UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Instituto de Química de São Carlos Departamento de Físico Química

Thiago Serafim Martins

Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para furosemida baseado em superfície de grafite de lápis modificada com filme polimérico de Ni-Salen e nanopartículas de Ni(OH)₂/C

> São Carlos 2018

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.

Assinatura: Abapation

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Martins, Thiago Serafim

Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para furosemida baseado em superfície de grafite de lápis modificada com filme polimérico de Ni-Salen e nanopartículas de Ni(OH)2/C / Thiago Serafim Martins. — São Carlos, 2018. 71 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2018. Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

1. Química analítica. 2. Eletroanálise. 3. Sensor. 4. Nanopartículas. I. Título.

Referências Bibliográficas conferidas pelo SB1/1QSC

Sonia Alves - CRB: 4280

Thiago Serafim Martins

Desenvolvimento de um sensor eletroquímico para furosemida baseado em superfície de grafite de lápis modificada com filme polimérico de Ni-Salen e nanopartículas de Ni(OH)₂/C

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

Dedico este trabalho aos meus avós, Oswaldo Alves Martins e Ruth Tassinari Alves Martins por acreditarem em mim e pelo incentivo à sabedoria desde sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, Ruth e Oswaldo, pelo carinho, compreensão e por estarem sempre ao meu lado. Não tenho palavras para descrever a importância dos dois em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu amigo, Sergio Antonio Marques de Lima pelo carinho e incentivo a minha formação.

Ao José Luiz Bott Neto pelas contribuições e enriquecimento deste projeto, além do companheirismo e apoio nessa fase tão importante em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela oportunidade, pelo apoio, por fornecer suporte e pelas discussões que me ajudaram a enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Antonio Ticianelli por fornecer suporte e pelas discussões que me ajudaram a enriquecer este trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório que conheci durante estes dois anos de mestrado.

Ao Instituto de Química de São Carlos por todo suporte estrutural (biblioteca, salas, Central de Análises Químicas Instrumentais - CAQI, oficinas de mecânica e vidraria) e pessoal (corpo docente, funcionários e técnicos) que juntos proporcionaram auxilio na realização deste projeto.

RESUMO

Neste trabalho, um sensor eletroquímico baseado em grafite de lápis modificado de via eletropolimerização do monômero N, N' - bis(salicilideno)etilenodiaminoníquel (II) na presença de nanopartículas de Ni(OH)₂ suportadas em carbono (chamado aqui de [Ni(salen)] e Ni(OH)₂/C) foi desenvolvido e investigado para quantificação de furosemida (FUR) em meio alcalino. O sensor eletroquímico e seus componentes foram caracterizados por técnicas físicoquímicas, enquanto que o processo de oxidação da FUR foi investigado por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier in situ (FTIV in situ). Estes resultados indicam que a oxidação da FUR nestas condições leva à formação de 2-amino-4-cloro-5-sulfamoilbenzoato e 5-hidroxi-furano-2-carboxilato. A resposta eletroquímica do eletrodo de grafite modificado (EGM) para a determinação de FUR foi medida por voltametria cíclica (VC). A curva analítica (mudança de corrente de pico voltamétrico versus concentração de FUR) apresentou uma faixa linear de 2,5 x 10⁻ ¹⁰ mol L⁻¹ a 2,7 × 10⁻⁹ mol L⁻¹ com um limite de detecção calculado tão baixo quanto $1,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ nas condições otimizadas, que é menor do que os valores relatados na literatura. A sensibilidade ultrabaixa obtida com sensor desenvolvido foi atribuída a um efeito sinérgico entre o filme de poli[Ni(salen)] e as nanopartículas de Ni(OH)₂/C.

Palavras-chave: furosemida, sensor eletroquímico, polímero condutor, [Ni(salen)], nanopartículas de Ni(OH)₂.

ABSTRACT

In this work, an electrochemical sensor based on pencil graphite modified via electropolymerization of the N, N' - bis(salicylidene)ethylenediaminonickel (II)monomer in the presence of carbon supported Ni(OH)₂ nanoparticles (here called as poly[Ni(salen)] and Ni(OH)₂/C) was developed and investigated for furosemide (FUR) quantification in alkaline medium. The electrochemical sensor and its components were characterized by physico-chemical techniques, while the FUR oxidation process was investigated by in situ Fourier transform infrared spectroscopy (in situ FTIR). These results indicate that the oxidation of FUR in these conditions leads to the 2-amino-4-chloro-5-sulfamoylbenzoate formation of and 5-hydroxy-furan-2carboxylate. The electrochemical response of the modified graphite electrode (MGE) for the determination of FUR was measured by cyclic voltammetry (CV). The analytical curve (change of voltammetric peak current vs. FUR concentration) presented a linear range from 2.5 \times 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ to 2.7 \times 10⁻⁹ mol L⁻¹ with a calculated limit of detection as low as 1.4×10^{-10} mol L⁻¹ under the optimized conditions, which is lower than values reported in the literature. The ultra-low sensitivity obtained with the MGE sensor was attributed to a synergistic effect between the poly[Ni(salen)] film and Ni(OH)₂/C nanoparticles.

Keywords: furosemide; electrochemical sensor; conducting polymer; [Ni(salen)]; Ni(OH)₂ nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da FUR15
Figura 2: Esquema mostrando componentes importantes típico de um sensor
eletroquímico17
Figura 3: Esquema representativo da reação para obtenção de complexos M-salen.
Figura 4: Esquema representativo para formação de radical centrado no ligante na
oxidação / redução de um complexo metálico
Figura 5: Diagrama de Bode que descreve as formas estruturais do hidróxido de
níquel; os dois detalhes mostram as projeções de célula unitária para as estruturas do
tipo brucita do β -Ni(OH) ₂ e α -Ni(OH) ₂ .xH ₂ 0. As esferas verdes são Ni ⁺² ; esferas
vermelhas são O2 ⁻ ; esferas cinzas H ⁺ ; esferas azuis H2O20
Figura 6: Mecanismo não balanceado de oxidação eletroquímica da FUR22
Figura 7: Representação do aparato utilizado para síntese das nanopartículas de
Ni(OH) ₂ suportadas em carbono Printex [®] 6L27
Figura 8: Imagem do ligante a) e complexo [Ni(salen)] b) obtidos
Figura 9: Aparato espectroeletroquímico empregado nas medidas de espectroscopia
de FTIV in situ
Figura 10: Diagrama esquemático da preparação do sensor eletroquímico baseado na
eletropolimerização do monômero [Ni(salen)] na presença de nanopartículas de
Ni(OH) ₂ /C
Figura 11: (a) DRX das nanopartículas de Ni(OH) ₂ /C; a efeito de comparação, os
padrões de DRX de α -Ni(OH) ₂ (1), JCPDF 38-715 e β -Ni(OH) ₂ (2), JCPDS 14-117,
também são mostrados
Figura 12: MET (a) e AR-MET (b) imagens do carbono Printex [®] 6L puro34
Figura 13: Imagem de MET das nanopartículas de Ni(OH) ₂ /C com o histograma
mostrado na inserção35
Figura 14: Imagens de AR-MET das nanopartículas de Ni(OH) ₂ /C (a-b) juntamente
com as imagens tratadas usando o software GATAN GMS 3 para calcular franjas de
rede (c-f)
Figura 15: Espectro de FTIV ex situ do [Ni(salen)] diluído em pastilha de KBr36
Figura 16: Espectro de absorção no UV-Vis de 1,0 × 10^{-5} mol L ⁻¹ do ligante e do
[Ni(salen)] em etanol

Figura 24: Voltamogramas cíclicos dos EGMs obtidos durante a etapa de eletropolimerização do monômero [Ni(salen)] e das NPS Ni(OH)₂/C em solução de PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ saturada com N₂ a 100 mV s⁻¹ para cada intervalo de potencial estudado.

Figura 25: Voltamogramas cíclicos para o EGM obtido durante a eletropolimerização de 0 a 1,1 V em solução de 0,1 mol L⁻¹ de PTBA / CH₃CN saturada com N₂ a 100 mV s⁻¹......45

Figura 26: Voltamogramas cíclicos dos EGMs eletropolimerizados em diferentes intervalos de potencial (5º ciclo) estabilizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹......46

Figura 29: Voltamogramas cíclicos do EGM obtidos durante a etapa de estabilização Figura 30: Espectros de FTIV in situ do EGM obtidos de 0,2 a 0,6 V vs Ag / AgCl (KCl 3 M) a 2 mV s⁻¹ em (a) solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e (b) NaOH 1,0 mol L^{-1} + 1,0 × 10⁻² mol L^{-1} de FUR. (c) Também são mostrados os espectros em ambas as condições coletados com o potencial mantido em 0,6 V por 5 minutos. (d) porção anódica do VC com presença de FUR. (e) Mecanismo proposto para a oxidação da FUR......50 Figura 31: Espectros de FTIV in situ obtidos durante a oxidação da FUR de 0,2 a 0,6 V a 2,0 mV s⁻¹ em EGM modificado apenas com poli[Ni(salen)] estabilizado em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹......52 Figura 32: Espectros de FTIV in situ obtidos durante a oxidação da FUR de 0,2 a 0,6 V a 2,0 mV s⁻¹em Ni-*bulk* estabilizado em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹......53 Figura 33: Avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade (a) e resultados de testes de estabilidade (b). Resultados obtidos da voltametria cíclica do sensor EGM realizado Figura 34: Curva analítica do sensor EGM para a determinação da FUR obtida de 0,2 a 0,6 V a 50 mV s⁻¹. A porção anódica dos voltamogramas cíclicos é mostrada na inserção......56 Figura 35: Variação do sinal de possíveis interferentes para o sensor EGM investigado por voltametria cíclica em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ de 0,2 a 0,6 V a 50 mV s⁻¹ com 2,7 × 10^{-9} mol L⁻¹ FUR e 1,2 × 10^{-5} mol L⁻¹ de interferentes (interferentes: ácido úrico; glicose; ácido oxálico; ácido ascórbico; ácido cítrico)......57

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	-	Comparação	do	desempenho	analítico	para	diferentes	sensores
eletroqu	ıími	ico	s para FUR						21
Tabela	2 —	- At	ribuição das b	anda	as dos espectro	s de FTIV	in situ	I	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Alta Resolução
С	Carbono Printex [®] L6
DMF	N,N-dimetilformamida
DRX	Difratometria de Raios-X
EA	Eletrodo Auxiliar
EG	Eletrodo de Grafite de lápis
EGM	Eletrodo de Grafite de lápis Modificado
ER	Eletrodo de Referência
ESI	Ionização por Electrospray
ET	Eletrodo de Trabalho
FTIV	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
FUR	Furosemida
PA	Corrente de Pico Anódico
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC	Cromatografia Líquida
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Polímero Molecularmente Impresso
MS	Espectrometria de Massa
NCPM	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas
NPs	Nanopartículas
РТВА	Perclorato de Tetrabutilamônio
salen	N , N' - bis(salicilideno)etilenodiamina
UV-Vis	Ultra Violeta-Vísivel
VC	Voltametria Cíclica
WADA	Agência Mundial Antidoping
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X
ΔΙρα	Variação da Corrente de Pico Anódico (descontado do branco)

SUMÁRIO

AGRA	DECIMENTOS	xv
RESU	MO	xvi
ABSTR	RACTx	vii
LISTA	DE FIGURAS	viii
LISTA	DE TABELAS	xxi
LISTA	DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 IN ⁻	TRODUÇÃO	15
1.1	Aspectos gerais	15
1.2	Sensores eletroquímicos	16
1.3	Nanomateriais à base de níquel	18
1.5	Sensores eletroquímicos para furosemida	21
2 OE	BJETIVO	24
3 ME	ETODOLOGIA	26
3.1	Reagentes	26
3.2	Síntese de nanopartículas de hidróxido de níquel suportadas em	
carb	ono Printex [®] L6	26
3.3	Síntese do complexo N, N' - bis(salicilideno)etilenodiaminoníquel (II)	27
3.4	Técnicas de caracterização	28
3.5	Preparação dos eletrodos e medidas eletroquímicas	30
4 RE	ESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Caracterização	33
4.2	Otimização das condições para a preparação do sensor EGM	42
4.3 FTIV	Estudo do processo de eletro-oxidação da FUR por espectroscopia de <i>in situ</i>	e 49
4.4	Avaliação da repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do EGM.	53

4.5	Curva analítica para detecção de furosemida	55
4.6	Estudos de interferência	56
5 C	ONCLUSÕES	59
6 R	EREFÊNCIAS	61

Capítulo 1 — Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

O ácido 4-cloro-2-[(2-furilmetil)amino]-5-sulfamoilbenzóico, também conhecido como furosemida (FUR), cuja fórmula molecular é mostrada na **Figura 1**, é um diurético amplamente utilizado no tratamento da hipertensão e das condições edematosas causadas pela sobrecarga de fluidos, para as quais um aumento no fluxo urinário poderia aliviar os sintomas [1,2]. Esta substância atua em uma parte específica do néfron que regula o equilíbrio de cloreto de sódio e água, bloqueando a adsorção de sal e aumentando o fluxo urinário [3]. A rápida perda de água corporal e a deficiência de potássio na corrente sanguínea, causada pelo efeito diurético da FUR, pode levar a disfunções como disritmia cardíaca, hiperuricemia, hiperglicemia e, portanto, o monitoramento médico e a detecção rápida de FUR são fundamentais durante o tratamento prolongado com essa droga [1].

Além disso, a FUR também é usada ilegalmente pelos atletas para alterar o volume e a composição dos fluidos corporais, dos tecidos [4], e para mascarar o uso de substâncias ilícitas devido principalmente a dois fatores: aumento do fluxo urinário [5] e alterações no valor do pH urinário inibindo assim a excreção de drogas ácidas e básicas na urina [6–8]. Por conseguinte, a Agência Mundial Antidoping (WADA) considera ilegal qualquer quantidade do diurético FUR no organismo, salvo para atletas com isenção para uso terapêutico aprovada [9].

Figura 1: Estrutura molecular da FUR.



Fonte: Autoria própria.

Existem na literatura várias técnicas para detecção e quantificação de FUR, tais como: (i) métodos de cromatografia líquida [10,11] e micelar [11–13]; (ii) métodos

ópticos, como o espectrofotométrico [14–16], quimiluminescência [17,18] e espectrofluorimétrico [19,20]; e (iii) eletroforese capilar [21,22]. No entanto, geralmente essas técnicas exigem manutenção contínua, e podem envolver alto custo operacional, instalações sofisticadas, o uso de solventes poluentes e, em alguns casos, longos períodos de tempo. Além disso, esses métodos podem não ser suficientemente sensíveis para a quantificação direta de FUR, exigindo eventualmente uma etapa de pré-concentração [2].

Alternativamente, os sensores eletroquímicos têm sido amplamente investigados porque são dispositivos de alta sensibilidade, seletividade e velocidade para uma ampla gama de compostos biológicos, normalmente envolvendo métodos de baixo custo [23–25], e portanto, eles são candidatos promissores para a detecção e monitoramento de forma eficiente e rápida de FUR em fluídos biológicos e em amostras de medicamento.

1.2 Sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são dispositivos que detectam as transformações químicas, físicas e biológicas e convertem em um tipo de sinal mensurável [26]. Os componentes principais de um sensor eletroquímico constituem de um agente de reconhecimento, um transdutor e um processador de sinal, conforme ilustrado na **Figura 2**. O transdutor é responsável por converter a informação em um sinal detectável, podendo trabalhar de forma potenciométrica, amperométrica, condutométrica e piezoelétrica.

i. Transdutores iônicos potenciométricos: são eletrodos de íonseletivos e / ou íon-sensíveis, cujo processo envolve mecanismos complexos que depende do material eletroativo (membrana/filme), solução, interface membrana/solução, propriedades termodinâmicas е cinéticas. Todas essas características induzem a diferentes modelagens de resposta, e portanto, sua resposta é genericamente baseada na medida do potencial elétrico [27].

- ii. Transdutor amperométrico: esse tipo de eletrodo tem sua resposta baseada no monitoramento da corrente associada à oxidação ou redução de uma espécie eletroativa envolvida no processo de reconhecimento [28].
- iii. Transdutores condutométricos: são eletrodos comumente usados para detecção de gases, no qual sua resposta baseia-se na medição da variação de condutância [29].
- iv. Transdutores piezoelétrico: são eletrodos sensíveis à alterações de massa ou de energia causadas pelo acúmulo de um analito, que transformam essas mudanças em um desvio de frequência ou deslocamento de dissipação [30].

Figura 2: Esquema mostrando componentes importantes típico de um sensor eletroquímico.



Fonte: Autoria própria.

Para aplicações práticas, um sensor eletroquímico precisa apresentar alta detectabilidade, seletividade e estabilidade. O desenvolvimento desse dispositivo com eletrodo ativo e que exiba todas essas propriedades é um grande desafio. Desse modo, diversos estudos têm investigado agentes modificadores tanto em micro quanto em nano escala, depositados na superfície do transdutor por meio de reações químicas, processos de quimissorção, formação de compósitos ou revestimento de polímeros. Como consequência, uma nova geração de materiais nanoestruturados à base de nanopartículas de metal / óxido de metal, carbono com / sem funcionalização

(como nanotubos de carbono, grafeno, grafite, e outros) [2,23,31–33] e polímeros condutores [31,34–36] foram e estão sendo estudados para detecção de uma variedade de analitos incluindo FUR.

1.3 Nanomateriais à base de níquel

Recentemente, complexos poliméricos de metais de transição com ligantes à base de Schiff do tipo salen, poli[M(Schiff)], que recebem o nome mais simples de N, N' - bis(salicilideno)etilenodiamina, têm sido investigados para diversas aplicações. Sua síntese consiste na condensação de um salicilaldeído com uma amina dando origem a um ligante diprótico em que a base de Schiff presente (constituída por um grupo azometina (-R=CN-) contendo carbono, nitrogênio e um grupo arila ou alquila em sua estrutura) geralmente coordena íons metálicos por meio de um nitrogênio amina e outro grupo ligado ao aldeído, conforme mostrado na **Figura 3**.

Figura 3: Esquema representativo da reação para obtenção de complexos M-salen.



Fonte: Autoria própria.

Desse modo, as bases de Schiff, cujo termo vem do nome do químico alemão Hugo Schiff (1834-1915) [37] são na realidade estruturas orgânicas que inclui ligação dupla carbono-nitrogênio (-C=N-), nomeadas de grupo imina e azometina. Esses grupos imina e azometina são responsáveis por fornecer a esse tipo de complexo polimérico várias vantagens sobre outros polímeros eletroativos tais como: capacidade de mimetizar reações enzimáticas devido à presença de radicais centrado no ligante [38] (ver **Figura 4**) que também estão presentes e são essenciais nos sítios ativos de muitas metaloenzimas [39]; estabilidade térmica única até 350 °C [40]; alta capacidade redox e condutividade eletrônica, que fornece altas taxas de transferência de carga [41].

Figura 4: Esquema representativo para formação de radical centrado no ligante na oxidação / redução de um complexo metálico.



Fonte: Adaptação de Clarke et al.,2017 [39].

Todas essas características e propriedades além de conferir a esses polímeros importância tanto na classe farmacêutica quando medicinal, podendo ser aplicados em uma ampla gama de atividades biológicas, como anti-inflamatórios, antivirais, antimaláricos, antibacterianos, entre antipiréticos. outras [42–45], também possibilitam aplicações em materiais eletrônicos e dispositivos tais como, catálise, sensores. dispositivos de memórias, células solares. nanocompósitos, armazenamento de energia e materiais de luminescência [46-51]. Além disso, importantes estudos foram realizados sobre o uso de base de Schiff eletropolimerizado especialmente para dispositivos fotocondutores e eletrocrômicos [52,53]. Entretanto, há poucos relatos sobre o uso destes materiais para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Em particular, nanoestruturas baseadas em níquel têm capturado mais atenção em aplicações analíticas, provavelmente devido à sua ampla faixa linear, excelente atividade catalítica e maior estabilidade para a oxidação de algumas moléculas orgânicas em meio alcalino, principalmente utilizando suas características de intermediação devido às espécies como Ni(OH)₂ e NiOOH [54–56]. Neste contexto, filmes poliméricos de [Ni(salen)] e nanopartículas de hidróxido de níquel são candidatos promissores para serem utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

As nanopartículas de hidróxido de níquel possuem estruturas de célula unitária do tipo brucita com empacotamento lamelar [57], que possibilita a presença de íons e moléculas de água entre essas lamelas. Desse modo, as espécies de níquel podem apresentar diferentes estruturas cristalográficas e / ou estruturas mais oxigenadas, tanto no estado oxidado quanto no reduzido, dependendo da disposição das lamelas ao longo do eixo cristalográfico. Por conseguinte, segundo Bode *et al.* [58] fenômenos de carga e descarga podem levar essas espécies a apresentar as fases α -Ni(OH)₂, β -NiOOH e γ -NiOOH, conforme mostra **Figura 5**.

Figura 5: Diagrama de Bode que descreve as formas estruturais do hidróxido de níquel; os dois detalhes mostram as projeções de célula unitária para as estruturas do tipo brucita do β-Ni(OH)₂ e α-Ni(OH)₂.xH₂O. As esferas verdes são Ni⁺²; esferas vermelhas são O₂⁻; esferas cinzas H⁺; esferas azuis H₂O.



Fonte: Autoria própria.

1.5 Sensores eletroquímicos para furosemida

Como exposto acima, devido à grande importância em monitorar e quantificar de forma rápida a FUR, várias pesquisas têm sido realizadas no desenvolvimento e estudo de sensores eletroquímicos que quantifiquem com alta sensitividade esse diurético. Desse modo, algumas informações a respeito dos estudos realizados para quantificação da FUR visando um baixo limite de detecção estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Comparação do desempenho analítico para diferentes sensores eletroquímicos para FUR.

Eletrodo	Faixa Linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Ref.	
Carbono vítreo	Até 5,5 × 10⁻⁵	1,5 × 10⁻ ⁷	[59]	
Pasta de nanotubos de carbono de	$8,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$	2,9 × 10 ⁻⁷	[60]	
paredes múltiplas (NCPMs)				
Polímero molecularmente impresso	$8,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-6}$	7,0 × 10⁻ ⁸	[34]	
(MIP) modificado com ouro				
Carbono vítreo modificado por	9,1 × 10 ⁻⁸ - 4,2 × 10 ⁻⁴	2,1 × 10 ⁻⁸	[2]	
Carboxil-NCPMs				
Membrana de poli(cloreto de vinila)	1,6 × 10 ⁻⁴ - 1,0 × 10 ⁻²	1,2 × 10⁻⁴	[14]	
Pasta de Carbono	$5,0 \times 10^{-7} - 10,0 \times 10^{-6}$	4,5 × 10⁻ ⁹	[61]	
Diamante dopado com boro (DDB)	$3,0 \times 10^{-7} - 13,0 \times 10^{-6}$	3,0 × 10⁻ ⁷	[1]	
Grafite-poliuretano	Até 2,1 × 10 ⁻⁵	1,5 × 10⁻ ⁷	[62]	

Fonte: Autoria própria.

Alguns grupos interessados em compreender os processos eletroquímicos por trás da eletro-oxidação da FUR, tem investigado o mecanismo desta reação em diversos eletrodos à base de carbono e ouro (com ou sem modificações) em eletrólitos diversos (ácido, básico e neutro). Por exemplo, Nagaraj P. Shetti *et al.* [63] estudaram o mecanismo de eletro-oxidação da FUR em eletrodo de ouro policristalino em solução tampão Britton-Robinson (0,04 mL L⁻¹ e pH 5) por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e de pulso diferencial) e espectrométricas (cromatografia líquida acoplada à ionização por electrospray e espectrometria de massas, também conhecida como LC–ESI-MS do inglês *liquid chromatography coupled with electrospray ionization and mass spectrometry*); assim como UV–Vis para caracterização dos produtos gerados após eletrólise exaustiva [63]. Os resultados obtidos sugerem que esta reação sobre ouro envolve dois elétrons com perda de dois prótons, um no grupo amina e outro no grupo metila (R-NH-CH₂-R') formando uma dupla ligação sem quebra da molécula de

FUR, sendo a 2-cloro-4-[furan-2-metilmetileno)-amino]-benzenossulfonamida o produto formado.

Malode *et al.* investigaram o mecanismo da eletro-oxidação de FUR exatamente nas mesmas condições descritas acima, porém sobre eletrodo de pasta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas [64], e chegaram nas mesmas conclusões que Shetti *et al.* Por outro lado, Mohammad Hasanzadeh *et al* [65] propuseram uma abordagem mecanicista para a eletro-oxidação de FUR sobre eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno magnético funcionalizado com ácido clorosulfônico em solução 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 6. Fazendo uso de técnicas voltamétricas como, voltametria cíclica, medidas coulométricas e cronoamperometria, no qual o mecanismo de reação de oxidação eletroquímica envolve dois elétrons, com a quebra da molécula de FUR cujo produtos são mostrados na **Figura 6**. Todavia, apesar dos esforços, o mecanismo depende muito do meio de estudo, se ácido, básico ou neutro.



Fonte: Hasanzadeh et al.,2014 [65].

Neste contexto, apesar da literatura reportar vários eletrodos promissores para a construção de sensores eletroquímicos para a quantificação de FUR, observa-se que ainda não há eletrodos sensíveis à FUR na ordem de 10⁻¹⁰ e 10⁻⁹ mol L⁻¹. Nesse sentido, ainda é necessário o desenvolvimento de novos eletrodos à base de materiais nanoestruturados, principalmente para aplicações no controle de *doping* esportivo, visto que a presença deste fármaco no organismo é considerada *doping* independentemente da concentração dele em fluidos biológicas (sangue, urina, etc). Além disso, quando se considera o mecanismo de oxidação da FUR em diferentes superfícies, esta necessidade se torna ainda mais premente, justificando novos estudos com este importante analito.

Capítulo 2 – Objetivos

2 OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver um sensor eletroquímico baseado em grafite de lápis modificado via eletropolimerização do monômero [Ni(salen)] na presença de nanopartículas de Ni(OH)₂/C para a quantificação de furosemida.

Para isso, foi necessário a realização das seguintes etapas:

- Sintetizar o monômero [Ni(salen)] e as nanopartículas de Ni(OH)₂ suportadas em carbono;
- Caracterizar os eletrodos modificados e seus constituintes por difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia de ultravioletavisíveis (UV-Vis), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de alta resolução (AR-MET), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIV) *ex-situ* e espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS, do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*).
- Investigar o desempenho do eletrodo de grafite modificado para detecção da furosemida, bem como sua reprodutibilidade e estabilidade em meio alcalino por voltametria cíclica;
- Investigar o mecanismo da reação de oxidação da furosemida por espectroscopia de FTIV *in situ*.

Capítulo 3 – Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho foram utilizados sem qualquer outro procedimento de purificação. O acetato de níquel (II) (pureza de 99%) foi obtido da Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). O etanol (99% de pureza) foi adquirido da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Etilenodiamina, salicilaldeído, N, N - dimetilformamida (DMF), perclorato de tetrabutilamônio (PTBA), acetonitrila (CH₃CN) e metanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O carbono Printex[®] L6 foi obtido da Degussa (Essen, Renânia do Norte-Vestefália, Alemanha). O grafite de papelaria foi adquirido da Faber-Castell® (Stein, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada de um sistema Millipore com resistividade > 18 MΩ cm (Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). A solução estoque do medicamento FUR (Lasix[®], 40 mg) foi preparada dissolvendo a medicação em solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ (NaOH) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.2 Síntese de nanopartículas de hidróxido de níquel suportadas em carbono Printex[®] L6

Nanopartículas (NPs) de Ni(OH)₂ suportadas em carbono Printex[®] 6L (aqui designadas por Ni(OH)₂/C) foram sintetizadas em DMF. Inicialmente, 120 mL de DMF foram adicionados a um balão de ebulição e aquecido a aproximadamente 90 °C sob refluxo em atmosfera de N₂ durante 30 min, para facilitar a dissolução dos precursores e para remover o oxigénio presente no DMF. Cinquenta mililitros dessa solução aquecida foram usados para preparar 10⁻² mol L⁻¹ de solução de acetato de níquel (II) enquanto 70 mL restante foi usado para dispersar as nanopartículas de carbono Printex[®] 6L. Finalmente, ambas as soluções foram misturadas no balão de ebulição e o sistema foi submetido a refluxo sob atmosfera inerte de N₂ durante 20 horas a 90 °C, conforme mostrado na **Figura 7**. O produto obtido foi filtrado, lavado com DMF e seco a temperatura ambiente [66].

Figura 7: Representação do aparato utilizado para síntese das nanopartículas de Ni(OH)₂ suportadas em carbo<u>no</u> Printex[®] 6L.



Fonte: Autoria própria.

3.3 Síntese do complexo N, N' - bis(salicilideno)etilenodiaminoníquel (II)

O complexo N, N' - bis(salicilideno)etilenodiaminoníquel (II) ([Ni(salen)]) foi produzido etapas. Inicialmente, ligante em duas 0 de salen (N, N' - bis(salicilideno)etilenodiamina) foi sintetizado a partir das soluções etanólicas de etilenodiamina e salicilaldeído nas proporções de 10/25 e 30/50 (vol/vol), respectivamente. Ambas as soluções foram misturadas gotejando lentamente a solução de etilenodiamina sobre a solução de salicilaldeído e refluxando durante 2 h a 40 °C sob atmosfera de N₂ (utilizado mesmo aparato mostrado na Figura 7). Finalmente, um precipitado amarelo foi obtido (ver Figura 8a), que foi filtrado, recristalizado em metanol e seco a temperatura ambiente [67].

Na segunda etapa, 100 mL de etanol foram adicionados em um balão de ebulição e tratados a 40 °C durante 30 min sob atmosfera de N₂. Subsequentemente, dissolveu-se 6,4 x 10^{-3} mol do ligante de salen sintetizado em 50 mL de etanol tratado, solução A; e os 50 mL restantes foram utilizados para solubilizar 6,4 x 10^{-3} mol de acetato de níquel (II), solução B. Ambas as soluções foram misturadas adicionando solução B na solução A. A mistura obtida foi submetida a refluxo com agitação mecânica durante 2 h a 40 ° C sob atmosfera de N₂ (utilizado mesmo aparato

mostrado pela **Figura 7**). O precipitado laranja obtido (**Figura 8b**), típico do complexo [Ni(salen)], foi filtrado, recristalizado em metanol e seco à temperatura ambiente [68].



Figura 8: Imagem do ligante a) e complexo [Ni(salen)] b) obtidos.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Técnicas de caracterização

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato (modelo PGSTAT302 Autolab[®], Holanda) controlado pelo software GPES (versão 4.9 - Eco Chemie, Holanda). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos utilizando grafite de lápis (Faber-Castell[®]), com diâmetro de 2 mm, como eletrodo de trabalho, uma folha de platina (2,25 cm²) como eletrodo auxiliar e um eletrodo Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) como eletrodo de referência.

Os materiais recém-sintetizados foram caracterizados por difração de raios-X (DRX). As análises foram conduzidas em um difractômetro Brucker D8 Advance operando a uma potência de 40kV/40 mA usando uma radiação Cu k α (λ = 1,5418 Å). Também foram realizados analises de DRX, em ângulo rasante, para o filme poli[Ni(salen)] ativado. Esta amostra foi preparada sobre uma placa de platina pura com dimensão 10 mm × 10 mm, conforme descrito na **seção 3.5**.

A medida por espectroscopia de FTIV *ex situ* foi feita em um espectrofotômetro Shimadzu modelo IRAffinity 1, utilizando pastilha da amostra diluída em KBr. Por outro lado, os espectros de ultravioleta-visíveis (UV-Vis) foram coletados em um espectrofotômetro JASCO V-630 com cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

A morfologia e tamanho de partícula, dos materiais recém-sintetizadas, foram avaliadas por Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de alta resolução (AR-MET) em um microscópio JOEL 2100 operando a 200 kV. Também foram coletados imagens de MET do filme poli[Ni(salen)] antes e após a estabilização em 1,0 mol L⁻¹ de NaOH, preparado como mostrado na **seção 3.5.**

As mudanças do monômero [Ni(salen)] após as etapas de eletropolimerização, ativação e estabilização também foram investigadas por XPS. A amostra do poli[Ni(salen)] foi preparada sobre uma placa de platina pura com dimensão 10 mm × 10 mm, conforme descrito na **seção 3.5**. As análises foram feitas usando um espectrômetro Scientia Omicron ECSA equipado com um analisador hemisférico EA 125 e uma fonte monocromática de raios-X modelo XM1000 usando uma radiação Al kα (1486,7 eV). O equipamento atuou com uma passagem de 50 eV de energia e com neutralizador Cn 10 Omicron Charge com energia de 1,6 eV. Varreduras amplas e varreduras de regiões elementares individuais foram obtidas com a passagem de energia de 0,5 e 0,05 eV, respectivamente. Os dados obtidos foram tratados usando o software Casa XPS[®]. O eixo de energia espectral foi calibrado em 284,8 eV para C 1_S. Finalmente, os picos foram simulados usando uma função hibrida Gaussiana-Lorentziana (GL30) com linha de base ajustada pelo método de Shirley.

O FTIV in situ foi empregado para avaliar o mecanismo de oxidação da FUR. Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula espectroeletroquímica de três eletrodos com uma janela IV de ZnSe à temperatura ambiente (25 ± 1 ° C), conforme mostrado na Figura 9. Outras informações da célula espectroeletroquímica podem ser obtidas na referência do trabalho de Iwasita e Nart [69]. Os mesmos eletrodos descritos na seção 3.5 foram usados também aqui, exceto o eletrodo de trabalho. Neste caso, a camada do EGM empregada ou um disco Ni*bulk* policristalino (usado para comparação), ambos com 7 mm de diâmetro, foram utilizados como eletrodos de trabalho, após a superfície dos substratos serem previamente polida com alumina 0,05 µM (Buehler) e limpas em banho ultrassônico com etanol seguido de água deionizada. O polimento dos substratos é um passo fundamental para garantir uma superfície espelhada, fundamental para as medições de FTIV por refletância. Ambos os eletrodos de trabalho foram gentilmente pressionados contra uma janela IV de ZnSe, formando uma fina película de eletrólito (1 a 10 µm) entre o eletrodo e a janela [69]. Os espectros foram coletados durante um experimento de varredura linear com potencial de 0,2 a 0,6 V vs. Ag/AgCI $(3,0 \text{ mol } L^{-1} \text{ KCI})$ a 2,0 mV s⁻¹ entre 4000 a 900 cm⁻¹ usando uma média de 32 interferogramas e resolução de 2 cm⁻¹.

29

Figura 9: Aparato espectroeletroquímico empregado nas medidas de espectroscopia de FTIV *in situ*.



Fonte: Autoria própria.

3.5 Preparação dos eletrodos e medidas eletroquímicas

A preparação do EGM para a detecção de FUR envolve três etapas, conforme apresentado na **Figura 10**: eletropolimerização, ativação e estabilização, que foram realizadas por voltametria cíclica (VC). Na etapa de eletropolimerização, 6 ciclos voltamétricos foram realizados em uma mistura contendo $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ do monômero [Ni(salen)] e 5,0 mg de NPs de Ni(OH)₂/C em 0,1 mol L⁻¹ solução PTBA / CH₃CN entre 0 V e 1,1 V a 100 mV s⁻¹; depois o eletrodo foi lavado com etanol e seco na temperatura ambiente. Na etapa de ativação, 100 ciclos foram realizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ de 0 V a 0,6 V a 50 mV s⁻¹. Finalmente, no passo de estabilização, foram executados 5 ciclos entre 0,2 e 0,6 V com o EGM em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹. Os outros parâmetros usados no estudo de otimização EGM são discutidos na **seção 4.2**.

Para a curva analítica, foi preparada uma solução estoque contendo 1×10^{-5} ,0 mol L⁻¹ de FUR (Lasix[®], 40 mg) em NaOH 1,0 mol L⁻¹. Este solvente foi escolhido devido à alta estabilidade e solubilidade deste analito em soluções alcalinas. As

medições foram realizadas usando VC a 50 mV s⁻¹ entre 0,2 e 0,6 V em 1,0 mol L⁻¹ de solução de NaOH com o mesmo tempo de agitação mecânica de 30 segundos entre as adições de FUR.

Figura 10: Diagrama esquemático da preparação do sensor eletroquímico baseado na eletropolimerização do monômero [Ni(salen)] na presença de nanopartículas de Ni(OH)₂/C.



Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização

Os difratogramas das NPs de Ni(OH)₂/C sintetizadas são mostrados na **Figura 11**. São observados picos mais largos em torno de $2\theta = 25 \circ e 2\theta = 43 \circ$ atribuídos aos planos cristalográficos (002) e (101) da estrutura hexagonal do carbono, respectivamente [70]. Os picos de difração em $2\theta = 17 \circ e 2\theta = 70 \circ são$ característicos dos planos cristalográficos (001) e (103 e / ou 200) da estrutura β-Ni(OH)₂, respectivamente[71]. Os outros picos em $2\theta = 33,8 \circ e 2\theta = 59 \circ$ podem ser atribuídos às fases α e β do Ni(OH)₂. Portanto, os dados de DRX sugerem que as NPs sintetizadas de Ni(OH)₂ são compostas por uma mistura de fases α-Ni(OH)₂ e β-Ni(OH)₂. Além disso, a ausência de picos acentuados de difração é uma evidencia de que as NPs de Ni(OH)₂ obtidas possuem domínios cristalino muito pequenos, como confirmado pelas imagens de MET (**Figura 11**).

Figura 11: (a) DRX das nanopartículas de Ni(OH)₂/C; a efeito de comparação, os padrões de DRX de α-Ni(OH)₂ (1), JCPDF 38-715 e β-Ni(OH)₂ (2), JCPDS 14-117, também são mostrados.



Fonte: Autoria própria.

As imagens de MET e AR-MET do carbono Printex[®] 6L puro (**Figura 12**) e Ni(OH)₂/C (**Figura 13** e **Figura 14**) foram obtidas para verificar a morfologia e tamanho médio das NPs de Ni(OH)₂ em carbono. Na **Figura 13** observa-se que as

nanopartículas de Ni(OH)₂ são esféricas e estão bem dispersas no carbono. A imagem AR-MET do carbono puro evidencia uma distância interplanar de cerca de 0,34 nm atribuída ao plano de reflexão (002) do carbono (**Figura 12b**) [72–74]. A **inserção** na **Figura 13** mostra o histograma de distribuição de tamanho de partícula de Ni(OH)₂, que indica um tamanho médio de 2,1 ± 0,3 nm. As imagens AR-MET (**Figura 14**) revelam franjas de rede com espaçamento interplanar de 0,21 nm (**Figura 14a**) correspondente ao plano (103) da fase α-3Ni(OH)₂.2H₂O [75] e com 0,23 nm (**Figura 14b**) correspondente ao plano cristalográfico (001) do β-Ni(OH)₂ [76]. Portanto, similarmente aos dados de DRX, as imagens de AR-MET também sugerem que o material obtido é composto por uma mistura das fases β-Ni(OH)₂ e α-Ni(OH)₂.

Figura 12: MET (a) e AR-MET (b) imagens do carbono Printex[®] 6L puro.



Fonte: Autoria própria.

Figura 13: Imagem de MET das nanopartículas de Ni(OH)₂/C com o histograma mostrado na inserção.



Fonte: Autoria própria.

Figura 14: Imagens de AR-MET das nanopartículas de Ni(OH)₂/C (a-b) juntamente com as imagens tratadas usando o software GATAN GMS 3 para calcular franjas de rede (c-f).



Fonte: Autoria própria.
O espectro de FTIV do complexo [Ni(salen)] diluído em KBr (**Figura 15**) exibiu algumas bandas de baixa intensidade nas regiões de 2800-3100 cm⁻¹, que correspondem ao estiramento CH de aromático (=CH) e bandas de estiramento de alifático (-CH) [77]. As bandas observadas na região de 1450 a 1600 cm⁻¹ são características de vibração de estiramento C-C no anel aromático [78]. A banda intensa em 1624 cm⁻¹ é atribuída às vibrações de estiramento dos grupos azometina que se deslocam para maior número de onda no complexo devido à coordenação dos átomos de nitrogênio com os íons de níquel [77]. A banda em 1127 cm⁻¹ é atribuída à vibração fenólica do estiramento C-O que sofre uma alteração para um número de onda mais baixo comparado ao ligante [79].



Figura 15: Espectro de FTIV ex situ do [Ni(salen)] diluído em pastilha de KBr.

Fonte: Autoria própria.

A **Figura 16** apresenta o espectro de absorção no UV-Vis do ligante e do [Ni(salen)]. Para o ligante, os dois picos largos observados em 255 e 318 nm são atribuídos à transição $\pi - \pi * [78]$. O pico em 406 nm, atribuído à transição n - $\pi * \acute{e}$ mais proeminente para o complexo [Ni(salen)] comparado ao ligante. O espectro para o complexo [Ni(salen)] mostra um pico em 330 nm, o qual está deslocado em relação ao pico do ligante livre para 318 nm. Isso é resultado da coordenação do íon de níquel com o ligante, que diminui a energia do orbital $\pi * e$, consequentemente, faz com que a transição $\pi - \pi *$ ocorra com energia mais baixa [80]. As medidas de difração de

raios-X para este complexo, **Figura 17**, revelam vários picos de reflexão característicos de uma estrutura cristalina bem organizada, sugerindo que essas NPs são agrupamentos do monômero [Ni(salen)], como já relatado na literatura [77].



Figura 16: Espectro de absorção no UV-Vis de 1,0 \times 10⁻⁵ mol L⁻¹ do ligante e do [Ni(salen)] em etanol.

Fonte: Autoria própria.



Figura 17: DRX do [Ni(salen)] sintetizado.

Fonte: Autoria própria.

As imagens de MET também foram utilizadas para verificar as características morfológicas do monômero [Ni(salen)] na presença / ausência de NPs de Ni(OH)₂/C, antes e após o processo de eletropolimerização. A **Figura 18a** mostra que as nanopartículas do monômero [Ni(salen)] puro são esféricas e apresentam tamanhos na ordem de 50 nm. Em contraste, a **Figura 18b** mostra que NPs alongadas são formadas como consequência da polimerização oxidativa do monômero [Ni(salen)]. Finalmente, a imagem de MET do filme poli[Ni(salen)] é exibido na **Figura 18c**. Aqui, novamente, as estruturas alongadas de poli[Ni(salen)] estão presentes, juntamente com as NPs de Ni(OH)₂ suportadas em carbono. O processo envolvido na formação do polímero será discutido a seguir.

Figura 18: Imagens de MET do monômero (a) [Ni(salen)], (b) filme de poli[Ni(salen)], (c) compósito do filme de poli[Ni(salen)] e de NPs Ni(OH)₂/C; d) Mecanismo de polimerização oxidativa eletroquímica do monómero [Ni(salen)] no eletrodo de grafite.



Fonte: Autoria própria.

O filme poli[Ni(salen)] após ter sido ativado e estabilizado eletroquimicamente em 1,0 mol L⁻¹ de NaOH, também foi caracterizado por DRX, MET e XPS, conforme exibido nas **Figuras 19-22**. É importante salientar aqui que essas caracterizações de DRX e XPS foram realizadas em uma folha de platina, enquanto que para as análises de MET, o filme foi preparado e ativado diretamente no grid.

Figura 19: (a) DRX do poli[Ni(salen)] eletropolimerizado sobre uma placa de platina após estabilização em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Imagens de MET do (b) poli[Ni(salen)] eletropolimerizado sobre grid após estabilização em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹ por voltametria cíclica, (c) EDX das NPs Ni(OH)₂ formadas sobre o filme de poli[Ni(salen)].



Fonte: Autoria própria.

As medidas de difração de raios-X para o poli[Ni(salen)] ativado e estabilizado sobre uma folha de platina em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹ por voltametria cíclica, **Figura 19a**, revelam picos na região de $2\theta = 10^{\circ}$ e 15 ° que podem

ser atribuídos, respectivamente, aos planos cristalográficos (001) e (003) da estrutura α-Ni(OH)₂ [57,81], indicando uma mudança da estrutura do filme polimérico.

As imagens de MET também foram utilizadas para verificar as características morfológicas do filme de poli[Ni(salen)] após a etapa de estabilização. A **Figura 19b** e a **inserção** na **Figura 19b** mostram a formação de partículas de Ni(OH)₂ dispersas sobre o nano filme polimérico e o histograma de distribuição de tamanho de partícula indicando um tamanho médio de 2,4 ± 0,5 nm, respectivamente. As análises de EDX confirmam que a composição química destas NPs inclui espécies de níquel, **Figura 19c**.

As investigações das mudanças na estrutura dos nano filmes poliméricos também foram realizadas por meio da análise dos estados de valência dos átomos de Ni, C, N, O, refletidos por suas respectivas bandas nos espectros de fotoelétrons de raios-X. Os espectros de varreduras amplas e os espectros das regiões elementares individuais do C 1s, N 1s, O 1s e Ni 2p do monômero [Ni(salen)] e poli[Ni(salen)] após estabilização em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹ por voltametria cíclica são apresentados nas **Figuras 20-22.**



Figura 20: Espectros de XPS de varreduras amplas.

Fonte: Autoria própria.

Os espectros de XPS de varreduras amplas (Figura 20) mostram claramente que há uma mudança na estrutura e composição atômica do complexo polimérico após a etapa de estabilização que é atribuída à formação de espécies mais 40 oxigenadas de níquel, conforme mostra os dados de concentração percentual atômica inseridos no gráfico. Podemos notar no espectro de varreduras amplas do poli[Ni(salen)] a presença de um pico na região de energia do Na 1s que é atribuído ao sódio do hidróxido de sódio usado como eletrólito nas etapas de ativação e estabilização. Na **Figura 21**, o espectro na região de energia do N 1s do monômero [Ni(salen)] apresenta um pico a 397,45 eV que desaparece no poli[Ni(salen)] após a etapa de estabilização em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹, provavelmente devido à ruptura das ligações N-C, N-Ni [82].



Figura 21: Espectros de XPS das regiões elementares individuais do N 1s.

Fonte: Autoria própria.

O espectro de XPS em alta resolução na região de energia Ni 2p do monômero (**Figura 22**) mostra claramente a presença de um pico a 853,53 eV sem satélite, que é característico de complexos quadrado-planares de Ni(II). Em contraste, o espectro de XPS na região de energia de Ni 2p do poli[Ni(salen)] apresenta um pico a 855,53 eV com presença de um pico satélite a 861,38 eV que é característico de espécies de níquel com estado de oxidação similar ao hidróxido de níquel, que surge devido à quebra da ligação que ocorre entre o metal e o ligante [83]. Portanto, estes resultados em conjunto com os dados DRX são evidencias claras de que as NPs observadas nas micrografias para o poli[Ni(salen)] ativado são NPs de Ni(OH)₂.

Além disso, o pico satélite localizado entre 6 e 8 eV de energia de ligação mais alta que o pico principal é atribuído a divisão múltipla nos níveis de energia dos metais de transição, e é tipicamente usado para confirmar a presença de níquel divalente [84]. No entanto, a quantificação dos estados químicos do Ni a partir das características do espectro de XPS do Ni 2p tem um alto grau de incerteza devido às assimetrias de pico, complexação múltipla complexa, estrutura de perda de agitação / sobreposição de Plasmo e sobreposição de energias [83].



Figura 22: Espectros de XPS das regiões elementares individuais do Ni 2p.

Fonte: Autoria própria.

4.2 Otimização das condições para a preparação do sensor EGM

O comportamento eletroquímico dos eletrodos de grafite de lápis (EG) foi investigado antes e após modificações por polimerização eletroquímica para formar os filmes poli[Ni(salen)]. Essas eletropolimerizações foram feitas na presença e ausência de carbono ou de NPs de Ni(OH)₂/C, e os processos envolvidos foram seguidos por curvas de VC em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ entre 0 e 0,6 V a 50 mV s⁻¹. É muito importante enfatizar que os voltamogramas cíclicos dos EGs modificados apresentados aqui foram obtidos após a etapa de estabilização (ver item **3.5**).

Como mostrado na **Figura 23**, para todos os EG modificados com filme de poli[Ni(salen)], um par redox é aparente, como tipicamente visto para espécies de hidróxido de níquel. Para os outros EG modificados, foram obtidos perfis voltamétrico

qualitativos semelhantes. Um aumento na corrente para o EG modificado por eletropolimerização na presença de carbono Printex[®] 6L é observado e isto pode ser devido a uma melhora na distribuição do filme de poli[Ni(salen)] por causa da alta área superficial do carbono e o aumento da condutividade. Eletrodo de grafite modificado com filme poli[Ni(salen)] e NPs de Ni(OH)₂/C (EGM) apresenta as maiores correntes redox, de modo que o valor da corrente de pico anódico é cerca de 114% maior do que o EG modificado com [Ni(salen)] e carbono. Esse aumento de corrente pode ser provavelmente atribuído a um aumento nas áreas eletroquímicas desse eletrodo, devido à incorporação simultânea de NPs de Ni(OH)₂ e carbono no filme de poli[Ni(salen)], resultando em um sensor com maior sensibilidade. Como relatado anteriormente, durante o ciclo potencial em solução alcalina, a película de poli[Ni(salen)] sofre clivagem das ligações de coordenação de níquel-nitrogênio levando à formação de Ni(OH)₂ [85], que são retidas pela matriz polimérica.

Figura 23: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite de lápis não modificado e modificados, realizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ de 0,2 a 0,6 V a 50 mV s⁻¹ (5º ciclo).



Fonte: Autoria própria.

A eficiência do eletrodo de um sensor eletroquímico depende de sua composição química e morfologia, que são determinadas pelos parâmetros e técnicas de preparação. Assim, o efeito do intervalo de potencial e do número de ciclos das

etapas de eletropolimerização e ativação foram investigados primeiramente visando otimizar a resposta eletrocatalítica para detecção e quantificação de FUR.

Na **Figura 24**, o quinto ciclo dos voltamogramas obtidos durante a polimerização oxidativa eletroquímica em solução de 0,1 mol L⁻¹ PTBA / CH₃CN saturada com N₂ a 100 mV s⁻¹ em diferentes intervalos de potencial são mostrados. Para todos os perfis de VC, observa-se um par redox devido à polimerização do monômero [Ni(salen)], que resulta na formação de um filme laranja escuro na superfície do eletrodo.

Figura 24: Voltamogramas cíclicos dos EGMs obtidos durante a etapa de eletropolimerização do monômero [Ni(salen)] e das NPS Ni(OH)₂/C em solução de PTBA/CH₃CN 0,1 mol L⁻¹ saturada com N₂ a 100 mV s⁻¹ para cada intervalo de potencial estudado.



Fonte: Autoria própria.

Na **Figura 25**, os resultados mostram que para toda a gama de potenciais, um crescimento consecutivo da corrente de pico só é observado após o primeiro ciclo de varredura, sugerindo que a deposição contínua do compósito na superfície do eletrodo ocorre somente após o segundo ciclo. Foi proposto que o monômero [Ni(salen)] é adsorvido na superfície do eletrodo durante varredura positiva de potencial e os monômeros [Ni(salen)] em solução reagem com este monômero adsorvido levando à eletropolimerização via empilhamento dos monômeros, como visto nas **Figuras 18b**

e **18c**. O mecanismo envolvido neste processo é o resultado das interações entre os centros metálicos dos monômeros, que atuam como doadores e receptores. Estes agregados supramoleculares são formados somente quando ocorre a oxidação do centro metálico concomitantemente com a orientação correta do ligante e do centro metálico do monômero adjacente [86].

Figura 25: Voltamogramas cíclicos para o EGM obtido durante a eletropolimerização de 0 a 1,1 V em solução de 0,1 mol L⁻¹ de PTBA / CH₃CN saturada com N₂ a 100 mV s⁻¹.



Fonte: Autoria própria.

A **Figura 26** mostra os voltamogramas cíclicos dos EG modificados em diferentes intervalos de potencial (de 0 V a 1,0 - 1,4 V) após as etapas de ativação e estabilização realizadas em NaOH 1,0 mol L⁻¹. Observa-se que os picos de corrente de oxidação e redução são maiores para as EGMs preparados em potenciais finais menores durante a etapa de eletropolimerização. A diminuição da resposta eletrocatalítica observada dos EGMs confeccionados com maiores limites de potenciais pode ser explicada pelos seguintes fatos: (1) aumento da espessura da camada catalítica com / sem empacotamento, que pode dificultar o transporte de carga e massa; (2) formação de um compósito cujas espécies de níquel-oxigênio são menos eletroativas por causa da oxidação excessiva dos centros ativos. Portanto, estes resultados mostram que o EGM com maior corrente de pico redox é precisamente o eletrodo preparado usando o menor intervalo de potencial.

Figura 26: Voltamogramas cíclicos dos EGMs eletropolimerizados em diferentes intervalos de potencial (5º ciclo) estabilizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹.



Fonte: Autoria própria.

Para o filme apresentando as maiores correntes de pico redox, o efeito do número de ciclagem utilizado na etapa de eletropolimerização na resposta eletrocatalítica do eletrodo foi avaliado em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹, como mostrado na Figura 27. Um aumento das correntes de pico é visto quando se utiliza até seis ciclos de varredura no processo de eletropolimerização (inserção da Figura 27), e isso pode ser atribuído a um aumento do conteúdo de material ativo na superfície do eletrodo. Por outro lado, um aumento adicional no número de ciclos pode levar a um aumento da espessura do filme, podendo ainda ser acompanhado pela compressão da estrutura do filme, que poderia isolar o centro Ni-ativo em relação ao eletrólito, como sugerido pelos baixos valores de corrente. Além disso, um deslocamento de potenciais para valores mais altos também é visto, provavelmente causado por um aumento da condutividade elétrica / eletrolítica ao longo da espessura do filme [87]. Assim sendo, o intervalo de potencial entre 0 a 1,1 V e usando seis ciclos de varredura podem ser considerados como parâmetros ótimos para a eletropolimerização do compósito no EG, de modo que isso foi usado para experimentos posteriores.

Figura 27: Voltamogramas cíclicos dos EGMs estabilizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹ eletropolimerizados de 0 a 1,1 V submetidos à diferentes números de ciclos.



Fonte: Autoria própria.

A **Figura 28** apresenta os VCs dos EGMs estabilizados em solução de NaOH a 1,0 mol L⁻¹ após o passo de ativação compreendendo 150 ciclos de 0 V a 0,50, 0,55 ou 0,60 V a 50 mV s⁻¹. Observa-se um aumento nos valores da corrente de pico com o aumento do potencial final e isso pode ser devido à formação de outras fases do níquel e / ou estruturas morfológicas e cristalográficas distintas (conforme dados de DRX, MET e XPS, consultar **seção 4.1**) que são mais eletroativas devido à melhoria do mecanismo de condução do elétron, como relatado anteriormente [58,88].

Figura 28: Voltamogramas cíclicos dos EGMs estabilizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹ submetidos à intervalos de potencial diferentes na etapa de ativação.



Fonte: Autoria própria.

A **Figura 29** mostra que a estabilidade da EGM em relação ao ciclo de potencial na faixa de 0,2 a 0,6 V é satisfatória, uma vez que nenhuma alteração nos perfis de voltametria é observada após os primeiros ciclos, de forma que os outros VCs (2° a 5°) são quase indistinguíveis. Por fim, 100 ciclos de 0 V a 0,6 V foram adotados como parâmetro ótimo para a etapa de ativação, enquanto 5 ciclos na faixa de 0,2 a 0,6 V foram padronizados para a etapa de estabilização.

Figura 29: Voltamogramas cíclicos do EGM obtidos durante a etapa de estabilização em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ de 0 a 1,1 V a 50 mV s⁻¹.



Fonte: Autoria própria.

4.3 Estudo do processo de eletro-oxidação da FUR por espectroscopia de FTIV *in situ*

O processo de oxidação de FUR no EGM foi investigado por FTIV *in situ*. Na **Figura 30** estão os espectros de FTIV obtidos na ausência (**Figura 30a**) ou presença (**Figura 30b**) de FUR e na **Figura 30d** está a porção anódica do VC. Um pequeno aumento das correntes VC (**Figura 30d**) é observado devido à presença de FUR. Por outro lado, em ambos os espectros de FTIV, observa-se uma banda em 2169 cm⁻¹ de estiramento de íons CN⁻ [89], que aparece apenas quando o eletrodo é mantido polarizado a 0,6 V por 5 minutos (ver **Tabela 2**). Os espectros de FTIV para o EGM com apenas o filme de poli[Ni(salen)] em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹, **Figura 31**, confirmam que o aparecimento desta banda está relacionado a mudanças ocorridas no filme de poli[Ni(salen)], em concordância com os resultados de DRX, MET e XPS (ver **seção 4.1** e **Figura 319-22**). Apesar disso, os resultados de estabilidade do sensor (**seção 4.4** e a **Figura 33b**) inequivocamente indicam que o sensor é estável nestas condições para oxidação de FUR.

A **Figura 30c** compara os espectros de FTIV coletados com o eletrodo polarizado a 0,6 V por 5 minutos na ausência e presença de FUR. As bandas em 1561 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento assimétrico de carboxilatos e / ou

carbonatos, enquanto as bandas de 1382 e 1402 cm⁻¹ são características de estiramento simétrico dos mesmos grupos [90,91]. Além disso, as bandas em 1468 cm⁻¹ (negativa) e 1481 cm⁻¹ estão relacionadas à deformação do grupo CH₂ [92] e ao estiramento de aminas em anéis aromáticos [93], respectivamente.

Figura 30: Espectros de FTIV *in situ* do EGM obtidos de 0,2 a 0,6 V vs Ag / AgCl (KCl 3 M) a 2 mV s⁻¹ em (a) solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e (b) NaOH 1,0 mol L⁻¹ + 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ de FUR. (c) Também são mostrados os espectros em ambas as condições coletados com o potencial mantido em 0,6 V por 5 minutos. (d) porção anódica do VC com presença de FUR. (e) Mecanismo proposto para a oxidação da FUR.



Fonte: Autoria própria.

É importante notar que o estiramento simétrico de C-O na banda de carbonato e / ou carboxilato na ausência de FUR está em uma região de número de onda um pouco menor (1382 cm⁻¹, comparado a 1402 cm⁻¹ no outro caso). Su *et al.* analisaram uma amostra de carbonato (Na₂CO₃) em diferentes concentrações de solução de NaOH e observaram que para a solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹os valores das bandas de carbonatos estavam em 1382 cm⁻¹ [94]. Portanto, a diferença no número de onda das bandas entre os espectros do EGM em NaOH na presença e ausência de FUR é consistente com duas situações: (i) o estiramento de C-O em 1382 cm⁻¹ é atribuído a espécies de carbonato; (ii) o alongamento de C-O em 1402 cm⁻¹ é devido à presença de carboxilato.

	Numero de onda (cm⁻¹)	Atribuiçao
	2169	Estiramento do CN⁻
	1561	Estiramento simétrico e assimétrico de carbonatos e / ou carboxilatos
	1382	Estiramento assimétrico de carbonatos e / ou carboxilatos
	1402	Estiramento simétrico de carbonatos e / ou carboxilatos
	-1468	Deformação do grupo CH ₂
	1481	Estiramento de aminas em anéis aromáticos
	-1662	Flexão O-H de água
	1397	Vibração de C-O de carboxilatos

Tabela 2 – Atribuição das bandas dos espectros de FTIV *in situ*.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31: Espectros de FTIV *in situ* obtidos durante a oxidação da FUR de 0,2 a 0,6 V a 2,0 mV s⁻¹ em EGM modificado apenas com poli[Ni(salen)] estabilizado em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹.



Fonte: Autoria própria.

Eletrodos baseados em carbono, como é o caso do material que contém Ni(OH)₂, sofrem oxidação em altos potenciais à CO₂, que é rapidamente convertido à CO₃-² em meio alcalino por um processo químico. Assim, devido à dificuldade de se atribuir as bandas às espécies carboxilato ou carbonato, também foram feitas medições FTIV *in situ* utilizando níquel *bulk* e os resultados são apresentados na **Figura 32.** Aqui, as bandas em 1662 (negativo) e 1397 cm⁻¹ são características de vibração de dobramento de OH de água e estiramento da vibração de C-O de carboxilatos, respectivamente [90,91]. A banda em 1662 cm⁻¹, que aparece pouco após de 0,2 V, sugere que a reação de oxidação da FUR sobre o Ni *bulk* envolve o consumo de espécies de OH⁻.



Figura 32: Espectros de FTIV *in situ* obtidos durante a oxidação da FUR de 0,2 a 0,6 V a 2,0 mV s⁻¹em Ni-*bulk* estabilizado em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹.

Fonte: Autoria própria.

Em suma, as medidas por FTIV *in situ* indicam que a eletro-oxidação de FUR em EGM envolve o consumo de espécies hidroxila (1662 cm⁻¹), consumo do grupo CH₂ (1468 cm⁻¹), formação de aminas aromáticas (1481 cm⁻¹) e a formação de carboxilatos (1561 cm⁻¹ e 1402 cm⁻¹). Portanto, os resultados espectroscópicos, juntamente com as medidas eletroquímicas, evidenciam que a oxidação FUR ocorre nas espécies oxigenadas de níquel presentes no EGM, cuja oxidação leva a uma quebra de ligação química entre a amina e a metila (R-NH₂-CH₂-R') resultando em 2amino-4-cloro-5-sulfamoilbenzoato e 5-hidroxi-furano-2-carboxilato, como mostrada na **Figura 30e**.

4.4 Avaliação da repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do EGM

A repetibilidade e reprodutibilidade do EGM foram avaliadas por medidas contínuas de VC para várias concentrações de FUR em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de 0,2 e 0,6 V a 50 mV s⁻¹ (**Figura 33a**) conforme método

descrito por Miller e Miller [95]. A repetibilidade foi verificada usando o mesmo eletrodo (medição intra-eletrodo), onde 5 medições da resposta de corrente de oxidação da FUR resultaram em um desvio padrão relativo (RSD) tão baixo quanto 3,1%. Para o estudo de reprodutibilidade, 5 medições com EGMs diferentes estabilizados (medição inter-eletrodo) foram conduzidas nas mesmas condições. Os resultados mostram que o sensor proposto apresenta um valor satisfatório de RSD de 4,7%.

A estabilidade do EGM recém preparado foi investigada por meio de VCs após a etapa de ativação, onde 100 ciclos de potenciais consecutivos foram realizados em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ de 0,2 a 0,6 V a 50 mV s⁻¹, como mostrado na **Figura 33b**. Durante as ciclagens de potenciais não houve alterações significativas da corrente de pico redox; desta forma, concluiu-se que o EGM tem boa estabilidade e pode ser aplicado de forma confiável como sensor para detecção de FUR.





Fonte: Autoria própria.

4.5 Curva analítica para detecção de furosemida

Para obter a curva analítica, foram realizadas medidas de VC entre 0,2 e 0,6 V a 50 mV s⁻¹ para o sensor EGM otimizado em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ com adições sucessivas de FUR, como mostrado na **inserção** da **Figura 34**. Os resultados obtidos mostram uma relação linear entre a corrente de pico anódico e a concentração de FUR para a faixa de 2,5 × 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ a 2,7 × 10⁻⁹ mol L⁻¹ ([a] \rightarrow [k]), sendo a equação de regressão linear Δ IPA = 17090C_{FUR} + 6 × 10⁻⁷ (R² = 0,997, N = 11). O limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados em 1,4 × 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ e 4,8 × 10⁻¹⁰ mol L⁻¹, respectivamente, calculados de acordo com o método estatístico de mínimos quadrados descrito por Miller e Miller [95] usando as equações:

 $y - y_B = 3 s_b$ (Equação 1) $y_B + 10 s_b$ (Equação 2)

com o valor de y_B (= a) e s_B (=s_{y/x}). Sendo a o intercepto do eixo y e s_{y/x} o desvio padrão estimado para a variação de erros normalmente distribuída apenas na direção y.

Os valores de LOQ e LOD obtidos são expressivamente menores do que os relatados na literatura.

Figura 34: Curva analítica do sensor EGM para a determinação da FUR obtida de 0,2 a 0,6 V a 50 mV s⁻¹. A porção anódica dos voltamogramas cíclicos é mostrada na inserção.



Fonte: Autoria própria.

4.6 Estudos de interferência

A seletividade do sensor EGM foi avaliada para cinco substâncias interferentes, possivelmente presentes na urina, na concentração de $1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ por VC e os resultados foram comparados / normalizados com o pico de oxidação da FUR pura a $2,7 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Na **Figura 35**, observa-se um aumento do sinal relativo de cerca de 2,5, 5,0, 3,6, 2,7 e 2,7% após a adição de ácido úrico, glicose, ácido oxálico, ácido ascórbico e ácido cítrico, respectivamente. Finalmente, nenhum pico adicional foi detectado no intervalo de potencial estudado para os compostos interferentes, sugerindo uma especificidade do sistema na detecção da FUR.

Figura 35: Variação do sinal de possíveis interferentes para o sensor EGM investigado por voltametria cíclica em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ de 0,2 a 0,6 V a 50 mV s⁻¹ com 2,7 × 10⁻⁹ mol L⁻¹ FUR e 1,2 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ de interferentes (interferentes: ácido úrico; glicose; ácido oxálico; ácido ascórbico; ácido cítrico).



Fonte: Autoria própria.

Capítulo 5 – Conclusões

5 CONCLUSÕES

A síntese elaborada de um eletrodo de grafite de lápis modificado por eletropolimerização do monômero [Ni(salen)] na presença de uma mistura de nanopartículas de α e β -Ni(OH)₂ com tamanho médio de 2,1 nm em carbono resultou em um sensor muito sensível para quantificação da FUR, o que possibilita seu emprego também no controle do *doping* esportivo. As superfícies nanoestruturadas apresentaram um comportamento bastante catalítico por meio da oxidação da molécula orgânica, gerando a detecção eletroanalítica com o menor limite de detecção disponível na literatura ($1,4 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹). Isso foi associado ao mecanismo de eletro-oxidação, conforme determinado por medidas espectroscopia de FTIV *in situ*. Estes estudos indicaram que as espécies oxigenadas de níquel são ativas para oxidação em meio alcalino da FUR conduzindo a formação de 2-amino-4-cloro-5-sulfamoilbenzoato e 5-hidroxi-furano-2-carboxilato. O sensor eletroquímico mostrou excelente estabilidade e baixa sensibilidade para moléculas interferentes selecionadas de interesse.

Capítulo 6 – Referências

6 REREFÊNCIAS

1 MEDEIROS, R.A.; BACCARIN, M.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA-FILHO, R.C.; DESLOUIS, C.; DEBIEMME-CHOUVY, C. Comparative study of basal-plane pyrolytic graphite, boron-doped diamond, and amorphous carbon nitride electrodes for the voltammetric determination of furosemide in pharmaceutical and urine samples. **Electrochimica Acta**, v. 197, p. 179–185, 2016.

2 HEIDARIMOGHADAM, R.; FARMANY, A. Rapid determination of furosemide in drug and blood plasma of wrestlers by a carboxyl-MWCNT sensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1242–1245, 2016.

3 ESPINOSA BOSCH, M.; RUIZ SÁNCHEZ, A.J.; SÁNCHEZ ROJAS, F.; BOSCH OJEDA, C. Recent developments in analytical determination of furosemide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 519–532, 2008.

4 BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11.ed. New York: McGraw-Hill, 2005. 1984 p.

5 CADWALLADER, A.B.; DE LA TORRE, X.; TIERI, A.; BOTRÈ, F. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, p. 1–16, 2010.

6 FURLANELLO, F.; SERDOZ, L.V.; CAPPATO, R.; DE AMBROGGI, L. Illicit drugs and cardiac arrhythmias in athletes. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v. 14, p. 487–494, 2007.

7 VENTURA, R.; SEGURA, J. Detection of diuretic agents in doping control. **Journal** of Chromatography B: Biomedical Applications, v. 687, p. 127–144, 1996.

8 TROUT, G.J.; KAZLAUSKAS, R. Sports drug testing: an analyst's perspective. **Chemical Society Reviews**, v. 33, p. 1–13, 2004.

9 WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). **Prohibited list documents.** Montreal, 2018. Disponível em: https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents. Acesso em: 2 jul. 2018.

10 FARTHING, D.O.N. External-standard high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 569–571, 1992.

11 YOUM, I.; YOUAN, B.-B.C. Validated reverse-phase high-performance liquid chromatography for quantification of furosemide in tablets and nanoparticles. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

12 BONET DOMINGO, E.; MEDINA HERNÁNDEZ, M.J.; RAMIS RAMOS, G.; GARCÍA ALVAREZ-COQUE, M.C. High-performance liquid chromatographic determination of diuretics in urine by micellar liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 582, p. 189–194, 1992.

13 CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C. Furosemide assay in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography: Study of the stability of the drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 803–817, 2000.

14 DIAS, I.L.T.; MARTINS, J.L.S.; DE NETO, G.O. Furosemide determination by firstderivative spectrophotometric method. **Analytical Letters**, v. 38, p. 1159–1166, 2005.

15 GÖLCÜ, A. Spectrophotometric determination of furosemide in pharmaceutical dosage forms using complex formation with Cu(II). **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, p. 748–754, 2006.

16 IDRIS, A.M.; ELGORASHE, R.E.E. Eco-friendly, cost-effective and fast method for the estimation of furosemide and amiloride in tablet formulation by sequential injection chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1193–1198, 2014.

17 ZHANG, Z.D.; BAEYENS, W.R.G.; ZHANG, X.R.; VAN DER WEKEN, G. Chemiluminescence flow-injection analysis of captopril applying a sensitized rhodamine 6G method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 939–945, 1996.

18 XI, J.; JI, X.; ZHANG, S.; AI, X.; HE, Z. Investigation of RuBPS-Ce(IV) chemiluminescence reaction and its application in determination of two diuretics. **Analytica Chimica Acta**, v. 541, p. 193–198, 2005.

19 LUIS, M.L.; FRAGA, J.M.G.; JIMÉNEZ, A.I.; JIMÉNEZ, F.; HERNÁNDEZ, O.; ARIAS, J.J. Application of PLS regression to fluorimetric data for the determination of furosemide and triamterene in pharmaceutical preparations and triamterene in urine. **Talanta**, v. 62, p. 307–316, 2004.

20 LIU, Y.; WANG, H.; WANG, J.; LI, Y. A simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of furosemide using zinc(II)-1,4-bis(imidazol-1-ylmethyl)benzene complexes. **Luminescence**, v. 28, p. 882–887, 2013.

21 SIRÉN, H.; SHIMMO, R.; SIPOLA, P.; ABENET, S.; RIEKKOLA, M.L. Capillary electrophoresis of diuretics and probenecid in methanol. **Journal of Chromatography A**, v. 1198–1199, p. 215–219, 2008.

22 CASLAVSKA, J.; THORMANN, W. Rapid analysis of furosemide in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence and electrospray ionization-ion trap mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 207–216, 2002.

23 JACOBS, C.B.; PEAIRS, M.J.; VENTON, B.J. Review: carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 105–127, 2010.

24 LIU, X.; LILLEHOJ, P.B. Embroidered electrochemical sensors on gauze for rapid quantification of wound biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p. 189–194, 2017.

25 JIN, M.; ZHANG, X.; ZHEN, Q.; HE, Y.; CHEN, X.; LYU, W.; HAN, R.; DING, M. An electrochemical sensor for indole in plasma based on MWCNTs-chitosan modified screen-printed carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p. 392–397, 2017.

26 RONKAINEN, N.J.; HALSALL, H.B.; HEINEMAN, W.R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 1747, 2010.

27 BOBACKA, J.; IVASKA, A.; LEWENSTAM, A. Potentiometric ion sensors. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 329–351, 2008.

28 WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 47–53, 1999.

29 KASSAL, P.; STEINBERG, M.D.; STEINBERG, I.M. Wireless Chemical Sensors and Biosensors: a review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 266, p. 228-245, 2018.

30 HUSSAIN, M.; RUPP, F.; WENDEL, H.P.; GEHRING, F.K. Bioapplications of acoustic crystals, a review. **TrAC - Trends In Analytical Chemistry**, v. 102, p. 194–209, 2018.

31 BAGHERI, H.; HAJIAN, A.; REZAEI, M.; SHIRZADMEHR, A. Composite of Cu metal nanoparticles-multiwall carbon nanotubes-reduced graphene oxide as a novel and high performance platform of the electrochemical sensor for simultaneous determination of nitrite and nitrate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 762–772, 2017.

32 WANG, H.; YAO, S.; LIU, Y.; WEI, S.; SU, J.; HU, G. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on Au nanoparticles in carboxylated multi-walled carbon nanotubes for sensitive determination of olaquindox in food and feedstuffs. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 417–421, 2017.

33 WANG, D.; HUANG, B.; LIU, J.; GUO, X.; ABUDUKEYOUMU, G.; ZHANG, Y.; YE, B.-C.; LI, Y. A novel electrochemical sensor based on Cu@Ni/MWCNTs nanocomposite for simultaneous determination of guanine and adenine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 389–395, 2018.

34 KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 146, p. 181–187, 2016.

35 BENJAMIN, M.; MANOJ, D.; THENMOZHI, K.; BHAGAT, P.R.; SARAVANAKUMAR, D.; SENTHILKUMAR, S. A bioinspired ionic liquid tagged cobalt-salophen complex for nonenzymatic detection of glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 380–387, 2017.

36 XU, G.; JARJES, Z.A.; DESPREZ, V.; KILMARTIN, P.A.; TRAVAS-SEJDIC, J. Sensitive, selective, disposable electrochemical dopamine sensor based on PEDOT-modified laser scribed graphene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 107, p. 184–191, 2018.

37 TIDWELL, T.T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of β-lactam synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, p. 1016–1020, 2008.

38 LYASKOVSKYY, V.; DE BRUIN, B. Redox non-innocent ligands: versatile new tools to control catalytic reactions. **ACS Catalysis**, v. 2, p. 270–279, 2012.

39 CLARKE, R.M.; HERASYMCHUK, K.; STORR, T. Electronic structure elucidation in oxidized metal–salen complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 67–82, 2017.

40 NOVOZHILOVA, M. V.; SMIRNOVA, E.A.; KARUSHEV, M.P.; TIMONOV, A.M.; MALEV, V. V.; LEVIN, O. V. Synthesis and study of catalysts of electrochemical oxygen reduction reaction based on polymer complexes of nickel and cobalt with Schiff bases. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 52, p. 1183–1190, 2016.

41 ALEKSEEVA, E. V.; CHEPURNAYA, I.A.; MALEV, V. V.; TIMONOV, A.M.; LEVIN, O. V. Polymeric nickel complexes with salen-type ligands for modification of supercapacitor electrodes: impedance studies of charge transfer and storage properties. **Electrochimica Acta**, v. 225, p. 378–391, 2017.

42 DHAR, D.N.; TAPLOO, C.L. Schiff bases and their applications. **Journal Scientific & Industrial Research**, v. 41, p. 501–506, 1982.

43 PRZYBYLSKI, P.; HUCZYNSKI, A.; PYTA, K.; BRZEZINSKI, B.; BARTL, F. Biological properties of schiff bases and azo derivatives of phenols. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 124–148, 2009.

44 JIA, Y.; LI, J. Molecular assembly of Schiff base interactions: construction and application. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1597–1621, 2015.

45 DE TOLEDO, T.A.; DA COSTA, R.C.; DA SILVA, L.E.; TEIXEIRA, A.M.R.; LIMA, V.N.; SENA, D.M.; COUTINHO, H.D.M.; FREIRE, P.T.C.; PIZANI, P.S. Thermal and biological properties of the Schiff base N,N'-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine, a potential adjuvant to antibiotic therapy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1115, p. 105–108, 2016.

46 ZHANG, J.; XU, L.; WONG, W.Y. Energy materials based on metal Schiff base complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 355, p. 180–198, 2018.

47 KILINÇ, D.; ŞAHIN, Ö. Synthesis of polymer supported Ni (II)-Schiff Base complex and its usage as a catalyst in sodium borohydride hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, p. 1–11, 2018.

48 DENG, F.; LI, X.; DING, F.; NIU, B.; LI, J. Pseudocapacitive energy storage in Schiff Base polymer with salphen-type ligands. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, p. 5325–5333, 2018. 49 SONKAR, P.K.; GANESAN, V.; PRAJAPATI, A. Polymeric Co(salen) scaffold for the electrochemical determination of acetaminophen in pharmaceutical sample. **Ionics**, v. 22, p. 1741–1749, 2016.

50 SUI, Y.; LI, D.P.; LI, C.H.; ZHOU, X.H.; WU, T.; YOU, X.Z. Ionic ferroelectrics based on nickel schiff base complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 1286–1288, 2010.

51 CHEN, C.; LI, X.; DENG, F.; LI, J. Electropolymerization and electrochemical behavior of nickel Schiff base complexes with different groups between imine linkages. **RSC Advances**, v. 6, p. 79894–79899, 2016.

52 IONESCU, A.; LENTO, R.; MASTROPIETRO, T.F.; AIELLO, I.; TERMINE, R.; GOLEMME, A.; GHEDINI, M.; BELLEC, N.; PINI, E.; RIMOLDI, I.; GODBERT, N. Electropolymerized highly photoconductive thin films of cyclopalladated and cycloplatinated complexes. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, p. 4019– 4028, 2015.

53 IONESCU, A.; AIELLO, I.; LA DEDA, M.; CRISPINI, A.; GHEDINI, M.; DE SANTO, M.P.; GODBERT, N. Near-IR electrochromism in electrodeposited thin films of cyclometalated complexes. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, p. 12272–12281, 2016.

54 ZHANG, J.; SHANGGUAN, L.; SHUANG, S.; DONG, C. Electrocatalytic oxidation of formaldehyde and methanol on Ni(OH)₂/Ni electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 49, p. 888–894, 2013.

55 JOTHI, L.; JAYAKUMAR, N.; JAGANATHAN, S.K.; NAGESWARAN, G. Ultrasensitive and selective non-enzymatic electrochemical glucose sensor based on hybrid material of graphene nanosheets/graphene nanoribbons/nickel nanoparticle. **Materials Research Bulletin**, v. 98, p. 300–307, 2018.

56 WEN, X.; XI, J.; LONG, M.; TAN, L.; WANG, J.; YAN, P.; ZHONG, L.; LIU, Y.; TANG, A. Ni(OH)₂/Ni based on TiO₂ nanotube arrays binder-free electrochemical sensor for formaldehyde accelerated detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 805, p. 68–74, 2017.

57 HALL, D.S.; LOCKWOOD, D.J.; BOCK, C.; MACDOUGALL, B.R. Nickel hydroxides and related materials: a review of their structures, synthesis and properties. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 471, p. 20140792–20140792, 2014.

58 BODE, H.; DEHMELT, K.; WITTE, J. Zur kenntnis der nickelhydroxidelektrode— I.Über das nickel (II)-hydroxidhydrat. **Electrochimica Acta**, v. 11, p. 1079–1087, 1966.

59 BARROSO, M.B.; ALONSO, R.M.; JIMÉNEZ, R.M. Electrochemical determination of the loop diuretics piretanide and furosemide in pharmaceutical formulations and urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, p. 332–339, 1995.

60 MALODE, S.J.; ABBAR, J.C.; SHETTI, N.P.; NANDIBEWOOR, S.T. Voltammetric oxidation and determination of loop diuretic furosemide at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 60, p. 95–101, 2012.

61 BUKKITGAR, S.D.; SHETTI, N.P. Electrochemical oxidation of loop diuretic furosemide in aqueous acid medium and its analytical application. **Cogent Chemistry**, v. 2, p. 1–10, 2016.

62 SEMAAN, F.S.; PINTO, E.M.; CAVALHEIRO, É.T.G.; BRETT, C.M.A. A graphitepolyurethane composite electrode for the analysis of furosemide. **Electroanalysis**, v. 20, p. 2287–2293, 2008.

63 SHETTI, N.P.; SAMPANGI, L. V.; HEGDE, R.N.; NANDIBEWOOR, S.T. Electrochemical oxidation of loop diuretic furosemide at gold electrode and its analytical applications. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, p. 104–121, 2009.

64 MALODE, S.J.; ABBAR, J.C.; SHETTI, N.P.; NANDIBEWOOR, S.T. Voltammetric oxidation and determination of loop diuretic furosemide at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 60, p. 95–101, 2012.

65 HASANZADEH, M.; POURNAGHI-AZAR, M.H.; SHADJOU, N.; JOUYBAN, A. A new mechanistic approach to elucidate furosemide electrooxidation on magnetic nanoparticles loaded on graphene oxide modified glassy carbon electrode. **RSC Advances**, v. 4, p. 6580–6590, 2014.

66 CANEVARI, T.C.; CINCOTTO, F.H.; LANDERS, R.; MACHADO, S.A.S. Synthesis and characterization of α-nickel (II) hydroxide particles on organic-inorganic matrix and its application in a sensitive electrochemical sensor for vitamin D determination. **Electrochimica Acta**, v. 147, p. 688–695, 2014.

67 VOGT, A.; WOŁOWIEC, S.; PRASAD, R.; GUPTA, A.; SKARLEWSKI, J. Synthesis and characterization of nickel (II), copper (II), manganese (III) and iron (III) complexes with new chiral salen-type ligand N, N'-bis (3, 5-di- tert-. **Polyhedron**, v. 17, p. 1231–1240, 1998.

68 SCOTT BOHLE, D.; ZAFAR, A.; GOODSON, P.A.; JAEGER, D.A. Synthesis and characterization of nickel(II) bis(alkylthio)salen complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 39, p. 712–718, 2000.

69 IWASITA, T.; NART, F. In situ infrared spectroscopy at electrochemical interfaces. **Progress in Surface Science**, v. 55, p. 271–340, 1997.

70 BHATTACHARJYA, D.; YU, J.S. Activated carbon made from cow dung as electrode material for electrochemical double layer capacitor. **Journal of Power Sources**, v. 262, p. 224–231, 2014.

71 EDE, S.R.; ANANTHARAJ, S.; KUMARAN, K.T.; MISHRA, S.; KUNDU, S. One step synthesis of Ni/Ni(OH)₂ nano sheets (NSs) and their application in asymmetric supercapacitors. **RSC Advances**, v. 7, p. 5898–5911, 2017.

72 BARO, M.; HUSSAIN, A.A.; PAL, A.R. Enhanced light sensing performance of a hybrid device developed using as-grown vertically aligned multiwalled carbon nanotubes on TCO substrates. **RSC Advances**, v. 4, p. 46970–46975, 2014.

73 CAO, L.; LIN, Z.; HUANG, J.; YU, X.; WU, X.; ZHANG, B.; ZHAN, Y.; XIE, F.; ZHANG, W.; CHEN, J.; XIE, W.; MAI, W.; MENG, H. Nitrogen doped amorphous carbon as metal free electrocatalyst for oxygen reduction reaction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 876–885, 2017.

74 DIMOVSKI, S.; NIKITIN, A.; YE, H.; GOGOTSI, Y. Synthesis of graphite by chlorination of iron carbide at moderate temperatures. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, p. 238–243, 2004.

75 CHANG, I.-C.; CHEN, T.-T.; YANG, M.-H.; CHIU, H.-T.; LEE, C.-Y. Self-powered electrochemical deposition of Cu@Ni(OH)₂ nanobelts for high performance pseudocapacitors. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, p. 10370–10374, 2014.

76 LUO, Z.; YIN, S.; WANG, K.; LI, H.; WANG, L.; XU, H.; XIA, J. Synthesis of onedimensional β -Ni(OH)₂ nanostructure and their application as nonenzymatic glucose sensors. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, p. 387–394, 2012.

77 MOHAMMADIKISH, M. Green synthesis of nanorod Ni(salen) coordination complexes using a simple hydrothermal method. **CrystEngComm**, v. 16, p. 8020–8026, 2014.

78 YANG, S.; KOU, H.; WANG, H.; CHENG, K.; WANG, J. Efficient electrolyte of N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamine zinc(II) iodide in dye-sensitized solar cells. **New Journal of Chemistry**, v. 34, p. 313–317, 2010.

79 CORREA, W.H.; PAPADOPOULOS, S.; RADNIDGE, P.; ROBERTS, B.A.; SCOTT, J.L. Direct, efficient, solvent-free synthesis of 2-aryl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolines. **Green Chemistry**, v. 4, p. 245–251, 2002.

80 GHANN, W.; SOBHI, H.; KANG, H.; CHAVEZ-GIL, T.; NESBITT, F.; UDDIN, J. Synthesis and Characterization of Free and Copper (II) Complex of N,N'-Bis(Salicylidene)Ethylenediamine for Application in Dye Sensitized Solar Cells. **Journal of Materials Science and Chemical Engineering**, v. 5, p. 46–66, 2017.

81 WENG, Y.-C.; CHOU, T.-C. Effects of electrochemical deposition of α-Ni(OH)₂/Pt/Ti electrodes for ethanol anodic oxidation. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 150, p. C385–C390, 2003.

82 KUZNETSOV, N.; YANG, P.; GORISLOV, G.; ZHUKOV, Y.; BOCHAROV, V.; MALEV, V.; LEVIN, O. Electrochemical transformations of polymers formed from nickel (II) complexes with salen-type ligands in aqueous alkaline electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 271, p. 190–202, 2018.

83 FU, Z.; HU, J.; HU, W.; YANG, S.; LUO, Y. Quantitative analysis of Ni²⁺/Ni³⁺ in Li[Ni_xMn_yCo_z]O₂ cathode materials: non-linear least-squares fitting of XPS spectra. **Applied Surface Science**, v. 441, p. 1048–1056, 2018.

84 NESBITT, H.W.; LEGRAND, D.; BANCROFT, G.M. Interpretation of Ni 2p XPS spectra of Ni conductors and Ni insulators. **Physics and Chemistry of Minerals**, v. 27, p. 357–366, 2000.

85 KUZNETSOV, N.; YANG, P.; GORISLOV, G.; ZHUKOV, Y.; BOCHAROV, V.; MALEV, V.; LEVIN, O. Electrochemical transformations of polymers formed from nickel (II) complexes with salen-type ligands in aqueous alkaline electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 271, p. 190–202, 2018.

86 SIEGLER, M.A.; LUTZ, M. Ni(salen): a system that forms many solvates with interacting Ni atoms. **Crystal Growth & Design**, v. 9, p. 1194–1200, 2009.

87 ZHANG, Y.; LI, J.; GAO, F.; KANG, F.; WANG, X.; YE, F.; YANG, J. Electropolymerization and electrochemical performance of salen-type redox polymer on different carbon supports for supercapacitors. **Electrochimica Acta**, v. 76, p. 1–7, 2012.

88 PISSINIS, D.E.; SERENO, L.E.; MARIOLI, J.M. Utilization of Special Potential Scan Programs for Cyclic Voltammetric Development of Different Nickel Oxide-Hydroxide Species on Ni Based Electrodes. **Open Journal of Physical Chemistry**, v. 2, p. 23–33, 2012.

89 OGURA, K.; KOBAYASHI, M.; NAKAYAMA, M.; MIHO, Y. Electrochemical and in situ FTIR studies on the adsorption and oxidation of glycine and lysine in alkaline medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 449, p. 101–109, 1998.

90 CAO, X.; ZHANG, T.; NGUYEN, Q.T.; ZHANG, Y.; PING, Z. A novel hydrophilic polymer-ceramic composite membrane 1. Acrylic acid grafting membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 312, p. 15–22, 2008.

91 DE SOUZA, N.E.; GOMES, J.F.; TREMILIOSI-FILHO, G. Reactivity of 3-carbonatom chain alcohols on gold electrode: a comparison to understand the glycerol electro-oxidation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 800, p. 106–113, 2017.

92 HARO, M.; CEA, P.; GASCÓN, I.; ROYO, F.M.; LÓPEZ, M.C. Mixed langmuir and langmuir-blodgett films of a proton sponge and a fatty acid: influence of the subphase nature on the interactions between the two components. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 2845–2855, 2007.

93 TAN, H.; CHEN, Y. Ag(+)-enhanced fluorescence of lanthanide/nucleotide coordination polymers and Ag(+) sensing. **Chemical Communications**, v. 47, p. 12373–12375, 2011.

94 SU, C.; SUAREZ, D.L. In situ infrared speciation of a desorbed carbonate on aluminum and iron oxides. **Clays and Clay Minerals**, v. 45, p. 814–825, 1997.

95 MILLER, J.N.; MILLER, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 6. ed. Essex: Person Education, 2010. 296 p.