas predominantemente por alumínio, magnésio ou ferro [63]. Além do arranjo em camadas do níquel e da capacidade de atuar como um trocador

iônico, o transporte de carga é atribuído a uma reação redox interna entre as formas oxidada e reduzida do NiAl-LDH [64].

Os hidróxidos duplos apresentam boas propriedades como trocadores de ânions, e a combinação de um metal bivalente (predominantemente Ni^{2+}) e trivalente (Al^{3+}) têm sido aplicados de maneira eficiente nos revestimentos de eletrodos [65]. Dentre os metais mais utilizados para compor o hidróxido duplo de níquel, considerando a aplicação como sensores, o alumínio corresponde quase à metade de todas as propostas já publicadas [66]. A Figura 7 apresenta os hidróxidos duplos de níquel mais estudados, quando aplicados como sensores. Os resultados apresentados na figura que segue foram obtidos via pesquisa no *web of knowledge*.

Figura 7. Distribuição das publicações em função dos íons metálicos adicionados à rede de hidróxido de níquel, para aplicação como sensores analíticos [50].

Ballarin e colaboradores foram os primeiros a realizar medições hidrodinâmicas associando um sensor amperométrico modificado com hidróxido duplo de níquel em um sistema de fluxo [66]. Eles investigaram o comportamento do sensor em soluções alcalinas para a eletroanálise de etanol por FIA (do inglês *Flow Injection Analysis*). Antes deste estudo, a investigação do comportamento do $\text{Ni}(\text{OH})_2$ só havia sido realizada em condições estacionárias [59-65]. Em um artigo anterior, eletrodos modificados por Ni/Al foram estudados por técnicas voltamétricas, usando um eletrodo estacionário e um eletrodo rotativo para determinação de álcoois e açúcares [63].

A amperometria foi a técnica predominante nos estudos que utilizam hidróxidos duplos de níquel [50]. Esta baseia-se na aplicação de um potencial fixo entre o eletrodo de trabalho (W) e o de referência (R) promovendo à oxidação ou redução de espécies de interesse na superfície de W, e resultando em um sinal mensurável de corrente [67]. Em 2011, o nosso grupo publicou seu primeiro artigo nesta linha empregando nanopartículas de α -Ni(OH)₂ no preparo de um sensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio [21]. Nesse estudo, o eletrodo modificado foi associado à técnica FIA, resultando em uma excelente sensibilidade ($446 \mu\text{A L mmol}^{-1} \text{cm}^{-2}$), um baixo limite de detecção ($\text{LOD} = 3 \mu\text{mol L}^{-1}$), e uma baixa lixiviação em condições hidrodinâmicas para a determinação de glicose.

Em 2014, foi preparado o primeiro sensor baseado em um hidróxido duplo nanoestruturado de Ni/Co no grupo do Professor Lúcio Angnes para determinação do fármaco isoniazida. Nesse trabalho, diferentes proporções de cobalto (Co) foram dopados ao α -Ni(OH)₂ para modificação de um eletrodo de FTO. O eletrodo modificado com 25% de Co apresentou sensibilidade 3 e 7,5 vezes maior, respectivamente para as análises por voltametria cíclica e análise com injeção por batelada (BIA), quando comparado aos eletrodos modificados com o α -Ni(OH)₂ sem cobalto [68].

Em 2017, o segundo trabalho foi publicado no mesmo grupo explorando um eletrodo de FTO modificado com hidróxido duplo de níquel/cério para determinação do fármaco prednisona. O α -Ni_{0,8}Ce_{0,2}(OH)₂ inicialmente preparado contendo Ce^{III}, foi oxidado à Ce^{IV} durante o tratamento térmico, conferindo um efeito positivo nas propriedades eletrocatalíticas para oxidação do composto analisado. Estudos desenvolvidos por microscopia, técnicas espectroscópicas e eletroquímicas revelaram as propriedades estruturais, químicas e catalíticas únicas desse material, e um limite de detecção tão baixo quanto $10^{-9} \text{mol L}^{-1}$ para determinação do fármaco [69].

O grande potencial dos eletrodos modificados com hidróxidos duplos, especialmente como sensores amperométricos, foi novamente comprovado em outro trabalho do grupo publicado em 2018. Nesse estudo, o novo nanomaterial produzido com hidróxido duplo de níquel e chumbo apresentou comportamento eletroquímico mais estável que o α -Ni(OH)₂ para determinação do fármaco acetilcisteína. Nanopartículas com 3 nm de tamanho foram preparadas e depositadas em lâminas de FTO, e o estudo foi conduzido em associação a uma célula de BIA construída com

capacidade de 4 mL com o eletrodo posicionado na parte inferior da célula. A frequência analítica obtida para este fármaco a partir da técnica BIA (120 análises h⁻¹) foi favoravelmente superior comparada a obtida por cromatografia (6 análises h⁻¹) [70].

1.3.2 – Sensores de hidróxidos trimetálicos lamelares

A fabricação de sensores modificados com hidróxidos trimetálicos lamelares ainda pode ser aprimorada, de modo a aumentar a estabilidade da fase alfa e melhorar a sensibilidade dos materiais [58]. A incorporação de íons metálicos na estrutura do hidróxido duplo de níquel tem se mostrado uma opção eficiente para melhorar o desempenho do nano-catalisador para diversos analitos [70]. Os hidróxidos trimetálicos possuem características semelhantes aos hidróxidos bimetálicos, somados à adição de um metal (Fe, Mn, Co, Mg, V...) que possa sofrer uma reação redox dentro da região potencial desejada. A adição do terceiro metal (mais tipicamente trivalente) deverá aperfeiçoar ainda mais as propriedades dos nanomateriais para a aplicação almejada [71].

Embora a aplicação de hidróxidos trimetálicos de níquel como sensores eletroquímicos ainda não tenha sido amplamente explorada, a primeira publicação envolvendo esse tópico ocorreu no final da década de 80 [72]. Nesse trabalho, Córdoba e colaboradores estudaram o comportamento voltamétrico de um eletrodo modificado com uma mistura ternária de hidróxidos de Ni, Mn e Fe em relação à reação de evolução de oxigênio. Baseado em suas observações, a adição do manganês como terceiro componente da mistura já existente do hidróxido lamelar de Ni-Fe, melhorou sua estabilidade e resistência à corrosão.

Mais de 20 anos depois, hidróxidos trimetálicos lamelares de Ni-Al-Co foram usados para modificar eletrodos de pasta de carbono visando a determinação não-enzimática de glicose em sucos de frutas [73]. Nas condições otimizadas, a resposta amperométrica do sensor apresentou uma alta sensibilidade (8,72 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$), baixo LOD (6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e uma ampla faixa de concentração linear (0,01-14,0 mmol L^{-1}) no potencial de detecção de 0,1 V vs Ag/AgCl. Para este eletrodo, as moléculas interferentes comuns, como ácido úrico e acético, bem como alguns outros açúcares, foram testadas e nenhum sinal significativo foi observado.

Mais recentemente, um eletrodo modificado com hidróxido trimetálico lamelar de Ni-Al-Mn foi aplicado para determinação de glicose em soro humano, apresentando um desvio inferior à 1,5% quando comparado ao glucosímetro comercial [74]. Sua excepcional atividade catalítica, baixo custo, além de ser ecologicamente correto, demonstrou uma excelente seletividade para glicose em relação ao ácido ascórbico e ácido úrico. O sensor fabricado com o hidróxido trimetálico exibiu uma alta sensibilidade ($2,253 \text{ mA L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), resposta rápida ($<3 \text{ s}$), boa estabilidade (2,44% RSD), ampla faixa de detecção de glicose ($15 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} - 8 \text{ mmol L}^{-1}$) e baixo LOD ($1,49 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). O excelente tempo de resposta do eletrodo $<3 \text{ s}$ foi atribuído principalmente aos efeitos combinados dos três íons metálicos na condutividade elétrica aprimorada do material e sua estrutura estável.

1.4 – Técnicas eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas apresentam vantagens notáveis, começando com o custo da instrumentação, que geralmente é muito menor quando comparado como, por exemplo, às técnicas espectroscópicas e cromatográficas [75]. O curto tempo de análise é também uma característica importante desses métodos, consequência das rápidas respostas da variação da corrente, potencial ou condutividade relacionada diretamente com a presença do analito [76]. A possibilidade de análises diretas na amostra sem necessidade de separação ou pré-tratamento é outro aspecto importante para impulsionar o crescimento das aplicações de métodos eletroanalíticos, satisfazendo a crescente necessidade de análises em tempo real [66].

Dentre o grupo de técnicas que se baseiam na aplicação de um potencial controlado aos eletrodos e monitoramento da corrente faradaica que resulta neste processo, destacam-se a voltametria cíclica e a amperometria (Figura 8). As técnicas voltamétricas, nas suas diversas formas, são versáteis e efetivas para estudar as variações de espécies eletroativas, sendo especialmente úteis para eletroanálise [76]. A variação do potencial no eletrodo de trabalho conduzirá à ocorrência de reações de oxidação ou de redução das espécies eletroativas presentes na solução (reações faradaicas), gerando variações na corrente registrada. A corrente faradaica resultante da transferência de elétrons na interface do eletrodo é o componente de corrente de interesse, que é relacionada com a concentração da espécie analisada [75].

Figura 8. Classificação das técnicas eletroquímicas com potencial controlado [77].

A voltametria cíclica, apesar de não ser a técnica mais sensível disponível, geralmente é o primeiro experimento que se realiza em um estudo eletroquímico/eletroanalítico de um sistema. Esta técnica baseia-se no registro da corrente elétrica que passa no eletrodo de trabalho (W) quando neste é aplicado um potencial que varia continuamente com o tempo a uma velocidade de varredura geralmente constante [77]. Os pontenciostatos são responsáveis por manter o potencial no W em um valor controlado em relação ao eletrodo de referência (R). Em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, a corrente elétrica flui entre W e um contra-eletrodo. Este último impõe a diferença de potencial necessária para que o eletrodo de trabalho assuma o potencial proposto pelo pontenciostato. O potencial é aplicado no W em relação ao R, mas virtualmente nenhuma corrente flui por R [78].

Ao contrário das técnicas potenciométricas, a voltametria impõe variações de potencial aos eletrodos imersos na solução a ser analisada para provocar/ forçar uma reação eletroquímica (reação faradaica). De fato, para qualquer espécie que seja eletroativa, ocorrerá uma reação de oxirredução a partir de um potencial definido, e a corrente faradaica resultante será proporcional à sua concentração (Figura 10). Dentre as vantagens dessas técnicas podem ser destacados a possibilidade de detecção simultânea, especiação, a capacidade de determinar parâmetros cinéticos e estimar os mecanismos de reações químicas e/ou eletroquímicas [79].

No voltamograma representado na Figura 9 podem ser observados os processos de oxidação e redução que se caracterizam, respectivamente, pela corrente de pico anódica (i_{pa}) e corrente de pico catódica (i_{pc}). Também estão indicados o potencial de pico anódico (E_{pa}) e potencial de pico catódico (E_{pc}) que fornecem o potencial de oxidação e redução de uma determinada espécie. A separação dos potenciais de pico (ΔE) indica se o processo é reversível, semi-reversível ou irreversível [78].

Figura 9. Representação de um voltamograma cíclico [79].

A amperometria consiste no registro da corrente gerada, pela oxidação ou redução de espécies que ocorrem em um potencial aplicado em função do tempo. A corrente que está sendo medida deve ter uma dependência direta (ou indireta) com a concentração da espécie analisada para aplicações analíticas. Medidas amperométricas podem ser realizadas aplicando um potencial constante. No primeiro caso, uma varredura do potencial acarreta em variações do carregamento/descarregamento da dupla camada elétrica, o que afetará os resultados, especialmente em baixas concentrações. A amperometria no potencial constante praticamente elimina os processos de carga/descarga da dupla camada, sendo a forma mais favorável, especialmente para baixas concentrações de analitos [76].

Quando a amperometria a potencial fixo é associada a sistemas em fluxo (FIA e BIA), a utilização da composição idêntica de eletrólito no carreador e na solução da amostra é crucial para minimizar a corrente de carga/descarga do eletrodo de trabalho, resultando em um método mais versátil e sensível. Em soluções estáticas, a corrente inicial é muito próxima de zero e logo após aplicar um pulso de potencial, as correntes faradaicas e capacitivas são elevadas. Após a aplicação de um degrau de potencial, a corrente capacitiva decai rapidamente e a corrente faradaica também decai, mas de forma bem mais lenta. A diminuição da corrente faradaica está relacionada ao esgotamento do material eletroativo nas proximidades da superfície do eletrodo (que é dependente do processo difusional) [80].

A conveniência da amperometria é mais notável quando esta é associada aos métodos em fluxo, tornando-se atraente para numerosas aplicações eletroanalíticas. Nos processos em fluxo, a utilização de soluções com composições idênticas (em termos de eletrólitos) tanto no carreador como na solução que contenha a amostra, reduzem as variações da corrente de carga ou descarga da dupla camada elétrica, tornando assim o método praticamente imune à este componente, permitindo quantificações em baixíssimas concentrações. Com o movimento da solução de forma controlada, o transporte de material para a superfície do eletrodo pode ser centenas ou milhares de vezes maior que o transporte propiciado apenas pelo processo de difusão. A demanda por análises mais rápidas, precisas e de menor custo, tem levado ao desenvolvimento de processos mecanizados ou automatizados. Sistemas em fluxo, como o FIA, se constituem em um campo fértil para estes desenvolvimentos [81].

No início da década de 90, foi proposta por Wang e Taha uma alternativa à análise em fluxo, a técnica BIA (do inglês *Batch Injection Analysis*), que apresenta muitas vantagens em relação à sua precursora (FIA) como baixo consumo de amostras e reagentes, elevada sensibilidade, reprodutibilidade e produtividade (em algumas situações, menor tempo por análise), com a vantagem de ser uma técnica mais simples que dispensa o uso de válvulas e bombas [82].

1.5 – Análise por Injeção em Batelada (BIA)

BIA consiste em uma técnica na qual o eletrodo de trabalho é colocado na célula eletroquímica, e o injetor de amostras é posicionado diretamente sobre ele (a apenas alguns milímetros de distância), de forma que a amostra atinja a superfície do sensor em um fluxo perpendicular a ela. Usualmente, o posicionamento do eletrodo é no fundo da célula com o injetor acoplado na tampa. No BIA, bombas, tubos e injetores de amostras foram substituídos por uma micropipeta automática (Figura 10), responsável pelo transporte de massa [83]. O transporte de material ao eletrodo se dá de forma uniforme durante a injeção e, uma vez terminada esta injeção, o transporte cessa. Uma significativa parcela do material injetado se dispersa para o interior da solução e o sinal eletroquímico remanescente é predominantemente proveniente do processo de difusão de material presente no eletrólito [82].

Figura 10. Ilustração do sistema BIA, composto pela pipeta automática, célula eletroquímica e o conjunto de três eletrodos (referência, trabalho e contra-eletrodo) [85].

Outros sistemas também foram desenvolvidos utilizando, como por exemplo, eletrodos de disco rotatório acoplados no topo da célula, havendo uma adaptação para o injetor, para que a injeção da amostra ainda ocorresse da mesma forma [84]. O acoplamento de BIA com detectores eletroquímicos oferece vantagens para aplicações no campo da analítica, tais como seletividade ajustável, alta sensibilidade, altas taxas de amostragem, exatidão e precisão. Entre os métodos eletroquímicos, a detecção amperométrica tem sido a técnica mais popular usada em sistemas BIA.

No BIA, o transporte de amostras até a superfície do eletrodo é realizado de forma reprodutível com o auxílio de uma pipeta automática motorizada (Figura 11). Assim, o uso do fluxo para o carregamento das amostras torna-se desnecessário, permitindo a obtenção de um sinal transiente em uma célula eletroquímica contendo uma solução estática [83]. A Figura 11C ilustra como ocorre a formação do pico transiente e o sinal típico obtido a partir da injeção de amostra em um sistema BIA. A altura dos picos obtidos é proporcional à concentração do analito injetado.

Figura 11. Ilustração esquemática de um sistema BIA. (A) Sistema eletroquímico BIA contendo a micropipeta na parte superior, a célula no meio e o eletrodo na parte inferior. (B)

célula montada e seção transversal mostrando a entrega da amostra e o sinal correspondente registrado. (C) Esquema mostrando o transporte de massa na superfície do eletrodo após uma injeção de amostra e o respectivo sinal obtido. 1) antes da injeção, 2) transporte do material durante a injeção, 3) final da injeção, 4) dispersão, 5) equilíbrio final [41].

Antes da injeção (1), o sinal é resultante apenas da corrente residual. Quando inicia a injeção (2), o sinal sobe abruptamente, formando uma zona que se dispersa a caminho do detector com transporte reprodutível e dispersão controlada. Isso resulta em uma resposta transitória em forma de pico (3), onde o sinal de corrente se mantém constante. Concluída a injeção, o sinal decai de forma exponencial (4) e atinge uma condição (5) onde a difusão do analito injetado (mais o sinal provindo de impurezas e dependendo do potencial a redução de O_2) responde pelo sinal [86].

Inicialmente, foram utilizadas células de grandes volumes (100 mL a 1 L) para garantir o retorno do sinal do eletrodo a um estado de equilíbrio sem a interferência do sinal residual do analito, bem como a agitação para ajudar na dispersão do material. As células BIA têm sido geralmente fabricadas em vidro ou materiais poliméricos como plexiglas e polipropileno e uma cronologia de diferentes designs de células BIA desenvolvidos é apresentada na Figura 12. Ao longo do desenvolvimento de trabalhos observou-se que a utilização de agitação poderia ser descartada dependendo do sistema e células cada vez menores foram confeccionadas.

Figura 12. Ilustração dos diferentes sistemas BIA desenvolvidos ao longo dos anos [83].

Terminada a injeção, rapidamente o sistema passa a depender unicamente da difusão do analito que foi diluído na solução [83]. Assim, salvo quando há a adsorção do material no sensor, com envenenamento da superfície, não há razão para a observação de efeitos de memória em injeções subsequentes, mesmo em volumes reduzidos. Dessa forma, foi possível o desenvolvimento de célula de volumes cada vez mais reduzidos (~ 4 mL) sem prejudicar o sinal obtido [69]. Adicionalmente, já foi reportado na literatura o uso de amperometria de múltiplos pulsos para renovar a superfície do eletrodo de carbono vítreo utilizado para análise de catequina o que apresenta a possibilidade do desenvolvimento de metodologias para detecção de outros analitos que apresentam problemas de envenenamento de superfície [87].

Devido a curta distância entre o injetor e o sensor (2 mm), a versatilidade do BIA para realização de reações e de derivatizações da amostra antes do contato com o detector, como é feito com sistemas em fluxo, é mínima (a não ser que seja feita previamente na bancada, o que não é prático). Por esse motivo, é preferível o foco no desenvolvimento do sensor a ser acoplado no sistema, de forma que este seja particularmente reativo ou seletivo ao analito de interesse dependendo da aplicação desejada. Nesse sentido, a técnica BIA é bem adaptada para aplicação junto aos eletrodos com alta seletividade, como biossensores [88] e eletrodos íon-seletivos [89]. Além de ser bastante eficiente para uso com detectores preparados, tendo em vista um único analito de interesse, o desenvolvimento de sensores compostos, como um conjunto de eletrodos íon-seletivos [90] ou o uso de técnicas como amperometria de múltiplos pulsos [91,92] permite a detecção de múltiplos analitos em amostras complexas.

Apesar da análise por injeção em batelada ter sido utilizada em conjunto com diversos tipos de técnicas de detecção, dentre elas fluorimetria [93], termometria [94], potenciometria [90], espectroscopia [95] e voltametria [96], seu uso mais frequente tem sido eletroquimicamente, particularmente associado à amperometria [82-88].

2. Objetivos

2.1 – Objetivos Gerais

Desenvolvimento de (bio)sensores eletroquímicos baseados em hidróxidos bi- e trimetálicos de níquel nanoestruturados e enzimas, assim como sua respectiva aplicação em amostras comerciais (farmacêuticas e enxaguante bucal) e fluidos biológicos (suor e saliva).

2.2 – Objetivos Específicos

→ Sintetizar novas composições de hidróxidos bi- e trimetálicos de $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ nanoestruturados utilizando a metodologia sol-gel.

→ Caracterizar os nanomateriais sintetizados por difratometria de raios-X (DRX), voltametria cíclica, espectrometria ótica de emissão por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), análises térmicas (TG e DTA), microscopia eletrônica de transmissão e varredura (TEM e SEM) e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS).

→ Utilizar as nanopartículas sintetizadas para modificação dos respectivos eletrodos impressos (SPEs) e de FTO.

→ Aplicar os novos eletrodos preparados com os hidróxidos de níquel na determinação e quantificação de diferentes analitos em amostras comerciais e fluidos biológicos.

→ Associar técnicas em fluxo (especialmente BIA) à amperometria, para avaliar a resposta dos sensores desenvolvidos para determinação de diversos analitos.

→ Avaliar o desempenho dos sensores impressos modificados com uma tinta composta por hidróxido de níquel em pHs biológicos (meio neutro e levemente ácido).

→ Desenvolver e aplicar os biossensores enzimáticos em dispositivos vestíveis e na produção de células biocombustíveis.

3. Materiais e métodos

3.1 - Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados apresentavam elevado grau de pureza, com exceção do hidróxido de potássio e peróxido de hidrogênio (Tabela 1). Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada (Resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) filtrada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore Bedford). As amostras farmacêuticas e o enxaguante bucal foram compradas em farmácias locais. As tintas condutivas de grafite e prata foram adquiridas da empresa Ercon.

Tabela 1. Reagentes utilizados, procedência, grau de pureza e fórmula molecular.

Reagente	Procedência	Pureza (%)	Fórmula molecular
Acetaminofeno	Sigma-Aldrich	99	$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$
Acetato de níquel	Sigma-Aldrich	99,0	$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Acetato de cério	Sigma-Aldrich	99,9	$\text{Ce}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Acetato de zinco	Vetec	98	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich	99	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$
Ácido úrico	Sigma-Aldrich	99	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$
Butanol	Merck	99,5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$
Cloreto de potássio	Synth	99	KCl
Cloreto de Vanádio	Sigma-Aldrich	99,0	VCl_3
Glicerina	Synth	99,5	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
Glicose	Merck	99,5	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Hexacloroplatinato de potássio	Sigma-Aldrich	99,9	K_2PtCl_6
Hidróxido de potássio	Sigma-Aldrich	85	KOH
Isopropanol	Synth	99,5	$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$
Lactato	Sigma-Aldrich	98	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$
Peróxido de hidrogênio	Synth	50	H_2O_2

3.2 – Síntese dos hidróxidos bi- e trimetálicos de níquel

A síntese dos hidróxidos mistos de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ foi realizada de acordo com a metodologia sol-gel [52]. Nas sínteses dos hidróxidos, uma massa de sal equivalente

a 9,64 mmol dos cátions de interesse foi adicionada à 25 mL de glicerina anidra, em um balão de fundo redondo. O sal de níquel ($\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foi solubilizado em glicerina anidra juntamente com o sal do metal dopante (Pt, Zn, Ce e/ou Ce/V) em um balão de fundo redondo. Em seguida, com o auxílio de uma chapa de aquecimento, a temperatura foi elevada lentamente até 50 °C sob constante agitação, para a solubilização dos sais. Após a completa solubilização, o aquecimento foi interrompido e a solução permaneceu em repouso até atingir 25 °C.

Na sequência, uma solução de KOH em álcool n-butílico foi adicionada lentamente e sob agitação constante. O número de mols adicionados da base correspondeu ao dobro do número de mols dos sais de níquel somados ao do(s) metal(is) dopante(s), de forma à quantidade de hidróxido no meio ser estequiométrica com o número de mol dos sais para a formação dos hidróxidos de níquel (2 mol de KOH para cada mol de sal metálico na solução de glicerina). A mistura reacional foi então deixada sob agitação por cerca de seis horas. Após o período de agitação, a solução sol de hidróxido duplo permaneceu em repouso por 24 h antes da sua utilização. Este procedimento permitiu observar se o material continuava na forma de sol (como é indicado no esquema da Figura 13) ou se havia ocorrido a sua precipitação.

O sol resultante foi separado em dois tubos. Metade do volume obtido foi guardado para a posterior preparação dos eletrodos e caracterizações pertinentes. À segunda parte foi adicionada água para que o material aglomerasse e precipitasse para obtenção do hidróxido na forma sólida. Após a precipitação o nanomaterial foi centrifugado e lavado com água para a eliminação dos solventes orgânicos e glicerina remanescente. A água de lavagem foi eliminada com auxílio de uma pipeta de pasteur, e após sucessivas lavagens, o material foi levado para secar na estufa à 180 °C. O pó obtido foi macerado para posteriores caracterizações.

Figura 13. Síntese das nanopartículas dos hidróxidos de níquel.

3.3 Métodos de Caracterização:

3.3.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

Análise Térmica Diferencial (DTA) é usada em conjunto com a termogravimetria (TG) e seu objetivo é obter informação através do monitoramento de fluxo de calor em função da temperatura, independentemente da ocorrência ou não de variação de massa. O termo diferencial vem do uso de dois sensores, sendo um o referência (o sinal obtido depende da diferença de resposta entre os dois). Dessa forma, um experimento DTA pode identificar mudanças de fase nas quais há variação muito pequena no valor de massa da amostra (que poderiam não ser detectadas pelo equipamento TGA), tais como mudanças estruturais, reações e transições sólido-sólido, cristalização, fusão, polimerização e reações catalíticas.

As análises térmicas foram realizadas em um equipamento da Shimadzu modelo TG50. Foi utilizado cadinho de platina, a faixa de aquecimento foi de 25 a 800 °C, com gradiente de temperatura de 10 °C min⁻¹. As análises foram realizadas sob atmosfera dinâmica de ar, em colaboração com o grupo do Prof. Koiti Araki.

3.3.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

Cerca de 95% de todos os materiais sólidos conhecidos podem ser descritos como cristalinos. Quando raios-X gerados por uma determinada fonte interagem com um material cristalino, mono ou polifásico, pode-se obter um padrão de difração. Cada substância (fase) cristalina produz um padrão de difração característico, que pode ser

considerado sua impressão digital. Em uma mistura, cada uma das substâncias produz o seu padrão independente das demais. O método de difração do pó ideal para a identificação e caracterização de materiais mono ou policristalinos.

Nesta técnica é utilizada uma pequena quantidade de amostra contendo minúsculos cristais aleatoriamente orientados em relação ao feixe de raios-X. É importante que a amostra seja razoavelmente homogênea, composta com partículas entre 2 a 5 μm de tamanho de forma que, ao ser acomodada num suporte, obtenha-se uma superfície lisa e plana para incidência do feixe. Espera-se que os cristais assumam orientações aleatoriamente distribuídas de forma que todos os planos de reflexão possíveis tenham igual representação durante a coleta do padrão de difração. Para algumas aplicações pode-se coletar o padrão de difração originado de filmes de cristais, entre outros tipos de amostras.

A principal utilidade da técnica de difração de raios-X do pó reside na identificação de componentes em uma amostra sólida. Além disso, as áreas dos picos em um difratograma estão relacionadas com a quantidade de cada uma das fases presentes, possibilitando a aplicação de métodos matemáticos na quantificação dos componentes de uma mistura ou a determinação da pureza em uma amostra. Permite a identificação de isomorfismo ao longo de uma série, bem como de polimorfos de uma mesma substância, apresentando aspectos estruturais diferentes.

As difratometrias de raios-X foram obtidas a partir dos hidróxidos na forma sólida, utilizando um difratômetro D2 Phaser da Brunker equipado com radiação de $\text{Cu K}\alpha$ (1,541 Å, 30 kV, 15 mA). As amostras na forma de pó foram usadas diretamente na faixa angular de análise de 2θ , entre $1,5^\circ$ a 70° com variação de $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Varredura (SEM) utilizam um feixe de elétrons como fonte de “iluminação” sobre uma amostra a ser observada, ao invés de luz visível onde é possível a obtenção de imagens com resoluções espaciais da ordem de centenas a milhares de vezes. Esta incidência de elétrons produz diversas interações passíveis de serem coletadas fazendo estas técnicas irem muito além da simples obtenção de imagens. Na técnica de SEM, ocorre a irradiação da superfície da amostra, onde os sinais elétricos produzidos são

traduzidos na forma de imagem. Assim, imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidos em um equipamento FESEM JEOL JSM-740 30 kV, da Central Analítica do Instituto de Química. As imagens foram obtidas usando tensão de aceleração abaixo de 5 kV e o contato elétrico feito empregando fita de carbono.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Na técnica de TEM, a amostra é disposta entre a fonte de elétrons e um anteparo, onde a imagem ampliada é formada pelo impacto dos elétrons transmitidos e difratados. A imagem gerada é uma projeção bidimensional da amostra, em campo claro ou escuro, ou ainda de difração de elétrons, dependendo do modo de operação do equipamento. Em ambos os casos (TEM e SEM) a coleta dos raios-X característicos pode ser empregada para se estudar a composição elementar através do mapeamento composicional e semi quantitativo - EDS.

Assim, o sol obtido na síntese foi diluído na suspensão de grafeno em água na proporção 1:10, adicionando gota a gota e sob agitação constante para dispersão das partículas sobre as folhas de grafeno. A mistura foi posteriormente centrifugada a 1400 rpm até a completa precipitação dos materiais. O sobrenadante foi retirado e parte do precipitado foi dispersado em álcool etílico. Por fim uma gota da dispersão alcoólica foi colocada sobre a malha de cobre de 400 mesh e após a completa secagem do solvente foi feita a imagem.

As amostras foram preparadas pela transferência de 2 a 4 μL da dispersão diluída dos nanomateriais em água, que foi depositada sobre grids de cobre. As imagens foram obtidas com um microscópio de transmissão eletrônica JEOL JEM 2100, com tensão de aceleração máxima de 200 kV. O porta-amostra utilizado foi uma malha de cobre de 400 mesh (Ted Pella) e as imagens foram obtidas na Central Analítica.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM, do inglês Scanning Transmission Electron Microscopy) e de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM, do inglês High-Resolution Transmission Electron Microscopy) foram obtidos no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), utilizando-se amostras preparadas pela transferência de 2 a 4 μL de uma dispersão diluída dos nanomateriais em água depositado em grid de cobre.

3.3.5 Espectrometria Ótica de Emissão por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

A Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP OES) que quantifica elementos (metais, semimetais e terras raras) em diversos tipos de amostras. Baseia-se na detecção da radiação eletromagnética emitida por átomos neutros ou íons excitados nas regiões do espectro eletromagnético visível e ultravioleta. O conteúdo/porcentagem dos metais nas nanopartículas foram medidos empregando-se um espectrômetro ótico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado, marca Spectro, modelo Arcos, da Central Analítica do IQ-USP. As amostras passam pelo processo de digestão ácida (ou abertura) para remover os compostos orgânicos presentes. Os nanomateriais foram pesados em cadinho de platina, e a digestão da amostra foi realizada por fusão alcalina com tetraborato de lítio, seguida de dissolução com ácido nítrico 30%.

3.3.6 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

As análises químicas de superfícies das nanopartículas foram realizadas usando um espectrômetro K-Alpha (Thermo Fisher Scientific) equipado com um analisador hemisférico de elétrons e radiação monocromática Al K α (1486,6 eV) no laboratório nacional de luz síncrotron. Para a análise de α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂, foram empregas energias de 200 e 50 eV, respectivamente. A análise dos dados obtidos foi realizada no programa Thermo Advantage (Versão 5,921). Os resultados XPS apresentados neste trabalho corresponderam a uma média de três medições independentes realizadas em diferentes regiões de cada amostra.

O XPS foi utilizado para detectar o espalhamento dos elétrons secundários, e esses elétrons fornecem informações como a composição elementar, porcentagem atômica e estado de oxidação na superfície da amostra estudada. Nesse sentido, a amostra foi bombardeada com raios-X e os fotoelétrons por ela emitidos foram coletadas em um analisador de elétrons, dispositivo capaz de resolvê-los em função das respectivas velocidades (energias cinéticas) e, então, contá-los. Um gráfico de contagem de elétrons x velocidade (corrente x energia cinética) foi estabelecido através do mecanismo de coleta de dados automatizado, e um espectro de XPS foi obtido [97].

3.3.7 Espectroscopia Eletrônica no Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram obtidos na faixa de 190 a 1100 nm utilizando-se um espectrofotômetro HP8453 com detector de matriz de diodos, e cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

3.4 – Preparo dos eletrodos de FTO modificados

Os eletrodos transparentes recobertos com FTO ($R = 15 \Omega/\text{cm}$, Pilkington Tec-15) foram primeiramente lavados com água/etanol e secos em estufa. A área de trabalho do eletrodo foi delimitada como 1cm^2 empregando insulfilm e deixando a extremidade oposta livre para estabelecer contato elétrico. Sob a superfície não isolada do FTO foi realizado o *drop-casting* de $20 \mu\text{L}$ dos nanomateriais eletrocatalíticos na forma de sol (Figura 14). Em seguida, realizou-se *spin-coating* (4000 rpm) durante um minuto para uma boa dispersão e homogeneização das partículas na superfície do eletrodo. Este procedimento foi repetido uma segunda vez e em seguida os eletrodos foram colocados no forno (240°C) por 2 horas para secar. Os eletrodos modificados pela suspensão dos hidróxidos foram deixados em repouso, e após 24h, varreduras de potencial foram realizadas até a estabilização do sinal de linha base (cerca de 10 voltamogramas cíclicos) para então iniciar as aplicações analíticas.

Figura 14. Modificação dos eletrodos de FTO com as nanopartículas de $\text{Ni}(\text{OH})_2$.

3.5 – Preparo dos eletrodos impressos (SPEs) modificados

Os SPEs modificados com as nanopartículas foram preparados e testados no laboratório de Nanobioeletrônicos da Universidade da Califórnia coordenado pelo Prof. Joseph Wang. O substrato utilizado para impressão do SPE foi o polímero PET (Polietileno tereftalato) flexível. A tinta de Ag/AgCl (cor prata) foi usada na impressão

do eletrodo de referência assim como dos contatos elétricos (as conexões da interface eletrônica com o potenciostato) para medidas eletroquímicas (Figura 15A). A tinta de grafite misturada com os hidróxidos bi- e trimetálicos (cor preta) foi usada na impressão dos eletrodos de trabalho (W) e contra-eletrodo (C), resultando na configuração de SPE apresentada na Figura 15B. O processo de fabricação foi simplificado com o uso da mesma tinta em W e C, principalmente porque resultados semelhantes foram observados para C impresso apenas com tinta grafite. As dimensões finais do sensor SPE foram 3 × 1 cm (comprimento x largura).

O processo de impressão foi conduzido utilizando uma impressora semiautomática MMP-SPM (Speedline Technologies, Franklin, MA). Estênceis personalizados desenvolvidos com o software AutoCAD (Autodesk, San Rafael, CA) e produzidos pela Metal Etch Services (San Marcos, CA) foram usados como moldes dos sensores impressos. Após a impressão das camadas de tinta prata, os SPEs foram colocados em um forno elétrico à 85 °C por 20 minutos para secagem da tinta, e então foram impressos os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo. Novamente, os SPEs foram secos no forno elétrico, e o contato elétrico dos eletrodos foi isolado com uma fita comercial para esta finalidade (fita azul, citada em muitos artigos como “*blue tape*”) de modo que a área útil do eletrodo de trabalho ficasse no formato circular com diâmetro de 3 mm. As medidas eletroquímicas foram realizadas após a conexão adequada de cada um dos eletrodos (W, R e C) a um potenciostato. Para as análises, 50 µL de eletrólito (ou da amostra) foram transferidos para a superfície do SPE, seguido por adições sequenciais de quantidades conhecidas do analito a ser estudado.

Figura 15. A) Representação do processo de impressão de um eletrodo SPE. B) Ilustração das camadas que compõe o SPE.

3.6 – Medidas eletroquímicas

As determinações das espécies biológicas de interesse analítico foram realizadas empregando as técnicas de voltametria cíclica e amperometria (em condição hidrodinâmica) em associação com BIA, utilizando um Potenciostato/Galvanostato μ Autolab tipo III (Metrohm Autolab, PGSTAT30). Diferentes eletrólitos suportes foram testados nesse trabalho entre eles KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, soluções artificiais de suor e saliva, assim como amostras humanas desses biofluidos. Para os estudos eletranalíticos envolvendo o FTO modificado como eletrodo de trabalho utilizou-se

também de um eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl 3 mol L⁻¹, um contra-eletrodo de aço inox e como eletrólito KOH 1 mol L⁻¹.

Uma célula eletroquímica de BIA miniaturizada (capacidade máxima ~ 4 mL) constituída de cilindro de acrílico de 2 cm de diâmetro externo com uma tampa, base e suporte impressos em impressora 3D em polímero ABS foi utilizada para as aplicações dos sensores desenvolvidos. A velocidade de varredura foi 50 mV s⁻¹ para todos os estudos voltamétricos.

3.7 – Preparo da solução artificial de suor

A solução de suor artificial foi preparada em água destilada utilizando sais na forma de cloretos. As concentrações alcançadas na solução foram: 3 mmol L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), 0,4 mmol L⁻¹ cloreto de cálcio (CaCl₂), 50 μmol L⁻¹ cloreto de magnésio (MgCl₂), 8 μmol L⁻¹ cloreto de potássio (KCl) e 35 mmol L⁻¹ cloreto de sódio (NaCl), além de 5,5 mmol L⁻¹ de ácido láctico (C₃H₆O₃) e 100 μmol L⁻¹ glicose. O pH da solução foi ajustado para 5,0 com NaOH [98].

3.8 – Preparo da solução artificial de saliva

A saliva artificial foi preparada dissolvendo 5 mmol L⁻¹ de NaCl, 1 mmol L⁻¹ de CaCl₂, 15 mmol L⁻¹ de KCl, 1 mmol L⁻¹ de ácido cítrico (C₆H₈O₇) e 4 mmol L⁻¹ de NH₄Cl em água destilada. O pH da saliva artificial foi ajustado para 6,2 que é um pH médio da saliva humana saudável [99].

3.9 – Coleta das amostras de suor e saliva no corpo

Amostras humanas de suor humano e saliva foram coletadas de adultos saudáveis e usadas diretamente para medições eletroquímicas sem qualquer tratamento. Ambas as coletas de fluidos corporais foram realizadas por meio de mecanismos não invasivos [98,99] e com a concordância de todos os voluntários envolvidos. Este estudo envolvendo doadores humanos não apresentou um risco

potencial para a saúde, segurança ou bem-estar de um participante e sua realização foi aprovada pelo Conselho de ética da Universidade da Califórnia em San Diego.

4. Resultados e discussão

4.1 Eletrodo de FTO modificado com nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$

A síntese das nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ foi realizada utilizando a metodologia sol-gel na proporção em massa de 98% de níquel e 2% de platina em massa. A platina é conhecida como um metal de transição catalisador eficiente devido ao seu desempenho em diversas reações de oxidação e hidrogenação. Sua aplicação prática só não é mais disseminada devido ao seu alto custo e pouca disponibilidade no meio-ambiente. Nesse sentido, optou-se por trabalhar com uma proporção baixa do sal de platina (K_2PtCl_6).

4.1.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A influência da adição de 2% em massa de platina na estrutura do hidróxido de níquel foi claramente observada a partir do estudo termogravimétrico. As curvas TG e DTA (de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$) foram registradas em atmosfera de ar sintético e apresentaram três eventos de perda de massa semelhantes para ambos materiais (Figura 16). O primeiro evento ocorreu em cerca de 100 °C, atribuído à saída de cerca de 10% de água de hidratação. O segundo ocorreu em 230 °C para o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ referente à perda em massa de 15% de matéria orgânica (glicerina remanescente da síntese), e em 225 °C para o $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$, referente à perda de massa de ~25%. O terceiro evento foi identificado como a termodecomposição do hidróxido em seu óxido e ocorreu acima de 285 °C, (cerca de 27% de perda em massa para o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, e 24% para o $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$). Esse processo ocorreu de forma mais rápida (pico do DTA mais fino e intenso) na amostra contendo o hidróxido duplo (Figura 15B), sugerindo que a platina pode estar catalisando a desidratação/desidroxilação [69].

Figura 16. Análises térmicas (curvas TG em preto e DTA em azul). A) $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, B) $\alpha\text{-Ni}_{0.98}\text{Pt}_{0.02}(\text{OH})_2$.

4.1.2 Difractometria de Raios-X

A difratometria de raios-X (DRX) fornece informações sobre o ordenamento dos planos cristalinos, assim como a distância interlamelar, pela qual as fases α e β podem ser diferenciadas. Nos difratogramas obtidos para o $\text{Ni}(\text{OH})_2$ e $\text{Ni}_{0.98}\text{Pt}_{0.02}(\text{OH})_2$ podem-se observar três picos com perfis similares de baixa intensidade referentes aos planos característicos da fase α (003), (101) e (110). Picos de baixa intensidade em $2\theta =$

34,17 ° (2,74Å) e 60,29 ° (1,77Å) podem ser atribuídos respectivamente às reflexões 101 e 110 associadas aos comprimentos das ligações Ni-O. A partir do pico correspondente ao plano (003) pode ser determinada a distância (d) entre as lamelas, empregando a equação de Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$). O valor obtido de 11,85 Å para o Ni(OH)_2 foi deslocado para 14,67 Å no $\text{Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$, consistindo com uma maior distância do plano basal (maior estabilização da fase alfa). Os picos de DRX do material misto são mais alargados e menos intensos, indicando que a platina está aumentando o grau de desordem estrutural, caracterizando um material mais amorfo (Figura 17A-B).

Figura 17. Difrátogramas de raios-X do **A)** $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$, **B)** $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$. Radiação de $\text{Cu } K\alpha$ (1,541 Å, 30 kV, 15 mA).

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão realizadas por deposição de NPs do $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ em folhas de óxido de grafeno mostraram sua forma essencialmente esférica com um diâmetro em torno de 6 nm (Figura 18A-C). As imagens amplificadas de TEM de alta resolução mostradas nas Figuras 18B e 18C são consistentes com NPs com um grau relativamente alto de cristalinidade e uma distribuição relativamente homogênea. Durante a análise, existe a possibilidade de conversão do hidróxido em óxido devido ao aquecimento local induzido pelo feixe de elétrons focalizado e às condições de alto vácuo na câmara de amostra.

Figura 18. A) Imagens de TEM convencional do nanomaterial sintetizado. B) e C) Imagens de TEM com alta resolução de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$.

4.1.4 Estudos analíticos com o FTO modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$

A hidralazina (Hy) é um composto diazo cíclico com um grupo lateral hidrazil na posição orto que pode sofrer oxidação. A resposta eletroquímica desse fármaco frente a eletrodos de carbono vítreo e FTO sem modificação foi investigada em meio alcalino. Na faixa de concentração entre 0,1 e 5 mmol L⁻¹ de Hy, nenhum processo redox relevante para a aplicação analítica desejada foi observada (Figura 19).

Figura 19. Voltametrias cíclicas obtidas para hidralazina na faixa de concentração entre 0,1 e 5 mmol L⁻¹ com os eletrodos de A) FTO, e B) Carbono vítreo. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito: KOH 1,0 mol L⁻¹.

Na sequência, nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ foram imobilizadas na superfície de eletrodos de FTO. O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados foi avaliado por voltametria cíclica (Figura 20) e revelou um aumento do pico anódico (e uma diminuição correspondente do catódico) com

aumento da concentração de Hy. A melhor atividade catalítica foi observada para o eletrodo modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ em termos de intensidade de corrente, linearidade e sensibilidade em relação ao eletrodo sem platina. Essa melhoria na resposta eletrocatalítica referente à oxidação de Hy mediada pelas nanopartículas bimetálicas pode ser atribuída tanto à catálise da platina, como a uma maior estabilização que esse metal confere ao $\text{Ni}(\text{OH})_2$ na fase alfa.

Figura 20. Voltamogramas obtidos para adições de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ Hy utilizando eletrodos de FTO modificados com: **A)** $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, **B)** $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$. A curva de calibração apresenta a variação da corrente em função da concentração do analito. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrólito: $\text{KOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Experimentos utilizando amperometria foram realizados visando promover quantificações com maiores sensibilidades e numa faixa linear mais ampla. Na Figura 21, o registro das medidas amperométricas é apresentado em função do tempo, utilizando potencial fixo em $0,45 \text{ V}$. Neste procedimento foram realizadas 10 adições sucessivas de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Hy. Na faixa de concentração explorada, a resposta obtida com a utilização dos eletrodos de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ foi mais interessante que a do eletrodo modificado apenas com $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, confirmando os resultados anteriores obtidos por voltametria cíclica. Desse modo, o FTO com $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ foi selecionado para dar continuidade nos estudos analíticos.

Figura 21. Amperometria hidrodinâmica obtida para Hy em KOH 1,0 mol L⁻¹, utilizando eletrodo de FTO modificados com: **A)** α -Ni(OH)₂, **B)** α -Ni_{0,98}Pt_{0,02}(OH)₂. As respectivas curvas de calibração foram obtidas no potencial fixo de 0,45 V.

4.1.5 Associação do eletrodo de FTO modificado ao sistema BIA

A quantificação rápida e precisa de fármacos é uma necessidade para diversas aplicações. A determinação amperométrica é vantajosa pela sua simplicidade e precisão, no entanto em larga escala torna-se interessante a utilização de sistemas em fluxo que permitam análises rápidas e automatizadas. O sistema BIA tem seu sinal dependente de diversos fatores, dentre os quais, a distância entre a ponteira da pipeta e o eletrodo de trabalho, a velocidade de injeção da amostra e o volume injetado. Adicionalmente, em se tratando de um teste amperométrico, o potencial aplicado também é um fator fundamental para a resposta do sistema [100]. Assim, a otimização desses parâmetros é uma parte essencial para o bom funcionamento dos experimentos.

Inicialmente, os parâmetros de otimização envolvidos no sistema BIA foram determinados na busca pelas melhores variáveis, como volume de amostra, velocidade de injeção e potencial (Tabela 2). A distância ideal entre o eletrodo de trabalho e a ponta da pipeta foi 2,0 mm, a velocidade de injeção selecionada da pipeta automática foi a mais rápida testada (274 μL s⁻¹), e o melhor volume de eletrólito de suporte foi 20 μL. O potencial mais favorável selecionado foi de 400 mV. Antes de iniciar este experimento, cada eletrodo de FTO modificado com α -Ni_{0,98}Pt_{0,02}(OH)₂ foi

condicionado pela voltametria cíclica através de dez ciclos, necessários para alcançar a estabilidade do sinal.

Tabela 2. Otimização dos parâmetros para análise por injeção em batelada.

Parâmetro	Faixa estudada	Optimizado
Potencial (V)	0,3 – 0,5	0,4
Volume injetado (μL)	10 – 50	20
Velocidade de injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	35,7 – 274	274

Os experimentos de repetibilidade (Figura 22) foram executados a partir de 45 injeções sucessivas de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hy, resultando em uma corrente de $9,5 \pm 0,4 \mu\text{A}$ e desvio padrão relativo (RSD) de 4%. Uma corrente intensa, nítida e reproduzível foi obtida com os eletrodos de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ FTO, confirmando a ausência de efeitos de memória e obstrução da superfície eletroativa do eletrodo de trabalho, revelando também uma frequência analítica expressiva para a Hy (240 análises / h).

Figura 22. BIAgramas obtidos para 45 injeções sucessivas de Hy $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ com o eletrodo de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$. O potencial aplicado foi $400 \text{ mV vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})}$, a velocidade de injeção de $274 \mu\text{L s}^{-1}$ e o volume de amostra de $20 \mu\text{L}$.

BIA associado a amperometria foi utilizado na determinação de Hy (Figura 23) utilizando os parâmetros previamente estabelecidos em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Essas medidas demonstraram a alta sensibilidade obtida através do coeficiente angular de

$0,134 \text{ A L mol}^{-1}$, na faixa de concentração entre 2×10^{-5} a $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Hy. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir de 3 replicadas e os valores encontrados foram respectivamente $5,9 \times 10^{-6}$ e $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 23. BIAgramas em triplicata para diferentes concentrações de Hy em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ no eletrodo de $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$. O potencial aplicado foi $400 \text{ mV vs. Ag/AgCl}(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})$, a velocidade de injeção de $274 \mu\text{L s}^{-1}$ e o volume de amostragem de $20 \mu\text{L}$.

4.1.6 Estudo analítico da hidralazina em fármacos pela técnica BIA

Hy é o princípio ativo do fármaco hipertensivo apresolina (APRL). Assim, análises por injeção em batelada foram realizadas para determinação de Hy em amostras farmacêuticas visando melhorar a sensibilidade da determinação e automatizar o sistema. Após a realização da curva de calibração a partir de concentrações conhecidas de Hy, uma adição de apresolina foi realizada contendo $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do princípio ativo. O resultado encontrado em comprimidos de APRL utilizando o novo sensor associado ao BIA, revelou um desvio em relação ao valor nominal do rótulo de $+ 7,5\%$ com coeficiente $R^2 = 0,999$ (Figura 24). Assim, os eletrodos de FTO modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,98}\text{Pt}_{0,02}(\text{OH})_2$ mostraram-se adequados para aplicações com fins analíticos, dentro da faixa de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Hy.

Figura 24. BIAgramas em quadruplicata obtido em KOH 1 mol L⁻¹ com o eletrodo de α -Ni_{0,98}Pt_{0,02}(OH)₂ da faixa de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,6 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de Hy. Adição de APRL em quadruplicata na concentração de $4,0 \times 10^{-4}$. O potencial aplicado foi 400 mV Ag/AgCl(KCl 3 mol L⁻¹), a velocidade de injeção de 274 μ L s⁻¹ e o volume de amostragem de 20 μ L.

4.1.7 Estudo analítico da hidralazina em fármacos pela técnica UV-VIS

A quantificação da hidralazina em comprimidos de APRL através do sistema BIA apresentou resultados similares à espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS) no comprimento de onda de 260 nm. Neste estudo, foi possível obter uma relação linear entre a corrente e concentração do analito, permitindo trabalhar em concentrações mais baixas. O desvio em relação ao valor nominal do rótulo está concordante com os resultados que foram obtidos por espectroscopia UV-VIS, que é um dos métodos recomendado pela farmacopeia para análise de Hy, cujo desvio foi de + 6,7% (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação de hidralazina em comprimidos de apresolina.

Método	Fármaco	Princípio ativo	Valor esperado (mg)	Valor encontrado (mg)	Recuperado (%)	RSD (%)
UV-VIS	APRL	Hy	50,0	53,3	106,7	6,7
BIA	APRL	Hy	50,0	53,7	107,5	7,5

O sistema BIA/potenciostato é facilmente montado em qualquer laboratório em locais remotos e permite a análise em larga escala de amostras, um vez que o sistema esteja calibrado. Embora a espectroscopia UV-VIS (Figura 25) seja uma técnica de fácil manuseio, o número de amostras que o BIA permite analisar em um mesmo espaço de tempo é maior. Além disso, o procedimento de BIA proposto aqui permitiu comprovar as indicações do rótulo relativo ao conteúdo do princípio ativo na composição do fármaco estudado (APRL). No entanto, para ambos os métodos, a quantidade de hidralazina encontrada foi superior ao valor especificado no rótulo. A presença de quantidades levemente superior ao princípio ativo no fármaco é bastante comum, para compensar a perda devido à eventual degradação do medicamento.

Figura 25. Determinação de hidralazina em comprimidos de apresolina por UV-VIS. Os pontos foram plotados para as absorbâncias medidas em 260 nm.

Assim, nesse trabalho observou-se que uma pequena porcentagem de platina (2%) presente no hidróxido duplo de níquel foi o diferencial para a catálise desta reação. O sensor modificado com as nanopartículas foi eficiente na determinação de hidralazina em amostras farmacêuticas, com resultados similares aos obtidos pelos métodos convencionais. Experimentos de voltametria cíclica foram realizados em paralelo com os excipientes presentes no composto farmacêutico (amido, celulose, sacarose e talco) e nenhuma resposta foi observada no potencial selecionado para Hy, indicando a ausência de interferentes.

Nesse sentido, outras composições de hidróxidos de níquel foram preparadas, utilizando sais metálicos mais baratos, solúveis, menos tóxicos e mais abundantes, que serão apresentados nas seções a seguir.

4.2 Eletrodo de FTO modificado com nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2$

Os hidróxidos de níquel e zinco apresentam produto de solubilidade ($K_{ps} = 5,5 \times 10^{-16}$ e $K_{ps} = 1,2 \times 10^{-17}$, respectivamente) e estados de oxidação semelhantes, o que é um fator favorável para a precipitação simultânea durante a preparação do hidróxido duplo, minimizando eventual lixiviação preferencial e podendo contribuir para a uniformidade dos hidróxidos de NiZn. Estudos anteriores com hidróxidos duplos de Ni/Al dopado com o zinco revelaram uma melhora no desempenho eletroquímico em termos de estabilidade e reversibilidade [103]. Outros trabalhos foram focados na estabilização estrutural de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ contra o envelhecimento em solução alcalina por incorporação de Zn^{2+} (em células alcalinas secundárias e baterias recarregáveis) [102,103], mas suas propriedades eletrocatalíticas ainda não foram demonstradas em solução neutra ou ácida e nem para sensores eletroquímicos.

Assim, a síntese das nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2$ foi realizada utilizando a metodologia sol-gel nas seguintes proporções em massa:

1. 100% em massa de acetato de níquel tetrahidratado - $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_4$
2. 100% em massa de acetato de zinco dihidratado - $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_2$
3. 75% em massa de $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ e 25% em massa de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_2$
4. 50% em massa de $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_4$ e 50% em massa de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})_2$

4.2.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

O perfil termogravimétrico dos materiais à base de hidróxido de níquel é bastante conhecido e documentado [46]. No entanto, dada a presença de etapas de aquecimento para a preparação dos eletrodos realizadas em mufla e em atmosfera não controlada, além da presença de solventes provenientes da síntese, optou-se por realizar a termogravimetria juntamente com a análise térmica diferencial dos hidróxidos em pó. As curvas TG-DTA registradas em atmosfera de ar sintético obtidas

para o α -Ni(OH)₂ e α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ apresentaram três eventos de perda de massa como mostrado na Figura 26.

Figura 26. Análises térmicas (curvas TG em preto e DTA em azul). A) α -Ni(OH)₂, B) α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂.

A saída de água de hidratação equivaleu à perda em massa de 10% do hidróxido por volta de 100 °C. O evento acima de 220 °C é identificado como a evaporação de glicerina (matéria orgânica) remanescente da síntese, promovendo uma perda em massa de cerca de 15% para o α -Ni(OH)₂ e 25% para o α -

$\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$. O terceiro evento por volta de 300 °C foi identificado como a decomposição térmica do hidróxido em seu óxido (perda de 27% em massa para $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e 24% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$). Esse processo é mais nítido nos hidróxidos duplos (Figura 26B) do que no simples (Figura 26A), sugerindo que o caráter mais ácido dos íons Zn^{2+} pode facilitar o processo de desidroxilação/desidratação em $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$.

4.2.2 Difratometria de Raios-X

Nanopartículas com diferentes proporções de níquel e zinco ($\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$, $\alpha\text{-Ni}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$) foram caracterizadas inicialmente por difratometria de raios-X, sendo comparadas seus difratogramas com as NPs do óxido de zinco (ZnO). Os difratogramas de raios-X das NPs de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ exibiram perfis semelhantes, caracterizados por três picos largos e de baixa intensidade: (003), (101) e (110). A incorporação de Zn(II) deslocou o pico correspondente ao plano (003) do $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ para ângulos menores, indicando um aumento da distância entre as lamelas de 11,0 para 14,4 Å (Figura 27).

Figura 27. Difração de raios-X de ZnO, $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$, $\alpha\text{-Ni}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$.

Distâncias do plano basal superiores à 8 Å demonstram que a fase polimórfica predominante das NPs é a α . O $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ sólido apresentou um pico em 2θ equivalente a $9,35^\circ$ (plano de reflexão 003), além de picos de menor intensidade em $34,3^\circ$ e $60,5^\circ$, respectivamente atribuídos aos planos (101) e (110) associado às

ligações Ni-O [69]. As NPs bimetálicas de $\alpha\text{-Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2$ foram formadas por substituição isomórfica de íons Ni^{2+} por Zn^{2+} nos sítios octaédricos da estrutura de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, uma vez que os padrões de DRX eram semelhantes, exceto pelas intensidades um pouco mais baixas. Esse resultado indica que a incorporação de íons Zn^{2+} aumenta o grau de desordem estrutural, como esperado para materiais mais amorfos ou nanocristais menores, mas preservando a estrutura do $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$. De fato, todos os picos de difração do $\text{Zn}(\text{OH})_2$ preparado podem ser indexados ao ZnO com estrutura hexagonal de wurtzita (JCPDS nº 36-1451) [102,103].

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As amostras para análise por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foram preparadas depositando uma monocamada de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, $\alpha\text{-Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2$ ou $\alpha\text{-Zn}(\text{OH})_2$ em folhas de óxido de grafeno, que foi transferido para o porta amostras. Como pode ser visto na Figura 28A, as NPs têm forma circular, com tamanho médio entre 5-8 nm, estimado com base na equação de Debye-Scherrer ($\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ (6,0 nm), $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ (7,0 nm) e $\alpha\text{-Ni}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}(\text{OH})_2$ (5,4 nm)). As inspeções mais próximas do HRTEM indicaram que elas são cristalinas, como indicado pelas franjas de interferência (Figura 28B), atribuídas ao plano (200) de NiO (JCPDS nº 73-1523). A conversão de $\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ em $\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{O}$ é induzida pelo feixe de elétrons na câmara do microscópio sob alto vácuo, gerando NPs de óxido de 6-8 nm de diâmetro. Resultado semelhante foi obtido com NPs do $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$.

As nanopartículas de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ (2-8 nm de diâmetro, Figura 28C-D) foram preparadas por procedimento sintético análogo usando $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A reação de desidratação induzida por feixe de elétrons de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ a ZnO também foi observada, como confirmado pela presença de franjas de interferência com distâncias interplanares de 2,87 Å, consistente com o espaçamento dos planos (002) na rede hexagonal de ZnO (Figura 28D) [102,103].

Figura 28. Imagens de TEM de uma unidade de camada densamente compactada de nanopartículas depositadas sobre folhas de óxido de grafeno e imagens HRTEM correspondentes após uma reação de desidroxilação induzida pelo feixe de elétrons gerando os respectivos óxidos mistos, respectivamente para (A-B) $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ e (C-D) ZnO .

4.2.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

Os espectros XPS permitem identificar quantitativamente na ordem de nanômetros, todos os elementos químicos na superfície da amostra, suas concentrações relativas, o ambiente químico dos elementos, seus estados de oxidação e, em casos específicos, permite inferir a morfologia da superfície em análise. Se uma espécie possui sítios ativos para o oxigênio interagir com ela, o XPS consegue detectá-los devido a diferença de energia. Além disso, se a espécie possui

uma banda de absorção em um determinado lugar, é possível identificar se o sítio ativo é de hidratação, adsorção, ou outros.

O espectro de fotoelétrons de raios-X dos hidróxidos duplos exibidos na Figura 29A indicou claramente a presença de Ni, Zn e O na amostra. A porcentagem atômica de cada elemento também foi determinada após lavagem com água (Figura 29B), que mostrou não ocorrer lixiviação preferencial. O conteúdo de carbono foi atribuído às moléculas de glicerina remanescentes da síntese. Os nanomateriais exibiram uma razão atômica Ni:Zn por XPS de 71:29 e 46:54, respectivamente, para α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ e α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂. Resultados obtidos por ICP-OES confirmaram a obtenção de uma razão atômica semelhante (74,7: 25,3 e 49,5: 50,5). Essa proximidade nas razões atômicas reveladas por ambas as técnicas sugerem que os materiais sintetizados são bastante homogêneos, sem segregação de fase aparente, uma vez que o volume (ICP) e sua superfície (XPS) possuem composição semelhante.

Ambos, α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ e α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂, apresentaram perfil espectral semelhante ao do padrão Ni(OH)₂ na região de níquel (Figura 29C). De acordo com a literatura [68,69], ocorrem dois dupletos na faixa de 850 a 885 eV podem ser atribuídos a duas transições de órbita de rotação envolvendo os estados de Ni 2p_{3/2} e Ni 2p_{1/2}. Tais picos foram encontrados em 855,7 e 873,4 eV para o α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂, apresentando um perfil espectral semelhante ao α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂, com um ligeiro deslocamento das bandas para energias mais altas, em 856,1 e 873,7 eV, revelando o efeito eletrônico significativo dos íons Zn(II).

Os espectros de alta resolução dos hidróxidos mistos e do ZnO, na região Zn2p (1022 a 1045 eV), são mostrados na Figura 29D. Ambos α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ e α -Ni_{0,50}Zn_{0,50}(OH)₂ exibiram dois picos característicos, atribuídos a transições envolvendo os estados de órbita de spin de Zn 2p_{3/2} e Zn 2p_{1/2} respectivamente em 1022.1/1045.2 e 1021.4/1044.5 eV. Curiosamente, as energias de ligação do Zn2p nos hidróxidos duplos não foram alteradas em comparação com o ZnO, sugerindo que os íons Ni²⁺ podem não alterar a estrutura eletrônica local de Zn²⁺ nas nanopartículas de hidróxido mistas.

Figura 29. (A) Espectro de fotoelétrons de raios-X do $\alpha\text{-Ni}_{0.75}\text{Zn}_{0.25}(\text{OH})_2$. (B) Porcentagem atômica determinada a partir do espectro. (C) Ni2p e (D) Espectro de alta resolução do Zn2p.

Os espectros comparativos de fotoelétrons de raios-X também foram realizados para o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$, $\alpha\text{-Ni}_{0.50}\text{Zn}_{0.50}(\text{OH})_2$ e $\text{Zn}(\text{OH})_2$ (Figura 30) e revelaram a composição atômica e estrutural similar entre os hidróxidos. Os espectros apresentados mostram os dados energéticos das espécies estudadas, e dependendo de como a nanopartícula é dopada, ocorre uma mudança nos sítios ativos. As energias de ligação do níquel, zinco, carbono e oxigênio mostram a força de ligação em determinadas regiões.

Além dos metais presentes na síntese, e do oxigênio observado no espectro proveniente do hidróxido, o conteúdo de carbono revelado nos espectros é proveniente da glicerina remanescente usada na síntese. Os espectros dos hidróxidos duplos demonstram ser uma mistura dos espectros de níquel e zinco separadamente, ou seja, os orbitais Ni2p³, o Zn2p³ e de adsorção do sítio ativo do oxigênio são observados para todos. O carbono é característico do orbital s (o orbital mais baixo), pois é aplicada uma energia de ligação cada vez mais baixa.

Figura 30. Espectro comparativo de fotoelétrons de raios X de (A) $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ (B) Zn(OH)_2 , e (C) $\alpha\text{-Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{(OH)}_2$.

Nos espectros de XPS obtidos, observou-se um deslocamento nas bandas de níquel após a adição de zinco na composição do hidróxido. Esse deslocamento representa uma mudança da estrutura superficial do material, uma vez que as bandas estão próximas e, trata-se da mesma espécie, com a mesma energia de ligação. Assim o XPS mostra quão ativo é o sítio em que o elétron se encontra. Como o orbital não é um local fixo, mas sim uma região com maior probabilidade de se encontrar o elétron, quando uma energia é aplicada no sistema, o orbital vai interagir com essa energia, fornecendo a informação de qual banda irá acontecer o espalhamento do elétron secundário.

4.2.5 Estudos analíticos com o eletrodo de FTO modificado com $\alpha\text{-Ni}_{1-x}\text{Zn}_x(\text{OH})_2$

O comportamento eletroquímico dos eletrodos de FTO modificados com os hidróxidos nanoestruturados foi avaliado primeiramente por voltametria cíclica, explorando sua atividade eletrocatalítica frente a ácido úrico (UA) em meio alcalino. Inicialmente, os eletrodos foram condicionados por ciclagens sucessivas (de 0,0 a 0,6 V vs Ag/AgCl_(KCl 3 mol L⁻¹) ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)) até atingir um perfil voltamétrico estável (tipicamente de 5 a 10 ciclos). O eletrodo de FTO sem modificação não exibiu corrente anódica a 0,0 V para determinação de UA na mesma faixa de concentração, apenas no potencial de 0,5 V (Figura 31).

Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de FTO sem modificação, para determinação de UA em solução de KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$). A reta de corrente em função da [UA] foi plotada referente ao potencial 0,5 V.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}(\text{OH})_2$ (Figura 32A e B) apresentaram uma resposta muito discreta no potencial 0,0 V vs Ag/AgCl_(KCl 3 mol L⁻¹) ($I = (17,9 \times [\text{UA}] + 0,003) \text{ mA}$ e $I = (15,2 \times [\text{UA}] + 0,008) \text{ mA}$, respectivamente). Já os eletrodos de FTO modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ (Figura 32C) apresentaram sensibilidade mais de 15 vezes superior para UA que os anteriores, sendo a equação da reta obtida: $I = (300,0 \times [\text{UA}] - 0,03) \text{ mA}$. Esse comportamento mostra uma forte dependência da razão Ni:Zn, uma vez que a corrente observada em 0,0 V é uma ordem de magnitude menor nos eletrodos modificados 50:50 Ni:Zn em relação aos eletrodos com 75:25. A menor sensibilidade

(baseada no coeficiente angular da curva de calibração) foi observada para os eletrodos de FTO modificados com Zn(OH)_2 (Figura 32D) no potencial de 0,4-0,5 V vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})}$ e equação da reta $I = (0,1 \times [\text{UA}] + 1,3 \times 10^{-6}) \text{ mA}$, uma vez que não possuía o par redox $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ para catalisar a oxidação.

Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de FTO modificados com (A) $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ (B) $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$, (C) $\alpha\text{-Ni}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}(\text{OH})_2$ e (D) $\alpha\text{-Zn(OH)}_2$, usando eletrodo de referência de $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})}$, para concentrações crescentes de UA em solução de $\text{KOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$). As inserções mostram os gráficos de corrente em função da concentração $[\text{UA}]$.

Os eletrodos de FTO modificados com hidróxido duplo ou simples de níquel apresentaram uma corrente anódica no potencial 0,0 V que aumentou em função da concentração de UA. O processo característico da oxidação do Ni(OH)_2 a NiOOH em 0,4 V também foi observado. No entanto, a atividade eletrocatalítica não foi relevante em $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ e nem em $\alpha\text{-Ni}_{0,50}\text{Zn}_{0,50}(\text{OH})_2$, quando comparado ao $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ como pode ser observado pelo coeficiente angular apresentado na Tabela 4. Isso

pode ser devido ao fato de zinco (na proporção de 25%) estar aumentando a estabilidade do hidróxido na fase alfa, o que resultou numa melhora nas propriedades eletroquímicas do material.

Tabela 4. Parâmetros analíticos obtidos para determinação de ácido úrico por voltametria cíclica, utilizando os eletrodos de FTO modificados com diferentes hidróxidos:

Hidróxidos	Potencial de resposta (V)	Coefficiente angular σ (mA L mmol ⁻¹)	R ²
α -Ni(OH) ₂	0,0	17,9	0,995
α -Ni _{0,50} Zn _{0,50} (OH) ₂	0,0	15,2	0,990
α -Ni _{0,75} Zn _{0,25} (OH) ₂	0,0	300,0	0,996
α -Zn(OH) ₂	0,45	0,1	0,986

Sensores amperométricos apresentam alta sensibilidade e uma larga gama de aplicações devido à grande quantidade de compostos que podem ser oxidados ou reduzidos em suas superfícies [25]. Assim, a resposta amperométrica foi avaliada para os eletrodos de FTO modificados com α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ na faixa de concentração entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (Figura 33), obtendo uma relação linear ($R^2 = 0,998$) e com boa sensibilidade para o ácido úrico (coeficiente angular = 0,016 A L mol⁻¹). Os experimentos foram realizados no potencial 0,1 V vs Ag/AgCl(KCl 3 mol L⁻¹), pois nesse potencial observou-se a corrente mais alta e estável alcançada para UA. Esse resultado ressalta a potencialidade de aplicação dos eletrodos de FTO modificados com α -Ni_{0,75}Zn_{0,25}(OH)₂ como sensores amperométricos para determinação de UA.

Figura 33. Amperometria hidrodinâmica obtida para um eletrodo FTO modificado por α - $\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ após adições consecutivas de 20 μL de UA ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), com um potencial fixo de 0,1 V vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})}$. Os valores de corrente vs [UA] e as respectivas regressões lineares são mostradas nas inserções das figuras.

4.2.6 Associação do eletrodo modificado de FTO ao sistema BIA

Uma vez que os eletrodos α - $\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ FTO apresentaram uma boa resposta eletroquímica por voltametria e amperometria, o seu desempenho foi avaliado associando-os à técnica BIA. Nesse sentido, os parâmetros analíticos como volume da amostra, velocidade da injeção, potencial de trabalho e distância do eletrodo à ponta da pipeta foram cuidadosamente otimizados para realização do BIA, a fim de encontrar as melhores condições analíticas (Tabela 5). O volume de amostra de 20 μL e o potencial de 0,0 V vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1})}$ foram escolhidos. A melhor velocidade de injeção foi 274 $\mu\text{L s}^{-1}$, a mais rápida alcançada na pipeta utilizada. A distância ideal entre a superfície do eletrodo de trabalho e a ponta da pipeta foi de 2,0 mm [69].

Tabela 5. Otimização dos parâmetros para análise por injeção em batelada.

Parâmetro	Faixa estudada	Optimizado
Potencial (V)	-0,2 – 0,2	0,0
Volume injetado (μL)	20 – 60	20
Velocidade de injeção ($\mu\text{L s}^{-1}$)	35,7 – 274	274

Para avaliar a repetibilidade do eletrodo, trinta injeções sucessivas de 20 μL de UA ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) foram realizadas com uma pipeta automatizada programável, monitorando as respostas em $0,0 \text{ V}$ (Figura 34). Sinais intensos, nítidos e reprodutíveis foram obtidos com o FTO modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$, resultando em uma corrente de $2,5 \pm 0,08 \mu\text{A}$ e RSD de 3,2% ($n = 30$). O sinal estável e reprodutível confirma a ausência do efeito de memória, deposição e obstrução da superfície do eletrodo modificado, uma vez que a corrente foi mantida constante ao longo de 30 injeções consecutivas da solução de UA. Para esta série de experimentos, uma frequência analítica expressiva de $72 \text{ análises h}^{-1}$ foi alcançada. Esse potencial é favorável para evitar interferência de outras espécies eletroativas na análise dos fluidos biológicos.

Figura 34. BIAgramas obtidos para 30 injeções sucessivas de UA $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ FTO. O potencial aplicado foi $0,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$), a velocidade de injeção de $274 \mu\text{L s}^{-1}$ e o volume de amostra de $20 \mu\text{L}$.

Estudos com os eletrodos de FTO modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ e associados à técnica BIA mostraram excelentes resultados para a determinação de UA na saliva. Os limites de detecção e quantificação foram observados na faixa de nanomolar (respectivamente 23 e 76 nmol L^{-1}). Os BIAgramas obtidos para 5 adições de UA com sua concentração variando de $0,1$ a $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (usados para a preparação de uma curva padrão) são apresentados na Figura 35. Uma adição de amostra real de saliva diluída a 50% com eletrólito de KOH a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizada sob as condições otimizadas. Uma relação linear entre corrente e $[\text{UA}]$ foi obtida

confirmando a alta sensibilidade do eletrodo modificado, a partir do coeficiente angular da reta ($0,045 \text{ A} / \text{mol L}^{-1} \text{ cm}^2$).

Diferentes alíquotas de saliva foram coletadas em um tubo eppendorf, imediatamente antes da análise. A solução de saliva foi diluída em KOH 2 mol L^{-1} na proporção 50/50 em volume. A amostra, cujos resultados são apresentados na Figura 35 revelou uma concentração de UA de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$, calculada através da curva de calibração. A concentração de ácido úrico em srum varia entre aproximadamente 200 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ [109], e esse resultado mostra o potencial dos novos eletrodos preparados para monitorar cido rico nessa faixa de concentrao.

Figura 35. BIAgramas obtidos para solues de $0,1$ a $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ UA (usados para a preparao de uma curva padro) e da amostra real de saliva diluda a 50% com eletrlito de KOH a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, sob as condies otimizadas. Os valores de corrente vs [UA] e as respectivas regresses lineares so mostradas nas inseres das figuras.

Os mtodos relatados para determinao da UA no suor e na saliva ainda so escassos devido s dificuldades associadas s suas baixas concentraes nesses biofluidos [106]. Em comparao com os mtodos recentemente relatados para a determinao de UA, os resultados aqui apresentados so interessantes, como pode ser visto na Tabela 6. O LOD encontrado no presente trabalho menor que o de um sensor vestvel aplicado para a determinao de UA no suor [107] e semelhante a um biossensor de nanoenzima ouro-cobalto desenvolvido para identificar UA no soro humano [108].

Tabela 6. Limites de detecção e respectivos métodos analíticos utilizados para determinação da UA em fluidos corporais relatados recentemente na literatura.

Método usado	LOD (mol L ⁻¹)	Referência
Sensor vestível	$7,4 \times 10^{-7}$	[107]
Biossensor de nanoenzima Au-Co	$2,3 \times 10^{-8}$	[108]
Eletrodo de microdisco de carbono	$2,0 \times 10^{-5}$	[109]
Eletroforese capilar com detecção eletroquímica	$3,3 \times 10^{-7}$	[110]
Eletroforese capilar com detecção UV	$1,1 \times 10^{-5}$	[111]
Sensor de nanohidróxido de Ni-Zn	$2,3 \times 10^{-8}$	Este sensor [112]

4.3 Eletrodos impressos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$

Após observar uma boa resposta eletroquímica em meio alcalino, o nanomaterial foi utilizado na impressão de sensores impressos (SPE), visando testar a possibilidade de trabalhar em condições mais próximas de pHs biológicos (meios neutros e/ou levemente ácidos). Nessa etapa do trabalho, as nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ foram misturadas/incorporadas com tintas condutivas de grafite (fabricante Ercon) dentro de um frasco eppendorf. O material $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ foi facilmente incorporado na tinta, dada sua natureza nanoparticulada, proporcionando boa condutividade e homogeneidade aos filmes. Nestes filmes foi observado que a solubilização das nanopartículas em solução ácida e neutra era completamente inibida. A mistura foi usada para imprimir os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo, visando obter um eletrodo que contenha as nanopartículas do hidróxido e ao mesmo tempo possa ser utilizado em pHs biológicos, tornando o novo material mais acessível.

A resposta do SPE modificado foi inicialmente examinada por voltametria cíclica, obtendo uma correlação entre corrente e concentração de analito linear em pH 7,4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS). A proporção ideal em massa da mistura tinta / $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ foi estudada visando otimizar a resposta em relação aos eletrodos de FTO modificados e a seletividade em relação à quantificação de UA, sendo também necessário considerar a qualidade da impressão. Foram testados sensores contendo

10, 25, 50 e 75% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ em tinta de grafite comercial. No entanto, a última composição (preparada com 75% em massa de nanopartículas e 25% de tinta) ficou muito líquida e não foi satisfatória para impressão dos sensores (Figura 36). Assim, essa mistura contendo 75% em massa de NPs não apresentou a viscosidade necessária para obter uma boa qualidade de impressão e, portanto, não será considerada adiante.

Figura 36. SPEs impressos em polímero PET utilizando a mistura de 75% NPs e 25% tinta de grafite para os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo.

Inicialmente, um SPE impresso apenas com tinta de grafite, sem modificação, foi testado para determinação de UA na faixa de concentração entre 9,9 e 122 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH = 7,4). Nenhum processo redox de transferência eletrônica foi observado para o SPE sem modificação (Figura 37), abrindo a possibilidade de testar os SPEs modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ em condições neutras e levemente ácidas. Antes desse trabalho, sensores de hidróxidos de níquel não haviam sido estudados em pHs biológicos, devido à dissolução dos hidróxidos nessas condições. De alguma forma, as nanopartículas incorporadas à tinta são protegidas e os eletrodos apresentam estabilidade.

Figura 37. Voltamogramas cíclicos registrados para adições de ácido úrico na faixa de concentração entre 0,01 e 0,1 mmol L⁻¹ em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,4) usando um SPE sem modificação ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Os voltamogramas obtidos para os SPEs modificados com 10% e 25% em massa de NPs revelaram um coeficiente angular de 3,8 e 16,0 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$, respectivamente como pode ser observado nas Figuras 38A-B. Essa resposta indica que aumentando a proporção de NPs de 10 para 25%, a sensibilidade aumentou em mais de 4 vezes. O melhor resultado obtido foi com a tinta de 50% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$, cujo coeficiente angular da reta foi 34,2 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$ (Figura 38C). Esse valor de sensibilidade foi 10 vezes maior que o obtido para o SPE modificado com 10% de NPs e mais que o dobro quando comparado ao SPE com 25% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$. As retas plotadas de corrente vs concentração de ácido úrico para os três tipos de SPE são mostradas na Figura 38D.

Figura 38. Voltamogramas cíclicos ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) obtidos para concentrações crescentes de UA em PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$) usando SPE preparado com (A) 10% em massa, (B) 25% em massa e (C) 50% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ NPs; (D) Curvas de calibração da corrente vs $[\text{UA}]$ para o SPE modificado com 10% em massa de NPs (A), 25% em massa de NPs (B), e 50% em massa de NPs em (C).

A fim de verificar a possibilidade de aplicar o SPE modificado com o hidróxido duplo para determinação de UA em pHs biológicos, investigações adicionais foram realizadas usando, inicialmente, soluções artificiais de suor como eletrólito (Figura 39). O processo de oxidação do UA nos eletrodos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ foi observado por voltametria cíclica no potencial de $0,0 \text{ V}$ para solução de $\text{KOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 32C), $0,1 \text{ V}$ em $\text{pH } 7,4$ PBS (Figura 38C), $0,24 \text{ V}$ em $\text{pH } 5$ (Figura 39B) e $0,26 \text{ V}$ em $\text{pH } 3$ (Figura 39A) usando suor artificial como eletrólito. Esse resultado demonstra que o potencial onde o processo de oxidação do ácido úrico ocorre foi deslocado para valores mais elevados à medida que o pH diminuiu, confirmando o possível envolvimento de prótons na reação.

Figura 39. Voltamogramas cíclicos de concentrações crescentes de UA no suor artificial ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) em (A) pH = 3 e (B) pH = 5. As respectivas curvas de calibração foram obtidas na faixa de concentração de 20 à $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA.

Essa observação de que meios com pHs mais baixos requerem potenciais mais positivos para a oxidação do ácido úrico (Tabela 7), pode estar relacionada ao fato do pK_a do ácido úrico (5,8) estar predominantemente na forma protonada em pHs abaixo de 5,8. Apesar desse leve aumento no valor do potencial de oxidação, a possibilidade de utilizar essas NPs em pHs tão baixos quanto 3,0 é ainda muito interessante e favorável para aplicações biológicas. Uma eventual explicação para o hidróxido duplo não se dissolver em tais condições de pH, pode ser atribuída ao fato de a matriz da tinta condutora de grafite estar de alguma forma protegendo as nanopartículas. Esse resultado é inovador e essencial para ampliar a faixa de pH na qual os hidróxidos de níquel podem ser usados para modificação da superfície de sensores impressos.

Tabela 7. Potenciais de oxidação observados para determinação de UA em diferentes eletrólitos, utilizando eletrodos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$:

Eletrólito	KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$	PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	Suor artificial	Suor artificial
pH da solução	13,0	7,4	5,0	3,0
Potencial de oxidação (V)	0,0	0,1	0,24	0,26

Embora a voltametria cíclica não seja uma técnica muito sensível para quantificações, esta geralmente é empregada para definir o potencial onde o processo redox do analito ocorre. Por outro lado, a amperometria mostra bom desempenho para quantificação de analitos em concentrações mais baixas. A fim de confirmar os resultados obtidos por voltametria (de que a incorporação das NPs de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ na tinta de grafite foi benéfica para resolver a incompatibilidade do material com o meio ácido/neutro), experimentos de amperometria foram executados (Figura 40A-B) utilizando agora suor artificial (pH = 5,0) como eletrólito suporte. Adições consecutivas de $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ UA foram realizadas na faixa de concentração entre 20 e $170\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, e novamente, observou-se que a proporção de massa de NPs/tinta 50/50% apresentou uma sensibilidade duas vezes maior em comparação com o sensor modificado na proporção 25/75% ($4,05$ vs $1,94\text{ }\mu\text{A L mmol}^{-1}$, respectivamente).

Figura 40. Amperometrias registrados para concentrações crescentes de UA, de 20 a $170\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, em suor artificial (pH = 5,0) como eletrólito no potencial de 0,3 V, usando SPE com (A) 25% em massa e, (B) 50% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$.

Um dos desafios mais relevantes é estabelecer uma condição para evitar a resposta simultânea de interferentes na análise. Assim o desempenho do SPE modificado foi avaliado considerando a presença de possíveis interferentes, usando como eletrólito suor artificial (pH = 5,0) e potencial aplicado 0,3 V vs tinta de Ag/AgCl. Inicialmente o eletrodo foi condicionado com eletrólito no potencial de 0,3V e após a estabilização da linha de base (Figura 41A), a primeira adição de $25\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de UA gerou um incremento de corrente (Figura 41B). Em seguida, os interferentes mais

comuns em suas concentrações típicas foram injetados, ou seja, ácido ascórbico $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, acetaminofeno $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, lactato 5 mmol L^{-1} e glicose $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 41C-F). Como pode ser visto, nenhum desses compostos produziu um aumento na corrente, mostrando que o SPE modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ não apresenta resposta para os principais interferentes dos biofluidos (suor e saliva) em concentrações típicas. Finalmente, repetiu-se mais uma injeção de UA $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (totalizando = $50 \mu\text{mol L}^{-1}$), reproduzindo o aumento anterior de corrente, demonstrando a robustez do eletrodo (Figura 41G).

Figura 41. Amperometrias obtidas para as espécies interferentes no potencial aplicado $0,3 \text{ V}$, utilizando suor artificial ($\text{pH} = 5,0$) com SPE modificado por 50% em massa de NPs e 50% de tinta. (A) Linha base. (B) Primeira adição de UA $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, seguida de injeções de (C) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ácido ascórbico (D) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ acetaminofeno (E) 5 mmol L^{-1} lactato (F) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ glicose. (G) segunda injeção de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de UA.

A quantificação de ácido úrico em amostras biológicas de suor foi realizada a partir do método de adição padrão, onde uma série de amperometrias foram registrados com potencial fixo de $0,3 \text{ V}$ vs tinta de Ag/AgCl (Figura 42). A análise começou registrando o sinal produzido por uma amostra de suor, cuja composição salina serviu de eletrólito. O sinal foi registrado por 60 s , condição onde há significativa estabilização da corrente. A seguir foram realizadas 10 adições de padrão. A extrapolação da reta levou ao conteúdo de ácido úrico na amostra de suor, que foi de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, calculado por extrapolação da curva analítica correspondente $I = (0,0035$

$\times [\text{UA}] + 0,071) \mu\text{A}$ determinada por regressão linear ($R^2 = 0,997$). Esse resultado indica o conteúdo de UA antes da adição padrão, e está próximo da concentração típica de UA no suor esperado para uma pessoa saudável (20 a $25 \mu\text{mol L}^{-1}$) [113].

Figura 42. Amperometrias obtidas para adições padrão de UA (entre as concentrações de 25 a $250 \mu\text{mol L}^{-1}$), usando suor humano como eletrólito e a curva analítica correspondente. A seta indica a linha base (apenas a solução de suor), antes das adições de padrão.

Após o estudo com suor artificial e real, experimentos semelhantes foram realizados para amostras de saliva artificial e real, usando SPE modificado com 50% em massa de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$. Primeiro, a voltametria cíclica foi realizada para adições sucessivas de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de UA na saliva artificial ($\text{pH} = 6,2$), revelando o aparecimento de um pico a $0,27 \text{ V}$ vs tinta de Ag/AgCl (Figura 43A). Após obter resposta linear com saliva artificial, o eletrodo impresso foi testado para análise de saliva humana (Figura 43B). O conteúdo de UA verificado nesta amostra real foi calculado empregando a regressão linear da curva analítica correspondente. A quantificação realizada pelo método de adição de padrão (da amostra em questão) revelou uma concentração de UA de $108 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acordo com a curva analítica $I = (11,2 \times [\text{UA}] + 1,2) \mu\text{A}$. Esse resultado é consistente com a concentração típica de UA na saliva de uma pessoa saudável (100 a $300 \mu\text{mol L}^{-1}$) [114-115]. Foi observado um deslocamento de 50 mV do pico anódico para potenciais mais positivos ao fazer a transição das amostras de saliva artificial para real ($0,27$ a $0,32 \text{ V}$ vs tinta de Ag/AgCl). A razão desta diferença não está clara, talvez em boa parte possa ser atribuída às

diferentes concentrações de cloreto, bem como a alguma espécie fortemente complexante a íons prata, uma vez que o potencial do eletrodo de referência depende da concentração de cloreto na solução e de prata livre na solução. No entanto, essa mudança não promoveu alterações significativas em termos de sensibilidade dos resultados no meio biológico.

Figura 43. Voltamogramas cíclicos registrados para uma série de adições subsequentes da solução padrão UA de 0,2 mmol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, respectivamente em: (A) saliva artificial. (B) saliva humana.

4.4 Eletrodos impressos (SPEs) modificados com α -Ni_{0,9}Ce_{0,1}(OH)₂

Recentemente, eletrodos de FTO modificados com hidróxido duplo na proporção de 80% níquel e 20% cério foram reportados para determinação do fármaco prednisona [68]. O material inicialmente preparado contendo Ce^{III} foi oxidado à Ce^{IV} durante o tratamento térmico (240 °C) dos eletrodos de FTO, conferindo um efeito positivo nas propriedades eletrocatalíticas para oxidação do fármaco no eletrodo modificado. Baseado nesses resultados, novas nanopartículas de hidróxido duplo foram sintetizadas em uma proporção maior de níquel (90% acetato de níquel e 10% acetato de cério(III) - Ce(CH₃CO₂)₃ · H₂O). Neste trabalho, uma temperatura inferior (120 °C) foi aplicada para a secagem da tinta contendo as NPs utilizadas na modificação dos SPEs. Deve ser destacado que a quantidade de NPs necessária para preparar um eletrodo impresso (~1 μL) é bem menor que a quantidade utilizada para

modificar um eletrodo de FTO ($\sim 20 \mu\text{L}$). Assim, uma temperatura menos drástica foi eficiente no preparo dos SPEs modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$.

4.4.1 Difratometria de Raios-X

Os difratogramas das amostras de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ foram obtidos depositando os materiais sobre lamínulas de vidro, que foram secos a vácuo a 80°C . A amostra de $\text{Ni}(\text{OH})_2$ apresentou um pico a $10,56^\circ$ de 2θ que pode ser indexado ao plano (003) característico do material na fase alfa turboestrática (Figura 44). Da mesma forma, o principal pico de difração da amostra de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ a $10,50^\circ$ foi atribuído ao hidróxido duplo lamelar. No entanto, a menor intensidade e largura desse pico fornece indícios de um material menos cristalino e/ou de um material constituído por partículas de menor tamanho, conforme o esperado.

Figura 44. Difratomogramas de raios-X de nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ depositadas em um substrato de lamínulas de vidro.

4.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

O microscópio eletrônico de varredura fornece uma variedade de modos de imagem diferentes, com informações sobre composição elementar e estrutura eletrônica com alta sensibilidade [68]. O tamanho reduzido e a formação de nanopartículas duplas de hidróxido de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ foram confirmadas por SEM (Figura 45A-B), onde o campo brilhante (Figura 45C, elétrons transmitidos) e o campo

escuro (Figura 45D) exibiram contraste semelhante e nenhuma evidência de eventual segregação das fases de Ni(OH)_2 e Ce(OH)_3 . Nas imagens da Figura 45, a constituição nanoestruturada do $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ é apresentada em imagens com diferentes ampliações. As Figuras 45A, C e E consistem em imagens ampliadas 5000 vezes da superfície do SPE, enquanto as Figuras 45B, D e F correspondem à ampliações 30000 vezes das imagens obtidas na superfície do eletrodo.

Antes de qualquer procedimento eletroquímico, imagens de SEM foram obtidas do SPE para verificar sua composição estrutural. Após o SPE ser submetido a 10 ciclos de voltametria entre os potenciais de 0,2 a 0,8 V (vs Ag/AgCl, 50 mV s^{-1}), nos quais o eletrólito utilizado foi PBS (Figuras 45 C-D) e saliva artificial (Figuras 45 E-F), novas imagens foram registradas. Esse experimento revelou que a composição estrutural na superfície do eletrodo foi semelhante para todas as imagens obtidas, confirmando a estabilidade do SPE e a qualidade do seu processo de impressão e preparo.

Figura 45. Imagens de SEM de $\alpha\text{-Ni}_{0.9}\text{Ce}_{0.1}(\text{OH})_2/\text{SPEs}$ (A-B) antes de qualquer procedimento eletroquímico; e após 10 ciclos de voltametria (entre 0,2 a 0,8 V (vs Ag/AgCl, 50 mV s⁻¹) em (C-D) PBS (pH = 7,4) e (E-F) saliva artificial (pH = 6,0).

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Imagens obtidas no Microscópio eletrônico de transmissão (TEM) também foram usadas para estimar o tamanho, a forma e a morfologia das NPs de α -

$\text{Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ depositando as amostras preparadas sobre folhas de óxido de grafeno. Como pode ser observado na figura 46A, foram sintetizadas nanopartículas de 3-5 nm de formato redondo à oval, confirmando o tamanho pequeno e uniforme. Imagens de microscopia eletrônica com alta resolução (HRTEM) indicaram que as NPs tinham um alto grau de cristalinidade, como confirmado pelas franjas de reflexão (Figura 46B) atribuídas ao plano 200 de NiO (JCPDS n° 73-1523) [42]. A possibilidade de conversão de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ em $(\text{NiCe})\text{O}_x$ pelo feixe de elétrons também é perceptível aqui, devido ao aquecimento local e ao alto vácuo na câmara de amostra, gerando NPs de óxido (Figura 45C-D) [63].

Figura 46. Imagens de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$: (A) TEM, (b) HRTEM (C) imagem de campo claro mostrando as NPs (pontos escuros) dispersas na superfície de óxido de grafeno e a mesma imagem de campo escuro (D), onde os NPs aparecem como pontos brilhantes.

4.4.4 Estudos analíticos com os SPEs modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$

Uma vez confirmada a informação estrutural das nanopartículas, o novo sensor modificado foi preparado integrando tinta de grafite (75% em massa) com 25% em massa do hidróxido de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$. Essa mistura foi usada para impressão dos eletrodos de trabalho e contra-eletródo. Na sequência, os eletrodos impressos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ foram aplicados para a determinação do acetaminofeno (AAP) em fluidos biológicos. Sabe-se que sua reação redox envolve um processo de dois elétrons e dois prótons [116] como representada na Figura 47. A resposta eletroquímica do AAP em diferentes meios revela o aparecimento de um pico anódico devido à sua oxidação em N-acetil-p-benzoquinona-imina.

Figura 47. Representação do processo redox faradáico do acetaminofeno, catalisado pelo hidróxido duplo de níquel e cério presente na superfície do SPE [117].

A possibilidade de intercalação de AAP no espaço intercamadas (região interlamelar) do hidróxido lamelar é pouco provável, uma vez que a análise de DRX indica uma distância do plano basal na ordem de 8,4 Å. Consequentemente, novos sítios de interação estão aparentemente sendo criados pela interação da tinta de grafite com as nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$, onde as moléculas de AAP podem interagir concomitantemente, alterando assim seu comportamento eletroquímico. Em outras palavras, a atividade eletroquímica superior reflete uma interação mais seletiva com tais sítios eletrocatalíticos, como esperado para estruturas relativamente abertas formadas pela associação de partículas de pequeno tamanho com o grafite, gerando uma alta densidade de sítios metálicos eletroquimicamente ativos.

Inicialmente, os eletrodos impressos apenas com as tintas condutivas de prata e grafite (sem as nanopartículas), foram testados para determinação de AAP que é o princípio ativo do fármaco paracetamol. Este experimento foi realizado em pHs biológicos, empregando saliva e suor artificial como eletrólitos. O suor geralmente é mais ácido do que a saliva, variando de pH 4,5 - 7,0, enquanto o pH da saliva fica na faixa entre 6,0 a 7,6. Como o pH do suor e da saliva diferem, duas condições (pH = 5,0 para suor e 6,2 para saliva) foram selecionadas para os experimentos eletroanalíticos. As voltametria cíclicas obtidas para o SPE sem modificação não revelaram processo catódico ou anódico, como é observado na Figura 48.

Figura 48. Voltamogramas cíclicos obtidos para os SPEs sem modificação utilizando como eletrólitos: (A) Saliva artificial (pH = 6,0) e (B) Suor artificial (pH = 5,0), a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (vs Ag/AgCl), em adições crescentes de acetaminofeno $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

O desempenho dos sensores eletroquímicos impressos contendo as nanopartículas foi investigado, visando sua aplicação para determinar acetaminofeno na secreção de fluidos humanos, na presença de possíveis interferentes e na faixa linear até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Experimentos realizados exatamente nas mesmas condições que os SPEs sem modificação, resultaram em voltamogramas com picos em torno de 0,3-0,4V para os SPEs modificados, atribuído a oxidação de AAP em suor artificial e saliva (amostras sintéticas). Ambas correntes de pico - de oxidação e redução - foram significativamente maiores para os SPEs modificados e atribuídos à condutividade melhorada, maior área de superfície e propriedades eletrocatalíticas aprimoradas fornecidas pelas NPs de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ incorporadas neles. O potencial de oxidação do acetaminofeno foi 343 mV para suor artificial e 348 mV para saliva artificial. Abaixo, a Figura 49A corresponde às medições no suor artificial (pH 5,0) e a Figura 49B corresponde à saliva artificial (em pH 6,2). Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados no intervalo de 0,0 a 0,6 V, região onde os picos de oxidação e redução estavam bem definidos.

Figura 49. Voltamogramas cíclicos de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ SPE em (A) Suor artificial (pH = 5,0) e (B) Saliva artificial (pH = 6,2), a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrodo de referência Ag/AgCl, e adições de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de [AAP] (até $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). As inserções mostram os gráficos de corrente em função da concentração de AAP. Linha base corresponde ao voltamograma em preto.

Nessas investigações, foi observada que a oxidação é facilitada em valores de pH mais elevados, provavelmente devido à desprotonação mais fácil de AAP ($\text{pK}_a \sim 9,5$), uma vez que o potencial de detecção foi mais baixo à medida que o pH

aumentou, como esperado para o envolvimento de prótons na reação redox (processo de transferência de elétrons acoplado a próton). Entretanto, experimentos em meio de KOH 0,1 mol L⁻¹ (pH = 13) condição onde AAP está totalmente desprotonado, revelaram uma baixa intensidade de corrente para o SPE modificado. O motivo não está claro, mas a perda de corrente observada nesse meio quando comparada a pHs mais baixos pode ser produto do desprendimento do filme ou passivação/envenenamento do eletrodo, provavelmente devido a algum produto gerado na reação eletroquímica. Os voltamogramas obtidos com os eletrodos impressos preparados a partir da tinta contendo $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ são apresentados abaixo. Fica evidente uma menor sensibilidade para acetaminofenol, cujo pico de oxidação nesse pH foi observado em torno de -45 mV (Figura 50).

Figura 50. Voltamogramas cíclicos obtidos para $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ SPE em KOH 0,1 mmol L⁻¹ (pH = 13), a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, eletrodo de referência Ag/AgCl. As inserções mostram os gráficos de corrente em função de adições crescentes de concentração de AAP 0,1 mol L⁻¹. A curva de calibração foi plotada no potencial de -45 mV.

4.4.5 Determinação de acetaminofeno em fluidos biológicos

Os fármacos podem ser eliminados pelo suor em pequenas quantidades, embora a via renal seja a principal via de excreção. A saliva é outro fluido biológico de composição complexa, que possibilita o diagnóstico de doenças, a realização de testes de drogas, entre outros. Assim, amostras biológicas de suor e saliva foram

coletadas de adultos saudáveis e usadas para medições eletroquímicas diretamente, sem nenhum tratamento adicional. Ambas as coletas de fluidos corporais foram realizadas com a concordância de todos os voluntários envolvidos.

A Figura 51 representa um esquema do mecanismo de operação do sensor SPE modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ para a determinação de AAP feita nesse trabalho. Para tanto, 50 μL do biofluido foram transferidos para a superfície do eletrodo e as medidas de voltametria cíclica realizadas para adições sequenciais de uma quantidade conhecida de analito. A concentração de AAP nos fluidos biológicos foi determinada pelo método de adição de padrões, por extrapolação da curva analítica para zero, para determinar a concentração na amostra real.

Figura 51. Esquema descrevendo o funcionamento do $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ SPE para a determinação de AAP em fluidos corporais, como suor e saliva [117]

A detecção seletiva de acetaminofeno é de suma importância no desenvolvimento de qualquer sensor eletroquímico prático e bem-sucedido. Em amostras biológicas, o ácido úrico, lactato, glicose e ácido ascórbico podem coexistir com o acetaminofeno. Nesse sentido, a oxidação eletroquímica de todas essas

espécies biológicas foi avaliada por voltametria cíclica. Após condicionar o α -Ni_{0,9}Ce_{0,1}(OH)₂ SPE, 10 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico foram adicionados, seguido pela adição de 100 mmol L⁻¹ de glicose, adição de 100 mmol L⁻¹ de lactato e 25 mmol L⁻¹ de ácido úrico. Em ambas amostras de suor e saliva, os voltamogramas registrados para cada adição não mostraram aumento da corrente. Na amostra real de suor (Figura 52A) foram realizadas duas adições sequenciais de acetaminofeno 20 mmol L⁻¹, resultando no aparecimento de um processo redox quase reversível proporcional à concentração. Experimento semelhante (Figura 52B) foi realizado para a amostra de saliva artificial, onde apenas as três adições consecutivas de acetaminofeno resultaram no aumento da corrente de resposta. Esses resultados confirmam que o novo SPE proposto (modificado com α -Ni_{0,9}Ce_{0,1}(OH)₂) não sofre a interferência das espécies comumente presentes nos fluidos biológicos nas condições estudadas, sendo adequado para a determinação de acetaminofeno nestas amostras.

Figura 52. Voltamogramas cíclicos registrados ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) para avaliar o efeito de espécies interferentes vs tinta de Ag/AgCl. (A). Suor humano ($\text{pH} = 5,0$) (B) Saliva artificial ($\text{pH} = 6,2$). (a) Linha base em preto, (b) adição de ácido ascórbico em vermelho, (c) adição de glicose em azul claro, (d) adição de lactato em ciano, (e) adição de ácido úrico em rosa magenta e (f-h) adições de acetaminofeno.

A voltametria cíclica obtida para o acetaminofeno determinado diretamente em amostras de suor e saliva é apresentada na Figura 53 e revela a potencialidade do α -Ni_{0,9}Ce_{0,1}(OH)₂ SPE proposto. Utilizando amostras humanas de suor e saliva como eletrólitos, observamos maior potencial de oxidação do que quando comparamos às

soluções artificiais. Embora a sensibilidade no sistema real seja menor (o que sugere eventual adsorção na superfície por outras moléculas presentes nas amostras), ela ainda é bastante satisfatória pois permite fazer a análise diretamente, sem diluição. Ainda, por apresentar composição (e viscosidade) diferente, o coeficiente de difusão é alterado em relação a análise simples em tampão. Além disso, a separação de picos é significativamente maior para as amostras humanas (acima de 340 mV) em comparação com o tampão (inferior a 250 mV), o que significa que a cinética do processo de transferência eletrônica é mais lenta nas amostras com maior complexidade.

Figura 53. Voltamogramas cíclicos registrados para adições de AA 0,1 mmol L⁻¹ ($v = 50$ mV s⁻¹), respectivamente em amostras reais de: (A) Suor. (B) Saliva. As barras de erros foram plotadas baseadas nas medidas de três voltamogramas.

A partir do método da adição de padrões, foram obtidos o LOD e LOQ para o acetaminofeno em amostras reais de saliva e suor, sendo respectivamente 4 e 28 μmol L⁻¹. A sensibilidade diminuiu levemente para essas amostras quando comparadas às artificiais (1,7 e 11,5 μmol L⁻¹, respectivamente, em amostras artificiais de saliva e suor), sugerindo/ reforçando a natureza mais heterogênea das amostras reais (Tabela 8).

Tabela 8. Variáveis e valores analíticos obtidos para a determinação de acetaminofeno por voltametria cíclica em diferentes eletrólitos:

	Saliva Artificial	Suor Artificial	Saliva Humana	Suor Humano
Potencial de detecção (mV)	348	343	365	494
Faixa linear (mmol L⁻¹)	0,1 – 0,9	0,2 – 1,0	0,1 – 1,0	0,1 – 1,0
Sensibilidade (μA / μmol L⁻¹)	0,032	0,034	0,016	0,016
LOD (μmol L⁻¹)	1,7	11,5	4,0	28
LOQ (μmol L⁻¹)	5,2	34,8	13,0	85

Observou-se também um deslocamento de potencial para regiões mais positivas ao aumentar a complexidade das amostras artificiais para as reais. No caso do saliva, o aumento do potencial de detecção foi cerca de 20 mV. Já no suor esse deslocamento foi mais substancial, onde o potencial de oxidação foi de 343 mV na amostra artificial e 494 mV para a amostra real na mesma faixa de concentração. Mesmo havendo esta variação de potencial e decréscimo de sensibilidade, os resultados obtidos habilitam o método proposto a ser aplicado, visto que puderam ser comparados favoravelmente com outros métodos descritos na literatura.

4.4.6 Estudo analítico do acetaminofeno em fluidos biológicos por UV-VIS

A quantificação de paracetamol na saliva também foi realizada com base na espectroscopia UV-VIS (Figura 54) para comparar os resultados eletroquímicos obtidos com o novo SPE modificado. Uma resposta semelhantemente reprodutível e uma relação linear entre absorbância vs concentração de analito foi observada, na faixa de concentração entre $2,9 \times 10^{-5}$ - $7,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Considerando a diluição da saliva em água (1:3), o conteúdo de AAP na amostra real, calculado com base no gráfico da absorbância a 245 nm em cada concentração, foi de 17,6 μmol L⁻¹ (equação: $A = 8,5[AAP] + 0,05$).

Figura 54. Determinação de AAP em uma amostra de saliva diluída utilizando espectrofotometria UV-VIS. A curva de calibração relaciona a absorbância de 245 nm em função da concentração de AAP (de $2,9 \times 10^{-5}$ – $6,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).

A concentração de acetaminofeno encontrada por UV-VIS foi próxima à concentração de AAP na saliva encontrada por meio da determinação eletroquímica ($18,2 \mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando o método de adição padrão (equação da reta: $i = 16,5 [AAP] - 0,3$). Desse modo, esse resultado também reafirma a adequação do novo SPE modificado com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ para determinação de amostras farmacêuticas em fluidos corporais.

4.5 Eletrodos impressos modificados com $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$

Os materiais ativos à base de vanádio têm chamado bastante atenção devido às suas características superiores, como estado de oxidação multivalente e baixo custo [118]. Além disso, a incorporação de íons metálicos na estrutura do hidróxido duplo tem se mostrado como uma opção eficiente para melhorar o desempenho dos eletrodos modificados [73,74]. Nesse sentido, hidróxidos trimetálicos de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ foram sintetizados a partir da metodologia sol-gel na proporção 90% de níquel, 5% cério e 5% vanádio, e utilizados na impressão de SPEs. Baseado no nosso conhecimento, esta é a primeira vez que o método sol-gel foi empregado para obter hidróxidos trimetálicos multifuncionais, sendo a síntese dessa composição

de hidróxido inédita. Os efeitos sinérgicos entre os recém incorporados cátions metálicos e os metais hospedeiros no retículo lamelar foram estudados para o desenvolvimento de nanomateriais eletroativos de alta performance baseados em hidróxido de níquel. A determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em enxaguante bucal também foi demonstrada utilizando o novo SPE associado à técnica BIA e será apresentada na sequência.

4.5.1 Difractometria de Raios-X

O hidróxido trimetálico foi caracterizado inicialmente por DRX para verificar a composição lamelar esperada, representada na Figura 55A. As NPs de $\text{Ni}(\text{OH})_2$ apresentaram pico em $2\theta = 10,68^\circ$ ($8,28 \text{ \AA}$), indexado ao plano (003) e atribuído à fase alfa turboestrática (Figura 55B). De forma semelhante, a presença das reflexões basais (003) no difratograma do $\text{Ni}_{0,9}\text{V}_{0,05}\text{Ce}_{0,05}(\text{OH})_2$ em $2\theta = 10,63^\circ - (8,32 \text{ \AA})$ evidencia a formação da estrutura lamelar, confirmada pela diminuição da intensidade do plano de reflexão (003), onde a aparente menor intensidade e amplitude desse pico caracteriza um material menos cristalino. Esta mudança tem grande potencial para melhorar o desempenho eletroquímico do hidróxido trimetálico em comparação com o $\text{Ni}(\text{OH})_2$ puro, devido a catálise induzida pelos novos átomos. A presença de Ce^{3+} e V^{3+} pode estar associada a queda no grau de cristalinidade, uma vez que estes íons metálicos introduzidos apresentam estados de oxidação elevados e possuem raios maiores, aumentando o grau de desordem na estrutura turboestrática do $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$.

Adicionalmente, a adaptação do método sol-gel também provocou a redução da cristalinidade nos materiais, uma vez que os picos (006), (101) e (110) previstos não aparecem. Na região de 2θ entre 20° e 40° observou-se também o padrão de difração do vidro, uma vez que os difratogramas foram obtidos com as NPs depositadas sobre uma lâmina revestida com FTO. Assim, a obtenção da fase α foi confirmada para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ por DRX, com base na posição do pico basal (003).

Figura 55. (A) Representação da estrutura lamelar esperada para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$.
(B) Difratogramas de raios-X obtidos para o $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ e $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Imagens de TEM foram obtidas para as NPs do hidróxido trimetálico (Figura 56A-B), onde sua forma esférica foi revelada com diâmetro de cerca de 4 nm e sem sinais de aglomeração. A partir do TEM de alta resolução (Figura 56C) foi possível obter informações cristalográficas, e um espaçamento interplanar de 0,21 nm (2,39 Å) para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ a partir da análise das franjas de interferência. Este resultado indica o plano de reflexão (111) do NiO e NiCeO₂. O processo de desidratação do hidróxido trimetálico ocorreu devido ao aquecimento da região causado pelo feixe de elétrons focado na amostra durante a obtenção das imagens, diferenciando-se do resultado esperado que seria a reflexão do plano (003) do Ni(OH)₂.

Em contraste com as imagens TEM, as imagens STEM têm NPs ainda menores em óxido de grafeno, indicando que o aquecimento local também pode induzir a junção das NPs, como confirmado por imagens do campo brilhante (elétrons transmitidos, Figura 56D) e imagens de campo escuro (elétrons espalhados em campo escuro anular de alto ângulo - Figura 56E-F). As imagens de campo claro e de campo escuro indicam que não houve formação de fases distintas, isto é, a formação de Ce(OH)₃ ou VO₂/V₂O₅, sugerindo a formação do hidróxido trimetálico.

Figura 56. (A-B) Imagens de TEM para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$, com aumento do grau de ampliação da esquerda para direita. (C) Imagem de HRTEM mostrando o diâmetro médio da nanopartícula, após a reação de desidroxilação / desidratação induzida pelo feixe de elétrons. (D) Imagem STEM de campo claro mostrando as NPs dispersas na superfície do óxido de grafeno. (E) Mesma imagem STEM obtida em campo escuro. (F) Imagem STEM obtida em campo escuro com uma ampliação maior.

4.5.3 Estudos analíticos realizados para o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE

O objetivo desse trabalho foi explorar as propriedades catalíticas dos metais constituintes deste novo nanomaterial para o preparo de um eletrodo impresso. Aplicações foram realizadas para a detecção eletroquímica melhorada de H_2O_2 encontrado em amostra de enxaguante bucal (comprado numa farmácia local). Os eletrodos impressos modificados com as nanopartículas dos hidróxidos trimetálicos de níquel foram preparados no laboratório de Nanobioeletrônicos da Universidade da Califórnia coordenado pelo Prof. Joseph Wang.

Para a realização destes estudos, inicialmente, o SPE modificado foi submetido a um processo de tratamento eletroquímico em meio de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando

primeiramente +1,4 V por 200s, seguido pelo potencial de -1,0 V por mais 200s [119]. Na literatura, o tratamento químico/eletroquímico com NaOH foi reportado como uma opção simples e rápida para melhorar a resposta de eletrodos modificados. De acordo com os autores, ao realizar esse procedimento, o material não condutivo desprende da superfície dos eletrodos, promovendo uma maior exposição das partículas condutoras e aumentando a transferência eletrônica [120]. Os registros voltamétricos dos eletrodos de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ foram obtidos antes do tratamento eletroquímico com NaOH (linha contínua preta) e após serem submetidos ao protocolo de tratamento (linha vermelha contínua). Baseado nos resultados apresentados na Figura 57, a resposta do SPE modificado aumentou em torno de 30% de corrente para determinação de 15 mmol L⁻¹ de H₂O₂ em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Figura 57. Sobreposição dos voltamogramas obtidos antes (linha preta) e após (linha vermelha) o tratamento eletroquímico com NaOH 0,5 mol L⁻¹ dos $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPEs na presença de 15 mmol L⁻¹ de H₂O₂ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ vs Ag/AgCl) em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Para a determinação de H₂O₂ pela técnica de BIA foram buscados os parâmetros analíticos mais adequados. O primeiro parâmetro avaliado foi o melhor potencial de detecção. Tal potencial foi escolhido através do experimento de voltametria hidrodinâmica associado ao BIA (Figura 58). Nesse experimento, a faixa de potencial entre 0 e -1,0 V foi avaliada. Para cada potencial foram realizadas 4 injeções de H₂O₂ 10 mmol L⁻¹. Como pode ser visto na figura, no potencial -0,8 V foi

alcançada a maior intensidade de corrente e, adicionalmente o desvio padrão mais baixo dentre todos os outros estudados. Sendo assim, esse potencial foi selecionado para as demais investigações.

Figura 58. Voltametria Hidrodinâmica do $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE após ativação eletroquímica com NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para otimização do melhor potencial de trabalho na determinação de H_2O_2 10 mmol L^{-1} . Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Eletrólito: KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Além do melhor potencial de detecção, outros parâmetros que afetam a técnica BIA foram avaliados, tais como velocidade e volume de injeção. A otimização desses dois parâmetros para determinação de $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ utilizando o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE tratado com NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ é apresentada na Figura 59. Baseados nos menores desvios padrões observados e nas maiores intensidades de corrente alcançadas, selecionou-se um volume de $150 \mu\text{L}$ e uma velocidade de injeção $120 \mu\text{L s}^{-1}$ para os estudos seguintes em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 59. Otimização do volume e velocidade de injeção na técnica BIA para determinação de $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ utilizando o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE tratado com $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito: $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Após a seleção dos melhores parâmetros para utilização da técnica BIA, o estudo da faixa linear foi realizado para a redução de H_2O_2 (Figura 60). Esse é o primeiro trabalho relatando sensores modificados com hidróxidos trimetálicos de níquel para determinações em potenciais negativos. Baseado no resultado observado a partir de 6 adições crescentes de H_2O_2 , uma faixa linear até 60 mmol L^{-1} foi obtida, com a correspondente equação da reta $I = -4,9[\text{H}_2\text{O}_2] - 2,2$. Nas condições otimizadas, o desvio padrão relativo (RSD) encontrado a partir de uma triplicata para as concentrações de 5 e 20 mmol L^{-1} foram 7,6 e 5,7% respectivamente, e um baixo LOD de $24 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido.

Figura 60. BIAgramas obtidos em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando o $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE tratado nas condições otimizadas (Potencial aplicado: $-0,8 \text{ V}$; Volume de injeção: $150 \mu\text{L s}^{-1}$). Concentrações de H_2O_2 : A) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, B) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, C) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, D) $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, E) $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, F) $6,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Os gráficos atuais vs $[\text{H}_2\text{O}_2]$ e as linhas de regressão linear são mostrados nas respectivas inserções.

A determinação de H_2O_2 em uma amostra comercial de enxaguante bucal foi realizada empregando os melhores parâmetros selecionados de potencial, volume e velocidade de injeção. Uma concentração de $25,8 \pm 0,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ foi encontrada na amostra, valor muito próximo (25 mmol L^{-1}) ao relatado no rótulo [121]. Adicionalmente, um estudo de adição e recuperação foi realizado utilizando-se a técnica de adição de padrão, em que uma recuperação satisfatória de aproximadamente 98% foi alcançada. A Tabela 9 resume os resultados obtidos.

Tabela 9. Parâmetros analíticos obtidos para determinação de H_2O_2 por BIA-amperometria em amostras de enxaguante bucal utilizando $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,05}\text{V}_{0,05}(\text{OH})_2$ SPE.

Analito	Faixa linear (mmol L ⁻¹)	Sensibilidade ($\mu\text{A mmol}^{-1}\text{ L}$)	LOD* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% RSD (n=5)		R ²
H_2O_2	1-60	$4,9 \pm 0,18$	24,3	7,6**	5,7***	0,992
5 mmol L ⁻¹ ; 20 mmol L ⁻¹						
Amostra	Encontrado (mmol L ⁻¹)	Adicionado (mmol L ⁻¹)	Recuperação (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)		
Enxaguante bucal	$25,8 \pm 0,3$	10,0	$35,0 \pm 2,0$	$97,6 \pm 7,0$		

5. Conclusões

Nanomateriais inéditos de hidróxidos lamelares de níquel (bi- e trimetálicos) foram sintetizados, caracterizados e aplicados para modificação de sensores eletroquímicos usados na determinação de diversos analitos em amostras comerciais e farmacêuticas (hidralazina, acetaminofeno e peróxido de hidrogênio), assim como em fluidos biológicos (ácido úrico). As caracterizações morfológicas e estruturais revelaram a obtenção de hidróxidos homogêneos e ultrapequenos (na ordem de nanômetros), sem agregação das partículas. Os efeitos sinérgicos da adição dos diferentes metais na estrutura dos hidróxidos lamelares de níquel foram avaliados e uma melhor resposta eletrocatalítica foi observada, caracterizada pelo aumento da corrente e antecipação do potencial de resposta.

Os hidróxidos de níquel sintetizados por meio da metodologia sol-gel apresentaram a presença da fase polimórfica alfa, comprovada pelas distâncias interlamelares calculadas a partir das difratometrias de raios-X. A composição nanoestruturada dos hidróxidos preparados foi confirmada através das imagens obtidas por microscopia. A partir das análises térmicas (TG-DTA) foi possível avaliar os processos que ocorreram durante as etapas de aquecimento, bem como conhecer a constituição do produto formado durante a síntese. A análise por ICP-OES e XPS confirmou que as proporções de níquel e zinco presente nos nanomateriais desenvolvidos estavam dentro das faixas esperadas.

A estabilização do $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ através da incorporação cátions metálicos na estrutura turboestrática do mesmo, gerando hidróxidos bi- e trimetálicos melhorou significativamente as propriedades eletroquímicas do nanomaterial. A incorporação de platina, zinco, cério e vanádio em nanopartículas de hidróxido de níquel melhorou as respostas dos eletrodos em termos de linearidade, seletividade e sensibilidade, permitindo trabalhar em uma ampla faixa de concentração. Nanopartículas de níquel e platina foram preparadas, caracterizadas, e sua potencialidade avaliada como material ativo de sensores para determinação amperométrica de hidralazina. A quantificação da Hy em comprimidos de APRL utilizando BIA mostrou-se uma alternativa interessante ao método descrito pela farmacopeia, devido a portabilidade da instrumentação analítica, praticidade e automatização do sistema.

A estratégia de incorporação de 25% em mols de íons Zn(II) em nanopartículas de $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ foi a que conferiu as melhores propriedades eletrocatalíticas entre as proporções de níquel e zinco testada para determinação de ácido úrico em fluidos biológicos. Os SPEs modificados com hidróxido duplo de $\alpha\text{-Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}(\text{OH})_2$ puderam ser utilizados em uma extensa região de pH (3 ao 13), permitindo sua aplicação em meios biológicos como suor e saliva. Nanopartículas de $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{Ce}_{0,1}(\text{OH})_2$ também foram incorporadas em tinta de grafite comercial, e os sensores resultantes foram testados em biofluidos para determinação de acetaminofeno, exibindo resultados com baixos limites de detecção e quantificação, além de uma ampla faixa linear de aplicação quando comparada à espectroscopia UV-VIS.

A incorporação dos íons V^{3+} e Ce^{3+} no $\alpha\text{-Ni(OH)}_2$ turboestrático aumentou sua estabilidade e melhorou suas propriedades eletroquímicas em comparação com NPs de hidróxido de níquel puro. Além disso, a funcionalidade do $\alpha\text{-Ni}_{0,9}\text{V}_{0,05}\text{Ce}_{0,05}(\text{OH})_2$ também foi mostrada para aplicações em sensores amperométricos utilizados no monitoramento do H_2O_2 por BIA-amperometria diretamente em uma amostra real complexa de enxaguante bucal. Os SPEs contendo as nanopartículas de hidróxido lamelares de níquel produziram sensores robustos e sensíveis, que requeriam baixo consumo de reagente e de fácil preparação, empregando como substrato para impressão o polímero PET, uma forma muito favorável em termos de custo-benefício para a produção em larga escala.

A ausência de interferentes foi observada nas amostras reais testadas (suor, saliva, fármacos e enxaguante bucal), demonstrando excelente seletividade para determinação dos analitos investigados, superando um dos maiores desafios de se trabalhar com matrizes complexas, que é a interferência de outras espécies presentes na amostra. A combinação da tinta de grafite com as propriedades das nanopartículas de hidróxido de níquel foi traduzida com sucesso para as SPEs, ampliando sua faixa de aplicação de pH. Esse resultado abre a possibilidade de utilização de uma variedade de hidróxidos duplos lamelares em outros analitos e fluidos biológicos.

6. Perspectivas

A aplicação de hidróxidos duplos lamelares de níquel como sensores ainda precisa ser mais explorada, sendo importante testar novas composições desses hidróxidos. O desenvolvimento de dispositivos analíticos potencialmente vestíveis para análise de amostras de interesse clínico tem um vasto campo de aplicações para ser explorado. Nesse sentido, as propriedades físicas e químicas desses nanomateriais devem ser melhor estabelecidas, de modo a compreender as respostas obtidas e projetar estratégias de detecção mais adequadas. Além disso, os sensores eletroquímicos podem ser desenvolvidos para determinações simultâneas de analitos e de sistemas mais complexos, e em outras amostras clínicas. Investigações adicionais sobre o mecanismo de proteção das NPs ao serem misturadas à tinta, após o preparo dos eletrodos impressos, também precisam ser conduzidas.

Biossensores desenvolvidos na Universidade da Califórnia

7. Dispositivo microfluídico eletroquímico vestível integrado com iontoforese (IP) para monitoramento em fluxo e em tempo real de suor em estado sedentário

7.1. Resumo

O desenvolvimento de biossensores sensíveis e seletivos são de fundamental importância, especialmente devido a demanda de dispositivos portáteis que possam ser usados em qualquer local para o monitoramento em tempo real e não-invasivo de eletrólitos e metabólitos em suor ou saliva, como indicadores do estado de saúde de

um indivíduo. Assim, além dos sensores modificados com hidróxidos bi- e trimetálicos de níquel, a doutoranda também desenvolveu biossensores vestíveis e células biocombustíveis, durante os 14 meses que estagiou na Universidade da Califórnia, e que serão descritos a seguir.

No primeiro projeto que a doutoranda teve oportunidade de participar no laboratório do Prof. Joseph Wang, um biossensor baseado em glucose oxidase foi acoplado dentro de um dispositivo *wearable* flexível para detecção amperométrica de glicose no suor. Neste trabalho a estimulação simultânea do suor através da administração transdérmica (pela aplicação na pele) do fármaco pilocarpina e sua coleta em um dispositivo microfluídico totalmente integrado para análise eletroquímica em tempo real de glicose no suor foi demonstrada, eliminando a necessidade de exercícios. O dispositivo foi desenhado com um canal microfluídico para a coleta e transporte do suor que era estimulado por um sistema iontoforético acoplado. Este dispositivo foi integrado ao sistema de transmissão de dados sem fio em tempo real, abrindo caminho no monitoramento de outros biomarcadores em amostras de suor. A boa correlação entre os níveis de glicose no suor e no sangue foi demonstrada, assim como a extração de glicose de forma não invasiva, sem a necessidade de furar a pele.

Palavras-chave: suor estimulado, glicose no suor, iontoforese, pilocarpina, sensores vestíveis, dispositivo microfluídico.

7.2 Parte experimental

7.2.1. Fabricação do dispositivo microfluídico flexível

Os moldes dos dispositivos foram obtidos empregando um disco de silício por meio de fotolitografia. Uma mistura de proporção de 10:1 a base de polidimetilsiloxano (PDMS) e agente de cura respectivamente foi preparada com um misturador/agitador da marca Thinky AR-1000. O PDMS foi então curado tanto no molde microfluídico quanto em lâminas de vidro de superfície plana a 120 °C por 5 minutos. As camadas planas de PDMS foram unidas com a camada microfluídica de PDMS para fechar os canais (visando evitar perdas de amostra de suor), utilizando um tratamento de plasma de oxigênio por 7 minutos. Os canais microfluídicos tinham largura de 485 µm, altura de 200 µm e comprimento variável de 1–2 cm. As estruturas PDMS resultantes

foram expostas ao ozônio UVO a uma taxa de fluxo de gás de $3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ por 10 min (25°C). Furos de $600 \text{ }\mu\text{m}$ foram feitos em cada poço usando uma haste de corte. Resumidamente, o PDMS foi preparado em moldes produzindo elastômeros sólidos com características de relevo em suas superfícies. A colagem de diferentes peças de PDMS formadas desta maneira permitiu formar canais microfluídicos selados e reservatórios de contenção. Uma camada adesiva fina de dupla face foi usada na superfície inferior do dispositivo para fixá-lo à pele. O dispositivo microfluídico incorpora diferentes multicamadas de PDMS funcionais de cima para baixo. Para evitar o colapso do reservatório, os micropilares (2 mm de altura) foram incorporados ao reservatório para aumentar a rigidez local e o uso de um PDMS rígido de 50 mm para aumentar o módulo de Young das características microfluídicas, aumentando assim a rigidez para os canais. Finalmente, o suor foi conduzido para um canal de saída (200 mm de largura por 300 mm de altura), levando a sua reposição contínua e contrapressão mínima.

7.2.2. Fabricação e modificação química dos biossensores eletroquímicos

Os eletrodos foram impressos com uma impressora semiautomática MMP-SPM (Speedline Technologies, Franklin, MA). Estênceis personalizados desenvolvidos com o software AutoCAD (Autodesk, San Rafael, CA) e produzidos pela Metal Etch Services (San Marcos, CA) foram usados como moldes para os SPEs. O substrato utilizado para impressão do sensor foi um polímero PET (Polietileno tereftalato) flexível. A tinta de Ag/AgCl foi usada na impressão do eletrodo de referência assim como contato elétrico (as conexões da interface eletrônica com o potenciostato) para medida eletroquímica. A tinta condutiva azul da prússia foi usada na impressão dos eletrodos de trabalho e contra-eletrodo por duas camadas de tintas separadas.

A modificação do biossensor ocorreu a partir da mistura de uma solução de glicose oxidase (40 mg / mL) com uma solução de quitosana ($0,5\%$ em peso em ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em uma razão de $1:1 \text{ v/v}$. Posteriormente, $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ desta solução foi transferida para a superfície do eletrodo de trabalho. Na sequência, $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de glutaraldeído (5% em água) foi aplicada na superfície modificada para auxiliar na fixação da enzima. Finalmente, o biossensor de glicose modificado pela enzima GOx foi seco à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por meia-hora.

7.2.3. Fabricação dos eletrodos de iontoforesis

Os eletrodos iontoforéticos foram impressos em uma tela de poliimida com tinta condutora Ag/AgCl. O processo de impressão foi conduzido utilizando uma impressora semiautomática e as folhas impressas de Ag/AgCl foram então curadas a 80 °C durante 10 min. A forma do ânodo foi projetada com três furos baseados no número de entradas microfluídicas para o suor. Eletrodos iontoforéticos foram projetados com o programa AutoCAD (Autodesk, San Rafael, CA) e cortados com uma máquina Cricut Explore Air.

7.2.4. Montagem do dispositivo microfluídico

A parte inferior da microfluídica é composta pelo sensor eletroquímico colado ao restante do dispositivo usando fita adesiva dupla-face 3M. A parte logo acima é constituída por uma camada fina de PDMS com o formato do reservatório da camada microfluídica. O compartimento do meio inclui outra camada microfluídica lisa, colada a camada anterior por um tratamento de ozônio (25°C por 10 min). Três micropilares feitos de PDMS foram cortados em uma forma circular e ligadas à peça microfluídica anterior. Após colados, foi feito um furo em cada um desses micropilares com auxílio de uma agulha de 700 µm para a entrada do suor. O ânodo impresso com tinta condutiva de prata foi então fixado no topo, ao redor dos furos.

7.2.5. Operação do dispositivo de microfluídica com seres humanos

A abordagem de iontoforese (IP) foi usada para fornecer nitrato de pilocarpina ao ânodo em contato com a pele de modo a induzir a secreção de suor. Os eletrodos iontoforéticos (ânodo e cátodo) foram recobertos com duas camadas diferentes, onde o eletrodo anódico foi modificado com hidrogel 4% de agarose e 2% de pilocarpina. O hidrogel de agarose foi preparado dissolvendo a quantidade apropriada de agarose (4% p/v) em água, aquecendo e agitando continuamente a 120 °C. Após sua dissolução completa, o nitrato de pilocarpina foi adicionado à mistura para obter 2% (p/v) de pilocarpina em solução de agarose. A solução foi então resfriada para formar uma camada uniforme de hidrogel sob a pele. Para a área catódica, foi preparado um

criogel de álcool polivinílico (PVA). Primeiro, uma solução de PVA a 5,0% p/v foi preparada em água deionizada por aquecimento da solução a 180 °C e, em seguida, resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento da mistura, ela foi então colocada em um banho de gelo (para alcançar a temperatura ambiente) e o pH foi ajustado para 1,0 pela adição de 5 mol L⁻¹ de uma solução de ácido clorídrico. Posteriormente, uma alíquota de 130 µL de glutaraldeído foi adicionada. A mistura final foi então agitada por 1 min e 500 µL foram vertidos em moldes em forma de moeda (área por moeda = 2,7 cm²) e colocados em freezer -20 °C durante a noite. Os criogéis resultantes foram removidos por imersão do molde em água deionizada. Para remover o excesso de ácido, os criogéis foram mergulhados em solução de nitrato de potássio a 1% por 1 h para posterior aplicação.

O protocolo de iontoforese foi otimizado em termos de geração de volume de suor e resposta da pele à corrente iontoforética. A geração de suor foi alcançada através da administração de pilocarpina na pele com a aplicação de uma densidade de corrente elétrica (~ 0,4 mA/cm²) fluindo do compartimento anódico para o catódico por 10 min. O suor secretado fluiu para dentro dos canais através dos furos localizados nos micropilares, preenchendo o reservatório onde o sensor estava acoplado. O suor armazenado na área do reservatório foi posteriormente utilizado para caracterização eletroquímica.

7.2.6. Monitoramento de glicose em tempo real no corpo

A avaliação epidérmica em seres humanos foi conduzida em conformidade com um protocolo aprovado pelo comitê de ética da Universidade da Califórnia em San Diego. Cinco voluntários saudáveis (sem histórico médico anterior de diabetes) foram recrutados para avaliação corporal da plataforma do sensor antes e após o consumo de alimentos ricos em carboidratos (os indivíduos foram solicitados a chegar ao laboratório em jejum). O dispositivo fluídico IP foi então transferido para o braço dos voluntários, previamente limpo com sabão e compressas de álcool esterilizadas.

O sistema microfluídico foi fixado à pele usando uma fita médica de revestimento duplo 3M com furos de 2 mm alinhados com as entradas de 0,5 mm do dispositivo. Durante a eletroanálise da glicose no suor, os níveis de glicose no sangue antes e após a refeição foram medidos simultaneamente através de um glucosímetro comercial para estabelecer a validação do desempenho do sensor. Posteriormente, a

corrente IP foi aplicada à pele através de eletrodos catódicos e anódicos durante 10 min para promover a geração de suor (no ânodo) sob uma densidade de corrente de $0,4 \text{ mA cm}^{-2}$.

Em seguida, foram realizadas medidas amperométricas aplicando um potencial de $-0,2 \text{ V}$ (vs Ag/ AgCl), após a administração do fármaco pilocarpina. Durante os primeiros 700 a 900 s não foi registrada corrente faradaica, variando de 700 a 900 s, pois o dispositivo microfluídico ainda estava sendo preenchido com suor. Um rápido aumento na corrente foi observado assim que o suor contendo glicose atingiu o reservatório, onde estava acoplado o sensor. As respostas amperométricas de glicose pré / pós-refeição em estado estacionário após 20 min foram tomadas como valores de glicose no suor para posterior correlação. Todos os experimentos no corpo foram realizados com a saída do dispositivo voltada para cima, pois as contribuições das forças da gravidade durante o enchimento do reservatório de detecção foram consideradas insignificantes.

7.3. Resultados e discussão

7.3.1. Princípio do Biossensor Microfluídico Epidérmico Integrado por IP

Um biossensor amperométrico vestível foi fabricado para análise de glicose em suor, combinando iontoforese, transpiração induzida por fármaco e detecção eletroquímica em um único dispositivo microfluídico. Nesse contexto, as camadas microfluídicas poliméricas foram preparadas a partir de um elastômero de silicone (PDMS), que apresentou a melhor correspondência com a textura pele. A região do braço foi selecionada como a área ideal para fixar o biossensor devido à sua estrutura plana, operação confortável, baixa curvatura da pele e alta densidade de glândulas sudoríparas ($108 \text{ glândulas / cm}^2$) sobre ela (Figura 61A, a).

O dispositivo completo é integrado por um sistema iontoforético flexível, que é composto de cátodo (esquerda) e ânodo (direita), e a indução do suor na pele ocorre com o auxílio de gel carregado de pilocarpina no compartimento anódico. A placa eletrônica miniaturizada é acoplada magneticamente aos sensores para obter o sinal eletrônico sem fio sobre o teor de glicose na amostra de suor. Essa placa eletrônica permite que os indivíduos operem o IP e analisem a glicose no suor, tornando o dispositivo útil como um sistema de auto-monitoramento (Figura 61A, b). A resposta amperométrica típica começa com a obtenção de um valor de corrente zero durante

os primeiros minutos após a administração de pilocarpina devido à ausência de suor (Figura 61A, c, i). Um salto na corrente é observado quando o suor (na foto com corante azul) chega ao reservatório, onde está localizado o transdutor (Figura 61A, c, ii). Após alguns segundos o sinal da corrente se estabiliza e a resposta eletroquímica do biossensor na presença da glicose no suor é observada (Figura 61A, c, iii).

O design do dispositivo microfluídico mostrando as camadas de cima para baixo inclui: O ânodo Ag/AgCl impresso em tela, e com pilares PDMS para coleta de suor, o biossensor (Figura 61B). Os recursos microfluídicos do PDMS consiste em 3 entradas alinhadas no local de amostragem, por onde o suor gerado através dos microcanais flui em direção ao reservatório. O biossensor de glicose é localizado na segunda camada de PDMS. O suor (tingido de azul) é direcionado para um canal de saída e é reabastecido continuamente.

Figura 61. A) (a) Representação do dispositivo fluídico com sensor eletroquímico colocado no braço do voluntário. **(b)** Sistema de eletrodos iontoforéticos com a placa eletrônica capaz de realizar transmissão de sinal sem fio (i) cátodo e (ii) ânodo. **(c)** Resposta eletroquímica

típica do dispositivo fluídico: (i) Inicialmente, a corrente zero é medida durante o tempo de aplicação da corrente iontoforética devido à ausência de suor. (ii) Suor em contato com o detector. (iii) Resposta eletroquímica do biossensor na presença de glicose no suor. **B)** Esquema mostrando as camadas do dispositivo de cima para baixo. **C)** Esquema mostrando os compartimentos do ânodo e do cátodo para a administração da pilocarpina e geração de suor. Uma gota do gel de agarose com Pilocarpina é aplicada no topo do ânodo. O suor é gerado e coletado na área de entrada situada nos micropilares do PDMS, o suor coletado flui pelos canais e é detectado na área do reservatório. **(a)** Vista frontal do dispositivo mostrando a direção do fluxo. **(b)** Vista posterior do dispositivo mostrando o ânodo com o eletrodo dourado.

Durante o processo de iontoforese, uma corrente elétrica é aplicada ($\sim 0,4 \text{ mA} / \text{cm}^2$), e a pilocarpina carregada dentro da gota de gel de agarose lançada no topo do eletrodo IP é distribuída por um efeito de eletro-repulsão. O suor é gerado e coletado na área de entrada situada nos pilares do PDMS. O suor coletado flui pelos canais e é detectado na área do reservatório (Figura 61C, parte inferior). A vista frontal do dispositivo mostrando a direção do fluxo (Figura 61C, a) e a parte traseira mostrando o ânodo e o eletrodo dourado pulverizado (Figura 61C, b) também são representadas.

7.3.2. Estudos de Deformação Mecânica de Dispositivo Microfluídico

A estabilidade mecânica do dispositivo microfluídico foi testada sob as diferentes tensões mecânicas que podem ocorrer durante o seu uso fixado ao corpo (Figura 62A). A aplicação de flexão (Figura 62, b), torção (Figura 62A, c) e alongamento do dispositivo (Figura 62A, d) não causou danos significativos na estrutura do PDMS em relação a imagem antes das deformações (Figura 62A, a) indicando uma boa propriedade flexível e extensível do dispositivo. Além disso, esses testes de deformação não induziram nenhuma fratura aparente ou quebra nas peças de detecção impressas, demonstrando a alta resistência mecânica de todo o dispositivo. Os furos nos pilares voltados para cima podem ser claramente observados na Figura 62B, a. O dispositivo microfluídico integrado é fixado na epiderme por um adesivo com três orifícios de 2 mm de diâmetro combinando com as três entradas da camada de PDMS para coleta de suor. Após a aplicação na pele, o dispositivo permanece sem danos na estrutura (Figura 62B, b) e bem aderido durante os testes corporais após a estimulação do suor IP (Figura 62B, c), revelando a estabilidade estrutural de todo o

sistema. O suor gerado no ânodo é eficientemente bombeado e transportado nos canais devido à forte adesão entre os pilares de entrada do suor presentes no dispositivo microfluídico, permitindo pressão suficiente dos poros da epiderme com as aberturas adesivas. Após a remoção do dispositivo da pele, o suor (colorido com corante alimentar azul) preencheu completamente o reservatório do dispositivo (Figura 62B, d). Esses testes demonstraram a resiliência da tensão mecânica do dispositivo, mostrando sua adequação para análise do suor corporal sem obstáculo para o indivíduo.

Figura 62. A) Estudo da resiliência mecânica do dispositivo fluídico IP (a) antes das deformações. (b) Flexão. (c) Alongamento. (d) torção e (e) após deformações. B) Representação mostrando o dispositivo antes da transferência para a pele (a) com as entradas para cima. (b) Após a transferência para a pele e (c) após a estimulação do suor. (d) Dispositivo preenchido removido da pele após a operação.

7.3.3. Otimização do dispositivo microfluídico para extração de suor

O ponto principal deste estudo é otimizar os dispositivos microfluídicos para amostragem de suor sem exercícios no menor tempo de preenchimento possível, bem como incorporar uma modalidade de detecção eletroquímica compatível com o corpo para garantir informações bioanalíticas oportunas com um dispositivo de diagnóstico personalizado. Assim, com o objetivo de obter as melhores condições de operação, parâmetros como densidade de corrente IP, número de micropilares e tempo de aplicação de corrente iontoforética foram examinados. A quantidade de suor gerada foi medida pela adoção de um único modelo microfluídico (Área: 0,368 cm²).

Densidades de corrente variando de 0,1 a 0,5 mA/cm² foram aplicadas no dispositivo, e após o término do tempo de coleta, o volume de suor foi plotado vs as diferentes densidades de corrente utilizadas (Figura 63A, a). O maior volume de suor foi coletado sob uma densidade de corrente de 0,4 mA/cm² sem causar qualquer irritação na pele. Valores mais elevados de densidade de corrente não proporcionaram um aumento significativo no volume e na velocidade que o suor preencheu o reservatório e, portanto, não foram selecionados (Figura 63A, b).

Tendo agora a densidade de corrente ideal, o tempo de corrente iontoforética aplicada para atingir o preenchimento completo de um modelo de 3 micropilares foi estudado. A aplicação de corrente iontoforética por 5 minutos resultou num maior tempo (30 min) necessário para preencher todo o sistema. Por outro lado, a aplicação por 10 e 20 min de corrente resultou num tempo de preenchimento semelhante entre si, sendo 10 min selecionado como o melhor tempo IP (Figura 63B, a). O tempo de preenchimento foi registrado em um único indivíduo através de fotos após 15 min do término do processo, durante os 3 tempos propostos (Figura 63B, b).

Após definir a densidade de corrente ideal como 0,4 mA/cm² e o tempo de duração IP como 10 min, o número de *inlets* (orifícios para entrada do suor) foi investigado. Dispositivos microfluídicos de 2, 3 e 4 entradas foram preparados e testados nas condições já obtidas anteriormente. Os dispositivos com 2 entradas precisaram de cerca 28 min para encher de suor, enquanto 3 e 4 entradas mostraram um tempo de preenchimento próximos (10 min). Assim, o modelo de 3 entradas foi preferido em termos de tempo de fabricação e reprodutibilidade (Figura 63B, c). A Figura 63B, d mostra as fotos comparando o comportamento de enchimento dos três tipos de dispositivo usando o mesmo indivíduo após 10 minutos que a corrente IP foi aplicada.

Figura 63. Otimização de dispositivo microfluídico: A) Otimização de densidade de corrente IP de acordo com a área do eletrodo de $0,368 \text{ cm}^2$: (a) Esquema do sistema usado para medir o volume total de suor gerado após diferentes densidades de corrente iontoforese (IP) aplicadas. (b) Gráfico correspondente ao volume de suor coletado com o dispositivo microfluídico após 5 minutos de IP versus as várias densidades de corrente estudadas. (B) Otimização do tempo IP aplicando a densidade de corrente de $0,4 \text{ mA cm}^{-2}$: (a) Gráfico mostrando o tempo IP vs. tempo de preenchimento do dispositivo com 3 entradas. (b) Testes corporais com dispositivo de 3 entradas após 5 min, 10 min e 20 min de IP. As fotos foram tiradas 15 minutos após o término de cada IP. c) Otimização do número de entradas aplicando a densidade de corrente de $0,4 \text{ mA cm}^{-2}$ e 10 minutos de IP para diferentes números de entradas. Gráfico mostrando o tempo medido para encher o dispositivo para os dispositivos com diferentes números de entradas de suor. (d) Testes corporais com dispositivo de 2, 3 e 4 entradas. As fotos foram tiradas 10 minutos após 10 minutos de durações IP.

7.3.4. Determinação de glicose diretamente no suor humano

Experimentos em tempo real para monitoramento da glicose no suor em transpiração induzida pelo fármaco pilocarpina, baseado no sistema microfluídico epidérmico com iontoforese foram realizados em diferentes voluntários saudáveis. Os níveis de glicose no suor foram medidos a partir de biossensores eletroquímicos baseados em glicose oxidase (GOx) localizados dentro do reservatório do dispositivo microfluídico. Um potencial de - 0,2 V (vs Ag / AgCl) foi aplicado e, a glicose no suor foi monitorada por amperometria a partir da redução do oxigênio produzindo peróxido de hidrogênio e ácido glucônico no eletrodo de trabalho impresso com Azul da Prússia, reação catalisada pela enzima GOx.

Inicialmente, 10 min de uma corrente iontoforética foi aplicada na pele. Após a liberação da pilocarpina dentro da pele, a quantificação da glicose no suor foi realizada por amperometria durante 20 minutos até atingir um estado estacionário. A forma da curva amperométrica observada é apresentada na Figura 64. Os experimentos foram realizados antes da refeição (B.M. – *before meal*) e após a refeição (A.M.– *after meal*) para comparação posterior. O dispositivo microfluídico foi substituído por um novo após o consumo das refeições para realização de um novo experimento de modo a evitar contaminações. Amostras de sangue foram coletadas na mesma região do dedo antes de iniciar a determinação de glicose por amperometria, tanto antes como após as refeições (B.M. e A.M.), de modo a comparar o método eletroquímico com os níveis no sangue reportados pelo glucosímetro.

Figura 64. Linha do tempo explicando o experimento realizado. **A)** O sinal eletroquímico da glicose é obtido após 10 min de iontoforese para estimulação do suor, tanto quando o indivíduo está em jejum como após a ingestão da refeição. **B)** Representação esquemática do princípio de funcionamento do dispositivo microfluídico. O suor foi colorido com tinta azul para melhor visualização. Primeiro, o suor entra no dispositivo por meio de pequenos orifícios nas entradas. Após 10 a 15 min, o suor começa a encher o reservatório. Em seguida, a corrente aumenta devido ao registro do sinal da medição de glicose e estabiliza após 20 min.

Como esperado, respostas de corrente desprezíveis foram observadas durante os primeiros minutos da amperometria, seguido por um ligeiro aumento negativo nos valores de corrente ao longo do tempo. Após atingir 20 min de monitoramento de glicose, a medição de corrente foi interrompida. Os valores de corrente selecionados para comparação foram destacados em uma linha verde pontilhada nas amperometrias. Os valores em jejum e após refeição de corrente (gráfico de barra azul) foram plotados *versus* a glicose sanguínea obtida a partir de um glicosímetro comercial (gráfico de barra vermelha). Uma mudança significativa foi observada após o experimento de consumo alimentar, e no tempo de monitoramento de 20 minutos é possível detectar as variações fisiológicas relacionadas com a glicose no suor (Figura 65). Assim, o sistema otimizado proposto, permitiu que os indivíduos monitorem glicose no suor em atividades sedentárias.

Figura 65. Experimentos no corpo para detecção de glicose no suor, usando o dispositivo microfluídico e aplicando uma corrente constante de $-0,2 \text{ V vs Ag/AgCl}$. As amperometrias foram obtidas para diferentes voluntários antes (B.M.) e depois (A.M.) de uma refeição. No lado direito, um gráfico de barra mostra a correlação obtida entre a corrente gerada para a glicose no suor e os valores de glicose no sangue. Antes e depois da refeição, a glicose no sangue foi medida com um glucosímetro comercial para correlação com a glicose no suor.

7.4 Conclusões

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez a estimulação iontoforética para geração reprodutível de suor sem a necessidade de exercícios físicos, juntamente com plataforma microfluídica para detecção de glicose em tempo real. Nesse sentido, o sensor transdérmico de glicose integra uma operação iontoforética carregada com fármaco estimulador da secreção de suor (pilocarpina) e biossensor amperométrico para oferecer medições rápidas de glicose no suor induzido. A estabilidade mecânica e resiliência do dispositivo microfluídico provou ser eficiente sob várias tensões mecânicas que podem ocorrer durante a operação no corpo, não causando danos significativos na estrutura PDMS, indicando a textura flexível e esticável do dispositivo. Além disso, esses testes de deformação não induziram nenhuma fratura aparente ou quebra nas peças de detecção impressas, demonstrando a alta resistência mecânica e a flexibilidade de todo o dispositivo.

O dispositivo microfluídico epidérmico proposto foi capaz de aumentar a amostragem de suor na pele em tempo controlado e o monitoramento eletroquímico da glicose no suor foi ilustrado com boa correlação para as medições de glicose no sangue. Este novo conceito de dispositivo sem fio e flexível fixado na pele oferece um novo caminho para o monitoramento de diabetes que supera as limitações relacionadas com os testes de glicose existentes. Além disso, poucos trabalhos relacionados ao desenvolvimento de detectores microfluídicos epidérmicos integrado para realizar o monitoramento corporal contínuo estão relatados na literatura. Assim, esse dispositivo microfluídico abre caminho para a saúde personalizada de indivíduos sedentários no que diz respeito ao controle do diabetes mellitus, uma das doenças globais mais comuns na sociedade atual. A análise em tempo real da glicose nesse sistema também pode ser facilmente estendida para outros biomarcadores presentes no suor (metabólitos, eletrólitos, elementos traços, etc.).

8. Células de biocombustíveis enzimáticas baseadas em eletrodos de pasta de carbono hidrofóbico protetor: Coleta de bioenergia epidérmica no suor ácido

8.1. Resumo

A operação de células de biocombustíveis (BFC) epidérmicas é propensa a efeitos de desativação irreversíveis sob mudanças dinâmicas de pH do suor de neutro a ácido. O objetivo aqui foi comparar a performance da pasta de carbono com

eletrodos impressos para investigar a estabilidade da enzima lactato oxidase (LOx) sob as rápidas e irreversíveis variações de pH entre os meios neutros e ácidos. O encapsulamento da enzima dentro de um ânodo de pasta de carbono (CPE) confere um ambiente protetor hidrofóbico e por consequência estabilidade excepcionalmente alta durante flutuações de pH, permitindo que a célula de biocombustível continue coletando a bioenergia de lactato, mesmo após longas exposições a condições ácidas. A capacidade única de recuperação de energia do BFC de pasta de carbono após mudanças dinâmicas de pH é atribuída à ação protetora do ambiente de pasta apolar. Assim, nesse trabalho foi desenvolvida uma célula de biocombustível funcional que pôde gerar energia a partir do suor.

Palavras-chave: células biocombustíveis, pasta de carbono, variações no pH do suor.

8.2. Resultados e discussão

Mudanças dinâmicas no pH do suor de valores próximos a 7 para valores menores que 7 (do meio neutro para ácido e vice-versa), que ocorrem em uma curta janela de tempo (cerca de minutos) podem desativar irreversivelmente BFCs epidérmicas que utilizam suor como meio de análise. Altas concentrações de lactato presentes no suor (desejáveis por gerar alta potência) e que podem ser usadas como combustível, levam a condições mais ácidas, o que prejudicam o desempenho da BFC. No entanto, esse desafio tem sido negligenciado para a operação de BFCs baseados em suor e pouca atenção tem sido dada à influência das flutuações dinâmicas do pH na capacidade de coleta de energia desses dispositivos. Para garantir a saída de energia contínua do dispositivo bioeletrônico, é fundamental manter a coleta de energia altamente estável sob condições de pH que mudam dinamicamente.

Bioeletrônicos de captação de energia, como as células de biocombustíveis variam sua produção de energia com mudanças bruscas de pH e temperatura. Por exemplo, as mudanças dinâmicas no pH do suor de neutro para ácido (pH ~ 4) são bem conhecidas. No entanto, estudos sobre o desempenho de BFC relacionado com tais mudanças no suor ainda não haviam sido reportados. Assim, nesse segundo trabalho foi estudado o efeito das mudanças fisiológicas do pH do suor no desempenho de BFCs epidérmicos. Nesse sentido, duas configurações de célula

biocombustíveis foram propostas (um ânodo de lactato impresso como SPE e um ânodo de CPE), de modo a avaliar qual era mais resistente e possuía melhor desempenho em termos de potência e estabilidade.

Na primeira configuração, o encapsulamento da enzima lactato oxidase foi realizado dentro de um ânodo de CPE, visando conferir proteção hidrofóbica às condições de mudança do pH do suor esperadas durante as operações normais no corpo (variações rápidas e irreversíveis do suor de um meio neutro ao ácido). O ânodo continha na sua composição nanotubos de carbono (CNT), naftoquinona (NQ), óleo mineral e LOx. Já o cátodo foi preparado com CNT, platina *black* e nafion (Figura 66A). Na segunda configuração (SPE), a enzima foi imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho impresso com tinta condutiva azul da prússia.

A reação redox objetivada na BFC preparada foi a oxidação do substrato (lactato) a piruvato (produto) gerando energia (Figura 66B). No cátodo, a reação complementar prevista era de redução da água em oxigênio.

Figura 66. A) (a) Célula a biocombustível de lactato onde o substrato (S) é oxidado ao produto (P) no ânodo e a reação complementar de redução da água em oxigênio acontece no cátodo. Em destaque está apresentada a composição do ânodo e do cátodo. B) Reação redox desejada no ânodo de conversão de lactato em piruvato gerando energia [122].

A capacidade de recuperação do BFC foi demonstrada durante operação prolongada (12 horas) sob uma ampla faixa de pH. Uma solução tampão de fosfato 1 mol L⁻¹ foi usada para tamponar o meio e evitar flutuações de pH devido às diversas adições de ácido láctico (pK_a = 3,86). Variações no pH da solução, correspondentes às mudanças fisiológicas do suor, mostraram que enquanto o SPE apresentou

desativação irreversível em pH 4, o CPE apresentou comportamento reversível após exposto a pHs severos. Além disso, a densidade de potência (PD, do inglês *power density*) do CPE foi estável por mais de 12h em todas as condições estudadas. Este alto desempenho foi alcançado devido à estabilidade aprimorada e ao efeito de memória do pH oferecido pelo ambiente orgânico semelhante ao do CPE. No entanto, em ambos os sistemas, o desempenho do BFC de lactato foi comprometido com a redução do pH.

A Figura 67A representa uma queda nas densidades de potência com máximos 165, 179, 77 e 22 $\mu\text{W cm}^{-2}$ e dos OCVs (potencial de circuito aberto, do inglês *open circuit voltage*) 598, 545, 548 e 505 mV para CPE-BFC em pHs 7,5 (a), 6,5 (b), 5,5 (c) e 4,0 (d), respectivamente (linha vermelha sólida). Uma tendência semelhante é observada em experimentos realizados com o SPE-BFC, cuja densidade de potência para o SPE-BFC foi 165, 131, 81 e 57 $\mu\text{W cm}^{-2}$ e OCVs de 574, 497, 486 e 459 mV, conforme ilustrado na Figura 67 (a-d) (linha azul contínua).

Ao comparar as densidade de potência (PDs) de ambos os sistemas, o CPE não mostrou variação significativa entre pH 7,5 e 6,5 (Figura 67A (e)), enquanto os valores de PD para o SPE diminuíram 50% em pH 5,5. Na Figura 67B (e) um decaimento linear de densidade de potência ocorreu na faixa de pH entre 7,5 a 4,0 para o SPE. Esses resultados demonstram que uma imobilização enzimática mais eficiente e estável acontece no CPE [121].

Figura 67. Gráficos de densidade de potência vs. potencial obtidos para CPE (A) e SPE (B) em pH 7,5 (a), 6,5 (b), 5,5 (c) e 4,0 (d) em PBS 1 mol L⁻¹ (linha preta tracejada) contendo lactato 30 mmol L⁻¹ (linha vermelha sólida). (e) Variação da densidade de potência vs. pH.

Como ambos os sistemas tiveram o mesmo comportamento em diferentes pHs, é seguro assumir que as variações de densidade de potência estão diretamente associadas ao efeito do pH sobre a atividade de LOx. Por outro lado, embora a melhor imobilização enzimática no CPE não tenha impedido a perda de atividade da BFC com o pH, ela teve um impacto drástico no estudo de estabilidade ao longo do tempo.

O desempenho das BFCs em termos de estabilidade é apresentado na Figura 68A ao serem usadas durante 12 h com CPE (em vermelho) e SPE (em azul). O CPE apresentou curvas de potência estáveis durante 12 h em pH 7,5, 6,5 e 5,5, enquanto o SPE apresentou uma rápida diminuição na densidade de potência máxima com o tempo (1-12 h). Essa diminuição é facilmente observada no percentual de PD, correspondente ao desempenho de estabilidade (Figura 68B). Assim, a densidade de potência foi considerada cerca de 100% nos pHs entre 7,5 e 5,5 para a enzima encapsulada na pasta de carbono. Nos eletrodos impressos, a densidade de potência não permaneceu estável ao longo do tempo, especialmente nos pHs 6,5 e 5,5.

Figura 68. A) Curvas de potência para CPE (vermelho) e SPE (azul) nos pH 7,5, 6,5, 5,5. A densidade de potência foi registrada por 12h com intervalo de 60 min em solução tampão de fosfato 1 mol L⁻¹ contendo 30 mmol L⁻¹ de lactato. B) Retenção de energia em % para CPE

(em vermelho) e SPE (em azul) durante 12h de atividade em pH 7,5 (a), 6,5 (b), 5,5 (c). Os dados correspondem ao estudo de estabilidade apresentado em A.

A alta estabilidade observada para a pasta de carbono (pontos vermelhos) em oposição a uma rápida diminuição da densidade de potência máxima para os SPEs (pontos azuis) pode ser atribuída a vários fatores como desnaturação da enzima, imobilização ineficiente da enzima na superfície do eletrodo, e possível lixiviação da enzima e do mediador da superfície do eletrodo [123]. A influência de tais variações pode estar relacionada à metodologia de modificação do SPE (*drop-casting*) com a enzima LOx [122].

O estudo de estabilidade do BFC apresentado nas Figuras 67 e 68 mostrou que as alterações fisiológicas do pH podem resultar na desativação completa dos BFCs. Mudanças no pH do suor de neutro para ácido, ocorrendo em uma janela de minutos, desativaram permanentemente o SPE. Em contrapartida, o CPE foi capaz de recuperar a atividade quando ocorreu a mudança inversa de pH (meio ácido para o neutro), fornecendo energia contínua para o dispositivo bioeletrônico. O sucesso na recuperação do sistema após falha relacionada com exposição de longo tempo a pHs severos foi atribuído ao ambiente hidrofóbico orgânico da pasta de carbono (Figura 69).

O suor é um biofluido levemente ácido com pH na faixa entre 4,0 e 6,8 [123]. Assim, o estudo de reversibilidade dos BFCs foi realizado após manter cada sistema imerso por 1 hora em pH 6,8 e 4,0, alternadamente. Esta operação foi repetida seis vezes de forma que o tempo total de aquisição de dados foi de 6 horas. A Figura 69A e a Figura 69B representam o estudo de reversibilidade da enzima utilizando sistemas CPE e SPE, respectivamente, alternando pH 6,8 e 4,0. Ao contrário do comportamento irreversível do SPE, o CPE exibe um perfil reversível entre as medições em pH 6,8 e 4,0 durante 6 h, ou seja, a segunda curva de potência em pH 6,8 foi semelhante à primeira curva de potência no mesmo pH.

Ao submeter o CPE a pH 6,8 após ter estado em meio com pH 4,0, observou-se que a densidade de potência inicial foi recuperada (Figura 69A(a)), indicando comportamento reversível devido ao efeito "memória de pH". Este fenômeno também foi reportado anteriormente para o biossensor de CPE para determinação de glicose em pHs "agressivos" [122]. Assim, a pasta de carbono preparada para a aplicação como célula a biocombustível demonstrou alta estabilidade em diferentes meios,

coletando a bioenergia do lactato mesmo após exposição prolongada a condições ácidas.

Comparativamente, a atividade enzimática do ânodo SPE foi completamente perdida após a primeira medição em pH 4,0 (Figura 69B). Nesse caso, o efeito “memória de pH” não foi preservado e alterações irreversíveis na estrutura da enzima podem ter ocorrido devido à falta de proteção da biomolécula.

Figura 69. Curvas de densidade de potência obtidas para (A) CPE e (B) SPE em solução de PBS 1 mol L⁻¹ contendo lactato 30 mmol L⁻¹ alternando entre os pHs 6,8 e 4,0 durante 6h (a). Curvas de potência máxima correspondente vs. tempo (b).

8.3 Conclusões

Um bioânodo eficaz à base de pasta de carbono foi desenvolvido com proteção exclusiva contra condições ácidas adversas. Esse comportamento atraente leva à recuperação da atividade LOx e correspondente saída de energia após a exposição a condições de flutuação de pH, incluindo exposições periódicas a meio ácido. A notável estabilidade em condições extremas da matriz CPE contendo a enzima encapsulada foi atribuída ao seu ambiente orgânico hidrofóbico e reflete a correspondente memória de pH em solventes orgânicos não polares. Tal comportamento incomum foi atribuído à retenção de uma fina camada de água fortemente ligada, envolvendo a enzima, na presença de um aglutinante não polar (óleo mineral) do CPE.

8.4 Perspectivas

Os resultados apresentados neste trabalho lançam novas perspectivas sobre o desenvolvimento de BFCs de alto desempenho e biossensores autoalimentados

relacionados. Uma vez que o suor é um biofluido facilmente obtido pois as glândulas sudoríparas estão distribuídas por todo o corpo (cerca de 100 glândulas por cm^2 de pele), o CPE preparado pode ser aplicado para determinação de lactato diretamente no corpo do indivíduo. O planejamento de estudos *on-body* pode revelar condições desafiadoras para a performance do dispositivo considerando que variações de temperatura da pele também interfere no desempenho da enzima LOx.

A geração de suor num potencial dispositivo microfluídico vestível contendo a pasta preparada pode ser promovida tanto por estimulação iontoforética como através de exercícios físicos e aquecimento térmico. A Figura 70 apresenta uma proposta de dispositivo microfluídico vestível contendo a pasta de carbono para futuros testes diretamente na pele do indivíduo. Nesse sentido, as camadas contendo a pasta podem ser preparadas com o polímero PDMS devido suas propriedades (observadas no estudo anterior) de flexibilidade e boa adequação à pele.

Além de glicose e lactato, o suor contém outros metabólitos como ureia, etanol e cortisol, assim como eletrólitos (sódio, potássio, cloreto e amônio), elementos traços (zinco e cobre) e moléculas de extensa cadeia carbônica (proteínas, ácidos nucleicos, neuropeptídeos e citocinas) que podem ser potencialmente estudados. Esses resultados também podem servir como um guia para a futura coleta de energia e biossensorização em outros biofluidos complexos, como saliva e lágrimas.

Figura 70. A) Fotografia da BFC vestível no braço do indivíduo e os passos de fabricação do dispositivo que inclui o empacotamento da pasta nos canais microfluídicos. B) Esquema mostrando a montagem das camadas do dispositivo.

9. Referências bibliográficas

- [1] R.K.A. Amali, H.N.Lim, I. Ibrahim, N.M. Huang, Z. Zainal, S.A.A. Ahmad. Significance of nanomaterials in electrochemical sensors for nitrate detection: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 31 (2021) e00135.
- [2] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman. Chemical sensors definitions and classification. *Pure & Applied Chemistry*, 63(9) (1991) 1247-1250.
- [3] F.G. Nejad, S. Tajik, H. Beitollahi, I. Sheikhshoae. Magnetic nanomaterials based electrochemical (bio)sensors for food analysis. *Talanta*. 228 (2021) 122075.
- [4] P.V.V. Romanholo, C.A. Razzino, P.A.R. Pereira, T.M. Prado, S.A.S. Machado, L.F. Sgobbi. Biomimetic electrochemical sensors: New horizons and challenges in biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 185 (2021) 113242.
- [5] P.K. Kalambate, J. Noiphung, N. Rodthongkum, N. Larpant, P. Thirabowonkitphithan, T. Rojanarata, M. Hasan, Y. Huang, W. Laiwattanapaisal. Nanomaterials-based Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Non-Steroidal anti-inflammatory Drugs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. (2021) 116403.
- [6] P. Kassal, M.D. Steinberg, I.M. Steinberg. Wireless chemical sensors and biosensors: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 266 (2018) 228-245.
- [7] G.M.S. Alves, L.S. Rocha, H.M.V.M. Soares. Multi-element determination of metals and metalloids in waters and wastewaters, at trace concentration level, using electroanalytical stripping methods with environmentally friendly mercury free-electrodes: A review. *Talanta*, 175 (2017) 53–68.
- [8] L.M.C. Ferreira, P.R. Martins, K. Araki, H.H. Toma, L. Angnes, Amperometric Folic Acid Quantification Using a Supramolecular Tetraruthenated Nickel Porphyrin μ -Peroxo-Bridged Matrix Modified Electrode Associated to Batch Injection Analysis. *Electroanalysis*. 27 (2015) 2322-2328.
- [9] A. Sudarvizhi, K. Pandian, O.S. Oluwafemi, S.C.B. Gopinath, Amperometry detection of nitrite in food samples using tetrasulfonated copper phthalocyanine modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 272 (2018) 151-159.
- [10] M.D.F. Alves, R.A.M.D.S. Corrêa, F.S. da Cruz, D.L. Franco, L.F. Ferreira, Electrochemical enzymatic fenitrothion sensor based on a tyrosinase/poly(2 -hydroxybenzamide)-modified graphite electrode. *Analytical Biochemistry*. 553 (2018) 15-23.

- [11] S. Bakhtiari Haft Lang, E. Azizi, J. Arjomandi, D. Nematollahi, A.R. Massah, Fabrication of a novel electrochemical sensor for the determination of water in some organic solvents based on naphthalene conducting polymers. *New Journal of Chemistry*. 42 (2018) 14926-14932.
- [12] G. Zhao, H. Wang, G. Liu. Recent advances in chemically modified electrodes, microfabricated devices and injection systems for the electrochemical detection of heavy metals: A review. *International Journal of Electrochemical Science*. 12(9) (2017) 8622–8641.
- [13] R.N. Goyal, S.P. Singh, S. Chatterjee, S. Bishnoi. Electrochemical investigations of prednisone using fullerene-C60-modified edge plane pyrolytic graphite electrode, *Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry*. 49 (2010) 26.
- [14] Y.R. Wang, P. Hu, Q.L. Liang, G.A. Luo, Y.M. Wang. Application of Carbon Nanotube Modified Electrode in Bioelectroanalysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 36 (2008) 1011-1016.
- [15] A. Radoi, A.C. Obreja, S.A.V. Eremia, A. Bragaru, A. Dinescu, G.L. Radu. *L*-Lactic acid biosensor based on multi-layered graphene. *Journal of Applied Electrochemistry*. 43 (2013) 985-994.
- [16] M.S. Kim, K.B. Kim. A Study on the Phase Transformation of Electrochemically Precipitated Nickel Hydroxides Using an Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Journal of The Electrochemical Society*. 145 (1998) 507.
- [17] P. Salazar, V. Rico, A.R. González-Elipé. Non-enzymatic hydrogen peroxide detection at NiO nanoporous thin film-electrodes prepared by physical vapor deposition at oblique angles. *Electrochimica Acta*. 235 (2017) 534-542.
- [18] M.E. Teixeira, G.C. Sedenho, N.R. Stradiotto. Detection of several carbohydrates using boron-doped diamond electrodes modified with nickel hydroxide nanoparticles. *Analytical Sciences*. 31(8) (2015) 773–780.
- [19] P. Lu, Y. Lei, S. Lu, Q. Wang, Q. Liu, Three-dimensional roselike α -Ni(OH)₂ assembled from nanosheet building blocks for non-enzymatic glucose detection. *Analytica Chimica Acta*. 880 (2015) 42-51.
- [20] P.R. Martins, M.A. Rocha, L. Angnes, H.E. Toma, K. Araki, Highly Sensitive Amperometric Glucose Sensors Based on Nanostructured α -Ni(OH)₂ Electrodes. *Electroanalysis*. 23 (2011) 2541-2548.

- [21] P.R. Martins, A.G.N. Motta, M. Nakamura, K. Araki, L. Angnes. Nanostructured Alpha-Nickel Hydroxide Electrodes for High Performance Hydrogen Peroxide Sensing. *Electroanalysis*. 25 (2013) 2060-2066.
- [22] M. Sajid, N. Baig, K. Alhooshani. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine: Challenges and opportunities. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 118 (2019) 368-385.
- [23] W. Boumya, N. Taoufik, M. Achak, N. Barka. Chemically modified carbon-based electrodes for the determination of paracetamol in drugs and biological samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 11 (2021) 138-154.
- [24] S. Nellaiappan, A.S. Kumar. Selective flow injection analysis of iodate in iodized table salts by riboflavin immobilized multiwalled carbon nanotubes chemically modified electrode. *Electrochimica Acta*. 109 (2013) 59-66.
- [25] B. Singh, F. Laffir, C. Dickinson, T. McCormac, E. Dempsey. Carbon supported cobalt and nickel-based nanomaterials for direct uric acid determination. *Electroanalysis*. 23(1) (2011) 79–89.
- [26] A.C. Pereira, A.S. Santos, L.T. Kubota, Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*. 25(6) (2002) 1012–1021.
- [27] J.V. Maciel, A.M.M. Durigon, M.M. Souza, R.F.N. Quadrado, A.R. Fajardo, D. Dias. Polysaccharides derived from natural sources applied to the development of chemically modified electrodes for environmental applications: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 22 (2019) e00062.
- [28] I.G. Casella, M. Contursi. Electrocatalytic oxidation and flow detection analysis of semicarbazide at based IrOx chemically modified electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 209 (2015) 25-31.
- [29] Y. Si, H.J. Lee. Carbon nanomaterials and metallic nanoparticles-incorporated electrochemical sensors for small metabolites: Detection methodologies and applications. *Current Opinion in Electrochemistry*. 22 (2020) 234-243.
- [30] A. Jouyban, E. Rahimpour. Optical sensors based on silver nanoparticles for determination of pharmaceuticals: An overview of advances in the last decade. *Talanta*. 217 (2020) 121071.
- [31] A.K.S. Kumar, Y. Zhang, D. Li, R.G. Compton. A minireview: How reliable is the drop casting technique? *Electrochemistry Communications*. 121 (2020) 106867.

- [32] F.C. Walsh, S. Wang, N. Zhou. The electrodeposition of composite coatings: Diversity, applications and challenges. *Current Opinion in Electrochemistry*. 20 (2020) 8-19.
- [33] Y. Fang, D. Wang, X. Lv, X. Xu, H. Zhou, P. Liu, B. Cui, L. Wang. Simultaneous electrochemical determination of nitrophenol isomers Based on spirofluorene-based microporous polymer film modified electrodes through one-step electropolymerization strategy. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 333 (2021) 129568.
- [34] C. Núñez, V. Arancibia, J.J. Triviño. A new strategy for the modification of a carbon paste electrode with carrageenan hydrogel for a sensitive and selective determination of arsenic in natural waters. *Talanta*. 187 (2018) 259-264.
- [35] C.M. Li, W. Hu, Electroanalysis in micro- and nano-scales. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 688 (2013) 20–31.
- [36] Y.B. Hahn, R. Ahmad, N. Tripathy. Chemical and biological sensors based on metal oxide nanostructures. *Chemical Communications*. 48(84) (2012) 10369.
- [37] R. Kaur, A. Marwaha, V.A. Chhabra, K.H. Kim, S.K. Tripathi. Recent developments on functional nanomaterial-based electrodes for microbial fuel cells. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 119 (2020) 109551.
- [38] A.S. Deshpande, W. Muraoka, S. Andreescu. Electrochemical sensors for oxidative stress monitoring. *Current Opinion in Electrochemistry*. (2021) 100809.
- [39] A.G.M. Ferrari, S.J. Rowley-Neale, C.E. Banks. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open*. 3 (2021) 100032.
- [40] A.L. Squissato, E.S. Almeida, S.G. Silva, E.M. Richter, A.D. Batista, Rodrigo A.A. Munoz. Screen-printed electrodes for quality control of liquid (Bio)fuels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 108 (2018) 210-220.
- [41] H.M. Mohamed. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 82 (2016) 1-11.
- [42] N.F.B. Azeredo, M.S.F. Santos, J.R. Sempionatto, L. Angnes. Screen-Printed Technologies Combined with Injection Analysis Techniques: Moving from Benchtop to Everywhere. *Submetido ao Analytical Chemistry* (2021).
- [43] L. Rojas, L. Molero, R.A. Tapia, R. del Rio, M.A. del Valle, M. Antilén, F. Armijo. Electrochemistry behavior of endogenous thiols on fluorine doped tin oxide electrodes. *Electrochimica Acta*. 56 (2011) 8711-8717.
- [44] C. Ramírez, M.A. del Valle, M. Isaacs, F. Armijo. Electrochemical oxidation of catecholamines on fluorine-doped SnO₂ substrates. Square-wave voltammetric method

for methyl dopa determination in pharmaceutical dosage forms. *Electrochimica Acta*. 199 (2016) 227-233.

[45] W. Boumya, N. Taoufik, M. Achak, N. Barka. Chemically modified carbon-based electrodes for the determination of paracetamol in drugs and biological samples. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 11(2) (2021) 138-154.

[46] D.S. Hall, D.J. Lockwood, C. Bock, B.R. MacDougall. Nickel hydroxides and related materials: a review of their structures, synthesis and properties. *Proceedings of the Royal Society A*. 471 (2015) 20140792.

[47] P.V. Kamath, G.N. Subbanna. Electroless nickel hydroxide: synthesis and characterization. *Journal of Applied Electrochemistry*. 22 (1992) 478.

[48] M.A. Rocha, F.J. Anaissi, H.E. Toma, K. Araki, H. Winnischofer. Preparation and characterization of colloidal Ni(OH)_2 /bentonite composites. *Materials Research Bulletin*. 44 (2009) 970-976.

[49] L. Kong, H. Tang, X. Wang, Y. Lei, B. Li, K. Chang, Z. Chang. Study on the in situ sulfidation and electrochemical performance of spherical nickel hydroxide. *International Journal of Hydrogen Energy*. 46(58) (2021) 30079-30089.

[50] P.O. Rossini, A.L. Correa, N.F.B. Azeredo, J.M. Gonçalves, F.S. Felix, K. Araki, L. Angnes. Ni-based double hydroxides as electrocatalysts in chemical sensors: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 126 (2020) 115859.

[51] P.R. Martins, A.L.A. Parussulo, S.H. Toma, M.A. Rocha, H.E. Toma, Koiti Araki. Highly stabilized $\alpha\text{-NiCo(OH)}_2$ nanomaterials for high performance device application. *Journal of Power Sources*. 218 (2012) 1-4.

[52] J.J. Bravo-Suárez, E.A.P. Mozoll, S.T. Oyama. Models for the estimation of thermodynamic properties of layered double hydroxides: application to the study of their anion exchange characteristics. *Química Nova*. 27(4) (2004) 574-581.

[53] M.A. Rocha, H. Winnischofer, K. Araki, F.J. Anaissi, H.E. Toma. A New Insight on the Preparation of Stabilized α -Nickel Hydroxide Nanoparticles. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*. 11 (2011) 3985.

[54] C. Miao, Y. Zhu, L. Huang, T. Zhao. The relationship between structural stability and electrochemical performance of multi-element doped α nickel hydroxide. *Journal of Power Sources*. 274 (2015) 186-193.

- [55] C. Nethravathi, N. Ravishankar, C. Shivakumara, Michael Rajamathi. Nanocomposites of α -hydroxides of nickel and cobalt by delamination and co-stacking: Enhanced stability of α -motifs in alkaline medium and electrochemical behavior. *Journal of Power Sources*. 172(2) (2007) 970-974.
- [56] P. Samanta, S. Ghosh, N.C. Murmu, T. Kuila. Effect of redox additive in aqueous electrolyte on the high specific capacitance of cation incorporated $\text{MnCo}_2\text{O}_4@\text{Ni}(\text{OH})_2$ electrode materials for flexible symmetric supercapacitor. *Composites Part B: Engineering*. 215 (2021) 108755.
- [57] S. Yadav, K. Shrivastava, P.K. Bajpai. Role of precursors in controlling the size, shape and morphology in the synthesis of copper sulfide nanoparticles and their application for fluorescence detection. *Journal of Alloys and Compounds*. 772 (2019) 579-592.
- [58] Y. Miao, L. Ouyang, S. Zhou, L. Xu, Z. Yang, M. Xiao, R. Ouyang. Electrocatalysis and electroanalysis of nickel, its oxides, hydroxides and oxyhydroxides toward small molecules. *Biosensors and Bioelectronics*. 53 (2014) 428-439.
- [59] M.E. Folquer, J.R. Vilche, A.J. Arvia. Electrochemical response of co-precipitated and layer-by-layer precipitated hydrous nickel hydroxide and hydrous cobalt hydroxide on platinum in alkaline solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 112 (1984) 235-253.
- [60] D.F. Pickett, J.T. Maloy. Microelectrode Studies of Electrochemically Co-precipitated Cobalt Hydroxide in Nickel Hydroxide Electrodes. *Journal of the Electrochemical Society*. 125 (1978) 1026-1032.
- [61] S.I. Córdoba, R.E. Carbonio, M.L. Teijelo, V.A. Macagno. The effect of iron hydroxide on nickelous hydroxide electrodes with emphasis on the oxygen evolution reaction. *Electrochimica Acta*. 32 (1987) 749-755.
- [62] B. Ballarin, R. Seeber, D. Tonelli, A. Vaccari. Electrocatalytic properties of nickel(II) hydrotalcite-type anionic clay: application to methanol and ethanol oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 463 (1999) 123-127.
- [63] B. Ballarin, R. Seeber, D. Tonelli, C. Zanardi. Anionic Clay Modified Electrode for Detection of Alcohols. An Electrocatalytic Amperometric Sensor. *Electroanalysis*. 12 (2000) 434-441.
- [64] E. Scavetta, M. Berrettoni, R. Seeber, D. Tonelli. [Ni/Al-Cl]-based hydrotalcite electrodes as amperometric sensors: preparation and electrochemical study *Electrochimica Acta*. 46 (2001) 2681-2692.

- [65] E. Scavetta, M. Berrettoni, M. Giorgetti, D. Tonelli. Electrochemical characterisation of Ni/Al-X hydrotalcites and their electrocatalytic behaviour *Electrochim. Acta.* 47 (2002) 2451–2461.
- [66] B. Ballarin, M. Berrettoni, I. Carpani, E. Scavetta, D. Tonelli. Electrodes modified with an electrosynthesised Ni/Al hydrotalcite as amperometric sensors in flow systems. *Analytica Chimica Acta.* 538 (2005) 219–224.
- [67] J. Janata, *Principles of Chemical Sensors*, 2nd ed. New York: Springer, 2009.
- [68] P.R. Martins, L.M.C. Ferreira, K. Araki, L. Angnes. Influence of cobalt content on nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes for electrocatalytic oxidation of isoniazid. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 192 (2014) 601-606.
- [69] J.M. Gonçalves, R.R. Guimarães, B.B.N.S. Brandão, L.P.H. Saravia, P.O. Rossini, C.V. Nunes Jr, J.S. Bernardes, M. Bertotti, L. Angnes, K. Araki. Nanostructured Alpha-NiCe Mixed Hydroxide for Highly Sensitive Amperometric Prednisone Sensors. *Electrochimica Acta.* 247 (2017) 30-40.
- [70] A.L. Correa, J.M. Gonçalves, P.O. Rossini, J.S. Bernardes, C.A. Neves, K. Araki, L. Angnes. Fast and reliable BIA/amperometric quantification of acetylcysteine using a nanostructured double hydroxide sensor. *Talanta.* 186 (2018) 354-361.
- [71] N.I. Chandrasekaran, H. Muthukumar, A.D. Sekar, M. Manickam. Hollow nickel-aluminium-manganese layered triple hydroxide nanospheres with tunable architecture for supercapacitor application. *Materials Chemistry and Physics.* 195 (2017) 247-258.
- [72] S.I. Cordoba, M.L. Teijelo, V.A. Macagno. Voltammetric behaviour of ternary mixtures of Ni, Mn and Fe hydroxides in relation to the oxygen evolution reaction. *Electrochimica Acta.* 32 (1987) 1783–1786.
- [73] S. Samuei, J. Fakkar, Z. Rezvani, A. Shomali, B. Habibi. Synthesis and characterization of graphene quantum dots/CoNiAl-layered double-hydroxide nanocomposite: Application as a glucose sensor. *Analytical Biochemistry.* 521 (2017) 31-39.
- [74] N.I. Chandrasekaran, M. Matheswaran. A sensitive and selective non-enzymatic glucose sensor with hollow Ni-Al-Mn layered triple hydroxide nanocomposites modified Ni foam. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 288 (2019) 188-194.
- [75] J. Wang, *Analytical electrochemistry*. Wiley-VCH, 2006.
- [76] A. Ghanam, H. Mohammadi, A. Amine, N. Haddour, F. Buret. *Chemical Sensors: Electrochemical Sensors; Voltammetry/Amperometry. Reference Module in Biomedical Sciences.* 2021

- [77] J. Wang, H. Zeng. Recent advances in electrochemical techniques for characterizing surface properties of minerals. *Advances in Colloid and Interface Science*. 288 (2021) 102346.
- [78] B. Sun, E.J. Berg. Electrochemical and Chemical Modifications of Electrode Surfaces and Interphases for Li-Ion Batteries. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry. Surface Science and Electrochemistry*. (2018) 680-693.
- [79] R.J. Forster, L.R. Cumba. Voltammetry/Cyclic Voltammetry of Organic Compounds. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. (2019) 197-208.
- [80] A. Amine, H. Mohammadi. Amperometry. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. (2019) 85-98.
- [81] V.N. Nikitina, E.D. Maksimova, M.D. Zavolskova, A.A. Karyakin. Flow injection amperometry as an alternative to potentiometry for solid contact ion-selective membrane-based electrodes. *Electrochimica Acta*. 377 (2021) 138074.
- [82] J. Wang, Z. Taha. Batch injection analysis. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1053.
- [83] D.P. Rocha, R.M. Cardoso, T.F. Tormin, W.R. Araujo, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, L. Angnes. Batch-injection Analysis Better than ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On-site Applications. *Electroanalysis*. 30 (2018) 1386–1399.
- [84] L. Chen, J. Wang, L. Angnes. Batch injection analysis with the rotating disk electrode. *Electroanalysis*. 3(8) (1991) 773–76.
- [85] N.F.B. Azeredo, P.O. Rossini, J.M. Gonçalves, G.L. Assis, K. Araki, L. Angnes. Nanostructured mixed Ni/Pt hydroxides electrodes for BIA-amperometry determination of hydralazine. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 95 (2019) 475-480.
- [86] M.S.M. Quintino, L. Angnes. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. *Electroanalysis*. 16(7) (2004) 513–523.
- [87] G.A.C. Ribeiro, C.Q. Rocha, A.A. Tanaka, I.S. Silva. A Fast, Direct, and Sensitive Analysis Method for Catechin Determination in Green Tea by Batch Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry (BIA-MPA). *Analytical Methods* 10 (2018) 2034–40.
- [88] A.A. Dias, T.M.G. Cardoso, R.M. Cardoso, L.C. Duarte, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, W.K.T. Coltro. Paper-Based Enzymatic Reactors for Batch Injection Analysis of

Glucose on 3D Printed Cell Coupled with Amperometric Detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 226 (2016) 196–203.

[89] S.S. Badawy, A.F. Youssef, A.A. Mutair. Construction and performance characterization of ion-selective electrodes for potentiometric determination of phenyl propanolamine hydrochloride applying batch and flow injection analysis techniques. *Analytica Chimica Acta*. 511 (2004) 207–214.

[90] D. Diamond, J. Lu, Q. Chen, J. Wang. Multicomponent batch-injection analysis using an array of ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 281(3) (1993) 629–635.

[91] P.F. Pereira, W.P. Silva, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter. Fast and Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim Using Batch Injection Analysis with Amperometric Detection and Boron-Doped Diamond Electrode. *Química Nova* 38(5) (2015) 663–68.

[92] D.T. Gimenes, M.C. Marra, J.M. Freitas, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter. Simultaneous Determination of Captopril and Hydrochlorothiazide on Boron-Doped Diamond Electrode by Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* 212 (2015) 411–18.

[93] J. Wang, G.D. Rayson, Z. Taha. Batch Injection Analysis Using Fiber-Optic Fluorometric Detection. *Applied Spectroscopy*. 46(1) (1992) 107–110.

[94] P. Thavarungkul, P. Suppapitnarm, P. Kanatharana, B. Mattiasson. Batch Injection Analysis for the Determination of Sucrose in Sugar Cane Juice Using Immobilized Invertase and Thermometric Detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 14 (1999) 19–25.

[95] J. Wang, L. Angnes. Batch Injection Spectroscopy. *Analytical Letters*. 26 (1993) 2329–2339.

[96] R.M. Dornellas, R.A.A. Munoz, R.Q. Aucelio. Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: Square-wave voltammetry versus BIA-multiple pulse amperometry. *Microchemical Journal*. 123 (2015) 1–8.

[97] G. Greczynski, L. Hultman. X-ray photoelectron spectroscopy: Towards reliable binding energy referencing. *Progress in Materials Science*. 107 (2020) 100591.

[98] C.J. Harvey, R.F. LeBouf, A.B. Stefaniak. Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use. *Toxicology in Vitro*. 24(6) (2010) 1790–1796.

- [99] J. Kim, S.Imani, W.R. Araujo, J. Warchall, G.V. Ramírez, T.R.L.C. Paixão, P.P. Mercier, J. Wang. Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics. *Biosensors and Bioelectronics*. 74 (2015) 1061-1068.
- [100] M.S.M. Quintino, K. Araki, H.E. Toma, L. Angnes. Batch Injection Analysis Utilizing Modified Electrodes with Tetra-ruthenated Porphyrin Films for Acetaminophen Quantification. *Electroanalysis*. 14(23) (2002) 1629-1634.
- [101] H. Chen, J.M. Wang, T. Pan, H.M. Xiao, J.Q. Zhang, C.N. Cao. Effects of co-precipitated zinc on the structure and electrochemical performance of Ni/Al-layered double hydroxide. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(5) (2002) 489-496.
- [102] M. Dixit, P.V. Kamath, J. Gopalakrishnan. Zinc-substituted α -nickel hydroxide as an electrode material for alkaline secondary cells. *Journal of The Electrochemical Society*. 146 (1999) 79–82.
- [103] H. Chen, J.M. Wang, Y.L. Zhao, J.Q. Zhang, C.N. Cao. Electrochemical performance of Zn-substituted $\text{Ni}(\text{OH})_2$ for alkaline rechargeable batteries. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 9 (2005) 421–428.
- [104] P. Ren, H. Fan, X. Wang. Electrospun nanofibers of $\text{ZnO}/\text{BaTiO}_3$ hetero-structures with enhanced photocatalytic activity. *Catalysis Communications*. 25 (2012) 32-35.
- [105] A. Hezam, K. Namratha, Q.A. Drmash, Z.H. Yamani, K. Byrappa. Synthesis of heterostructured $\text{Bi}_2\text{O}_3\text{--CeO}_2\text{--ZnO}$ photocatalyst with enhanced sunlight photocatalytic activity. *Ceramics International*. 43(6) (2017) 5292-5301.
- [106] P. Kassal, J. Kim, R. Kumar, W.R.Araujo, I.M. Steinberg, M.D. Steinberg, J. Wang. Smart bandage with wireless connectivity for uric acid biosensing as an indicator of wound status. *Electrochemistry Communications*. 56 (2015) 6–10.
- [107] Y. Yang, Y. Song, X. Bo, J. Min, O.S. Pak, L. Zhu, M. Wang, J. Tu, A. Kogan, H. Zhang, T.K. Hsiai, Z. Li, W. Gao. A laser-engraved wearable sensor for sensitive detection of uric acid and tyrosine in sweat. *Nature Biotechnology*. 38 (2020) 217–224.
- [108] K. Wang, C. Wu, F. Wang, M. Liao, G. Jiang. Bimetallic nanoparticles decorated hollow nanoporous carbon framework as nanozyme biosensor for highly sensitive electrochemical sensing of uric acid. *Biosensors and Bioelectronics*. 150 (2020) 111869.
- [109] K. Ngamchuea, C.B. McAuley, R.G. Compton. Understanding electroanalytical measurements in authentic human saliva leading to the detection of salivary uric acid. *Sensors Actuators B: Chemical*. 262 (2018) 404–410.

- [110] Y. Guan, Q. Chu, J. Ye. Determination of uric acid in human saliva by capillary electrophoresis with electrochemical detection: potential application in fast diagnosis of gout. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 380 (2004) 913–917.
- [111] M. Mori, T. Yamamoto, M. Kaseda, S. Yamada, H. Itabashi. Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of back-ground electrolyte. *Journal of chromatography. B: Biomedical applications*. 887–888 (2012) 1–7.
- [112] N.F.B. Azeredo, J.M. Gonçalves, P.O. Rossini, K. Araki, J. Wang, L. Angnes. Uric acid sensing in real biological samples using alpha-nickel-zinc hydroxide. *Microchimica Acta*. 187 (2020) 389.
- [113] C.T. Huang, M.L. Chen, L.L. Huang, I.F. Mao. Uric Acid and Urea in Human Sweat. *Chinese Journal of Physiology*. 45(3) (2002) 109-115.
- [114] M. Soukup, I. Biesiada, A. Henderson, B. Idowu, D. Rodeback, L. Ridpath, E.G. Bridges, A.M. Nazar, K.G. Bridges. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 4:14 (2012).
- [115] K. Shibasaki, M. Kimura, R. Ikarashi, A. Yamaguchi, T. Watanabe. Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia. *Metabolomics*. 8(3) (2012) 484-491.
- [116] B. Mahmoud, M. Khairy, F. Rashwan, C. Banks. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and isoniazid (Hepatotoxicity-Related drugs) utilizing bismuth oxide nanorod modified screen-Printed electrochemical sensing platforms. *Analytical Chemistry*. 89 (2017) 2170-2178.
- [117] N.F.B. Azeredo, J.M. Gonçalves, I.S. Lima, K. Araki, J. Wang, L. Angnes. Screen-printed nickel-cerium hydroxide sensor for acetaminophen determination in body fluids. *ChemElectroChem*. 8 (2021) 2505-2511.
- [118] J.M. Gonçalves, P.R. Martins, K. Araki. L. Angnes. Recent progress in water splitting and hybrid supercapacitors based on nickel-vanadium layered double hydroxides. *Journal of Energy Chemistry*. 57 (2021) 496-515.
- [119] D.P. Rocha, André L. Squissato, Sarah M. da Silva, Eduardo M. Richter, Rodrigo A.A. Munoz. *Electrochimica Acta*. 335 (2020) 135688.
- [120] D.P. Rocha, A.L. Squissato, S.M. Silva, E.M. Richter, R.A.A. Munoz. Improved electrochemical detection of metals in biological samples using 3D-printed electrode: Chemical/electrochemical treatment exposes carbon-black conductive sites. *Electrochimica Acta*. 335 (2020) 135688.

- [121] V. Katic, P.L. Santos, M.F. Santos, B.M. Pires, H.C. Loureiro, A.P. Lima, J.C.M. Queiroz, R. Landers, R.A.A. Muñoz, J.A. Bonacin. 3D Printed Graphene Electrodes Modified with Prussian Blue: Emerging Electrochemical Sensing Platform for Peroxide Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 11(38) (2019) 35068–35078.
- [122] J.R. Sempionatto, P.A.R. Pereira, N.F.B. Azeredo, A.N.L. Silva, L. Angnes, J. Wang. Enzymatic Biofuel Cells based on Protective Hydrophobic Carbon Paste Electrodes: Towards Epidermal Bio-energy Harvesting in the Acidic Sweat Environment. *Chemical Communications* 56(13) (2020) 2004-2007.
- [123] W.J. Guan, Y. Li, Y.Q. Chen, X.B. Zhang, G.Q. Hu. Glucose biosensor based on multi-wall carbon nanotubes and screen printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 21(3) (2005) 508-512.

Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome: Nathália Florencia Barros Azeredo

Data de Nascimento: 2 de novembro de 1991

Naturalidade: Belo Horizonte – Minas Gerais

Educação

Técnico Profissionalizante: Técnico em Química pelo Instituto Federal Fluminense.

Ensino superior: Licenciada em Química pela Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2009-2013.

Mestrado: Mestrado em Ciências Naturais pela Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2014-2015.

Monitorias

Instituição: Universidade de São Paulo - USP.

Período: 1º Semestre de 2016

Disciplina: Química de Coordenação (QFL1332).

Público alvo: Engenharia Química e de Materiais (diurno).

Instituição: Universidade de São Paulo - USP.

Período: 2º Semestre de 2016

Disciplina: Química Geral II (QFL0605).

Público alvo: Licenciatura em Física (noturno).

Instituição: Universidade de São Paulo - USP.

Período: 1º Semestre de 2017

Disciplina: Química Analítica III (QFL1313).

Público alvo: Licenciatura em Química (noturno).

Estágios e Experiências de Trabalho

Instituição: Laureate International Universities

Período: Março de 2021 – Em andamento

Função exercida: Professora de Química na modalidade EAD.

Instituição: University of California in San Diego

Período: Setembro/2018 – Dezembro/2019

Função exercida: Estágio no laboratório de Nanobioeletrônicos desenvolvendo dispositivos vestíveis para detecção de glicose e lactato no suor.

Instituição: University of La Verne

Período: Janeiro/2011 – Julho/2011

Função exercida: Visitas e interações com empresas responsáveis pela gestão da qualidade do ar/água e centros de reciclagem.

Ocupação Durante o Período do Doutorado

1. Bolsista de Doutorado no País (Capes-Proex) – (88882.328248/2018-01)

Duração: 40 meses.

2. Bolsista de Doutorado Sanduíche (Capes-PDSE) – (88881.186873/2018-01)

Duração: 12 meses.

3. Bolsista de Capacitação no Exterior (Capes-Print) – (88887.370045/2019-00)

Duração: 2 meses.

Artigos Científicos

1. **N.F.B. Azeredo**, É.S. Bull, J.A.L.C. Resende, A. Horn, C.F. Horn. Crystal Structure and Behavior in Solution of $[\text{Cu}(\text{HBPA})_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [HBPA = (2-hydroxybenzyl-2-pyridylmethyl)amine]. Journal of Chemical Crystallography. 45 (2015) 476-483.

2. C.F. Horn, A. Horn, B.F. Lopes, É.S. Bull, **N.F.B. Azeredo**, M.M. Kanashiro, F.V. Borges, A.J. Bortoluzzi, B. Szpoganicz, A.B. Pires, R.W.A. Franco, J.C.A. Almeida, L.L.F. Maciel, J.A.L.C. Resende, G. Schenk. Induction of apoptosis in leukemia cell

lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 153 (2015) 68-87.

3. L.J.H. Borges, É.S. Bull, C. Fernandes, A. Horn, **N.F.B. Azeredo**, J.A.L.C. Resende, W.R. Freitas, E.C.Q. Carvalho, L.S. Lemos, H. Jerdy, M.M. Kanashiro. In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 123 (2016) 128-140.

4. J.A. Portes, C.S. Motta, **N.F.B. Azeredo**, C.F. Horn, A. Horn, W. Souza, R.A. Damatta, S.H. Seabra. Toxoplasma gondii apoptosis and cellular division alterations after in vitro treatment with copper(II) complexes. *Veterinary Parasitology*. 245 (2017) 141-152.

5. **N.F.B. Azeredo**, F.P. Souza, F.C. Demidoff, C.D. Netto, J.A.L.C. Resende, R.W.A. Franco, P. Colepicolo, A.M.C. Ferreira, C. Fernandes. New strategies for the synthesis of naphthoquinones employing Cu(II) complexes: Crystal structures and cytotoxicity. *Journal of Molecular Structure*. 1152 (2018) 11-20.

6. J.A. Portes, **N.F.B. Azeredo**, P.T. Siqueira, T.S. Guinancio, C. Fernandes, A. Horn, D.R.S. Candela, W. Souza, R. A. Matta, S.H. Seabra. A new iron(III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of Toxoplasma gondii. *Parasitology Research*. 118 (2018) 1-11.

7. **N.F.B. Azeredo**, P.O. Rossini, J.M. Gonçalves, G.L. Assis, K. Araki, L. Angnes. Nanostructured mixed Ni/Pt hydroxides electrodes for BIA-amperometry determination of hydralazine. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 95 (2019) 475-480.

8. J.R. Sempionatto, P.R. Pereira, **N.F.B. Azeredo**, A.N.L. Silva, L. Angnes, J. Wang. Enzymatic Biofuel Cells based on Protective Hydrophobic Carbon Paste Electrodes: Towards Epidermal Bioenergy Harvesting in the Acidic Sweat Environment. *Chemical Communications*. 56 (2020) 2004-2007.

9. P.O. Rossini, A.L. Correa, **N.F.B. Azeredo**, J.M. Gonçalves, F.S. Felix, K. Araki, L. Angnes. Ni-Based Double Hydroxides as Electrocatalysts in Chemical Sensors: A Review. *Trends in Analytical Chemistry*. 126 (2020) 115859.

10. **N.F.B. Azeredo**, J.M. Gonçalves, P.O. Rossini, K. Araki, J. Wang, L. Angnes. Uric acid sensing in real biological samples using alpha-nickel-zinc hydroxide. *Microchimica Acta*. 187 (2020) 389.
11. **N.F.B. Azeredo**, J.M. Gonçalves, I.S. Lima, K. Araki, J. Wang, L. Angnes. Screen-printed nickel-cerium hydroxide sensor for acetaminophen determination in body fluids. *ChemElectroChem* 8 (2021) 2505-2511.
12. **N.F.B. Azeredo**, F.V. Borges, M.S. Mathias, J.A.L.C. Resende, R.W.A. Franco, M.M Kanashiro, A. Horn Jr, C. Fernandes. Effect of the hydroxamate group in the antitumoral activity and toxicity toward normal cells of new copper(II) complexes. *Biometals*. 34(2) (2021) 229-244.
13. F. Moreira, J. Portes, **N.F.B. Azeredo**, C. Fernandes, A. Horn, C. Santiago, B. Segat, G. Caramori, L. Madureira, D. Candela, M. Marques, J.A.L.C. Resende, W. de Souza, R. DaMatta, S. Seabra. Development of new dinuclear Fe(III) coordination compounds with in vitro nanomolar antitrypanosomal activity. *Dalton Transaction*. 50 (2021) 12242-12264.
14. **N.F.B. Azeredo**, M.S.F. Santos, J.R. Sempionatto, J. Wang, L. Angnes. Screen-Printed Technologies Combined with Injection Analysis Techniques: Moving from benchtop to everywhere. *Submetido ao Analytical Chemistry* (2021).
15. J.M. Gonçalves, I.S. Lima, **N.F.B. Azeredo**, D.P. Rocha, A. Siervo, L. Angnes. Trimetallic NiVCe-LDH as multifunctional nanomaterials for supercapacitor, oxygen evolution reaction and sensor applications. Aceito no *Frontiers in Materials*, section Energy Materials. doi: 10.3389/fmats.2021.781900
16. J.R. Sempionatto, G. Bolat, Ernesto de la Paz, **N.F.B. Azeredo**, C. Brown, M. Kartolo, J. Kim, R. Rueda, A.N.L. Silva, L. Angnes, J. Wang. Wearable soft electrochemical microfluidic device integrated with iontophoresis for sweat biosensing. *Submetido ao Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Premiação

1. O trabalho "Anti-toxoplasma activity of new inorganic compounds coordinated or not with sulfadiazine" foi premiado em 1º lugar entre os pôsteres apresentados no V International Congress on Congenital Toxoplasmosis (2015).

2. Prêmio de Melhor trabalho de Mestrado apresentado na modalidade oral na XV Mostra de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).
3. Prêmio de destaque na pós-graduação 2020 promovido pelo Instituto de Química da USP na categoria publicações referente ao artigo "Ni-Based Double Hydroxides as Electrocatalysts in Chemical Sensors: A Review" Trends in Analytical Chemistry (Fator de impacto **9,801**).

Patentes:

Patente de invenção depositada em 2018 e intitulada "Compostos de coordenação de cobre(II) como agentes anti-toxoplasma" (Número do Processo: BR1020180131761).

Idiomas:

1. Português: Nativo – Compreende, fala e escreve bem.
2. Inglês: Fluente – Compreende, fala e escreve bem.
3. Espanhol: Intermediário – Compreende bem. Fala e escreve razoavelmente.
4. Francês: Básico – Compreende, fala e escreve pouco.

Links de páginas e currículos disponíveis para consulta:

1. **Link** para a página ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8121-3643>.
2. **Link** para a página do LinkedIn: <https://www.linkedin.com/in/nath%C3%A1lia-flores-azeredo-99a8a630/>.
3. **Link** para a página do Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?user=A7kDGaYAAAAJ&hl=en>
4. **Link** para a página do ResearchGate: <https://www.researchgate.net/profile/Nathalia-Azeredo>.

Apêndice A (Trabalhos publicados referentes à tese de doutorado)

Nanostructured mixed Ni/Pt hydroxides electrodes for BIA-amperometry determination of hydralazine

Nathália F.B. Azeredo, Pamela O. Rossini, Josué M. Gonçalves, Geovanne L. Assis, Koiti Araki, Lúcio Angnes*

Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 748 – 05508-000 Sao Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2018

Revised 13 August 2018

Accepted 20 August 2018

Available online 13 October 2018

Keywords:

Ni/Pt hydroxide nanoparticles

Hydralazine

Modified FTO electrodes

Batch injection analysis

ABSTRACT

A fluorine doped tin oxide (FTO) coated glass modified with mixed nickel/platinum hydroxide nanoparticles (α -Ni_{0.98}Pt_{0.02}(OH)₂) was utilized as BIA amperometric sensor for fast determination of hydralazine in pharmaceutical formulations. The new electrode material was characterized by X-ray diffraction (XRD), thermal analysis (TG-DTA), transmission electron microscopy (TEM) and voltammetry, exhibiting high conductivity and enhanced activity compared to the FTO electrode without modification. The α -Ni_{0.98}Pt_{0.02}(OH)₂ electrode associated with batch injection analysis (BIA) showed good amperometric response to hydralazine, attaining detection and quantification limits of 5.93×10^{-6} and 2.0×10^{-5} mol/L, respectively, besides elevated analytical frequency (240 samples/h). The amount of hydralazine in real pharmaceutical samples were analyzed by BIA/amperometry and UV–Vis spectrophotometry, the method recommended by the United States Pharmacopeia, giving comparable results. In fact, both methods presented very good concordance (difference of 0.8%) indicating that the BIA method associated with the features of α -Ni_{0.98}Pt_{0.02}(OH)₂ electrode is thus well-suited for electroanalytical purposes, and can be employed for determination of hydralazine in pharmaceuticals.

© 2018 Published by Elsevier B.V. on behalf of Taiwan Institute of Chemical Engineers.

1. Introduction

Hydralazine is a direct-acting vasodilator belonging to the hydrazinophthalazine class of drugs [1], used as antihypertensive agents. According to pharmacodynamics studies, hydralazine relaxes blood vessels and increases the supply of blood and oxygen to the heart, reducing its workload [2]. It also works as an antioxidant, inhibiting membrane-bound enzymes that form reactive oxygen species, such as superoxides, which when in excess counteracts NO-induced vasodilation. It is commonly used in the condition of pregnancy called preeclampsia [3].

Quantitative analysis of chemical compounds like hydralazine in pharmaceutical formulations are generally performed by different analytical techniques such as mass spectrometry (MS) [4,5], high-performance liquid chromatography (HPLC) [6,7], gas chromatography (GC) [8,9] and spectrophotometric method [10,11]. Despite the high sensitivity and capability of these techniques, they are generally expensive, time-consuming and non-portable. In addition, sample preparation procedures are usually required, which may

include extractive pre-concentration or derivatization prior to the quantification step [12,13].

In recent years, the use of nanomaterials modified electrodes for quantification of compounds in pharmaceutical formulations has increased significantly, mainly due to their versatility, stability, easy construction and handling [14,15]. These electrodes are devices that have active chemical species immobilized on their surface, transferring to the electrode its catalytic properties. The electrochemically generated species (oxidized or reduced) are effective to mediate the oxidation and/or reduction of a substrate [16].

Nickel hydroxide (Ni(OH)₂) is one of the most extensively studied compound given to its long lifecycle, stability, low cost and high electrocatalytic activity for the oxidation of organic compounds in alkaline medium [17,18]. Mixed nickel nanoparticles (NPs), their oxides and hydroxides have been widely reported in the literature as potential modifier species, due to their enhanced electrical, optical, thermal and catalytic properties, as compared to the corresponding monometallic catalysts [19–21]. Fortunately, the increased compositional complexity does not affect on the preparation method, especially when based on the sol-gel method, one of the most utilized nowadays because of its versatility and simplicity [22,23]. The use of electrodes modified with mixed Ni_{1-x}M_x(OH)₂ (where M is a second metal) for determination of pharmaceuticals compounds has been demonstrated by our group [14,15,17,21,23].

* Corresponding author.

E-mail address: luangnes@iq.usp.br (L. Angnes).

Uric acid electrochemical sensing in biofluids based on Ni/Zn hydroxide nanocatalyst

Nathália F. B. Azeredo^{1,2} · Josué M. Gonçalves¹ · Pamela O. Rossini¹ · Koiti Araki¹ · Joseph Wang² · Lúcio Angnes¹

Received: 12 March 2020 / Accepted: 22 May 2020 / Published online: 9 June 2020
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

Abstract

A highly sensitive sensor for quantification of uric acid (UA) directly in body fluids (saliva and sweat) is reported, working at a potential as low as 0.0 V vs Ag/AgCl. New mixed hydroxide materials exhibiting stable electrocatalytic responses from alkaline to acidic media were prepared, their structure was thoroughly characterized, and the electrochemical properties of the modified FTO (fluorine-doped tin oxide) electrodes were evaluated for UA determination by cyclic voltammetry, chronoamperometry, and batch injection analysis. A very low limit of detection (2.3×10^{-8} mol L⁻¹) with good repeatability (RSD = 3.2% for 30 successive analyses) was achieved based on a fast and simple BIA procedure. Finally, α -Ni_{0.75}Zn_{0.25}(OH)₂ screen-printed electrodes (SPE) were developed for the measurement of UA directly in real saliva and sweat samples, without interference of ascorbic acid, acetaminophen, lactate, and glucose at their typical concentrations present in those body fluids, revealing high potential for application as disposable sensors in biological systems.

Keywords Nickel double hydroxide · Nanocatalysts · Uric acid · Batch injection analysis · Screen-printed electrodes · Biofluids

Introduction

Uric acid (UA) is a weak acid (pK_a 5.8) found predominantly as urate (its ionized form) at physiological pH [1]. The normal concentration of this water-soluble purine typically ranges from 300 to 500 μM in the plasma, from 100 to 250 μM in saliva, and 20 to 25 μM in the sweat of a healthy person [2]. On one hand, higher levels of UA can lead to an inflammatory response contributing for gout or neuroprotection effects [3]. On the other hand, lower levels are detrimental to the neurons since they possess antioxidant properties in biological conditions and help underpin the body's defense towards free-

radicals attack [4]. In fact, its catalytic oxidation in the presence of electron acceptor species helps in understanding its antioxidant activity and provides new opportunities for advancing electroanalytical detection strategies of purine derivatives [5].

In this context, catalysts combining two different metal elements have been reported in view of their enhanced activity as compared with the corresponding monometallic counterparts [6, 7]. Bimetallic nanoparticles constitute an important class of nanocatalysts exhibiting improved activity, selectivity, and stability [8], which is dictated by the composition and the coordination geometry at the bimetallic sites, thus enabling the optimization of properties [9]. In addition, their small size enhances the electroactive surface area promoting a considerable intensification of the Faradaic response [10].

The immobilization of nanomaterials (such as nickel hydroxide) is commonly used to transfer their electrocatalytic properties to the electrode surface decreasing the overpotential for heterogeneous electron-transfer to a target analyte (for example UA) shifting it to lower potentials (0.4 V vs Ag/AgCl or less), and/or enhancing the current signal, as expected for a faster electrode process [11]. In this sense, nickel-mixed hydroxide nanoparticles (NPs) have been widely reported as interesting surface modifiers due to the Ni²⁺/Ni³⁺ redox couple, which confers enhanced electrical, optical, thermal, and

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00604-020-04351-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nathália F. B. Azeredo
nathalia@iq.usp.br

✉ Lúcio Angnes
luangnes@iq.usp.br

¹ Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Nanoengineering, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

Ni-based double hydroxides as electrocatalysts in chemical sensors: A review

Pamela de O. Rossini ^a, Anabel Laza ^b, Nathália F.B. Azeredo ^a, Josué M. Gonçalves ^a,
Fabiana S. Felix ^c, Koiti Araki ^a, Lúcio Angnes ^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Química, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco 917, CEP 5700, SL, Argentina

^c Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CP 3037, Lavras, CEP 37200-000, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 10 March 2020

Keywords:

Ni-based double hydroxides

Electrochemical catalysts

Chemical sensors

Nanomaterials

Analytical applications

ABSTRACT

Traditionally, nickel hydroxides have been explored for the construction of batteries but many other applications have emerged more recently. This article reviews the use of Ni-based double hydroxide materials applied as electrochemical catalysts in Chemical Sensors. Aiming to provide readers with a good foundation of the subject, the characteristics of nano- and macro-structured nickel hydroxide materials, are also described, along with their use for batteries and supercapacitors. Special attention is given to discussion of the morphology of the various nanostructured materials scattered throughout the literature. Finally, a summary of reviews of sensors, from the early 80s to the most recent studies. This last section approaches the types of electrochemical sensors and their applicability for different analytes. We also present a table containing all reported double hydroxide sensors to date, allowing a comparison of the relevant parameters of each sensor response to make the evaluation of their potential easier.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Voltammetric methods present elevated sensitivity for numerous analytical applications. Many analytes are oxidised or reduced, so this process can be used for their identification and quantification. Unfortunately, voltammetric methods are not very selective, which is a drawback, since oxidation and reduction are additive processes. The possibility of interference increases significantly at elevated potentials, where it is difficult to differentiate the current from the analyte and that produced by interfering species present in the same solution. Thus, significant efforts have been made to overcome such issues.

The advent of modified electrodes has produced a myriad of new possibilities; many of these new transducers are able to solve different problems, as described in a recent review [1]. There are numerous ways to improve the characteristics of the electrodes, including the modification of surfaces with metallic nanoparticles [2], the use of polymeric films [3], the incorporation of enzymes [4], the use of layered materials [5], ionic liquids [6], porphyrins [7], carbon-based materials [8], and so on.

Therefore, chemically-modified electrodes (CME) are the product of one or more modifier agent(s) immobilised onto the electrode surface. The immobilisation can occur through chemical reactions, chemisorption, composite formation or polymer coating [9]. The presence of such species has the function of transferring their electrochemical properties to the electrode surface, thus being an interesting and versatile strategy to prepare electrodes with tailor-made properties and in a controlled manner. The properties of chemically-modified electrodes that have driven their development include: increased selectivity and sensitivity, chemical and electrochemical stability, larger potential windows and resistance to fouling [10]. Such effects/properties have been studied extensively by electrochemists over the last few decades [11].

Many types of metal-based materials are often used as electrode modifiers, ranging from metal nanoparticles [12–14] to oxides [15] and hydroxides [16]. These materials have good electrocatalytic properties [17] and are capable of lowering the overpotential necessary for analyte detection, usually reducing interference problems. The electrocatalytic potential of noble metals such as Pt [12], Au [18] and Ag [19] has long been known, but more common (and therefore cheaper) metals such as Cu [20], Co [21] and Ni [22] have shown equally promising results.

Nickel has been intensively studied as a surface modifier for electrodes, especially as oxides or hydroxides, due to its improved

* Corresponding author.

E-mail address: luangnes@iq.usp.br (L. Angnes).

Cite this: *Chem. Commun.*, 2020, 56, 2004

Received 9th December 2019,
Accepted 13th January 2020

DOI: 10.1039/c9cc09533k

rs.c.li/chemcomm

Enzymatic biofuel cells based on protective hydrophobic carbon paste electrodes: towards epidermal bioenergy harvesting in the acidic sweat environment†

Juliane R. Sempionatto,^{‡a} Paulo A. Raymundo-Pereira,^{‡ab} Nathalia F. B. Azeredo,^{id ac} Andre N. De Loyola e Silva,^a Lúcio Angnes^c and Joseph Wang^{id *a}

The operation of wearable epidermal biofuel cells is prone to rapid irreversible deactivation effects under dynamic sweat pH changes from neutral to acidic. We demonstrate that the encapsulation of lactate-oxidase (LOx) within a hydrophobic protective carbon-paste anode imparts unusually high stability during dynamically changing pH fluctuations and allows the BFC to continue harvesting the lactate bioenergy even after long exposures to acidic conditions. The unique power-recovery ability of the carbon-paste BFC after its failure in harsh pH is attributed to the protective action of the non-polar paste environment.

The past decade has witnessed tremendous research activities related to wearable devices.^{1,2} Realizing such on-body devices that perform multiple complex tasks requires the integration of powerful wearable energy sources. Wearable energy harvesting devices, that harness energy directly from the wearer's body, offer an attractive approach for powering wearable electronic systems. Among the emerging wearable energy-harvesting devices, biofuel cells (BFCs) offer an attractive approach for addressing the challenges of wearable power sources.^{3–5} In particular, recent attention has been given to epidermal BFCs that extract bioenergy from sweat lactate in connection to skin-worn lactate-oxidase (LOx)-based BFCs.^{6–8} Several groups, including ours, have demonstrated that such skin-worn lactate BFCs can generate high-power densities to power conventional electronic devices.⁹ The development of wearable BFCs, particularly epidermal ones, requires careful examination of the behavior of the enzyme used under extreme pH conditions, since enzymes are prone to rapid deactivation effects under harsh pH conditions.^{10,11} In particular, sweat pH changes from neutral to acidic, occurring in a short time window of minutes,^{12,13}

could permanently deactivate sweat-based epidermal BFCs. High lactate fuel concentrations, desirable for generating high power, also lead to more acidic conditions that hinder the BFC performance. However, this challenge has been overlooked for the operation of sweat-based wearable BFC devices and little attention has been given to the influence of dynamic fluctuations of sweat pH on the power-harvesting ability of these devices. To ensure continuous power output from the bioelectronic device, it is paramount to examine the performance of epidermal BFCs and maintain highly stable energy harvesting under dynamically changing pH conditions.

In this work, we demonstrate how physiological changes of sweat pH greatly affect the power-harvesting performance of epidermal BFCs, and how we can tackle this challenge and prevent complete BFC deactivation under the sweat-pH changing conditions expected during on-body operations. We demonstrate that by using a hydrophobic carbon-paste electrode (CPE) matrix to encapsulate LOx, the BFC continues to harvest lactate bioenergy even after prolonged exposure to acidic conditions reflecting the sweat dynamics. Such remarkable stability under extreme conditions has been attributed to the organic-like hydrophobic environment of the CPE matrix containing the encapsulated enzyme and reflects the high stability of the enzyme and corresponding pH memory in non-polar organic solvents.¹¹ Highly stable carbon paste biosensors were demonstrated following prolonged exposures to high temperatures (50 °C)¹⁴ and low pHs (pH 2).¹⁵ Such unusual behavior has been attributed to the retention of a tightly bound thin water layer, surrounding the enzyme, in the presence of a non-polar mineral-oil binder of the CPE.

In the following sections, we examine the pH-dependency of a lactate/oxygen BFC and demonstrate an effective carbon-paste based bioanode, with unique protection against harsh acidic conditions. Such attractive behavior leads to the recovery of the LOx activity and corresponding power output after exposure to fluctuating pH conditions, including periodic exposures to acidic medium. The new acid-recoverable BFC capabilities have been demonstrated during prolonged (12 hours) operation

^a Department of NanoEngineering, University of California, La Jolla, San Diego, USA. E-mail: josephwang@ucsd.edu

^b Sao Carlos Institute of Physics, University of Sao Paulo, Sao Carlos, Brazil

^c Department of Fundamental Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: Materials and methods, and experimental procedures. See DOI: 10.1039/c9cc09533k

‡ Authors with equal contribution.

Special
Collection

Screen-printed Nickel-Cerium Hydroxide Sensor for Acetaminophen Determination in Body Fluids

Nathália F. B. Azeredo,^{*,[a], [b]} Josué M. Gonçalves,^[a] Irlan S. Lima,^[a] Koiti Araki,^[a] Joseph Wang,^[b] and Lúcio Angnes^{*,[a]}

The possibility of fast, reliable, and sensitive ($\mu\text{mol L}^{-1}$) quantification of acetaminophen (AAP) directly in saliva and sweat was demonstrated in the pH range of 4 to 7 using a new user-friendly and cost-effective graphite screen-printed electrode (SPE) modified with 2–3 nm diameter alpha-nickel-cerium hydroxide nanoparticles. The nanoparticles (NPs) were fully characterized by transmission electron microscopy (TEM, HRTEM and STEM), XRD, and the electrochemical conditions for AAP analysis optimized, pushing down the limit of detection with good selectivity. The possibility of real-time measurements of AAP was demonstrated by carrying out experiments directly in

biofluids, without significant interference from species such as lactate, glucose, ascorbic and uric acid usually present in this kind of samples. This is the first report combining the catalytic properties and easy incorporation of alpha-nickel-cerium hydroxide nanoparticles into graphite ink to prepare an SPE for AAP electrochemical detection in secreting body fluids. The $\alpha\text{-Ni}_{0.9}\text{Ce}_{0.1}(\text{OH})_2$ SPE features good accuracy and selectivity, fast response, good accuracy and selectivity, as well as low reagent consumption for determination of AAP in real saliva and sweat samples.

1. Introduction

Acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, AAP), also known as paracetamol, is a worldwide prescribed analgesic (pain reliever) and antipyretic (fever reducer),^[1] characterized by rare side effects when administered at recommended dosages, although skin rashes and other allergic reactions have occasionally been reported.^[2] The most serious contraindication is liver damage, since it is primarily absorbed and metabolized in this organ.^[3] Overdoses of AAP lead to accumulation of toxic metabolites associated with lethal hepatic necrosis (hepatotoxicity) and renal failure (nephrotoxicity).^[4] Accordingly, the determination of hepatotoxic drugs plays an important role in quality control, clinical diagnosis and can affect public health significantly.^[5]

Among the analytical techniques, fast, inexpensive, easy to handle and miniaturized electrochemical devices are popular, especially when considering their good performance for many target analytes directly in real samples, dispensing tedious preparation steps.^[6,7] In addition, the portability and high sensitivity of voltammetric sensors in a wide linear dynamic range can be explored for development of paracetamol sensors

more competitive than those based on spectroscopic methods.^[8,9] Also, the poor sensing ability of conventional electrodes for selected analytes can be conveniently overcome by choosing suitable mediators and/or electrode modifiers to enhance the heterogeneous electron-transfer process,^[10] thus imparting selectivity, sensitivity and reproducibility to the sensors.^[11]

Several materials have been used to modify electrodes, including expensive noble metals^[12–14] and carbon-based materials,^[15–17] but the selectivity tend to be poor.^[18,19] In contrast, nanomaterials exhibit unique mechanical, electrical, optical, magnetic, and biological properties, not found in conventional bulk materials,^[20] in addition to a much larger concentration of available electroactive sites, associated with their enhanced surface area, making a perfect combination with electrochemical techniques.^[21] Metal oxide/hydroxide-based nanomaterials can be a good choice due to their cost effectiveness, and high electrocatalytic activity.^[22–24] Among them, nickel-based electrocatalysts such as Ni, NiO_2 and $\text{Ni}(\text{OH})_2$ micro and NPs have been extensively explored for modification of electrodes given their low prices and high electrocatalytic activity for many types of analytes.^[25–28] These nanomaterials present great chemical stability,^[29,30] as well as outstanding merits such as facile synthesis, excellent electrical conductivity, compatibility with water and organic solvents, large surface area, and high density of electrochemically active metallic sites on the surface,^[23,24] as expected for their small particle size and relatively open layered structure.

These properties can be improved in bimetallic nanomaterials such as NiCe hydroxides NPs, that have attracted considerable attention in recent years due to their unique mechanical and catalytic properties, consequence of synergistic and electronic effects.^[31] The photocatalytic activity, high chemical and thermal stability, high specific capacitance and

[a] N. F. B. Azeredo, Dr. J. M. Gonçalves, I. S. Lima, Prof. Dr. K. Araki, Prof. Dr. L. Angnes
Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry
University of São Paulo
São Paulo, Brazil
E-mail: nathalia@iq.usp.br
luangnes@iq.usp.br

[b] N. F. B. Azeredo, Prof. Dr. J. Wang
Department of Nanoengineering
University of California San Diego
La Jolla, USA

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/celc.202100417>

An invited contribution to a joint Special Collection in memory of Prof. Jean-Michel Savéant

Trimetallic NiVCe-Layered Double Hydroxide as Multifunctional Nanomaterials for Supercapacitor, Oxygen Evolution Reaction, and Sensor Applications

Josué M. Gonçalves^{1*}, Irlan S. Lima¹, Nathália F. B. Azeredo¹, Diego P. Rocha¹, Abner de Siervo² and Lúcio Angnes^{1*}

¹Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Applied Physics Department, Institute of Physics "Gleb Wataghin", State University of Campinas, Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Verónica de Zea Bermudez,
University of Trás-os-Montes and Alto
Douro, Portugal

Reviewed by:

Kai Yan,
Lakehead University, Canada
Yan Huang,
Harbin Institute of Technology,
Shenzhen, China

*Correspondence:

Josué M. Gonçalves
josuemartins@usp.br
Lúcio Angnes
luangnes@iq.usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Energy Materials,
a section of the journal
Frontiers in Materials

Received: 23 September 2021

Accepted: 18 October 2021

Published: XX XX 2021

Citation:

Gonçalves JM, Lima IS, Azeredo NFB, Rocha DP, de Siervo A and Angnes L (2021) Trimetallic NiVCe-Layered Double Hydroxide as Multifunctional Nanomaterials for Supercapacitor, Oxygen Evolution Reaction, and Sensor Applications. *Front. Mater.* 8:781900. doi: 10.3389/fmats.2021.781900

Multifunctional nanomaterials have been attracting increasing attention as solutions to the existing challenges in energy systems and sensing technologies. In this regard, multifunctional NiVCe-layered double hydroxide (NiVCe-LDH) nanoparticles were synthesized by the modified sol-gel method. The analysis of this material demonstrated excellent potential for its utilization as electrode materials for hybrid supercapacitor, oxygen evolution reaction (OER), and sensor applications. The NiVCe-LDH nanoparticles delivered a specific charge of 740 C g^{-1} at 10 A g^{-1} and decent rate performance (charge retention of 68.7% at 100 A g^{-1}), showing excellent prospects as electrode material for hybrid energy storage devices. In addition, NiVCe-LDH nanoparticles have also been successfully applied as a proof-of-concept for OER, as confirmed by their low Tafel slope of 47 mV dec^{-1} . Finally, trimetallic NiVCe-LDH-based screen-printed electrodes were developed for the sensing of hydrogen peroxide directly in a real complex mouthwash sample, achieving a satisfactory recovery value of around 98% using a fast and simple batch injection analysis procedure. These results allow us to predict the great potential of this trimetallic hydroxide for building electrochemical sensors with good perspectives as electroactive material for OER processes and energy storage technologies.

Keywords: layered double hydroxides (LDH), multifunctional, electrocatalyst, hybrid supercapacitor, electrochemical sensor

INTRODUCTION

Transition metal-containing layered double hydroxides (LDHs) have emerged as multifunctional inorganic nanomaterials with large specific surface area, remarkable mechanical properties, and tunable electric and thermal conductivity (Tomboc et al., 2021). In fact, these LDH-based nanomaterials with their extraordinary inherent properties have become potential candidates for several scientific and technological challenges for a more sustainable society. They are excellent candidates for electrochemical energy conversion and storage systems (Shao et al., 2015; Gonçalves et al., 2020a; Gonçalves et al., 2020b), as well as catalytic materials in electrochemical sensors (Rossini et al., 2020).

In fact, the high dispersion of active species in a layered structure, the exfoliation process, and chemical modification open new opportunities for the development of LDHs as multifunctional