UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

ANDERSON MASSAHIRO DE CAMPOS

**Influência do tamanho de nanoesferas de carbono na eletroanálise de
fármacos: detecção de paracetamol em amostras biológicas**

São Carlos

2018

ANDERSON MASSAHIRO DE CAMPOS

**Influência do tamanho de nanoesferas de carbono na eletroanálise de
fármacos: detecção de paracetamol em amostras biológicas**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Físico-Química

Área de concentração:

Química Analítica e Inorgânica

Orientador:

Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

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: Anderson Massahiro de Campos
Data: 03/05/2018

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

Campos, Anderson Massahiro de

Influência do tamanho de nanoesferas de carbono na eletroanálise de fármacos: detecção de paracetamol em amostras biológicas / Anderson Massahiro de Campos. — São Carlos, 2018.

64 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. Materiais nanoestruturados. 2. Eletroanálise. 3. Paracetamol. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, por muito me ensinar e contribuir para o meu desenvolvimento científico e intelectual.

Ao meu orientador experimental Dr. Paulo Augusto Raymundo Pereira por todo o ensino, suporte, ajuda, paciência, contribuição e oportunidades, tanto na vida acadêmica, quanto na vida pessoal.

Ao Instituto de Química de São Carlos pela infraestrutura e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa (Processo 1577963).

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia/Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNNano/CNPEM) pelas análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (*X-ray Photoelectron Spectrometer (XPS)*).

À Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC) pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE/DEMa/UFSCar) pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME), por disponibilizar sua infraestrutura, seu espaço e o conhecimento de todos os integrantes do grupo.

Aos meus familiares, pelo incentivo concedido desde o início.

RESUMO

CAMPOS, A. M. **Influência do tamanho de nanoesferas de carbono na eletroanálise de fármacos: detecção de paracetamol em amostras biológicas.** [Size Control of Carbon Spherical Shells for Sensitive Detection of Paracetamol in Sweat, Saliva and Urine]. 2018. 64f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Neste trabalho desenvolveu-se um procedimento simples para a separação de nanoesferas ocas de carbono (do inglês *Carbon Spherical Shells* ou CSS) em diâmetros entre 400 e 500 nm utilizando centrifugação, sendo caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. A análise de sua composição química, realizada por Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, indicaram que as CSS são constituídas de 79% de carbono e 21% de oxigênio em sua superfície, apresentando grupos funcionais carbonila e hidroxila. Plataformas sensoriais distintas foram obtidas formando filmes homogêneos das CSS sobre o eletrodo de carbono vítreo GCE (do inglês *glassy carbon electrode* ou GCE). Com o resultado dos experimentos eletroanalíticos, observou-se o aumento da sensibilidade do eletrodo GCE/CSS com a diminuição do diâmetro (500 até 400 nm) das CSS. As plataformas sensoriais GCE/CSS com 400 nm de diâmetro foram utilizadas para a detecção de paracetamol em tampão fosfato pH 7,0, e em amostras de fluídos biológicos sintéticos como suor, saliva e urina, sendo obtidos os valores de sensibilidade de 0,020, 0,023, 0,024, 0,018 $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$, e limite de detecção de 210, 120, 286 e 384 nmol L^{-1} , respectivamente. Os eletrodos GCE/CSS foram estáveis, com dispersão de 13% em medidas realizadas interdias e 2,7% em medidas intradias, apresentando pequena interferência de espécies concomitantes presentes na matriz das amostras (dispersão máxima de 13%). O método de detecção de paracetamol em suor e o método padrão baseado em cromatografia líquida de alta eficiência se mostraram estatisticamente equivalentes, tanto pelos resultados obtidos no método de curvas de regressão, no qual obteve-se valores de coeficiente linear e angular de $3,1 \times 10^{-8}$ e 0,96, respectivamente, quanto pelo cálculo dos testes t de Student pareado (apresentando resultado de 1,88) e de correlação (apresentando resultado de 63,4).

Palavras-chave: nanoesferas de carbono; sensoriamento em suor; detecção de paracetamol; sensores eletroanalíticos

ABSTRACT

CAMPOS, A. M. **Size Control of Carbon Spherical Shells for Sensitive Detection of Paracetamol in Sweat, Saliva and Urine.** [Influência do tamanho de nanoesferas de carbono na eletroanálise de fármacos: detecção de paracetamol em amostras biológicas]. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A simple strategy, based on centrifugation, to separate carbon spherical shells (CSS) was applied, resulting in sizes varying from 400 to 500 nm, as confirmed by the micrographs obtained in the Scanning and Transmission Electron microscopy data. Carbonyl and hydroxyl groups were present in the surface, that presented a composition of 21% of oxygen and 79% of carbon. The CSS were casted on surface of a glassy carbon electrode (GCE), forming a thin film, and the resulting platform was used as a sensor. A trend was observed in the results obtained by the electroanalytical experiments: as the size of the CSS were reduced, the sensitivity of the GCE/CSS platform towards paracetamol detection increased. The best attained result, namely the platform with the GCE and the 400 nm diameter CSS, have shown promising results, and thus were employed in Paracetamol detection in phosphate buffer solution at pH 7.0, in synthetic biological fluids such as sweat, saliva and urine. The results for sensitivity and limit of detection obtained were of 0.020, 0.023, 0.024, 0.018 $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$ and 210, 120, 286 e 384 nmol L^{-1} , for phosphate buffer solution, sweat, saliva and urine, respectively. The GCE/CSS electrodes present high stability, with maximum dispersion of 13% and 2.7% in interday and intraday measurements, respectively, suffering low interference from other possible species present in the sample (with maximum dispersion of 13%). The performance of the proposed sensor towards paracetamol detection in sweat samples were statistically identical to the standard method, which is based upon liquid chromatography. This is shown by the results obtained in the regression curve method (with calculated intercept and slope values of 3.1×10^{-8} and 0.96, respectively) and by the results obtained in the paired (with value of 1.88) and in correlation (with value of 63.4) Student's t-tests.

Keywords: Carbon nanoshells; size control; sweat; saliva; urine; paracetamol; sensors; non-invasive samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação tridimensional da molécula de paracetamol. Fonte: autoria própria 20
- Figura 2 - Regressão linear para a comparação de duas metodologias analíticas: (A) representa concordância perfeita entre as duas metodologias para todas as amostras; (B)-(F) ilustram os resultados de vários tipos de erros sistemáticos. Fonte: Adaptação de MILLER, J. N. M., MILLER J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5th ed. Harlow-Essex, UK: Pearson Education Limited, 2005, p 124. 23
- Figura 3 - (A) fluxograma do processo de síntese e separação das CSS; (B) detalhamento do processo de centrifugação Fonte: autoria própria 27
- Figura 4 - Fotomicrografias de SEM realizadas na superfície do GCE. (A) CSS separadas por meio da velocidade de centrifugação de 4000 rpm; (B) CSS separadas por meio da velocidade de centrifugação de 8000 rpm; (C) CSS separadas por meio da velocidade de centrifugação de 12000 rpm. Fonte: autoria própria..... 32
- Figura 5 - Fotomicrografias de TEM. (A e D) CSS de 400 nm, separadas ao aplicar a velocidade de centrifugação de 4000 rpm; (B e E) CSS de 450 nm, separadas ao aplicar a velocidade de centrifugação de 8000 rpm; (C e F) CSS de 500 nm, separadas ao aplicar a velocidade de 12000 rpm; (D-F) Estimativa da espessura das cascas de carbono. Fonte: autoria própria 34
- Figura 6 - Análise estrutural e funcional das superfícies de CSS. (A) espectro de XRD e (B) espectro de FTIR. Fonte: autoria própria 36
- Figura 7 - Análise química da CSS. (A) espectro íntegro de XPS identificando todos os elementos presentes na amostra, compreendendo o intervalo de energia de ligação de 1400 a 0 eV; (B) espectro de XPS de alta energia, relativo ao C1s, compreendendo o intervalo de energia de ligação de 298 a 280 eV; (C) espectro de

XPS de alta energia, relativo ao O1s, compreendendo o intervalo de energia de ligação de 545 a 525 eV. Fonte: autoria própria38

Figura 8 - (A) DPV comparativo com ajuste de linha de base para GCE, GCE/CSS_{400nm}, GCE/CSS_{450nm} e GCE/CSS_{500nm} na concentração de 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0; (B) Gráfico comparativo entre as curvas de calibração obtidas para as quatro plataformas sensoriais, sendo todas ajustadas com linha de base; (C) Representação da curva analítica obtida pelo sistema GCE-CSS₄₀₀; *Inset*: gráfico dos da distribuição dos resíduos; (E) Mecanismo simplificado de eletrooxidação do paracetamol proposto por Nematollahi *et al* ⁶¹ Fonte: autoria própria41

Figura 9 - Esquematização das CSS sobre a superfície do GCE (considerando apenas uma camada de esferas) e a consequente sensibilidade e quantidade de espécies eletroativas Fonte: autoria própria45

Figura 10 - (A) Resultado obtido para a análise de paracetamol em amostras de suor artificial, no intervalo de concentração 0,6 a 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, *inset* gráfico de dispersão; (B) Resultado obtido para a análise de paracetamol em amostras de saliva artificial, no intervalo de concentração de 0,60 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, *inset* gráfico de dispersão; (C) Resultado obtido para a análise de paracetamol em amostras de urina sintética, no intervalo de concentração de 0,60 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, *inset* gráfico de dispersão Fonte: autoria própria47

Figura 11 - Resultado da correlação entre as técnicas de voltametria de pulso diferencial e a cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte: autoria própria49

Figura 12 - Estudo de interferentes para a análise de paracetamol em amostras de suor. (A) DPV do estudo de interferentes; (B) Gráfico de barras com os percentuais relativos de corrente para o estudo de interferentes. Fonte: autoria própria.....53

Figura 13 - Teste de reprodutibilidade e repetibilidade do eletrodo proposto. (A) as medidas interdias e (B) as medidas intradias. Fonte: autoria própria54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes das amostras reais produzidas	30
Tabela 2 - Medidas das CSS.....	33
Tabela 3 - Valores de regressão linear, sensibilidade, coeficiente produto momento (r) calculados para as diferentes plataformas sensoriais	42
Tabela 4 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para GCE/CSS ₄₀₀	43
Tabela 5 - Valores calculados de carga e concentração de espécies eletroativas para cada plataforma sensorial	44
Tabela 6 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para as amostras de suor, saliva e urina	48
Tabela 7 - Resultados obtidos nos testes estatísticos t de Student	51
Tabela 8 - Revisão de literatura de sensores eletroquímicos propostos para sensoramento de paracetamol	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	eletrodo de carbono cerâmico (do inglês <i>ceramic carbon eletrode</i>);
CSS	nanoesferas ocas de carbono (do inglês <i>carbon spherical shells</i>);
CV	voltametria cíclica (do inglês <i>cyclic voltammetry</i>);
DAD	arranjo linear de diodos (do inglês <i>diode array detector</i>);
DLC	carbono similar a um diamante (do inglês <i>diamond-like carbon</i>);
DPV	voltametria de pulso diferencial (do inglês <i>differential pulse voltammetry</i>);
ERG	grafeno reduzido eletroquimicamente (do inglês <i>electrochemically reduced graphene</i>);
f-MWCNT	nanotubos de carbono funcionalizados (do inglês <i>functionalized multi-walled carbon nanotubes</i>);
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier, (do inglês <i>fourier-transform infrared spectroscopy</i>);
GCE	eletrodo de carbono vítreo (do inglês, <i>glassy carbon electrode</i>);
GO	óxido de grafeno (do inglês <i>graphene oxide</i>);
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>);
LD	limite de detecção;
LQ	limite de quantificação;
MWCNT	nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês <i>multi-walled carbon nanotubes</i>);
PEDOT	poli(3,4-etilenodioxitiofeno);
RC	membrana de celulose regenerada (do inglês <i>regenerated cellulose</i>

membrane);

SEM microscopia eletrônica de varredura (do inglês *scanning electron microscopy*);

SWCNT nanotubos de carbono de parede simples (do inglês *single walled carbon nanotubes*);

SWV voltametria de onda quadrada (do inglês *square wave voltammetry*);

TEM microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *transmission electron microscopy*);

VACNT nanotubos de carbono alinhados verticalmente (do inglês *vertically aligned carbon nanotubes*);

XPS espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios x (do inglês, *x-ray photoelectron spectroscopy*);

XRD espectroscopia de difração de raios x (do inglês *x-ray diffraction*);

LISTA DE SÍMBOLOS

μ_c	velocidade de sedimentação da partícula;
ρ_s	densidade da partícula;
ρ_f	densidade da suspensão;
d_{St}	diâmetro de Stokes da partícula;
ω	velocidade de rotação da centrífuga;
r	distância do eixo à suspensão na centrífuga;
η	coeficiente de viscosidade do meio;
Ω	resistência elétrica;
y_B	coeficiente linear;
$S_{y/x}$	desvio padrão dos valores de y em x;
y_i	valor obtido experimentalmente;
$\hat{y}$	valor de y_i , calculado ao utilizar a regressão linear;
n	número de medidas;
Γ	concentração de espécies eletroativas;
Q	carga elétrica corrigida;
n_e	número de elétrons envolvidos no processo;
F	constante de Faraday;
A	área geométrica superficial do eletrodo;
r	coeficiente de correlação produto-momento;
$\bar{x}$	valor médio de x;
$\bar{y}$	valores médios de y;
$\bar{d}$	valor médio das diferenças entre os valores;
S_d	desvio padrão das diferenças;
d	valor das diferenças para cada ponto;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Reagentes e soluções	25
2.2 Síntese das nanoesferas de carbono	25
2.3 Equipamentos e preparo das amostras	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanoesferas de carbono	31
3.2 Desempenho eletroanalítico das Carbon Spherical Shells	39
4 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Transformações químicas, físicas ou biológicas podem ser convertidas em um tipo de sinal mensurável através de um transdutor¹. Quando o sinal obtido está relacionado com os processos de transferência de elétrons, o sensor é definido como eletroquímico². As técnicas instrumentais, baseadas em métodos analíticos como a voltametria, amperometria, potenciometria, entre outras, associadas a estratégias de amplificação de sinal analítico, podem ser definidas como eletroanalítica³.

Com o intuito de se produzir sensores eletroquímicos com alta seletividade, sensibilidade, taxa de transferência de elétrons, entre outros, pesquisadores têm se baseado no desenvolvimento de novos materiais⁴, visto que os materiais puros nem sempre apresentam todas as características desejadas. Estes novos materiais são em grande parte compostos de materiais nanotestruturados, os quais são amplamente utilizados na construção de sensores eletroquímicos.

Estes nanomateriais podem ser fabricados através de diversos processos de síntese⁵, apresentando características diferenciadas quando comparadas aos materiais em seu formato comum (*bulk*), principalmente devido à sua elevada razão entre área e volume⁶. Dentre os nanomateriais existentes, aqueles baseados no carbono são amplamente utilizados, principalmente devido à sua abundância, baixo custo, elevada área superficial, estabilidade química e facilidade de obtenção^{7; 8} além de apresentarem características físico-químicas úteis^{5; 9; 10}, as quais podem ser empregadas em estratégias de amplificação de sinal para ser utilizados em sensores eletroquímicos^{11;12}.

Nanotubos de carbono e grafeno são provavelmente os nanomateriais a base de carbono mais utilizados^{13,14} porém outros nanomateriais derivados do carbono como o Carbon

Printex¹⁴, Carbon black¹⁵, biochar¹⁶ e *carbon spherical shells* (CSS)¹¹, também estão sendo utilizados na construção de sensores.

Utilizar as CSS como nanomaterial pode ser bastante vantajoso, devido à sua rota de síntese ser hidrotermal, a qual constitui um processo experimental simples e com a baixa produção de resíduos. No processo de síntese hidrotermal utiliza-se uma autoclave, um carboidrato como precursor e água como solvente¹⁷. Solubiliza-se o carboidrato na água e a solução resultante é selada dentro da autoclave. O sistema é aquecido, atingindo elevada temperatura e pressão¹⁸, levando à formação de partículas esféricas suspensas em fase líquida, as quais, após serem separadas, podem ter sua superfície adicionalmente modificadas¹⁹.

O diâmetro médio das esferas formadas depende das condições experimentais, como temperatura, tempo de síntese e concentração de carboidrato^{17; 20}, sendo obtidas nanopartículas com tamanhos variando da ordem de nanômetros a micrômetros. Como o desempenho do sensor está estritamente relacionado a ambos, formato e tamanho das nanopartículas em sua superfície⁷, o controle do seu tamanho torna-se essencial para o desenvolvimento de um sensor com desempenho equiparável à uma técnica padrão de análise. Por este motivo, neste trabalho, propõe-se a separação das CSS por diâmetro utilizando a centrifugação com diferentes velocidades.

Geralmente, é necessário um período de tempo muito longo para que ocorra a sedimentação de partículas em suspensão sob ação exclusiva da força gravitacional, sendo que para soluções contendo partículas na escala nanométrica, a sedimentação é dificultada devido ao efeito de movimento Browniano, sendo necessário centrifugar a amostra²¹. A relação que governa a velocidade de sedimentação de uma partícula em um campo centrifugacional e o tamanho das partículas é dada pela equação de Stokes:

$$\mu_c = \frac{(\rho_s - \rho_f)d_{St}^2\omega^2r}{18\eta} \quad (1)$$

na qual μ_c representa a velocidade de sedimentação da partícula, ρ_s a densidade da partícula; ρ_f a densidade da suspensão; d_{St} é a diâmetro de Stokes da partícula; ω é a velocidade de rotação da centrífuga; r é a distância do eixo à suspensão na centrífuga; η representa o coeficiente de viscosidade do meio²¹. Pela análise de equação é possível verificar que a velocidade de sedimentação da partícula é inversamente proporcional à viscosidade do meio e diretamente proporcional à diferença entre a densidade da partícula e a densidade da suspensão; ao quadrado do diâmetro de Stokes da partícula; ao quadrado da velocidade de rotação da centrífuga e a distância entre o eixo da centrífuga e a suspensão.

Como as CSS são produzidas em tamanhos variados no processo de síntese hidrotermal, e ao final da síntese estão dispersas no mesmo meio reacional (no qual se mantêm constantes a viscosidade do meio e a densidade da suspensão), é possível separá-las por tamanho ao aplicar diferentes velocidades de centrifugação. Ao centrifugar o produto reacional utilizando a mesma centrífuga, pode-se assumir que apenas o diâmetro e a densidade das partículas variam, sendo possível concluir que a velocidade de sedimentação seja proporcional a ambos²¹. portanto, para um mesmo período, ao variar a velocidade de centrifugação, torna-se possível a separação das partículas, por tamanho. Esse procedimento é intitulado como método de centrifugação diferencial²². Na centrifugação diferencial as partículas menos volumosas (consequentemente mais densas) se sedimentam em menores velocidades de centrifugação, e as mais volumosas (consequentemente menos densas) são as que sedimentam em maiores velocidades. Ao aplicar este processo, torna-se necessária a etapa de redispersão em etanol e posteriormente em água, seguida do processo de centrifugação a fim de minimizar a mistura de tamanhos entre as partículas²². Utilizando este procedimento

pós-sintético simples e inédito para o material adotado, é possível separar as CSS formadas pelo seu diâmetro, e assim aplicá-las em plataformas sensoriais.

As CSS foram utilizadas em diversos sistemas, dentre eles, aparelhos de conversão e armazenamento de energia²³, painéis solares²⁴, baterias^{25; 26}, em sensores^{25; 27; 28} e biossensores^{11; 29; 30}. Elas constituem um material atrativo aos demais nanomateriais de carbono devido ao seu baixo custo de produção, à possibilidade de produção em larga escala, à sua baixa toxicidade, à sua área superficial elevada, sua flexibilidade e estabilidade químicas^{27; 31}. Além destes fatores, as CSS produzidas no processo de polimerização de carboidratos apresentam grande interação com analitos devido à presença de grupos funcionais (como carboxila, hidroxila²⁷), o que é desejável em sensores e biossensores eletroquímicos para detecção de biomarcadores e fármacos em amostras não-invasivas.

O paracetamol (N-acetil-p-aminofenol, 4-hidroxiacetanilida ou Acetaminofen), cuja estrutura química tridimensional é apresentada na Figura 1, é um medicamento amplamente utilizado como analgésico e antitérmico, sendo sua administração feita exclusivamente por via oral³². Possui efeitos inibidores sobre a síntese de prostaglandinas no sistema nervoso central e sedativo sobre o centro regulador de calor, reduzindo assim a temperatura do paciente⁴. Se utilizado de maneira crônica ou excessiva, apresenta o efeito de hepatotoxicidade³³. O paracetamol é o principal responsável pela maioria dos casos relacionados à overdose causada por medicamentos³⁴, sendo o tempo do diagnóstico um fator essencial para a manutenção da saúde do paciente³⁵. Como o tempo e a confiabilidade de um exame inicial realizado em um paciente com suspeita de overdose medicamentosa são essenciais para seu prognóstico, o desenvolvimento de um sensor que analise de maneira rápida, com baixa interferência dos constituintes da matriz analisada e que possa monitorar sua concentração no organismo, se torna bastante atrativo.

Figura 1 - Representação tridimensional da molécula de paracetamol.
Fonte: autoria própria

O paracetamol é uma molécula extensamente estudada, sendo que em 2006 em um único artigo de review, já haviam mais de 300 métodos desenvolvidos para a sua detecção³⁶. Dentre os métodos desenvolvidos, incluem-se os titrimétricos³⁷, espectrofotométricos^{38 39 40}, cromatográficos^{41,42,43}, eletroquímicos^{44,45 46}. Grande parte dos métodos desenvolvidos (principalmente para as metodologias padrão de análise), utilizam equipamentos de custo elevado, que podem apresentar operação complicada⁴⁷ e de grande porte⁴⁸, geralmente sendo necessário um extensivo pré-tratamento da amostra, consistindo da extração do analito da matriz, filtração, fortificação, além de apresentar elevada demanda de tempo para a análise, o que inviabiliza análises rápidas, contínuas e de rotina⁴. A fim de superar estes problemas, surgiram os métodos não invasivos de análise⁴⁸.

Os métodos não invasivos têm apresentado um crescente uso⁴⁸, devido à facilidade de obtenção de amostras, possibilidade de monitoramento em tempo real, facilidade em estudos farmacocinéticos e análise de patógenos em fluídos corpóreos, geralmente lágrima, saliva e suor, principalmente quando associados aos sensores eletroquímicos⁴⁷.

Um tratamento estatístico rigoroso se faz necessário, para avaliar se a metodologia proposta possui desempenho similar ao da metodologia padrão de análise, de modo que a comparação seja feita de maneira adequada. A comparação entre dois métodos analíticos distintos tem por objetivo avaliar a presença de erros sistemáticos e aleatórios, mostrando se os resultados obtidos são significativamente maiores ou menores do que aqueles oriundos do

procedimento padrão. Os procedimentos de pré-tratamento de amostra e de operação também devem ser considerados, pois são fatores importantes ao se comparar as técnicas analíticas⁴⁹. A forma mais comum de se relacionar duas metodologias analíticas utiliza-se da comparação de resultados obtidos por meio de experimentos de recuperação, realizados utilizando-se tanto o método proposto, quanto o método analítico padrão, eventualmente adotado por uma agência de controle, o que não apresenta significado algum de corroboração, visto que o valor da recuperação é uma das características inerente das técnicas analíticas, e que não está relacionado com a precisão ou exatidão do método⁴⁹.

Miller e Miller⁵⁰ propuseram o método de curvas de regressão, o qual utiliza-se de ferramentas estatísticas adequadas para realizar a comparação de resultados obtidos com diferentes técnicas analíticas. Inicialmente constroem-se curvas de calibração para cada metodologia a ser comparada, geralmente a técnica padrão contra um método proposto. Em seguida são analisadas o mesmo conjunto de amostras por cada uma das técnicas. Os valores de concentração determinados pelas técnicas são então graficados, de maneira que os resultados obtidos pelo método padrão sejam relacionados com as coordenadas do eixo X e os resultados obtidos com o método proposto, a ser validado, com as coordenadas do eixo Y. Com este conjunto de pontos espera-se obter uma relação linear entre os dois métodos, e utilizando ferramentas estatísticas bem definidas, calcular seu coeficiente angular (b), o intercepto (a) e o coeficiente produto-momento (r) da regressão linear ($y=a+bx$).

Caso cada amostra forneça resultados semelhantes para ambas as técnicas, o intercepto apresentará valor nulo, ou seja, a curva interceptará a origem do gráfico e ambos o coeficiente angular e o produto-momento apresentarão valor igual a 1 (Figura 2A). Este resultado não ocorre na prática devido à presença dos *erros experimentais* tanto do tipo *sistemáticos*, quanto do tipo *aleatórios*. Ainda que os erros sistemáticos sejam eliminados, os erros

aleatórios não permitem que os resultados sejam os mesmos para todas as amostras e, portanto, ocorrem desvios da idealidade de maneiras distintas.

Uma das possibilidades é a curva de regressão com o valor do coeficiente angular igual a 1, porém com valor do intercepto sendo diferente de zero (Figura 2B), indicando que um dos métodos de análise fornece resultados com valores maiores ou menores do que o outro, por um valor fixo. Isto pode ocorrer quando a linha de base não for corretamente tratada em alguma das técnicas. Este caso é comum quando se compara técnicas eletroquímicas com as restantes, visto que no sistema eletroquímico existe a corrente capacitiva, o que torna a linha de base diferente de zero ⁵¹.

Em outra possibilidade, o valor do coeficiente angular pode ser maior ou menor do que 1, o que indica a presença de erros sistemáticos nas curvas de calibração individuais de ambos os métodos (Figura 2C). Podem ainda ocorrer outros casos, nos quais o valor do intercepto difere de 0 e o coeficiente angular difere de 1, levando a outros resultados. A Figura 2D a 2F expõe os resultados decorrentes de vários tipos de erros sistemáticos.

Figura 2 - Regressão linear para a comparação de duas metodologias analíticas: (A) representa concordância perfeita entre as duas metodologias para todas as amostras; (B)-(F) ilustram os resultados de vários tipos de erros sistemáticos.

Fonte: Adaptação de MILLER, J. N. M., MILLER J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5th ed. Harlow-Essex, UK: Pearson Education Limited, 2005, p 124

1.1 Objetivos

Esse trabalho propõe aplicar de maneira inédita para as CSS um procedimento pós-sintético simples de centrifugação diferencial, a fim de separá-las de acordo com seus diâmetros. Após separadas serão contruídas plataformas sensoriais distintas utilizando as CSS e eletrodos de carbono vítreo. A fim de verificar a influência do tamanho das CSS no desempenho analítico e possibilitar a comparação com outros métodos de detecção previamente desenvolvidos, os sensores propostos serão sujeitos à uma prova de conceito, na qual será realizada a detecção do Paracetamol, um fármaco amplamente estudado, em amostras não-invasivas de suor, saliva e urina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados tinham grau de pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada no sistema Nanopure com resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Barnsted Nanopure System). A glicose, o *N,N*-Dimetilformamida (DMF), o cloreto de potássio (KCl), a uréia, o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), o cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de amônio (NH_4Cl), o ácido láctico, o sulfeto de sódio nonaidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,05%)), o brometo de potássio (KBr) e o etanol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. O nitrato de prata (AgNO_3), sulfeto de sódio (Na_2S) e o sulfato de sódio (Na_2SO_4) foram adquiridos da empresa MERCK®. Os estudos voltamétricos com paracetamol (Sigma-Aldrich®) foram realizados em solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 7,0) dissolvendo-se quantidades apropriadas dos sais fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 , respectivamente) (Sigma-aldrich®). O cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido da empresa Vetec.

2.2 Síntese das nanoesferas de carbono

A síntese das CSS foram realizadas utilizando-se o método modificado baseado no proposto por Sun *et al.*²⁰. Neste método, foi preparada uma solução de glicose $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, a qual foi levada à autoclave por períodos variáveis de tempos, de 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 h à temperatura de 180°C , a fim de verificar qual tempo resultaria na formação de produtos de

maneira mais reprodutível, sendo o tempo de 5 horas escolhido. Após realizada a síntese das CSS, elas foram submetidas a um tratamento pós-síntese de centrifugação diferencial.

O processo de centrifugação diferencial consistiu de duas etapas principais: precipitação do sólido disperso, seguido de etapas de lavagem dos precipitados obtidos.

Inicialmente o produto da síntese hidrotermal foi centrifugado à velocidade de 4000 rpm por um período de 30 minutos, a fim de separar as CSS de tamanho inferior, no caso 400 nm. Este processo originou o precipitado, denominado “precipitado 1”, e o sobrenadante, denominado “sobrenadante 1”.

O precipitado 1 foi levado às etapas de lavagem, as quais consistiam de três ciclos de redispersão em água, seguida de centrifugação, redispersão em etanol, seguida de centrifugação, sendo cada etapa de centrifugação de 30 minutos. Após a lavagem do precipitado 1, obteve-se as CSS de diâmetro de 400 nm. O sobrenadante 1 foi submetido a centrifugação com velocidade de 8000 rpm, gerando um novo precipitado, denominado “precipitado 2” e um novo sobrenadante, denominado “sobrenadante 2”.

O precipitado 2 foi submetido às etapas de lavagem, obtendo-se as CSS de 450 nm. O sobrenadante 2 foi submetido ao processo de centrifugação com velocidade de 12000 rpm, gerando apenas o precipitado, denominado “precipitado 3”. Este foi levado às etapas de lavagem, obtendo-se ao final as CSS de 500 nm.

Os três precipitados foram levados à estufa sob a temperatura de 90 °C para secagem. O fluxograma geral do processo de síntese está representado na Figura 3A, e a Figura 3B representa o fluxograma detalhado do processo de centrifugação.

Figura 3 - (A) fluxograma do processo de síntese e separação das CSS; (B) detalhamento do processo de centrifugação
 Fonte: autoria própria

2.3 Equipamentos e preparo das amostras

As fotomicrografias obtidas por meio da SEM e TEM foram obtidas, respectivamente, por meio do equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV, corrente de 2,82 A e *I probe* de 200 pA, e com o equipamento FEI TECNAI G² F20, operando a 200 kV. As amostras do SEM foram preparadas em GCE a fim de verificar o recobrimento superficial do eletrodo. Os GCE-CSS foram então recobertos com 6 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidos em dessecador até o momento de

análise. A amostra do TEM foi suspensa em DMF por 60 minutos e a suspensão resultante foi depositada em uma grade de cobre recoberta por carbono.

As medidas de XRD foram feitas utilizando o equipamento *Rigaku Rotaflex Diffractometer* modelo RU200B a 50 kV e 100 mA, com o comprimento de onda da radiação $\text{CuK}\alpha$ de $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$, em 2θ entre 10° e 80° . Para a análise de XRD, cerca de 50 mg de pó do material sintetizado foram dispersos sobre o suporte do equipamento e a análise foi realizada à temperatura ambiente (25°C).

As amostras analisadas por FTIR foram preparadas na forma de pastilha, composta por KBr e as CSS (99% e 1% em massa, respectivamente). As análises de FTIR foram realizadas com o equipamento *IRAffinity 1 spectrophotometer* (Shimadzu, Portland, USA), na faixa de número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e aquisição de 36 scans.

A composição química das esferas foi analisada por XPS, utilizando um espectrômetro de fotoelétrons de raios-X *K-AlphaTM + X-ray Photoelectrons Spectrometer system K-* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) equipado com um analisador de elétrons hemisférico.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato PGSTAT 302 Autolab Electrochemical System (Metrohm Herisau, Suíça) conectado a um computador gerenciado pelo software NOVA 1.11. A cela eletroquímica utilizada foi composta por três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho o GCE (com $0,07 \text{ cm}^2$ de área geométrica) modificado com as CSS, o eletrodo de referência um Ag/AgCl (KCl 3M) e o contra-eletrodo uma placa de platina com $1,0 \text{ cm}^2$ de área geométrica.

A suspensão contendo as CSS foi preparada dispersando-se 2,0 mg das CSS em 2,0 mL de DMF em banho ultrassônico por um período de 60 minutos.

O GCE foi inicialmente limpo com álcool isopropílico e polido numa lixa 4000, lavado abundantemente com álcool etílico e água ultrapura, sendo posteriormente seco com

N₂. Com o auxílio de uma micropipeta, 6,0 µL da suspensão das CSS sintetizadas foram gotejados no GCE, deixando secar a temperatura ambiente, dentro de um dessecador, até completa evaporação do solvente.

Os experimentos de DPV foram realizados utilizando um intervalo de potenciais entre -0,2 e +0,7 V (vs. Ag/AgCl), em tampão fosfato pH 7,0, à temperatura aproximada de 25°C. A velocidade de varredura utilizada foi de 5,0 mV s⁻¹, com amplitude de pulso de 50 mV e tempo de modulação de 50 ms.

As análises de HPLC foram realizadas utilizando um equipamento da Shimadzu com sistema manual de injeção, duas bombas (LC-10AD VP) utilizando o DAD como detector, equipado com uma coluna de fase reversa C18 (250 × 4,6 mm ID, com partículas de tamanho de 5 µm) ambas da Ascentis[®] Supelco. As amostras analisadas através da técnica de HPLC foram filtradas inicialmente utilizando um papel de filtro, seguido pela filtração através de membrana RC de 0,45 µm de diâmetro dos poros. O volume de injeção foi de 20,0 µL, sendo a fase móvel composta por acetonitrila e água no modo isocrático, o tempo de corrida foi de 10 minutos, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e monitoração UV em $\lambda = 280$ nm.⁵²

As amostras de suor artificial, urina sintética e saliva artificial foram preparadas de acordo com M. T. Mathew *et al.*⁵³, Laube *et al.*⁵⁴ e Raymundo-Pereira *et al.*⁵⁵, respectivamente, sendo que os componentes de cada amostra foram solubilizados em tampão fosfato pH 7,0 e estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes das amostras reais produzidas

Componente	Componentes dos fluidos biológicos sintéticos		
	Suor	Saliva	Urina
Ácido Lático	1,0 mL	-	-
Uréia	1,0 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	25,0 g L ⁻¹
NaCl	7,5 g L ⁻¹	0,40 g L ⁻¹	2,92 g L ⁻¹
KCl	1,0 g L ⁻¹	0,43 g L ⁻¹	1,6 g L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	0,81 g L ⁻¹	1,08 g L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	-	-	2,24 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	-	-	1,40 g L ⁻¹
NH ₄ Cl	-	-	1,0 g L ⁻¹
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	0,78 g L ⁻¹	-
Na ₂ S·9H ₂ O (0,05%)	-	10 mL L ⁻¹	-

Fonte: autoria própria

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanoesferas de carbono

A Figura 4 apresenta as imagens obtidas pela SEM do material separado em intervalos de centrifugação de 4000 (A), 8000 (B) e 12000 rpm (C). As micrografias obtidas por meio da SEM indicaram sucesso no processo de síntese, visto que o material sintetizado possui morfologia esférica, formando as CSS. Também foi possível verificar o recobrimento superficial no eletrodo de GCE, o qual foi preparado de maneira análoga ao GCE utilizado nos experimentos eletroquímicos. Analisando as micrografias de SEM, é possível verificar que houve um bom recobrimento da superfície com a formação de mais de uma camada de CSS sobre a superfície do GCE, o que leva a formação de espaços intersticiais gerando um aumento considerável de área superficial.

Figura 4 - Fotomicrografias de SEM realizadas na superfície do GCE. (A) CSS separadas por meio da velocidade de centrifugação de 4000 rpm; (B) CSS separadas por meio da velocidade de centrifugação de 8000 rpm; (C) CSS separadas por meio da velocidade de centrifugação de 12000 rpm.
Fonte: autoria própria

A Figura 5 apresenta as micrografias obtidas por TEM com ampliações de 225.000× e 500.000 ×. Onde as Figuras A e D são as análises das CSS separadas com velocidade de 4000 rpm, B e E são as separadas com velocidade de 8000 rpm, e C e F as separadas com velocidade de 12000 rpm. Ao analisar as micrografias obtidas por MEV e TEM, foi possível observar que as CSS apresentam diâmetros que variam entre 400, 450 e 500 nm. Utilizando o contraste obtido nas micrografias das CSS foi possível estimar a espessura das cascas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas das CSS

CSS-Diâmetro total	Espessura estimada da casca	CSS-Diâmetro interno
/ nm	/ nm	/ nm
400	50	300
450	80	320
500	90	320

Fonte: autoria própria

Figura 5 - Fotomicrografias de TEM. (A e D) CSS de 400 nm, separadas ao aplicar a velocidade de centrifugação de 4000 rpm; (B e E) CSS de 450 nm, separadas ao aplicar a velocidade de centrifugação de 8000 rpm; (C e F) CSS de 500 nm, separadas ao aplicar a velocidade de 12000 rpm; (D-F) Estimativa da espessura das cascas de carbono.
Fonte: autoria própria

Após determinada a forma das CSS, e sua separação por diâmetro, foi realizada a caracterização química de sua superfície, a fim de verificar quais os eventuais grupos funcionais orgânicos formados, usando XRD, FTIR e XPS. Os resultados são apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

A Figura 6 demonstra os resultados das análises realizadas por XRD (A) e FTIR (B). No espectro de XRD é possível observar que as CSS apresentaram um padrão de difração típico de materiais amorfos compostos por carbono, com a presença de um pico largo próximo de $20,4^{\circ}$ ^{7; 56}.

No espectro de FTIR as bandas em 1703 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupamento carbonila C=O (presentes em ésteres ou grupos carboxílicos), sendo que as bandas em 1620 e 1513 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações das ligações -C=C-. As bandas compreendidas na região entre 1000 e 1450 cm^{-1} correspondem a ligação C-O (presentes em hidroxilas, ésteres ou éteres) e torções no grupamento OH¹⁷. As bandas em 800 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações em ligações C-H fora do plano, e as bandas em 2900 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de CH alifático e as bandas entre 3000 e 3700 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações no grupamento OH (presentes em hidroxilas ou grupos carboxílicos)⁵⁷.

Figura 6 - Análise estrutural e funcional das superfícies de CSS. (A) espectro de XRD e (B) espectro de FTIR.
Fonte: autoria própria

O espectro de XPS para as CSS está representado na Figura 7, sendo: (A), o espectro íntegro e (B e C) os espectros de baixa energia, fornecendo os valores de energia de ligação para os componentes spin-órbita O1s e C1s.

A análise da superfície das CSS indicou um percentual de 79,3% para o carbono e 20,7% para o oxigênio, cujas energias de ligação são de 285 e 533 eV, respectivamente⁵⁸. A deconvolução do espectro de XPS relativo ao carbono C1s mostrou três componentes correspondendo a átomos de carbono com grupos funcionais distintos: a maior componente (56,5% do C1s) cuja energia de ligação está em torno de 284,7 eV indica átomos de carbono ligados entre si (C-C, C=C); a segunda maior componente (26,8% do C1s), cuja energia de ligação está próxima de 287,4 eV indica a formação de grupos funcionais contendo grupos carbonila (C=O) e a componente de menor intensidade (16,7% do C1s), cuja energia de ligação está em 286,0 eV indica a formação de ligações entre C-O^{17; 59}. O espectro de oxigênio O1s, demonstra duas componentes na energia de ligação, sendo a maior componente (78,8% do O1s) com energia de ligação em torno 533,8 eV atribuída a agrupamentos C=O, e a menor componente (21,2% da O1s) em 532,4 eV, atribuído aos grupos C-O^{7; 59}, concordando com o espectro C1s. A presença de grupos funcionais oxigenados nas CSS constituem sítios de transferência de elétrons entre o eletrodo e o analíto⁶⁰.

Figura 7 - Análise química da CSS. (A) espectro íntegro de XPS identificando todos os elementos presentes na amostra, compreendendo o intervalo de energia de ligação de 1400 a 0 eV; (B) espectro de XPS de alta energia, relativo ao C1s, compreendendo o intervalo de energia de ligação de 298 a 280 eV; (C) espectro de XPS de alta energia, relativo ao O1s, compreendendo o intervalo de energia de ligação de 545 a 525 eV.
Fonte: autoria própria

3.2 Desempenho eletroanalítico das Carbon Spherical Shells

A Figura 8A apresenta os voltamogramas de DPV com ajuste de linha de base, na concentração de $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de paracetamol, comparando-se o GCE, GCE-400, GCE-450 e GCE-500. A Figura 8B apresenta o sinal de corrente em função da concentração de paracetamol realizado em tampão fosfato pH 7,0, para as diferentes plataformas sensoriais e pelo GCE. A Figura 8C exibe a curva analítica resultante para a plataforma GCE-CSS₄₀₀. A Figura 8D representa o mecanismo simplificado de eletro-oxidação (próximo de 450 mV), envolvendo a transferência de dois prótons e dois elétrons, formando o composto N-acetil-p-quinonaimina, como proposto por Nematollahi *et al*⁶¹.

Figura 8 - (A) DPV comparativo com ajuste de linha de base para GCE, GCE/CSS_{400nm}, GCE/CSS_{450nm} e GCE/CSS_{500nm} na concentração de 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,0; (B) Gráfico comparativo entre as curvas de calibração obtidas para as quatro plataformas sensoriais, sendo todas ajustadas com linha de base; (C) Representação da curva analítica obtida pelo sistema GCE-CSS₄₀₀; *Inset*: gráfico dos da distribuição dos resíduos; (E) Mecanismo simplificado de eletrooxidação do paracetamol proposto por Nematollahi *et al* ⁶¹
 Fonte: autoria própria

Como é possível observar na Figura 8A, a corrente de oxidação do paracetamol no eletrodo GCE/CSS_{400nm} é consideravelmente maior do que os demais. O gráfico de resíduos na inserção da Figura 8C mostra o diagnóstico de regressão com 50% dos pontos distribuídos acima e abaixo de zero indicando que a regressão linear é adequada. A Figura 8C mostra uma relação diretamente proporcional entre a corrente de pico anódica e a concentração do paracetamol, na faixa de concentração compreendida entre 0,60 e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O GCE não apresentou esta proporcionalidade no intervalo de concentração estudado. O coeficiente angular da regressão linear foi estimado com a equação:

$$b = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum[(x_i - \bar{x})^2]} \quad (2)$$

na qual $\bar{x}$ representa o valor médio dos valores de x e $\bar{y}$ representa o valor médio dos valores de y e os resultados obtidos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de regressão linear, sensibilidade, coeficiente produto momento (r) calculados para as diferentes plataformas sensoriais

Plataforma sensorial	Regressão linear		Sensibilidade A mol L ⁻¹	r	Número de medidas
	I / A				
	C _{paracetamol} / mol L ⁻¹				
GCE/CSS _{400nm}	I _P = 1,0×10 ⁻⁸ +0,020 C _p		2,0 × 10 ⁻²	0.998	20
GCE/CSS _{450nm}	I _P = 7,9× 10 ⁻⁹ + 0,015C _p		1,5 × 10 ⁻²	0.999	19
GCE/CSS _{500nm}	I _P = 9.8 × 10 ⁻⁹ + 0,011 C _p		1.1 × 10 ⁻²	0.993	17

Fonte: autoria própria

Os valores de LD e LQ foram obtidos utilizando as equações:

$$LD = y_B + 3 S_{y/x} \quad (3)$$

$$LQ = y_B + 10 S_{y/x} \quad (4)$$

em que y_B representa o coeficiente linear e $S_{y/x}$ o desvio padrão dos valores de y em x ⁶². O valor do $S_{y/x}$ é calculado pela equação:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (5)$$

na qual y_i representa o valor obtido experimentalmente, $\hat{y}_i$ o valor de y_i calculado ao utilizar a regressão linear e n o número de medidas. A Tabela 4 lista os resultados obtidos.

Tabela 4 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para GCE/CSS₄₀₀

Plataforma sensorial	LD	LQ
	mol L ⁻¹	mol L ⁻¹
GCE/CSS _{400nm}	$2,1 \times 10^{-7}$	$7,1 \times 10^{-7}$
GCE/CSS _{450nm}	$3,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
GCE/CSS _{500nm}	$3,8 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$

Fonte: autoria própria

Devido à dispersão aleatória dos resíduos (*Inset* Figura 8C), pode-se afirmar que a regressão linear proposta, representa de maneira adequada a relação entre a concentração de paracetamol e sua corrente de oxidação⁶². A concentração de espécies eletroativas (Γ / mol cm⁻²) na superfície das plataformas sensoriais foi estimada utilizando a Equação 6⁶³:

$$\Gamma = \frac{Q}{n_e F A} \quad (6)$$

em que Q (C), representa a carga elétrica corrigida, estimada ao integrar os picos anódicos obtidos em cada plataforma, para uma mesma concentração de analito; n representa o número de elétrons envolvidos no processo; F é a constante de Faraday (96485 C mol⁻¹) e A a área geométrica superficial do eletrodo. Os valores de Γ calculados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores calculados de carga e concentração de espécies eletroativas para cada plataforma sensorial

Plataforma sensorial	$Q / 10^{-6} \text{ C}$	$\Gamma / \text{mol cm}^{-2}$
GCE/CSS _{400nm}	1,7	1,2
GCE/CSS _{450nm}	1,2	0,89
GCE/CSS _{500nm}	0,83	0,61

Fonte: autoria própria

Os resultados obtidos indicaram que a sensibilidade do método está relacionada de maneira inversamente proporcional ao diâmetro das CSS. Este fato ocorre, devido ao arranjo superficial das CSS na superfície do GCE. Quando as esferas apresentam diâmetro reduzido, mais esferas se distribuem na superfície e mais camadas se formam, resultando em maior o número de esferas distribuídas na superfície, o que provoca a presença de maior número de espaços intersticiais entre as esferas e, conseqüentemente, maior é a área superficial do eletrodo e o número de espécies eletroativas presentes para ativar a reação redox⁶⁴. Conforme ocorre o aumento do diâmetro das esferas, há uma alteração em seu arranjo sobre a superfície do GCE, diminuindo assim a sensibilidade da detecção, como esquematizado na Figura 9.

Figura 9 - Esquematização das CSS sobre a superfície do GCE (considerando apenas uma camada de esferas) e a consequente sensibilidade e quantidade de espécies eletroativas
 Fonte: autoria própria

Portanto, devido ao desempenho superior e as evidências apresentadas, a plataforma GCE/CSS₄₀₀, foi selecionada como o eletrodo proposto pelo presente trabalho, sendo sobre o qual os demais estudos foram realizados.

Para investigar se o efeito de matriz afetava significativamente a resposta do sensor proposto, foram realizados estudos em três diferentes amostras baseadas em fluídos corpóreos artificiais (suor, saliva e urina), as quais foram utilizadas tanto como eletrólito suporte na cela eletroquímica, quanto para solubilizar o paracetamol que seria adicionado na cela.

A Figura 10 A, B e C apresenta as curvas analíticas e os respectivos gráficos de distribuição de resíduos (*inset*) obtidos nas análises das amostras de suor, de saliva e de urina, respectivamente.

Figura 10 - (A) Resultado obtido para a análise de paracetamol em amostras de suor artificial, no intervalo de concentração 0,6 a 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, *inset* gráfico de dispersão; (B) Resultado obtido para a análise de paracetamol em amostras de saliva artificial, no intervalo de concentração de 0,60 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, *inset* gráfico de dispersão; (C) Resultado obtido para a análise de paracetamol em amostras de urina sintética, no intervalo de concentração de 0,60 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, *inset* gráfico de dispersão
Fonte: autoria própria

É possível observar que a análise do paracetamol nas matrizes selecionadas sucedeu-se de maneira análoga à realizada em tampão fosfato, indicando que o efeito de matriz pode ser ignorado. A distribuição dos resíduos viabiliza afirmar que os pontos estão distribuídos de maneira aleatória ao redor do valor 0, sem a formação de tendências, o que indica que a curva de regressão ajusta-se de maneira adequada aos dados experimentais.⁴⁹ O sensor apresentou também baixos valores de limites de detecção, quando comparado a outras plataformas previamente desenvolvidas^{65,66,67,68,69,70,71} (listadas na tabela 8), e quantificação para a análise de paracetamol nas amostras de suor, saliva e urina artificiais, listados na Tabela 6.

Tabela 6 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para as amostras de suor, saliva e urina

Amostra	LD / nmol L⁻¹	LQ / nmol L⁻¹
Suor	120	480
Saliva	286	470
Urina	384	530

Fonte: autoria própria

Um estudo comparativo estatístico foi realizado entre a metodologia de análise desenvolvida e a padrão para a análise de paracetamol baseada em HPLC⁵², a fim de averiguar se há equivalência entre a técnica eletroquímica e cromatográfica⁶². Amostras de suor contendo paracetamol foram analisadas por DPV e HPLC.

A comparação estatística foi realizada pela regressão linear da equação da reta composta pelos resultados obtidos com cada uma das duas técnicas. Neste caso, foram atribuídos ao eixo das ordenadas os resultados da detecção eletroanalítica e ao eixo das abscissas os resultados da metodologia padrão de detecção, HPLC, apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Resultado da correlação entre as técnicas de voltametria de pulso diferencial e a cromatografia líquida de alta eficiência.
Fonte: autoria própria

É possível observar que o valor do intercepto é próximo de zero, ambos o coeficiente angular e o de correlação produto-momento apresentam valores próximos de 1, caracterizando a situação na qual os dois métodos apresentam equivalência para a detecção de paracetamol.

A fim de sustentar o resultado apresentado, foram realizados dois testes estatísticos do tipo *t de Student*, o teste *t de Student de correlação* e o teste *t pareado*. Estes analisam de maneira independente se existe relação entre as duas técnicas.

No teste *t de correlação*, verifica se há correlação linear entre as duas técnicas, sendo que a hipótese nula (H_0), alega que a correlação não existe, ou seja, caso o valor de t calculado seja inferior a um valor de t crítico, as duas técnicas não apresentam correlação⁴⁹. Para realizar este teste, utilizou-se a Equação 7:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (7)$$

na qual r é o coeficiente de correlação produto-momento; n o número total de medidas realizadas para cada técnica⁶². O coeficiente r é calculado pela Equação 8:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (8)$$

em que $\bar{x}$ representa o valor médio dos valores de x e $\bar{y}$ representa os valores médios de y .

No teste *t pareado*, avalia-se se existem diferenças significativas entre as duas técnicas, sendo que a hipótese nula (H_0) afirma que as duas técnicas são equivalentes, ou seja, de maneira contrária a do teste *t de correlação*, caso o t calculado apresente valor inferior a um t crítico, as duas técnicas são equivalentes⁴⁹. Para realizar este teste, utilizou-se a Equação 9:

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{s_d} \quad (9)$$

na qual $\bar{d}$ representa o valor médio das diferenças entre os valores pareados (valores de concentração obtidos para cada uma das técnicas ao analisar a mesma amostra); n o número total de medidas realizadas (o mesmo número para as duas técnicas) e s_d o desvio padrão das diferenças⁶². O valor do s_d é calculado pela Equação 10:

$$s_d = \sqrt{\sum_i (d_i - \bar{d})^2 / (n - 1)} \quad (10)$$

em que d representa o valor das diferenças para cada ponto e $\bar{d}$ o valor médio das diferenças.

Os resultados obtidos pelos dois testes t e as características de cada um dos testes estão listados no Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos nos testes estatísticos t de Student

	Teste t de correlação	Teste t pareado
	G.L = $n-2$	G.L = $n-1$
H_0	Não há correlação entre as técnicas	Não há diferença entre as técnicas
95%; $n=11$; $\alpha=0,05$	$t_{\text{crítico}} = 2,26$	$t_{\text{crítico}} = 2,26$
	$t_{\text{calculado}} = 63,4$	$t_{\text{calculado}} = 1,88$
Resultado	$t_{\text{calc}} > t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crítico}}$
	H_0 rejeitada	H_0 mantida
	As duas técnicas são equivalentes	

Fonte: autoria própria

Baseado nos resultados apresentados é possível afirmar que a técnica eletroquímica proposta aqui é exata⁶², podendo ser utilizada para quantificação de paracetamol em amostras biológicas de suor, de maneira alternativa ao método cromatográfico.

A seletividade do sensor proposto foi avaliada monitorando-se o pico de oxidação do paracetamol, em valor de concentração de $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ na amostra de suor, antes e após a adição dos possíveis interferentes na matriz, como glicose⁷², colesterol⁷³, ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico⁷³ em concentrações de $4,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, como indicado na Figura 12. Não

foram adicionadas outras substâncias como ácido lático e uréia, pois as mesmas já estavam na composição do suor⁵³.

No intervalo de potenciais estudado não foram observados picos adicionais, sugerindo que estas substâncias não interferem com a detecção de paracetamol. O sinal obtido para a concentração de paracetamol apresentou pequena variação com as adições dos interferentes, cerca de 3,6% para a glicose, 1,4% para o colesterol, 3,1% para o ácido ascórbico, 13% para a dopamina e 4,5% para o ácido úrico, o que sugere que o sensor apresentado apresenta seletividade suficiente para ser utilizado na quantificação de paracetamol, em amostras reais.

Figura 12 - Estudo de interferentes para a análise de paracetamol em amostras de suor. (A) DPV do estudo de interferentes; (B) Gráfico de barras com os percentuais relativos de corrente para o estudo de interferentes. Fonte: autoria própria

Os estudos de reprodutibilidade e repetibilidade foram realizados monitorando-se a variação da intensidade do pico de oxidação de paracetamol na concentração de $2,40 \mu\text{mol L}^{-1}$, em dez medidas (medida *intradias*, retirando o eletrodo da solução entre cada medida) e em dez medidas realizadas em no decorrer de dez dias (medida *interdias*, sem renovação da superfície), respectivamente. Os resultados estão indicados na Figura 13, sendo (A) interdias e (B) intradias. Pode-se observar que as medidas interdias apresentam uma dispersão de cerca 13,0% e as intradias uma dispersão de 2,70%, o que pode estar associado às alterações que ocorrem na superfície do GCE/CSS, provavelmente em relação à adsorção de paracetamol e à sua oxidação não controlada⁷⁴.

Figura 13 - Teste de reprodutibilidade e repetibilidade do eletrodo proposto. (A) as medidas interdias e (B) as medidas intradias.
 Fonte: autoria própria

Na Tabela 8 estão listados outros sensores eletroquímicos propostos para a detecção de paracetamol, juntamente com os resultados obtidos neste presente trabalho, para comparação. É possível verificar que a plataforma sensorial obtida neste trabalho, GCE/CSS₄₀₀, possui desempenho equivalente às demais plataformas sensoriais propostas em outros artigos presentes na literatura. Apesar de apresentar o menor valor de sensibilidade dentre os trabalhos listados, obteve-se o segundo menor valor de LD, apresentando faixa linear de concentração estreita, porém com intervalo superior a uma década de concentração, o que demonstra ser suficiente para realizar medidas de paracetamol nestas concentrações.

Portanto, ao aplicar a estratégia simples de separação por diâmetro baseado em centrifugação foi possível obter um sensor equiparável aos demais sensores, os quais requerem estratégias mais complexas de fabricação.

Tabela 8 - Revisão de literatura de sensores eletroquímicos propostos para sensoriamento de paracetamol

Plataforma utilizada	Técnica eletroquímica	Sensibilidade ($\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
ERG¹/GCE	DPV	-----	1,2	5,00–800	Adhikari, B. R. et al, 2015 ⁶⁵
DLC²:VACNT³	CV	0,28	2,30	10,0–100	Silva, T. A., et al, 2014 ⁷⁵
SWCNT⁴/CCE⁵	DPV	0,47	0,12	0,20–150	Habibi, B. et al, 2011 ⁶⁷
MWCNTs⁶: graphite/GCE	SWV	0,11	0,20	0,47–13,2	Moghaddam, A.B. et al., 2010 ⁶⁸
PEDOT⁷/GO⁸/GCE	CV	0,08	0,57	10,0–60,0	Si, W. M. et al., 2014 ⁶⁹
f-MWCNTs⁹/GCE	DPV	0,06	0,52	1,00–90,0	Baghayeri, M. et al., 2013 ⁷¹
CSS/GCE	DPV	0,02	0,18	0,3–7,2	este trabalho

¹ grafeno reduzido eletroquimicamente; ² carbono similar a um diamante; ³ nanotubos de carbono alinhados verticalmente; ⁴ nanotubos de carbono de parede simples; ⁵ eletrodo de carbono cerâmico; ⁶ nanotubos de carbono de paredes múltiplas; ⁷ poli(3,4-etilenodioxitiofeno); ⁸ óxido de grafeno; ⁹ nanotubos de carbono funcionalizados.

4 CONCLUSÕES

O modo hidrotermal foi eficiente em preparar CSS de diversos diâmetros, as quais foram efetivamente separadas pelo seu diâmetro após sua síntese, através do processo de centrifugação diferencial. As CSS de diferentes diâmetros (400, 450 e 500 nm) foram empregadas na construção de diferentes plataformas sensorias para detecção do paracetamol. Selecionada a melhor plataforma (GCE/CSS_{400nm}), foram realizadas detecção e quantificação do fármaco em amostras de suor, saliva e urina, compondo um método não-invasivo de análise. O sensor exibiu excelente desempenho em relação aos valores de sensibilidade, limite de detecção e de quantificação para as três amostras. Baseado em parâmetros estatísticos, como o resultado gráfico de comparação entre as duas técnicas, sendo adicionalmente suportados pelos testes *t* de Student (de correlação e o pareado), o sensor se demonstrou equivalente à metodologia padrão de análise de paracetamol, baseada em HPLC, além de apresentar uma dispersão de 13% no decorrer de 10 dias, o que é bastante satisfatório.

As CSS são mais simples de serem sintetizadas quando comparadas aos outros materiais de carbono, como grafeno e nanotubos, seu uso é mais vantajoso, visto o custo relacionado à sua produção e desempenho apresentado, baixo custo de análise e baixa produção de resíduos.

REFERÊNCIAS

- ¹ RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- ² LEE, K. E.; MORAD, N.; TENG, T. T.; POH, B. T. Development, characterization and the application of hybrid materials in coagulation/flocculation of wastewater: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 203, p. 370-386, 2012.
- ³ WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: Wiley, 2004. 262p.
- ⁴ CERNAT, A.; TERTIȘ, M.; SĂNDULESCU, R.; BEDIQUI, F.; CRISTEA, A.; CRISTEA, C. Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 886, p. 16-28, 2015.
- ⁵ KUMAR, S.; RANI, R.; DILBAGHI, N.; TANKESHWAR, K.; KIM, K. H. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 1, p. 158-196, 2017.
- ⁶ CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373-2433, 2012.
- ⁷ GAN, T.; SHI, Z.; WANG, K.; CHEN, Y.; SUN, J.; LIU, Y. Size-controlled core-shell-structured Ag@ carbon spheres for electrochemical sensing of bisphenol A. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, n. 8, p. 2299-2309, 2015.
- ⁸ SUN, X. M.; LI, Y. D. Colloidal carbon spheres and their core/shell structures with noble-metal nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 43, n. 5, p. 597-601, 2004.
- ⁹ KOMIYAMA, M.; YOSHIMOTO, K.; SISIDO, M.; ARIGA, K. Chemistry can make strict and fuzzy controls for bio-systems: dna nanoarchitectonics and cell-macromolecular nanoarchitectonics. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 90, n. 9, p. 967-1004, 2017.
- ¹⁰ BAIRI, P.; MINAMI, K.; HILL, J. P.; NAKANISHI, W.; SHRESTHA, L. K.; LIU, C.; HARANO, K.; NAKAMURA, E.; ARIGA, K. Supramolecular differentiation for construction of anisotropic fullerene nanostructures by time-programmed control of interfacial growth. **ACS Nano**, v. 10, n. 9, p. 8796-8802, 2016.
- ¹¹ XU, Q. N.; YAN, F.; LEI, J. P.; LENG, C.; JU, H. X. Disposable electrochemical immunosensor by using carbon sphere/gold nanoparticle composites as labels for signal amplification. **Chemistry-a European Journal**, v. 18, n. 16, p. 4994-4998, 2012.

- ¹² KHAN, A. H.; GHOSH, S.; PRADHAN, B.; DALUI, A.; SHRESTHA, L. K.; ACHARYA, S.; ARIGA, K. Two-dimensional (2d) nanomaterials towards electrochemical nanoarchitectonics in energy-related applications. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 90, n. 6, p. 627-648, 2017.
- ¹³ CANEVARI, T. C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; LANDERS, R.; BENVENUTTI, E. V.; MACHADO, S. A. S. Sol-gel thin-film based mesoporous silica and carbon nanotubes for the determination of dopamine, uric acid and paracetamol in urine. **Talanta**, v. 116, p. 726-735, 2013.
- ¹⁴ CAMPOS, A. M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; CINCOTTO, F. H.; CANEVARI, T. C.; MACHADO, S. A. S. Sensitive determination of the endocrine disruptor bisphenol A at ultrathin film based on nanostructured hybrid material SiO₂/GO/AgNP. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2503-2507, 2016.
- ¹⁵ VICENTINI, F. C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; JANEGITZ, B. C.; MACHADO, S. A. S.; FATIBELLO, O. Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 227, p. 610-618, 2016.
- ¹⁶ KALINKE, C.; MANGRICH, A. S.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Biochar prepared from castor oil cake at different temperatures: A voltammetric study applied for Pb²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions preconcentration. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 526-532, 2016.
- ¹⁷ SEVILLA, M.; FUERTES, A. B. Chemical and structural properties of carbonaceous products obtained by hydrothermal carbonization of saccharides. **Chemistry – A European Journal**, v. 15, n. 16, p. 4195-4203, 2009.
- ¹⁸ BEATON, C. F.; EDWARDS, D. K.; SCHLÜNDER, E. U. **Heat exchanger design handbook: HEDH physical properties**. Düsseldorf: VDI-Verlag, 1987. 1500p.
- ¹⁹ ZHAO, P.; LI, D.; YAO, S.; ZHANG, Y.; LIU, F.; SUN, P.; CHUAI, X.; GAO, Y.; LU, G. Design of Ag@C@SnO₂@TiO₂ yolk-shell nanospheres with enhanced photoelectric properties for dye sensitized solar cells. **Journal of Power Sources**, v. 318, p. 49-56, 2016.
- ²⁰ SUN, X. M.; LI, Y. D. Ag@C core/shell structured nanoparticles: Controlled synthesis, characterization, and assembly. **Langmuir**, v. 21, n. 13, p. 6019-6024, 2005.
- ²¹ ALLEN, T. **Particle size measurement**. New York: Chapman and Hall, 1975. 512 p.
- ²² MAJEKODUNMI, S. O. A review on centrifugation in the pharmaceutical industry. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 5, n. 2, p. 67-78, 2015.

- ²³ XIA, X. H.; ZHANG, Y. Q.; FAN, Z. X.; CHAO, D. L.; XIONG, Q. Q.; TU, J. P.; ZHANG, H.; FAN, H. J. Novel metal@carbon spheres core-shell arrays by controlled self-assembly of carbon nanospheres: a stable and flexible supercapacitor electrode. **Advanced Energy Materials**, v. 5, n. 6, p. 1-9, 2015.
- ²⁴ ZHAO, P. L.; LI, D.; YAO, S. T.; ZHANG, Y. Q.; LIU, F. M.; SUN, P.; CHUAI, X. H.; GAO, Y.; LU, G. Y. Design of Ag@C@SnO₂@TiO₂ yolk-shell nanospheres with enhanced photoelectric properties for dye sensitized solar cells. **Journal of Power Sources**, v. 318, p. 49-56, 2016.
- ²⁵ GAN, T.; LV, Z.; DENG, Y. P.; SUN, J. Y.; SHI, Z. X.; LIU, Y. M. Facile synthesis of monodisperse Ag@C@Ag core-double shell spheres for application in the simultaneous sensing of thymol and phenol. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 6244-6252, 2015.
- ²⁶ DING, C.; ZENG, Y. W.; CAO, L. L.; ZHAO, L. F.; ZHANG, Y. Hierarchically porous Fe₃O₄/C nanocomposite microspheres via a CO₂ bubble-templated hydrothermal approach as high-rate and high-capacity anode materials for lithium-ion batteries. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 4, n. 16, p. 5898-5908, 2016.
- ²⁷ GAN, T.; SHI, Z. X.; WANG, K. L.; CHEN, Y. Y.; SUN, J. Y.; LIU, Y. M. Size-controlled core-shell-structured Ag@carbon spheres for electrochemical sensing of bisphenol A. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, n. 8, p. 2299-2309, 2015.
- ²⁸ ZHANG, S.; ZHENG, J. B. Synthesis of single-crystal alpha-MnO₂ nanotubes-loaded Ag@C core-shell matrix and their application for electrochemical sensing of nonenzymatic hydrogen peroxide. **Talanta**, v. 159, p. 231-237, 2016.
- ²⁹ MAO, S. X.; LONG, Y. M.; LI, W. F.; TU, Y. F.; DENG, A. P. Core-shell structured Ag@C for direct electrochemistry and hydrogen peroxide biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 48, p. 258-262, 2013.
- ³⁰ ZHOU, X.; DAI, X. X.; LI, J. G.; LONG, Y. M.; LI, W. F.; TU, Y. F. A sensitive glucose biosensor based on Ag@C core-shell matrix. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 49, p. 579-587, 2015.
- ³¹ HUANG, H. P.; CUI, R. J.; YU, L. J.; MAO, C. J. Preparation of au-decorated ag@c nanoparticle and its biosensing application. **Chemistry Letters**, v. 43, n. 6, p. 781-783, 2014.
- ³² PRESCOTT, L. F. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 10, p. S291-S298, 1980.
- ³³ RAUCY, J. L.; LASKER, J. M.; LIEBER, C. S.; BLACK, M. Acetaminophen activation by human-liver cytochromes P450iie1 and P450ia2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 271, n. 2, p. 270-283, 1989.
- ³⁴ KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 489-499, 2005.

- ³⁵ HARRISON, P. M.; WENDON, J. A.; GIMSON, A. E. S.; ALEXANDER, G. J. M.; WILLIAMS, R. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 26, p. 1852-1857, 1991.
- ³⁶ BOSCH, M. E.; SANCHEZ, A. J. R.; ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Determination of paracetamol: historical evolution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 291-321, 2006.
- ³⁷ BURGOT, G.; AUFFRET, F.; BURGOT, J. L. Determination of acetaminophen by thermometric titrimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 343, n. 1-2, p. 125-128, 1997.
- ³⁸ SIRAJUDDIN; KHASKHELI, A. R.; SHAH, A.; BHANGER, M. I.; NIAZ, A.; MAHESAR, S. Simpler spectrophotometric assay of paracetamol in tablets and urine samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 68, n. 3, p. 747-751, 2007.
- ³⁹ SAHEB, D. J.; REDDY, N. R.; CHAKRAVARTHY, I. E. Simultaneous determination of paracetamol and diclofenac sodium from combined dosage forms by absorbance difference method. **Asian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 767-772, 2004.
- ⁴⁰ SAFAVI, A.; MORADLOU, O. Simultaneous kinetic determination of paracetamol and p-aminophenol by using h-point standard addition method. **Journal of Analytical Letters**, v. 37, n. 11, p. 2337-2349, 2004.
- ⁴¹ EL-KOMMOS, M. E.; MOHAMED, N. A.; HAKIEM, A. F. A. Selective reversed phase high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of some pharmaceutical binary mixtures containing nsoids. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 15, p. 2188-2202, 2012.
- ⁴² BELAL, T.; AWAD, T.; CLARK, R. Determination of paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical mixture using HPLC and GC-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 10, p. 849-854, 2009.
- ⁴³ NÉMETH, T.; JANKOVICS, P.; NÉMETH-PALOTÁS, J.; KŐSZEGI-SZALAI, H. Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4-5, p. 746-749, 2008.
- ⁴⁴ GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; CHATTERJEE, S. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 149, n. 1, p. 252-258, 2010.
- ⁴⁵ DALMASSO, P. R.; PEDANO, M. L.; RIVAS, G. A. Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 173, p. 732-736, 2012.

- ⁴⁶ SACIOTO, T. R.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. New screen printed electrode based on graphite and polyurethane composite for the determination of acetaminophen. **Analytical Letters**, v. 46, n. 2, p. 312-322, 2013.
- ⁴⁷ BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 363-371, 2014.
- ⁴⁸ WINDMILLER, J. R.; WANG, J. Wearable electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 29-46, 2013.
- ⁴⁹ MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Harlow-Essex, UK: Pearson Education, 2005. 268 p.
- ⁵⁰ DA SILVA, O. B.; MACHADO, S. A. S. Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2348-2354, 2012.
- ⁵¹ BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. New York: Wiley, 2000. 883 p.
- ⁵² RANJBARI, E.; GOLBABANEZHAD-AZIZI, A. A.; HADJMOHAMMADI, M. R. Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 94, p. 116-122, 2012.
- ⁵³ MATHEW, M. T.; ARIZA, E.; ROCHA, L. A.; FERNANDES, A. C.; VAZ, F. TiCxOy thin films for decorative applications: Tribocorrosion mechanisms and synergism. **Tribology International**, v. 41, n. 7, p. 603-615, 2008.
- ⁵⁴ LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1-2, p. 367-374, 2001.
- ⁵⁵ RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; SHIMIZU, F. M.; COELHO, D.; PIAZZETA, M. H. O.; GOBBI, A. L.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA, O. N. A nanostructured bifunctional platform for sensing of glucose biomarker in artificial saliva: synergy in hybrid pt/au surfaces. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 86, p. 369-376, 2016.
- ⁵⁶ ASSUMPÇÃO, M. H. M. T.; DE SOUZA, R. F. B.; RASCIO, D. C.; SILVA, J. C. M.; CALEGARO, M. L.; GAUBEUR, I.; PAIXÃO, T. R. L. C.; HAMMER, P.; LANZA, M. R. V.; SANTOS, M. C. A comparative study of the electrogeneration of hydrogen peroxide using Vulcan and Printex carbon supports. **Carbon**, v. 49, n. 8, p. 2842-2851, 2011.
- ⁵⁷ LUA, A. C.; YANG, T. Effect of activation temperature on the textural and chemical properties of potassium hydroxide activated carbon prepared from pistachio-nut shell. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, n. 2, p. 594-601, 2004.

- ⁵⁸ KAHLERT, J. U.; RAWAL, A.; HOOK, J. M.; RENDINA, L. M.; CHOUCAIR, M. Carborane functionalization of the aromatic network in chemically-synthesized graphene. **Chemical Communications**, v. 50, n. 77, p. 11332-11334, 2014.
- ⁵⁹ BEAMSON, G. B., D. **High resolution XPS of organic polymers: the scienta ESCA300 database.v. 3.1.** New York: Wiley Interscience, 1992. 295 p.
- ⁶⁰ PUMERA, M. Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4146-4157, 2010.
- ⁶¹ NEMATOLLAHI, D.; SHAYANI-JAM, H.; ALIMORADI, M.; NIROOMAND, S. Electrochemical oxidation of acetaminophen in aqueous solutions: Kinetic evaluation of hydrolysis, hydroxylation and dimerization processes. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 28, p. 7407-7415, 2009.
- ⁶² MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry.** Harlow-Essex, UK: Pearson Education, 2005. 268 p
- ⁶³ RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; CAMPOS, A. M.; VICENTINI, F. C.; JANEGITZ, B. C.; MENDONCA, C. D.; FURINI, L. N.; BOAS, N. V.; CALEGARO, M. L.; CONSTANTINO, C. J. L.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA, O. N. Sensitive detection of estriol hormone in creek water using a sensor platform based on carbon black and silver nanoparticles. **Talanta**, v. 174, p. 652-659, 2017.
- ⁶⁴ CHENG, C.; WANG, S. T.; WU, J. N.; YU, Y. C.; LI, R. Z.; EDA, S.; CHEN, J. G.; FENG, G. Y.; LAWRIE, B.; HU, A. M. Bisphenol A sensors on polyimide fabricated by laser direct writing for onsite river water monitoring at attomolar concentration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 28, p. 17784-17792, 2016.
- ⁶⁵ ADHIKARI, B.-R.; GOVINDHAN, M.; CHEN, A. Sensitive detection of acetaminophen with graphene-based electrochemical sensor. **Electrochimica Acta**, v. 162, p. 198-204, 2015.
- ⁶⁶ SILVA, T. A.; ZANIN, H.; MAY, P. W.; CORAT, E. J.; FATIBELLO, O. Electrochemical performance of porous diamond-like carbon electrodes for sensing hormones, neurotransmitters, and endocrine disruptors. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 23, p. 21086-21092, 2014.
- ⁶⁷ HABIBI, B.; JAHANBAKHSHI, M.; POURNAGHI-AZAR, M. H. Differential pulse voltammetric simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid using single-walled carbon nanotube-modified carbon-ceramic electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 411, n. 2, p. 167-175, 2011.
- ⁶⁸ MOGHADDAM, A. B.; MOHAMMADI, A.; MOHAMMADI, S.; RAYEJI, D.; DINARVAND, R.; BAGHI, M.; WALKER, R. B. The determination of acetaminophen using a carbon nanotube:graphite-based electrode. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 3-4, p. 377-384, 2010.

- ⁶⁹ SI, W. M.; HAN, Z.; LEI, W.; WU, Q. J.; ZHANG, Y. H.; XIA, M. Z.; HAO, Q. L. Fast electrochemical determination of imidacloprid at an activated glassy carbon electrode. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 161, n. 1, p. B9-B13, 2014.
- ⁷⁰ ALOTHMAN, Z. A.; BUKHARI, N.; WABAIDUR, S. M.; HAIDER, S. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and acetaminophen using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 146, n. 1, p. 314-320, 2010.
- ⁷¹ BAGHAYERI, M.; NAMADCHIAN, M. Fabrication of a nanostructured luteolin biosensor for simultaneous determination of levodopa in the presence of acetaminophen and tyramine: Application to the analysis of some real samples. **Electrochimica Acta**, v. 108, p. 22-31, 2013.
- ⁷² MITSUBAYASHI, K.; SUZUKI, M.; TAMIYA, E.; KARUBE, I. Analysis of metabolites in sweat as a measure of physical condition. **Analytica Chimica Acta**, v. 289, n. 1, p. 27-34, 1994.
- ⁷³ CHENG, J. B.; RUSSELL, D. W. Mammalian wax biosynthesis: II. expression cloning of wax synthase cdnas encoding a member of the acyltransferase enzyme family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37798-37807, 2004.
- ⁷⁴ RAY, K. R.; MCCREERY, R. L. Characterization of the surface carbonyl and hydroxyl coverage on glassy carbon electrodes using Raman spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 469, n. 2, p. 150-158, 1999.
- ⁷⁵ SILVA, T. A.; ZANIN, H.; MAY, P. W.; CORAT, E. J.; FATIBELLO-FILHO, O. Electrochemical performance of porous diamond-like carbon electrodes for sensing hormones, neurotransmitters, and endocrine disruptors. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 23, p. 21086-92, 2014.