

0

São Paulo
2014

FT-3895
Versão corr.

MICROELETRODOS DE MEDIÇÃO AU-PIM-Cu(II) E ELETRODOS DE
REFERÊNCIA EM ESTADO SÓLIDO AU/AU^xCL/PPi-CL/PU:
SENSOR VOLTAMÉTRICO INTEGRADO SOBRE UM SUBSTRATO
PLANAR DE SILÍCIO E MODIFICADO COM POLÍMEROS
CONDUTORES PARA MEDIÇÃO EM MEIO FISIOLÓGICO DO
NÍTRITO E AVALIAÇÃO DOS INTERFERENTES

FERNANDO LUIS DE ALMEIDA

FERNANDO LUIS DE ALMEIDA

Microeletrodos de medição Au-PIm-Cu(II) e eletrodos de referência em estado sólido Au/Au_xCl_y/PPi-CI/PU: sensor voltamétrico integrado sobre um substrato planar de silício e modificado com polímeros condutores para medição em meio fisiológico do nitrato e avaliação dos interferentes

Tese de doutorado apresentada à
Escola Politécnica da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

FERNANDO LUIS DE ALMEIDA

Microeletrodos de medição Au-PIm-Cu(II) e eletrodos de referência em estado sólido Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU: sensor voltamétrico integrado sobre um substrato planar de silício e modificado com polímeros condutores para medição em meio fisiológico do nitrato e avaliação dos interferentes

Tese de doutorado apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Area de Concentração: Engenharia Elétrica

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Gomes dos Santos Filho

São Paulo

2014

0881564


Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 30 de abril de 2014.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador Roberto Gomes dos Santos Filho

Escola Politécnica - EPBC

31200051251

RC

Universidade de São Paulo
Biblioteca da Escola Politécnica
FT-3895
v. 1251 corr.

Catálogo-na-publicação

Almeida, Fernando Luis de
Microeletrodos de medição Au-Ptm-Cu(II) e eletrodos de referência em estado sólido Au/Au₂Cl₂/PPi-Cl/PU: sensor voltamétrico integrado sobre um substrato planar de silício e modificado com polímeros condutores para medição em meio fisiológico do nitrato e avaliação dos interferentes / F.L. de Almeida. -- versão corr. -- São Paulo, 2014. 303 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1. Microeletrônica 2. Eletroquímica 3. Química orgânica I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II. t.

DEDICATÓRIA

Homenagem ao Leitor

Em celebrações especiais oferecem-se presentes para comemorar.

No dia de hoje, especial para mim e, principalmente, para você, também gostaria de oferecer-lhe um presente.

Presente e vivenciado nas primeiras horas deste dia, por isto ainda na memória!

Na verdade é uma receita, uma receita que proporcionará equidade nos sentimentos e racionalidade nas ações.

Estou falando da simplicidade...

Sábio aquele que busca na coisa aparentemente complexa a simplicidade de sua essência.

Se regramos a vida, como dito, é possível intensificar sentimentos que são necessários aos seres humanos e, além disso, conduzir conscientemente os propósitos estabelecidos, a fim de conquistar objetivos de vida.

Utilizar essa receita é uma tarefa árdua, que exige muita dedicação e disposição para vencer as contradições.

O presente oferecido cultivado em nós dará frutos. Da semente germina uma nova geração de pessoas especiais como você, que fazem jus ao presente.

(Fernando de Almeida, estudante de Ciências Sociais)

AGRADECIMENTOS

Letor, permita-me um breve comentário. Dediquei-me quatro anos e alguns meses a este trabalho de Doutorado¹; eu não teria muito a agradecer se fosse extremamente rígido às minhas ilusões e aos meus anseios, perante à pesquisa científica desenvolvida no Brasil quanto à forma e às relações humanas. Por outro lado, seria injusto de minha parte não registrar as colaborações prestadas que ora corroboraram e ora limitaram o desenvolvimento deste trabalho de Doutorado. Agradeço:

Ao Laboratório de Sistemas Integráveis da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LSI-EPUSP), pela infra-estrutura disponível e não disponível, tornando possível o avanço tecnológico e os fatores limitantes.

Ao orientador Prof. Dr. Sebastião Gomes dos Santos Filho, pela dedicação científica e pelas alusões durante a elaboração e desenvolvimento desse Doutorado.

Ao *Programa Ibero-Americano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)*, pelo suporte financeiro (Projeto SENSAME - 506P10292).

Ao *Instituto de Microelectrónica de Barcelona - Centro Nacional de Microelectrónica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IMB-CNM CSIC)*, pelo grupo de trabalho que desenvolveu os macroeletrodos de ouro (Au) sobre substrato de silício (Si) fixados em *print circuit board* (PCB).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro na compra do equipamento Autolab.

Ao Prof. Dr. Marcelo Baratto Andrade Fontes, pelos eletrodos de referência *Bionalytical Systems Inc. (BASi®)* e pelas máscaras fotolitográficas.

¹ A palavra Doutorado (com letra maiúscula), nesta tese, expressa o conceito de integrabilidade entre as necessidades perante aos indivíduos (orientado/orientador) e ao social (grupos de pesquisa e relações extra-acadêmicas) e as atividades totais realizadas no decorrer do tempo (estudos, publicações, reuniões e trabalhos referentes ao doutorado e tese e defesa e outras ações vinculadas). Similar definição para as palavras Mestrado e Pós-doutorado.

À Profa. Dra. Idágene Cestari, pelo empréstimo do suporte com slot WPLCC-68 conectado a 4 DB-25 macho, o qual foi desenvolvido por Fontes, Mazzetto e Cestari (2004).

Ao Ricardo Rangel, pelo crescimento térmico do óxido de silício (SiO₂), pela troca do filtro de água desionizada (DI) e pelo intercâmbio de concepções críticas no âmbito da pesquisa.

Ao Dr. Sérgio Lopera Aristizábal, pela ajuda com os procedimentos de deposição e fotografação do SU-8 e de inversão das máscaras fotolitográficas.

Ao Márcio de Almeida Valle, pelas deposições - por *e-beam* ou por *sputtering* - de titânio e de ouro sobre substrato de silício oxidado.

À Dra. Cecília Jimenez-Jorquera, pelo eletrodo de referência Orion, pela alumina coloidal e pelos macroeletrodos PCB adquiridos do grupo IBM-CNM.

Ao Prof. Dr. Mario Ricardo Gongora Rubio, pelas pastas poliméricas de ouro e de cloreto de prata (AgCl).

Ao Prof. Dr. Lúcio Agnes, pelos reagentes químicos.

Ao Prof. Dr. Fernando Josepetti Fonseca, membro da banca de qualificação desse doutorado, pelas disponibilização de amostras de monômeros poliméricos, as quais foram separadas pelo Dr. Guilherme Braga.

Ao Prof. Dr. Mauricio Massazumi Oka, pela participação na banca de qualificação desse Doutorado.

Ao Dr. Leonardo Frois Hernandez, ao Dr. Roberto Lima e à Dra. Maria Lúcia Pereira da Silva, pela colaboração na deposição e na caracterização dos filmes *tetraetilortossilicato* (TEOS) e *tetraetilortossilicato-metil-nonafluoro(iso)butil-éter* (TEOS-HFE).

À Dra. Juliana Lopes Cardoso, pela contribuição irrestrita na transferência de conhecimentos e no desenvolvimento do *software* em *Labview*® e pelas especificações técnicas para compra do *No-break*.

Ao Me. Timoteo Francisco de Oliveira, pelos cortes das lâminas de silício que definiram as dimensões dos sensores integrados.

Ao Me. Gustavo Marcati Alexandrino Alves, pela manutenção no programa de aferição e gravação de potencial eletroquímico (*software* em *Labview*®), pela configuração do *No-break* e pelas ideias arboradas entre catés.

Ao doutorando Massaki Igarashi, pela disponibilização da lâmpada de radiação ultravioleta de onda curta, do inglês, *short-wavelength ultraviolet radiation (UV-C)* e pelo uso da máquina fotográfica.

À Dra. Zaira Mendes da Rocha, pelo empréstimo de válvulas solenóides que não foram utilizadas devido ao limite de tempo.

Ao Me. César Augusto Alves de Souza, que foi o último usuário do *PalmSens* antes deste trabalho de Doutorado, pela conversão do equipamento com exceção dos conectores.

Ao Valtemar F. Cardoso, pela contribuição com soldagens para fabricação dos cabos com conectores DB-25 e pela utilização do estereoscópio.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), pelo suporte financeiro (Projeto doutorado 143405/2009-8) e pelos projetos temáticos que permitiram a compra do *No-break*, do computador portátil, da capela de eletroquímica e da balança analítica de precisão.

Ao Nelson Ordonez, pelos encaminhamentos de fabricação das mãos-francesas e do filtro de ar para o insuflador e pelo treinamento no uso do perfilômetro.

Ao Elísio Lima, pela confecção dos suportes mãos-francesas para sustentação do motor de exaustão e de insulfamento da capela eletroquímica e pelo corte de barras de ferro para montagem de experimentos eletroquímicos.

A equipe técnica do laboratório, principalmente ao técnico Rubens de Alcântara Pereira e Júlio Cesar dos Santos, pelo trabalho de colocação do tubo pouco flexível da exaustão e pelos rolos de papéis toalhas, luvas e produtos químicos usados no laboratório.

Ao técnico Dr. Adir José Moreira, pela ajuda na reforma do laboratório de eletroquímica (desmontagem e montagem de capelas químicas e bancadas de trabalho), pela instalação da capela eletroquímica que recebeu o equipamento Autolab e do sistema de exaustão e insulfamento da mesma e pelo trabalho na obtenção das imagens por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Ao Rubens Pereira e ao Celso Nascimento de Alcântara, pela ajuda na colocação dos suportes mãos-francesas.

A equipe de informática, em especial ao Alexandre e ao Renato, pela configuração do computador de controle do Autolab e pelos trabalhos de validação da senha de acesso ao sistema.

Aos colegas do administrativo e da secretaria: Sara, Bruna, Edvaldo, Márcio, Cellina, Fernanda e Noemi, que sempre que necessário ajudaram-me com as burocracias. Em especial, à Noemi, que será novamente agradecida por incentivar a contratenação mensal dos aniversariantes.

Ao Pedro Mariano Teóodor Caetano, pelas embalagens de M&M's que serviram para armazenar reagentes, pela folha de papel em branco usada como fundo branco na tiragem de fotos e pelas curiosidades e um teste empírico como tentativa de fabricação de uma célula eletroquímica.

À minha ex-namorada, Talita Luzia Alves Tecedor, que mesmo sabendo do "barco furado" se dispôs a navegar neste Doutorado, ela merece minhas considerações pelo apoio nos momentos de cansaço e pelas quentinhas saborosas.

À minha "muié", Juno e aos meus "fios", Cotoço e Nickole, pelas mordidas, abraços e arranhões que permitiram aliviar o estresse e aflorar novas ideias no Doutorado.

À amiga Moira Versolato, que trabalhou na adequação linguística de algumas publicações científicas e na correção ortográfica desta tese.

Ao Beto Antunes, sempre amigo e irmão, que ajudou-me em momentos que mais precisei e comprou passagens aéreas para ida a congressos.

A outros amigos e amigas que mesmo sem tempo, não deixei de considerá-los importantes em minha vida. Cito-os: Paulo Antunes, Daniela Avelar, Vitor Ahagon, Renata Santarem, Thati Mendes, Marília Zendron, Bruno Lima, Edson Lima, Tatiana Gobo, Leandro Latu, Sheila Heuser, Theo Cardoso, Fernanda Borsatto, Giuliano Araújo e família (Daniela, Eduarda e Matheus), Karen Caldeira, Sérgio Terra, Marcus Vinicius de Souza, Tatiana Souza, Lucineia Vieira, Kathleen Angulo, Paulinha, Fernando Filho, Patrick, Fabiana Carneiro, Mari Oliveira e Vinicius Heltai.

Aos camaradas do Partido Comunista Brasileiro (PCB), que compreenderam meu distanciamento da militância diante da necessidade de concluir esse Doutorado: Renato Queiroz, Roqueiro, Guilherme Guedes, Thiago Loreto, Wagner Farias, Vivi, Edmilson Costa, César Mangolin, Michele da Silva e Mario Pereira.

Aos trabalhadores que contribuíram com sangue, suor e impostos, os quais são necessários para custear a infra-estrutura básica da universidade e possibilitar meus estudos.

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

À família:

Minha madrinha, Alzira Fermino de Souza, que ultimamente movida por ciúmes e valores morais reluta em apoiar-me, pelo "passádo" ajudando-me no trajeto acadêmico e científico.

Tio Guiné, faço votos pela recuperação integral de sua saúde (cirurgia de ponte de safena).

Renata Mari de Oliveira, Clayton (marido) e Guilherme (filho), por incentivos - nada tradicionais - que me motivaram a trilhar caminhos pelos estudos e chegar ao Doutorado.

Leonilda, Dona Tuca, Carlos, Adalberto Carlos de Oliveira e a lista é grande.

Zé Roberto, pelas conversas e cervejas no interior de São Paulo.

Pedrinho, pelos conselhos e experiências válidos para avançar no Doutorado.

As amigas de Monte Aprazível, em especial: Zinha, Cida e Clarice.

Ao Movimento Estudantil da Universidade Federal de São Paulo (ME-UNIFESP), pelas lutas travadas pro-educação; as conseqüências para este Doutorado foram duas disciplinas com conceito B. Por outro lado, muitos amigos e amigas foram conquistados, cito alguns: Erica Meireles, Daniel Andrade, Vinicius Pacheco de Lima, Thiago Miguel, Amanda das Mercês, Ricardo Almeida, Yago Matos, Felipe Alencar e Renan Cervera.

Durante este Doutorado, agradeço - *in memoriam* - algumas pessoas cujo corpo fisiológico chegou ao fim por causa de um câncer, mas suas vidas não terminam diante ao cenário científico; são elas: Claudia Sexilha de Oliveira, Natalia Dias, Antônio de Oliveira, Rita Maria Ribeiro e Agnaldo Stefani.

Tão importante quanto agradecer aos demais, é agradecer a todos os meus amigos que colaboraram voluntária ou involuntariamente com o desenvolvimento deste Doutorado. Em especial o Claudio da Silva.

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

EPÍGRAFE

O Mundo, a Sociedade, o Doutorando, a Vida...
Um pouco de tudo, extremamente pouco de muito.
Muito pouco de um.

(Fernando de Almeida, estudante de Ciências Sociais)

Outros poemas e reflexões no livro:

Poemas censurados de um recém-Dr.

RESUMO

Nesta tese, *a priori*, diversos polímeros condutores - especialmente polianilina, polipirrol, polí(imidazol) e poliuretano - foram avaliados, objetivando a fabricação de eletrodos modificados de medição e de referência para a medição do nitrito em meios fisiológicos. Baseado na avaliação dos diversos polímeros mencionados, desenvolvemos um sensor integrado - sobre um substrato de silício de dimensões 25,5 mm de largura e 25,5 mm de comprimento - com microeletrodos de ouro (raio entre 2 µm e 7,5 µm) eletropolimerizados com polí(imidazol), funcionalizados com cobre(II) (Au-PIm-Cu(II)) e utilizando eletrodo planar de referência em estado sólido (EPRES) de ouro/cloro de ouro/polipirrol-cloro/políuretano (Au/Au_xCl_y/PPi-Cl⁻/PU) miniaturizado, cuja área geométrica média foi de (0,135 ± 0,001) mm². Os EPRES Au/Au_xCl_y/PPi-Cl⁻/PU foram caracterizados com relação ao eletrodo comercial de referência prata/cloro de prata 3 mmol cm⁻³ de cloreto de sódio (Ag/AgCl 3M NaCl). O potencial de eletrodo foi aferido - durante trinta dias em solução 0,15 mmol cm⁻³ de cloreto de sódio (NaCl) com pH 7,2 - o valor médio obtido foi próximo a +0,200 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} (gradiente de degradação médio de -14 µV h⁻¹). Um terceiro eletrodo, o auxiliar de platina [(1,75 ± 0,01) mm²] foi introduzido na célula de medição completando o sistema de medição eletroquímica (SME) com três eletrodos. Este trabalho de doutorado descreve um procedimento inédito para a medição voltamétrica do nitrito buscando uma aplicação, por exemplo prevenir um infarto do miocárdio. Para tal, a solução química de referência (SQR) com pH de 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C foi desenvolvida com o objetivo de imitar as condições fisiológicas do sangue de seres humanos (as espécies químicas em concentração compatível com as encontradas em meio fisiológico - cloratos, fosfatos, sulfatos, cobre(II), íons de hidrogênio, hidroxilas e os gases oxigênio, nitrogênio e carbônico dissolvidos). Por meio da técnica eletroquímica de voltametria cíclica [faixa de potencial entre (+0,050 e +0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, mediu-se as concentrações de nitrito de (5 a 30) nmol cm⁻³ e avaliou-se, no sinal de medição do nitrito, a influência cruzada das espécies interferentes. As concentrações foram administradas ao dobro e a dez vezes das encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos: 0,11 µmol cm⁻³ de ácido ascórbico (AA), 0,52 µmol cm⁻³ de ácido úrico (AU) e 0,15 µmol cm⁻³ de paracetamol (PA). Por fim, foi empregada uma metodologia de análise comparativa dos resultados experimentais com os trabalhos reportados na literatura, principalmente a sensibilidade normalizada pela área efetiva dos eletrodos. A partir de uma sequência de experimentos, destacamos aqui, os resultados de linha base, linearidade, repetitividade, estabilidade e sensibilidade: -(150,35 ± 0,05) nA, 0,9919, 80%, 99% e 7,25 10⁵ A cm mol⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Medição voltamétrica. Nitrito. Interferentes. Polí(imidazol). Eletrodo em estado sólido. Referência integrada.

ABSTRACT

In this dissertation, various conductive polymers – especially polyaniline, polypyrrole, polyimidazole and polyurethane – were evaluated, *a priori*, aiming the fabrication of modified electrodes for measurement and as reference for the detection of nitrite in physiological media. Based on the evaluation of the mentioned polymers, it was developed an integrated sensor – on a silicon substrate, 25,5 mm in width and 25,5 mm in length – with gold microelectrodes [radius of (2 to 7,5) μm] electropolymerized using polyimidazole, activated with copper(II) (Au-PI_m-Cu(II)) and by using a miniaturized solid state planar electrode as reference (EPRES) of gold/chloride and gold/polypyrrole-chloride/polyurethane (Au/Au^xCl_y/PI-Cl/PU), whose geometrical average area, was (0,135 \pm 0,001) mm^2 . The EPRES Au/Au^xCl_y/PI-Cl/PU were characterized using a commercial silver/silver chloride electrode as reference with 3 mmol cm^{-3} of sodium chloride (Ag/AgCl 3M NaCl). The electrode potential was measured during thirty days in a 0,15 mol cm^{-3} solution of sodium chloride (NaCl) with pH 7,2 – the average value was approximately +0,200 $\text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ (with an average degradation gradient of -14 $\mu\text{V h}^{-1}$). A third electrode, the auxiliary of platinum [(1,75 \pm 0,01) mm^2], was introduced in the electrochemical cell to complete the electrochemical measurement system (SME) with three electrodes. In addition, this dissertation describes a novel electrochemical procedure to measure nitrite based on applications, for example, as a *in- loco* system to prevent myocardial infarction. For this, a solution, used as reference to simulate a physiological media (SQR) with pH 7,4 \pm 0,02 a (24 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, was proposed to imitate the physiological media provided by the human blood (this is to say, having the chemical species that are encountered in the physiological media – chlorides, phosphates, sulphates, copper(II), hydrogen ions, hydroxyls and gas oxygen). Using cyclic voltammetry [ranging from (+0,050 to +0,300) $\text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$], it was measured concentrations of nitrite in the range of (5 to 30) nmol cm^{-3} and it was evaluated the cross influence of some interfering chemical species. The concentrations of the interfering chemical were chosen two and ten times higher than that in the blood, plasma or human serum: 0,11 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ of ascorbic acid (AA), 0,52 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ of uric acid (AU), and 0,15 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ of paracetamol (PA). Lastly, it was employed a methodology for a comparative analysis of the experimental results with the results reported in literature including the sensitivity normalized in relation to the effective area of the electrodes, the ground line, the linearity, repeatability, and stability: 7,25 $10^5 \text{ A cm mol}^{-1}$, -(150,35 \pm 0,05) nA, 0,9919, 80% and 99%, respectively.

Keywords: Voltametric measurement. Nitrite. Interfering chemicals. Polyimidazole. Solid state electrode. Integrated reference.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Números de artigos publicados abordando algum tipo de limpeza ou condicionamento eletroquímico ou ativação superficial para microeletrodos de ouro. 65
- Figura 2** – Números de artigos publicados a cada ano com as palavras-chave “nitrite” e “sensor” “electrochemical detection” ou “electrochemical determination” ou “electrochemical analysis”. 69
- Figura 3** – Porcentagens do total de publicações com as palavras-chave “nitrite” e “electrochemical sensor”, distribuídos por países. A China representa 1/3 das publicações mundias, e o Brasil está em terceiro lugar, concorrendo com Reino Unido e França. 70
- Figura 4** – Números de artigos publicados ao longo do tempo, por autores brasileiros que mais reportaram artigos com as palavras-chave “nitrite” e “sensor” e “electrochemical”. 71
- Figura 5** – Números de artigos publicados por universidades brasileiras com as palavras-chave “nitrite” e “sensor” e “electrochemical”. 71
- Figura 6** – Em (a), a representação da variação do pH sanguíneo e da concentração de gás oxigênio pela ação do óxido nítrico convertido a partir do nitrito, seja pelas células endoteliais, hemoglobinas ou mioglobinas. Em (b), o detalhe da parede muscular do coração, endocárdio (tecido interno), miocárdio (tecido intermediário) e pericárdio (tecido externo). 79
- Figura 7** – Esquema ilustrativo do processo de geração de energia bioquímica pela fosforilação oxidativa na mitocôndria e a ação de descontinuidade quando na presença de nitrito. 80
- Figura 8** – Esquema do mecanismo de reação do nitrito com a hemoglobina. 81
- Figura 9** – Mascara fotolitográfica: a) desenho da visão geral do sensor e b) detalhe da região central e das trilhas para definição dos 64 microeletrodos. 83

- Figura 10** – Mascara fotolitográfica II: a) desenho geral dos dois eletrodos de referência; e os detalhes: b) dos eletrodos de referência e c) da região central mostrando os 64 microeletrodos de medição. 83
- Figura 11** – Em (a), o esquema dos eletrodos da BASI[®] em uma célula eletroquímica em formato de T para testes de condicionamento eletroquímico usando solução em fluxo (descrita no APENDICE B e resultados apresentados em 5.1); e em (b), a configuração do sensor integrado (microeletrodos de Au), do eletrodo de referência comercial Ag/AgCl 3M NaCl da BASI[®] e do eletrodo auxiliar de platina com área de $(1,75 \pm 0,01) \text{ mm}^2$; todos foram introduzidos em um béquer contendo SQR a $\text{pH } 7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ \text{C}$. 85
- Figura 12** – Imagens de algumas etapas de fabricação do sensor integrado em substrato planar de silício. a) litografia do SU-8 e a definição das regiões de trilhas sobre as quais foram definidos os microeletrodos. As demais imagens ilustram alguns problemas recorrentes durante a fabricação dos sensores: b) 10 min em acetona a 80°C , onde o polímero se despegou da lâmina de silício oxidada; c) bordas com resquícios de revelação do SU-8 (tempo insuficiente); e d) SU-8 com trincas devido ao estresse térmico (processo realizado a 95°C) e resfriado rapidamente a 25°C). 87
- Figura 13** – a) efeitos dos íons de hidrogênio na condução elétrica em polímeros de imidazole e b) capacidade de alterar os estados de oxidação. 99
- Figura 14** – Esquema representativo dos efeitos de dopagem (mais pronunciado usando soluções ácidas) com íons de hidrogênio e ânions em filmes de polipirrol. 100
- Figura 15** – Esquema demonstrativo do processo de oxidação e de redução da polianilina esmeraldina (condutor) e leucoesmeraldina (isolante), respectivamente, e de dopagem com íons de hidrogênio e ânions (da polianilina Base para a Salt). 101

- 100 Figura 16 – Esquema proposto por Long et al. (2003) para reação eletroquímica do poli(1,2-DAB) envolvendo íons de hidrogênio.
- 103 Figura 17 – Mero do 1,3-DAB na formação do polímero de 1,3-diaminobenzeno.
- 123 Figura 18 – Imagem ilustrativa do gráfico padrão DPV, que indica as correntes de pico (i_p) e de início de reação (i_i) e os respectivos potenciais (E_p) e (E_i).
- 127 Figura 19 – Imagens do macroeletrodo de ouro [(4,51 ± 0,01) mm²] obtidas por Microscopia Óptica; a) ouro corroído a potenciais positivos, empregando a solução de 1 H₂SO₄: 20 (20% IPA e água DI) e b) limpeza de ouro em mesma solução de ácido sulfúrico e IPA, efeitos de oxidação do IPA (WANG, Li et al., 2003).
- 128 Figura 20 – Condicionamento eletroquímico de microeletrodos de ouro empregando uma solução contendo 1 μmol cm⁻³ de ferricianeto de potássio em 0,10 mol cm⁻³ de KNO₃; as setas na vertical indicam o comportamento de decréscimo da corrente eletroquímica.
- 129 Figura 21 – Condicionamento eletroquímico dos microeletrodos de ouro (MF-2006 da BASI®) em solução de ácido nítrico e álcool isopropílico (0,05 mol cm⁻³ de HNO₃ + 0,05 mol cm⁻³ de IPA). a) os efeitos da oxidação do IPA em uma solução em estado estacionário (50 ciclos) e, em b) para uma solução pressurizada por ar atmosférico, onde ocorre saturação de gás oxigênio pela oxidação da água (12 ciclos).
- 130 Figura 22 – Condicionamento eletroquímico dos microeletrodos de ouro em solução ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (0,05 mol cm⁻³ de HNO₃ + 0,20 mol cm⁻³ de H₂O₂), pressurizada por gás nitrogênio ultrapuro configurando um fluxo ≥ 5 ml min⁻¹.
- 132 Figura 23 – O filme de ouro depositado seja por *e-beam* ou *sputtering* tem morfologia compatível com a literatura, mínima rugosidade e boa aderência (a). Em caso de exceção, o filme se despegou de acordo com a imagem (b).

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o cálculo de área efetiva exposta em solução ($1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,10 \text{ mmol cm}^{-3}$ de KNO_3). 134

Figura 25 – Voltamogramas padrão à velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$ em solução ($1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,10 \text{ mmol cm}^{-3}$ de KNO_3), após o condicionamento eletroquímico. 136

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos de eletropolimerização dos filmes poliméricos (70 ciclos a $0,050 \text{ V s}^{-1}$, as setas na vertical indicam decaimento de corrente durante a eletrodeposição dos polímeros ou o sentido da varredura). a) polianilina, b) poli(1,2-cis/trans-diaminobenzeno), c) poli(1,3-diaminobenzeno) e d) polipirrol foram polimerizadas usando uma faixa de potencial entre 0 e $+0,700 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$; e entre $+0,200$ e $+0,850 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ para eletrodepositar e) poli(imidazol) um microeletrodo e f) poli(imidazol) três microeletrodos. 138

Figura 27 – Imagens da superfície dos polímeros condutores obtidas por MEV com detector ETD de alto vácuo, energia de 10 kV e spot 2. a) poli(1,2-cis/trans-diaminobenzeno), b) poli(1,3-diaminobenzeno), c) polianilina, d) polipirrol e e) poli(imidazol). 140

Figura 28 – Em (a), o esquema - para eletrodos quadrados e circulares - com a indicação dos pontos de medição de espessura, realizadas com a técnica perfilométrica e em (b), o esquema para medição por elipsometria. 141

Figura 29 – Esquema de camadas para obtenção do eletrodo de referência em estado sólido com junção redox $\text{Au/Au} \times \text{Cl}_y$. 144

Figura 30 – Experimentos para averiguar a densidade de corrente adequada na eletrodeposição de prata (100 nm de espessura), utilizando a solução química SILVREX-S. 145

Figura 31 – Filme de prata eletrodepositado a $1,0 \text{ mA cm}^{-2}$ de densidade de corrente, com espessura de $1 \mu\text{m}$ sobre macroeletrodos de ouro cuja área geométrica é de $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$. 147

- Figura 32** – Imagens obtidas por Microscopia Óptica do filme de prata. a) espessura de 100 nm com ocorrência de defeitos pontuais na superfície da prata b) prata com 1 µm de espessura, na mesma escala de ganho, não se observa quantidade significativa de defeitos. 148
- Figura 33** – Imagens obtidas por Microscopia Óptica dos filmes de ouro e de prata. a) superfície de ouro não limpa, b) ouro após a limpeza química (já comentado no item 5.1 e 5.2) e c) a ocorrência de particulado sobre a prata eletrodepositada. 149
- Figura 34** – Cloreto reagido sobre a prata em três etapas de forma a permitir melhor aderência e maior estabilidade do filme AgCl eletroformado. 149
- Figura 35** – Imagens por Microscopia Óptica do cloreto de prata (espessura total do filme de 2,5 µm). (a) filme AgCl com a ocorrência de alguns defeitos pontuais (círculos em branco), (b) filme AgCl com homogeneidade adequada (aumento: 20x / 0,40) e (c) campo escuro em filme AgCl de 2,5 µm de espessura. 151
- Figura 36** – Imagem obtida por Microscopia Confocal para obtenção das rugosidades RMS dos filmes de AgCl. 151
- Figura 37** – Imagens obtidas por MEV (energia EHT de 5 kV e detector SE2) com técnica FIB acoplada (comprimento de 10 µm feito com energia de 30 kV:2pA). a) morfologia superficial do filme AgCl, b) região onde foi aplicado o FIB, c) perfil na vertical do filme AgCl e d) efeito de carregamento de elétrons no filme AgCl. 152
- Figura 38** – Sequência de fabricação dos macroEPER de junção redox Ag/AgCl. (a) ouro limpo de acordo com o procedimento de condicionamento eletroquímico para macroeletrodos, (b) prata eletrodepositada, (c) filme de cloreto de prata e (d) imagem por MEV da superfície do filme cloreto de prata. 153
- Figura 39** – Por Microscopia Óptica em campo escuro. (a) antes do procedimento de condicionamento e (b) após. 154

- Figura 40** – Comportamento eletroquímico típico durante a reação de cloração de superfície de ouro, a um potencial fixo de $+0,850 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl}}^{3\text{M NaCl}}$ durante 10 min em solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,2. 155
- Figura 41** – Por Estereoscopia Óptica, imagens dos filmes de ouro clorado. Comparação entre o ouro clorado e ouro não modificado. 155
- Figura 42** – Comportamento eletroquímico na eletropolimerização do filme de polipirrol com cloretos (a) e imagem obtida por MEV da superfície do polímero PPi-Cl (b). 158
- Figura 43** – Imagens por Microscopia Óptica dos filmes de TEOS e de compostos TEOS-HFE recém-depositados e após exposição à UV-C (setas vermelhas). No final dos experimentos eletroquímicos (setas azuis), as superfícies dos filmes com e sem exposição UV-C também foram analisadas. 160
- Figura 44** – Comportamento eletroquímico típico durante a eletrodeposição de poliuretano sobre PPi-Cl a um potencial fixo de $+0,650 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl}}^{3\text{M NaCl}}$ durante 1 h, solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,2. 161
- Figura 45** – Sequência de fabricação dos macroEPRES de junção redox Au/Au \times Cl $_y$. (a) Au limpo de acordo com o procedimento de condicionamento eletroquímico desenvolvido, (b) cloreto reagido sobre superfície de ouro, (c) filme de polipirrol com cloretos e (d) imagem por MEV da superfície do filme de poliuretano depositado sobre o polipirrol com cloretos. 161
- Figura 46** – Potenciais medidos entre eletrodos de referência RE-5B da BASI[®] (eletrodos I e II) e o eletrodo de referência comercial Digimed. 163
- Figura 47** – Curva padrão de reversibilidade obtida entre o eletrodo de referência fabricado e comercial Orion. 164

- Figura 48** – Esquema da configuração experimental para medição dos potenciais de eletrodos modificados. O equipamento NI USB-6259, os eletrodos de referência, o pH metro e a solução fisiológica ($0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 6,36 a 25°C) são apresentados. 166
- Figura 49** – Ateriação, ao longo do tempo, dos potenciais de EPER de junção redox Ag/AgCl com relação a um eletrodo de referência comercial Orion. 167
- Figura 50** – (a) Experimentos eletroquímicos realizados em soro fisiológico ($0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 6,36 a 25°C) para eletrodos com espessura maior que 100 nm. (b) O comportamento eletroquímico dos filmes finos de TEOS (70 nm de espessura ou menos) e dos compostos de TEOS-HFE (com espessura média de 100 nm). 171
- Figura 51** – Ateriação dos potenciais eletroquímicos dos macroEPRES após 30 dias em solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,4 a 25°C . 174
- Figura 52** – Voltamogramas cíclicos para avaliação comparativa do comportamento do SME alterando o eletrodo auxiliar. Linhas em vermelho e preto representam o eletrodo auxiliar de cobre e linhas em azul e verde o eletrodo auxiliar de platina. A velocidade de varredura foi de $0,050 \text{ V s}^{-1}$ e a faixa de potencial de $+0,300$ a $+0,050 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$. Sentidos dos voltamogramas cíclicos estão indicados no gráfico. 176
- Figura 53** – Gráficos DPV em soro fisiológico (sinal de linha base) de acordo com as concentrações de: a) (1 e 2) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, b) (0,22 e 0,44) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico, c) (0,34 e 0,68) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol e d) (1 e 2) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato. 1789
- Figura 54** – Mapeamento em formato triangular da corrente eletroquímica em função do potencial a partir dos gráficos DPV e dos cálculos matemáticos, usando o equacionamento Nernstiano. 182

- Figura 55** – A técnica eletroquímica DPV foi utilizada por analisar os efeitos de adsorção/absorção de ions hidrogênio e oxigênio ou a evolução de gás hidrogênio e os efeitos de adsorção e dessorção de cloretos usando uma SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, sem sulfato de cobre(II) e concentrações constantes de espécies químicas. Os polímeros condutores estudados foram: (a) polipirrol, (b) polianilina, (c) polí(imidazol), (d) polí(1,2-DAB) e (e) polí(1,3-DAB). As setas nos voltamogramas indicam o comportamento da corrente na dessorção dos cloretos.
- 185
- Figura 56** – Considerando a faixa de potencial entre $-0,150$ e $+0,300$ V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, os DPV indicam a resposta eletroquímica de $1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, sem sulfato de cobre(II) e concentrações constantes das espécies químicas. Os polímeros condutores analisados foram: (a) polí(1,3-DAB), (b) PANI, (c) polí(1,2-DAB), (d) PPI e (e) PIm.
- 189
- Figura 57** – Macroeletrodo de ouro modificado com PIm foi analisado - por meio da técnica DPV - em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ contendo 20 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II), com e sem $1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de NO_2^- .
- 190
- Figura 58** – Voltamogramas cíclicos após o microeletrodo Au-PIm ficar guardado em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 20 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) durante 40 min (3 ciclos a uma velocidade de varredura de $0,050 \text{ V s}^{-1}$). A seta indica o sentido da varredura do voltamograma.
- 194
- Figura 59** – Voltamogramas cíclicos representativos de 60 ciclos da estabilização do polí(imidazol) eletropolimerizado sobre o microeletrodo de ouro tendo uma SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ (faixa de potencial entre $+0,400$ e $+0,050$) V_{Ag/AgCl 3M NaCl} a uma velocidade de varredura de $0,050 \text{ V s}^{-1}$. As setas indicam o sentido das varreduras dos voltamogramas.
- 195

Figura 60 – Medição eletroquímica do nitrato em uma SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 20 nmol cm^{-3} de cobre(II), usando microeletrodo de ouro ($r = 7,5\ \mu\text{m}$) modificado com poli(imidazol) e a técnica eletroquímica de voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de $0,010\ \text{V s}^{-1}$ e 10 ciclos a cada concentração de nitrato. A seta na vertical indica o sentido dos voltamogramas, corrente crescente com a adição de NO_2^- .
199

Figura 61 – Microeletrodo de ouro ($r = 7,5\ \mu\text{m}$) modificado com poli(imidazol) guardado por uma hora em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes em concentração de $5,2\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, $1,1\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico e $1,5\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol. O gráfico foi obtido por voltametria cíclica de $(+0,300$ a $+0,050)\ \text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ a uma velocidade de varredura de $0,010\ \text{V s}^{-1}$ e 6 ciclos.
201

Figura 62 – Medição do nitrato em SQR pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) usando três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) ($r = 2,5\ \mu\text{m}$ cada) e a técnica eletroquímica de voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de $0,010\ \text{V s}^{-1}$ e 10 ciclos a cada concentração de nitrato. A seta na vertical indica o sentido dos voltamogramas, incremento em corrente com a adição de nitrato.
202

Figura 63 – Interligação de três microeletrodos ($r = 2,5\ \mu\text{m}$) Au-PIm-Cu(II) para a medição do nitrato a concentração de $(5, 10, 20, 25$ e $30)\text{ nmol cm}^{-3}$ em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes concentrações de $1,10\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ de AU, $0,22\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e $0,34\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA. Os voltamogramas cíclicos (10 ciclos a cada concentração de nitrato) foram obtidos de $(+0,300$ a $+0,050)\ \text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ a uma velocidade de varredura de $0,010\ \text{V s}^{-1}$. A seta na vertical que transpassa os voltamogramas indica o incremento de corrente com a adição de nitrato.
203

Figura 64 – Três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados ($r = 2,5 \mu\text{m}$ cada)

para a medição do nitrato a concentração de (5, 10 e 20) nmol cm^{-3} em SQR com $\text{pH } 7,4 \pm 0,02$ a (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ e com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes em concentração dez vezes (10x) as encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos ($5,2 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de AU, $1,1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e $1,5 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos de (+0,300 a +0,050) $\text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ a uma velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$ e 10 ciclos a cada concentração do nitrato. A seta na vertical indica incremento de corrente com a adição de nitrato.

204

Figura 65 – Os voltamogramas cíclicos de (+0,300 a +0,050) V ($0,010 \text{ V s}^{-1}$ e

10 ciclos por voltamograma) para verificação da funcionalidade do SME e do comportamento eletroquímico do EPPRES Au/Au_xCl_y/PI-PIm-CI/PU miniaturizado comparado ao eletrodo comercial BASI[®] (Ag/AgCl 3M NaCl). Um SME com três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados ($r = 2,5 \mu\text{m}$ cada) em SQR com $\text{pH } 7,4 \pm 0,02$ a (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ e com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes em concentração ao dobro das encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos ($1,1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, $0,22 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico e $0,34 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol) e 30 nmol cm^{-3} de nitrato.

205

Figura 66 – Curvas de calibração; respectivas inclinações de sensibilidades,

desvios padrões (DP) e regressões lineares (RL), considerando a corrente de linha base correspondente à SQR foi considerada nula para ausência do nitrato. (a) 1 microeletrodo - nitrato, (b) 3 microeletrodos - nitrato, (c) 3 microeletrodos - 2x interferentes e nitrato, e (d) 3 microeletrodos - 10x interferentes e nitrato.

211

Figura 67 – Esquema ilustrativo da vista frontal do sensor integrado com três

eletrodos.

219

- Figura 68** – Por FIA-automatizada, o esquema do SMEF: configuração das válvulas solenoides (V_{S1} , V_{S2} , V_{S3} , V_{S4} , V_{S5} , V_{S6} , V_{SN} , V_{SJ} e V_{SLC}) e das válvulas de controle de fluxo (V_{FLC} , V_{FN} , V_{F1} , V_{F2} , V_{F3} , V_{F4} , V_{F5} e V_{F6}) para injeção das soluções químicas (S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 e S_6) no misturador (MR) ou da solução de limpeza (SL) ou de carregamento (SC) no Sensor. 220
- Figura 69** – Macroeletrodos de ouro ou níquel, com geometria circular de área igual a $(0,3 \pm 0,05) \text{ cm}^2$ ou quadrada de área igual a $(1 \pm 0,25) \text{ cm}^2$, foram usados na deposição de polímeros condutores, cuja finalidade foi realizar testes de caracterização e de deposição dos filmes poliméricos. 253
- Figura 70** – Macroeletrodos de ouro empregados na verificação da faixa de potencial adequada para a deposição de polímeros condutores pelo processo de eletropolimerização, cuja finalidade foi realizar testes de medição com nitrato e avaliar os efeitos de algumas espécies químicas interferentes no sinal de medição do nitrato. Área ativa de $(4,51 \pm 0,01) \text{ mm}^2$, de $\approx 9 \text{ mm}^2$ e de $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$. 254
- Figura 71** – Esquema e foto dos microeletrodos de ouro ($r = 7,5 \text{ }\mu\text{m}$) desenvolvidos para testes iniciais de deposição de polímeros condutores, de medição eletroquímica do nitrato e de avaliação das espécies químicas interferentes no sinal do nitrato. 255
- Figura 72** – Sensor fotografado em substrato planar de silício e deposição de pasta polimérica de ouro para propiciar efetivo contato elétrico (a) e matriz de microeletrodos de ouro a serem modificados com polímeros condutores e respectivos eletrodos de referências integrados (b) e imagem por MEV com os detalhes de dimensões do eletrodo de referência miniaturizado (c). 256
- Figura 73** – *Software LabView*® 8.6. 298
- Figura 74** – *Layout* do programa desenvolvido por Cardoso, J. L. em 2009. 298
- Figura 75** – Autolab PGSTAT302N da Metrohm Autolab B.V. 300
- Figura 76** – PalmSens da Ivium. 300

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Faixa de concentração de nitrato em meio bioquímico, allimentício e ambiental. 74
- Tabela 2** – Alguns procedimentos encontrados na literatura para o condicionamento eletroquímico de microeletrodos de ouro. ND: não descrito. 92
- Tabela 3** – Constantes de estabilidade ($\log k$) do ligante EDTA com diversos metais que foram preferencialmente obtidas a uma temperatura de 25 °C, e à razão de 1 de ligante para 1 de metal ou na condição experimental de concentração. 105
- Tabela 4** – Constantes de estabilidade ($\log k$) de alguns ligantes com cobre(II) que foram preferencialmente obtidas à temperatura de 25 °C e à razão de 1 de ligante para 1 de metal ou na condição experimental de concentração. ND: não descrito. 106
- Tabela 5** – Descrição das espécies químicas presentes na SQR e suas concentrações administradas, assim como os valores de potencial redox - em relação ao eletrodo de referência primário de hidrogênio. ND: não disponível. 110
- Tabela 6** – Experimentos para definição da solução química e do número de ciclos voltamétricos no condicionamento eletroquímico em solução estacionária de macro e microeletrodos, a partir da avaliação da razão entre a área efetiva e a área geométrica. NA: não analisado. 125
- Tabela 7** – Idem a Tabela 6, exceto: os experimentos foram realizados para definir os parâmetros do condicionamento eletroquímico usando uma solução em fluxo e microeletrodos de ouro. 129

- Tabela 8** – Valores médios de área efetiva (A_e), os parâmetros de reversibilidade (corrente de pico anódica (i_{pa}) dividida pela corrente de pico catódica (i_{pc}); potencial de pico catódico (E_{pc}) menos o potencial de meia-onda ou de metade de pico ($E_{p1/2}$) - mediana) e a variação de área com relação à área geométrica (A_g). Os resultados apresentados compõem uma amostra representativa de um conjunto de dez macroeletrodos com referência integrada (RI), limpos por SU-8, limpos por limpeza química tradicional descrita no item 5.2. 135
- Tabela 9** – Os resultados apresentados compõem uma amostra representativa de um conjunto de vinte microeletrodos de ouro fotografados com SU-8, limpos por limpeza química tradicional descrita no item 5.2. 137
- Tabela 10** – Faixa de potenciais, sob a influência dos ions hidrogênio a gás hidrogênio, da oxidação da água, das hidroxilas e do gás oxigênio, para a melhor condição de eletropolimerização dos monômeros. 139
- Tabela 11** – Por perfilometria, os valores das espessuras dos polímeros condutores depositados, de acordo com a marcação na Figura 28a, em macroeletrodos de ouro. 142
- Tabela 12** – Valores das espessuras medidas do óxido de silício foram extraídos de acordo com a Figura 28b, justamente com os índices de refração. 142
- Tabela 13** – Medições das espessuras dos filmes de prata e comparações da espessura teórica calculada e os valores de espessura média medida. 146
- Tabela 14** – Eletrodeposição cronopotométrica de prata sobre ouro. Mostram-se os valores de área efetiva exposta em solução de ferricianeto de potássio calculada a partir do equacionamento de Randles-Sevick, a comparação entre a espessura teórica esperada e a espessura média medida e erro sobre o valor de espessura teórica esperada (E_{esp}). 147
- Tabela 15** – Parâmetros para reagir cloreto sobre prata e comparações entre a espessura teórica calculada e espessura média medida e a rugosidade RMS obtida por técnica de Microscopia Confocal. 150

- Tabela 16** – Estrutura e as propriedades químicas dos compostos uretano e metilmetacrilato (MMA) são apresentadas. As porcentagens dos compostos, do fotopolimerizador e do solvente para a preparação das membranas de proteção iônica estão sistematizadas. NA: não analisado e ND: não descrito. 157
- Tabela 17** – Aferição do potencial de eletrodos com relação ao eletrodo de referência comercial Orion ou Digimed. NA: não analisado. 162
- Tabela 18** – Sistematização dos resultados de aferição dos potenciais de EPER de junção redox Ag/AgCl. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo de referência comercial Orion. 167
- Tabela 19** – Resumo dos parâmetros de caracterização dos EPER de junção redox Ag/AgCl. 168
- Tabela 20** – Aferição do potencial dos EPER de ouro com prata eletrodepositada e cloretos reagidos com a prata para eletroformar a junção redox Ag/AgCl, na sequência, eletropolimerizado PPI-Cl. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo I de referência comercial da BASI®. 169
- Tabela 21** – Aferição do potencial dos eletrodos PCl de ouro com cloreto reagido e eletropolimerizado com polipirrol em solução 0,10 mmol cm⁻³ de HCl para obter a junção redox Au/Au_xCl_y/PPI-Cl. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo I de referência comercial BASI®. 170
- NA: não analisado. 170
- Tabela 22** – Aferição do potencial de macroeletrodos de ouro modificados com TEOS e TEOS-HFE com e sem tratamento por UV-C. O potencial foi medido com relação ao eletrodo I de referência comercial BASI®. 171
- Tabela 23** – Resumo dos parâmetros de caracterização dos eletrodos de referência recobertos com filme de TEOS e de compostos TEOS-HFE. 172
- Tabela 24** – Aferição dos potenciais dos EPERs de junção redox Au/Au_xCl_y/PPI-Cl eletropolimerizado poliuretano que atuou como membrana de proteção/contenção e contato iônico. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo de referência comercial da Digimed. 173

- Tabela 25** – Resumo dos parâmetros de caracterização dos macroEPRES e EPRES Au/Au_xCl_y/PPi-CI/PU (miniaturizados). NA: não analisado. 174
- Tabela 26** – Sistematização dos potenciais obtidos por DPV no início, no pico e no fim da reação eletroquímica do nitrato e das espécies interferentes (considerando o dobro das concentrações reportadas para a concentração máxima em fluidos sanguíneos). 179
- Tabela 27** – A partir dos experimentos DPV, sistematizamos as respostas relacionadas às espécies químicas estudadas para cada membrana polimérica; observam-se os comportamentos eletroquímicos dos polímeros condutores que foram definidos como: medição possível, não indicado para sensoramento ou com interferência eletroquímica. 191
- Tabela 28** – Quadro resumo das faixas de potencial em que ocorre a influência dos íons de hidrogênio, cloretos, hidroxilas e oxigênio. Também apresenta-se as faixas de potencial eletroquímico de acordo com a menor corrente de linha base. NA: não analisado. 196
- Tabela 29** – Sumário das variáveis catalogadas de acordo com o tipo: entrada e saída. 206
- Tabela 30** – Valores mais prováveis de corrente para microeletrodos Au-PIm-Cu(II), conforme as concentrações químicas administradas e os potenciais especificados. Foram extraídos dos experimentos de medição do nitrato sem e com espécies interferentes subtraindo o sinal de linha base correspondente à resposta em corrente da SQR. 210
- Tabela 31** – Valores calculados (nos potenciais especificados) da inclinação de sensibilidade, da sensibilidade normalizada pela área efetiva, da seletividade e da repetitividade. 214
- Tabela 32** – Valores extraídos (nos potenciais eletroquímicos especificados) de linha base relativa à corrente eletroquímica em SQR (linha base), de estabilidade e de linearidade na medição eletroquímica do nitrato e de ruído eletroquímico presente nos voltamogramas cíclicos. 215

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,2-DAB	monômero 1,2-cis/trans-diaminobenzeno
1,3-DAB	monômero 1,3-diaminobenzeno
1,4-DAB	monômero 1,4-diaminobenzeno
1,5-DAN	monômero 1,5-diaminonaftaleno
1,8-DAN	monômero 1,8-diaminonaftaleno
2-Ana	monômero 2-aminonaftaleno
2-VIP	monômero 2-vinilpiridina
3,4-DAP	monômero 3,4-diaminopiridina
3-API	monômero 3-aminopiridina
4-VIP	monômero 4-vinilpiridina
AA	ácido ascórbico
ANI	monômero anilina
Au/Au ^x Cl _y /PPi-CI/PU	junção redox de ouro/cloro de ouro/polipirrol-cloretos/ poliuretano
Au-P1m-Cu(II)	ouro-polí(imidazol)-cobre(II)
AU	ácido úrico
BASI [®]	do inglês, <i>Bionalytical Systems Inc.</i> (tradução livre: Sistemas Bioanalíticos)
CENPRA	Centro de Pesquisas Renato Archer
CHEAQS Pro	do inglês, <i>Chemical Equilibria in Aquatic Systems Pro</i> (tradução livre: Equilíbrio Químico em Sistemas Aquáticos - Profissional)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CSIC	do espanhol, <i>Consejo Superior de Investigaciones Científicas</i> (tradução livre: Conselho Superior de Pesquisas Científicas)
CV	do inglês, <i>cyclic voltammetry</i> (tradução: voltametria cíclica)
CYTED	do espanhol, <i>Programa Ibero-Americano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo</i> (tradução livre: Programa Ibero- americano para o Desenvolvimento de Ciência e Tecnologia)
DC	do inglês, <i>direct-current</i> (tradução: corrente contínua)

ddp	diferença de potencial elétrico
DI	desionizada
DP	desvio padrão
DPV	do inglês, <i>differential pulse voltammetry</i> (tradução: voltametria por pulso diferencial)
EDTA	etilendiamino-tetra-acético
EPRES	eletrodo planar de referência em estado sólido
EPUSP	Escola Politécnica da Universidade de São Paulo
ETD	do inglês, <i>Everhart-Thornley Detector</i> (sem tradução)
FAPESP	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
FIA	do inglês, <i>Flow-Injection Analysis</i> (tradução: Análise por Injeção em Fluxo)
FIB	do inglês, <i>Focussed Ion Beam</i> (tradução livre: canhão de ions focalizado)
HFE	metil-nonanfluoro(iso)butil-éter
IMB-CNM	do espanhol, <i>Instituto de Microelectrónica de Barcelona - Centro Nacional de Investigaciones Científicas</i> (tradução livre: Instituto de Microeletrônica de Barcelona - Centro Nacional de Microeletrônica)
Ind	monômero indol
IPA	do inglês, <i>isopropyl alcohol</i> (tradução: álcool isopropílico)
ISFET	do inglês, <i>Ion-Selective Field Effect Transistors</i> (tradução livre: Transistores Seletivos a Ions por Efeito de Campo)
ITO	do inglês, <i>indium tin oxide</i> (tradução livre: óxido de índio dopado com estanho)
IUPAC	do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (tradução livre: União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LSI	Laboratório de Sistemas Integráveis
LSV	do inglês, <i>Linear Sweep Voltammetry</i> (tradução: Voltametria de Varredura Linear)

LTC	do inglês, <i>Low Temperature Co-fired Ceramics</i> (tradução livre: Cerâmicas de Cozimento a Baixas Temperaturas)
macroEPRES	macroeletrodo planar de referência em estado sólido
MCT	Ministério de Ciência e Tecnologia
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NA	não analisado
NADH	dinucleótido de nicotinamida-adenina
ND	não definido ou não descrito
NI	do inglês, <i>National Instruments</i> (sem tradução)
NO	do inglês, <i>nitric oxide</i> (tradução: óxido nítrico)
NRSE	do inglês, <i>nonreferenced single-ended</i> (sem tradução)
NTC	nanotubo de carbono
PA	paracetamol
Pa	plasma sanguíneo de humanos
PANI	polianilina ou polímero de anilina
PCB	Partido Comunista Brasileiro
PCB	do inglês, <i>print circuit board</i> (tradução: placa de circuito impresso)
PCI	placa de circuito impresso
PCL	poli(caprolactona)
PDLA	poli(DL-ácido láctico) ou poli(DL-lactato)
PDS	poli(p-dioxanona)
PEDOT	do inglês, <i>poly(3,4-ethylenedioxythiophene)</i> (tradução: poli(3,4-etilendioxitiofeno))
EPER	eletrodos de pseudo-referência
PET	polietileno
PGA	poli(ácido glicólico)
PI	monômero pirrol
PID	monômero piridazina
PIM	monômero pirimidina
PIm	polímero de imidazol ou poli(imidazol)
PLA	poli(ácido láctico) ou poli(lactato)
PLLA	poli(L-ácido láctico) ou poli(L-lactato)

PMMA	polímero de metil metacrilato ou poli(metil metacrilato)
poli(1,2-DAB)	polímero de 1,2-cis/trans-diaminobenzeno ou poli(1,2-cis/trans-diaminobenzeno)
poli(1,3-DAB)	polímero de 1,3-diaminobenzeno ou poli(1,3-diaminobenzeno)
poli(1,4-DAB)	polímero de 1,4-diaminobenzeno ou poli(1,4-diaminobenzeno)
poli(1,5-DAN)	polímero de 1,5-diaminonaftaleno ou poli(1,5-diaminonaftaleno)
poli(1,8-DAN)	polímero de 1,8-diaminonaftaleno ou poli(1,8-diaminonaftaleno)
PPi	polímero de pirrol ou polipirrol
PTFE	poli(tetrafluoretileno)
PU	polímero de uretano ou poliuretano
PU-PCL	poli(uretano-caprolactona)
Qui	monômero quinolina
RCA	do inglês, <i>Radio Corporation of America</i> (a sigla patenteada que representa o procedimento padrão para limpeza de lâminas de silício)
RI	referência integrada
RL	regressão linear
RMS	do inglês, <i>root mean square</i> (tradução: valor quadrático médio)
Sa	sangue de humanos
SENSAME	do espanhol, <i>Desarrollo de Microsistemas y Sensores para Monitorización MedioAmbienta</i> (sem tradução)
SME	sistema de medição eletroquímica
So	soro sanguíneo de humanos
SPE	do inglês, <i>Screen-Printed Electrodes</i> (tradução livre: Eletrodos Serigrafados)
SPM	do inglês, <i>solution powdered microspitter</i> (sem tradução)
SQR	solução química de referência
STF	solução tampão fosfato
TCC	trabalho de conclusão de curso
TEOS	tetraetilortossilicato
TEOS-HFE	tetraetilortossilicato-metil-nonafiuoro(iso)butil-éter

U
monômero uretano
UNIFESP
Universidade Federal de São Paulo
USP
Universidade de São Paulo
UTI
Unidade de Terapia Intensiva
UV-C
do inglês, *short-wavelength ultraviolet radiation* (tradução livre:
radiação ultravioleta de onda curta)

LISTA DE SÍMBOLOS

A, a, A, α

A	Ampère.
A_g	Área geométrica de um eletrodo de medição.
A_e	Área efetiva de um eletrodo de medição.
α	Inclinação de sensibilidade.
a_{ox}	Atividade das espécies químicas oxidadas.
a_{red}	Atividade das espécies químicas reduzidas.
$a_{i^{+*}}$	Atividade de uma dada espécie química eletroativa "A*" (espécie química oxidada ou reduzida; portanto, espécie química iônica negativa ou positiva), e "r" índice estequiométrico.
$a_r^{(s)} = 1$	Atividade unitária de uma dada espécie química em estado sólido "A(s)", e "r" índice estequiométrico.
$a_r^{(d)} = 1$	Atividade unitária a pressão parcial de uma dada espécie química em estado gasoso "pA", e "r" índice estequiométrico.
(ad)	Espécie química adsorvida sobre um eletrodo.
(ab)	Espécie química absorvida sobre um eletrodo.
(aq)	Espécie química em estado aquoso.
B, b, B, β	
B	Sinal de linha base.
C, c, X, χ	
C	Concentração de uma espécie química em solução.
C_d	Capacitância decorrente da distribuição de cargas.
cm	Notação de centímetros.
$^{\circ}C$	Notação de graus Celsius.

D, d, Δ, δ	
DI	Desionizada (água que passou por filtro de troca iônica para a remoção dos íons metálicos).
ΔG ⁰	Energia livre padrão.
D ^o	Coeficiente de difusividade (7,6 · 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹ para a espécie química ferricianeto de potássio). Hemoglobina sem oxigênio.
<i>deoxyHb</i> ou Hb(Fe ²⁺)	
E _{Ox/Red}	Potencial de uma reação eletroquímica (espécies oxidadas e reduzidas).
E _a	Potencial de equilíbrio termodinâmico.
E _{esp}	Erro esperado a partir de um cálculo teórico.
E _{cal}	Erro calculado (cálculo teórico) a partir de uma situação experimental.
E _p	Potencial de pico de uma reação eletroquímica.
E _{pa}	Potencial de pico anódico de uma reação eletroquímica.
E _{pc}	Potencial de pico catódico de uma reação eletroquímica.
E _i	Potencial de início de uma reação eletroquímica.
E _f	Potencial de fim de uma reação eletroquímica.
E _{1/2}	Potencial de meia-onda de um voltamograma cíclico.
E ₀	Potencial de eletrodo padrão para reação global.
E _A	Potencial de meia-célula anódico.
-E _C	Potencial de meia-célula catódico.
-E _C ⁰	Potencial de eletrodo padrão para reação de meia-célula de redução.
E _A ⁰	Potencial de eletrodo padrão para reação de meia-célula de oxidação.
E(0)	Potencial de referência secundário.
E _{célula}	Potencial de célula eletrolítica.

E_{red}	Potencial de redução eletroquímica.	
E(S)	Potencial eletroquímico total de uma sistema de medição.	F, f, ϕ, Φ
F	Constante de Faraday (96487 C mol ⁻¹).	
		G, g, I, γ
g	Notação de gramas.	
G	Notação de giga.	
GD	Gradiente de degradação.	
		H, h, H, η
Hz	Notação de hertz.	
Hb	Hemoglobina.	
η	Sobrepotencial total de um sistema eletroquímica de medição.	
η^*	Sobrepotencial devido à polarização em série da resistência de cabos, trilhas, conexões e contatos elétricos.	
$\eta^{1/2}$	Sobrepotencial de uma meia-célula de reação eletroquímica.	
$\eta_a^{1/2}$	Sobrepotencial devido à polarização de uma meia-célula anódica da reação eletroquímica.	
$-\eta_c^{1/2}$	Sobrepotencial devido à polarização de uma meia-célula catódica da reação eletroquímica.	
η^A	Sobrepotencial devido à polarização por ativação da reação eletroquímica.	
η^C	Sobrepotencial devido à polarização por concentração de uma dada espécie química.	
η^X	Sobrepotencial devido à polarização de cristalização decorrente do efeito de migração dos íons nos sítios ativos no eletrodo.	
η_{Re}^*	Sobrepotencial devido à polarização de resistência entre o eletrodo e eletrodo.	

μ	Notação de metro.
mm	Notação de milímetros.
min	Notação de minutos.
μ	Notação de micro.

M, m, M, μ

log	Notação de logaritmo.
ln	Notação de logaritmo neperiano.
L	Linearidade em uma sequência de medições eletroquímica variando a concentração de uma dada espécie química.

L, I, V, λ

K	Temperatura absoluta em Kelvin.
K_e	Constante de equilíbrio termodinâmico.
k	Constante de estabilização química em sistemas de complexação.
k	Notação de kilo.

K, k, k , K, κ

j	Densidade de corrente elétrica.
-----	---------------------------------

J, j, \mathcal{J} , ϕ

I	Amplitude de corrente eletroquímica medida.
I_p	Amplitude da corrente de pico de uma reação eletroquímica.
I_i	Amplitude da corrente de início de uma reação eletroquímica.
I_f	Amplitude da corrente de fim de uma reação eletroquímica.
I_{pa}	Amplitude da corrente de pico anódico de uma reação eletroquímica.
I_{pc}	Amplitude da corrente de pico catódico de uma reação eletroquímica.

I, i, I, i

M Notação de mega.
 Mb Mioglobina.
 methb, $\text{Hb(Fe}^{3+}\text{)}$ ou $\text{Hb(Fe}^{3+}\text{)O}$
 Metaemoglobina. $\text{Hb(Fe}^{3+}\text{)O}$

N, n, N, v

v Velocidade de varredura (V s^{-1}).
 n Notação de nano.

O, o, O, o, Ω

Ox Espécie oxidada.
 Ω Notação de Ohm.
 oxyHb ou $\text{Hb(Fe}^{2+}\text{)O}_2$
 Hemoglobina com oxigênio.

P, p, ρ , Π , π

pH Potencial hidrogênico.

π Constante pi (3,14159...).

ρ Notação de pressão parcial.

P Representa um tipo de filme polimérico.

p Notação de pico.

Q, q, Θ , θ

Q Carga elétrica.

Q_c Coeficiente de atividade que indica concentrações reais.

q Espécies químicas presentes na solução eletroquímica

R, r, P, p	
rpm	Rotações por minuto.
RL	Regressão linear.
R	Constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).
Red	Espécie química reduzida.
Ru	Rugosidade de um filme depositado.
Re	Repetitividade de uma medição eletroquímica.
Rp	Reprodutibilidade na medição eletroquímica entre similares sensores.
Rq	Ruído eletroquímico no sinal de medição eletroquímica.
r	Raio.
S, s, Σ, σ	
S	Sensibilidade a uma dada espécie química eletroativa.
Se	Seletividade na medição eletroquímica de um dado químico eletroativo em relação a outro(s).
s	Notação de segundo.
SD	Desvio padrão.
SQ	Solução química.
St	Estabilidade na medição eletroquímica.
(s)	Espécie química em estado sólido.
T, t, T, τ	
t	Notação de tempo.
T	Temperatura.
T	Notação de terra.
Th	Espessura teórica de um filme eletrodepositado.
U, u, Y, v	
u	Notação de densidade de uma espécie química.

V, v, σ , ω

V Volts.

V_H Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação à referência primária do eletrodo de hidrogênio.

V_{Ag/AgCl 3M KCl} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl em 3 mmol cm⁻³ KCl.

V_{Ag/AgCl 3M NaCl} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl em 3 mmol cm⁻³ NaCl.

V_{Ag/AgCl Nation[®] 117} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl recoberto com Nation[®] 117.

V_{Ag/AgCl} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de pseudo-referência Ag/AgCl.

V_{Au/Au_xCl_y/Pt-CI-/PU} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo planar de referência em estado sólido (EPRES) Au/Au_xCl_y/Pt-CI-/PU.

V_{Ag/AgCl Orion} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl de dupla junção Orion.

V_{Ag/AgCl Digimed} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl de dupla junção Digimed.

V_{SCE} Potencial aplicado no eletrodo de medição com relação ao eletrodo de referência de calomelano saturado.

X, x, Ξ , ξ

2x Dobro das concentrações das espécies químicas interferentes.

10x Dez vezes as concentrações das espécies químicas interferentes.

X₁ Variável de entrada: potencial eletroquímico aplicado (E).

X₂ Variável de entrada: concentração química (C).

X₃ Variável de entrada: espécies químicas (Q).

Y, y, Ψ , ψ

Y₁ Variável de saída: amplitude de corrente medida (I).

Z

Número de elétrons transferidos em uma reação eletroquímica.

Z, z, Z, ζ

Y ₂	Varíavel de saída: inclinação de sensibilidade (α).
Y ₃	Varíavel de saída: sensibilidade normalizada (S).
Y ₄	Varíavel de saída: seletividade (Se).
Y ₅	Varíavel de saída: repetitividade (Re).
Y ₆	Varíavel de saída: reprodutividade (Rp).
Y ₇	Varíavel de saída: linha base (B).
Y ₈	Varíavel de saída: estabilidade (St).
Y ₉	Varíavel de saída: linearidade (L).
Y ₁₀	Varíavel de saída: ruído eletroquímico (Rq).

LISTA DE IONS E REAGENTES

Nome Espécie

AgCl	AgCl
óxido de silício sobre alumínio	Al-SiO ₂
hidróxido de ouro(I)	AuOH
di-hidroxourato(I)	Au(OH) ₂ ⁻
hidroxo-ouro(III)	Au(OH) ₂ ⁺
di-hidroxo-ouro(III)	Au(OH) ₂ ⁺
hidróxido de ouro(III)	Au(OH) ₃
tetra-hidroxourato(III)	Au(OH) ₄ ⁻
penta-hidroxourato(III)	Au(OH) ₅ ²⁻
hexa-hidroxourato(III)	Au(OH) ₆ ³⁻
cloreto de ouro(I)	AuCl(OH) ⁻
hidroxo-clorourato(I)	AuCl(OH) ₃ ⁻
tri-hidroxo-clorourato(III)	AuCl ₂ ⁻
diclorourato(I)	AuCl ₂ (OH) ₂ ⁻
di-hidroxo-diclorourato(III)	AuCl ₂ ⁺
dicloro-ouro(III)	AuCl ₃
cloreto de ouro(III)	AuCl ₃ (OH) ⁻
hidroxo-triclorourato(III)	AuCl ₄ ⁻
tetraclorourato(III)	AuO ₃ ⁻
ourato(III)	Br ⁻
brometo	C ₆ H ₅ OH
hidroxi-benzeno	C ₆ H ₆ O ₂ ⁻
ascorbato	C ₆ H ₈ O ₆
ácido L-deidroascórbico	C ₇ H ₈ O ₄ S
ácido metilfenólico sulfônico	CO ₂
gás carbônico	CH ₂ OHSO ₃ ⁻
hidroximetanosulfonato	CH ₃ HSO ₃ ⁻
metanosulfonato	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈
ácido etilenodiamino-tetra-acético (ácido EDTA)	

Continua...

Nome	Especie
cloreto	Cl
clorato	ClO ₃ ⁻
perclorato	ClO ₄ ⁻
ion cianeto	CN ⁻
tiourea	CS(NH ₂) ₂
ion de cobre(II)	Cu(II) ou Cu ²⁺
sulfato de cobre(II)	CuSO ₄
fluoreto	F ⁻
especies de hidrogenio	*H
ion de hidrogenio	H ⁺
gas hidrogenio	H ₂
acido perclorico	HClO ₄
hidrogeno-ascorbato	H(C ₆ H ₆ O ₆) ⁻
hidrotiosulfato	H(S ₂ O ₂) ⁻
hidrossulfito	H(SO ₃) ⁻
hidrossulfato	H(SO ₄) ⁻
acido L-ascorbico	H ₂ (C ₆ H ₆ O ₆)
di-didrossulfito	H ₂ (SO ₃) ₂ ⁻²⁻
metanodiol	H ₂ C(OH) ₂
acido etanodioico ou acido oxalico	H ₂ C ₂ O ₄
agua	H ₂ O
peroxido de hidrogenio	H ₂ O ₂
hipofosfito	H ₂ PO ₂ ⁻
di-hidrogeno-fosfito	H ₂ PO ₃ ⁻
di-hidrogeno-fosfato	H ₂ PO ₄ ⁻
sulfeto de hidrogenio	H ₂ S
acido sulfonico	H ₂ SO ₃
acido sulfurico	H ₂ SO ₄
acido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxilico ou acido citrico	H ₃ (C ₆ H ₅ O ₇)
acido fosfinico	H ₃ PO ₂ ^(aq)

Nome	Espécie
ácido fosforoso	$H_3PO_3^{(aq)}$
ácido orto-fosfórico	$H_3PO_4^{(aq)}$
tetra-hidrogeno-fosfato	$H_4PO_4^+$
ácido tetra-clorúrico(III)	$HAuCl_4$
metanal	$HCHO$
ácido clorídrico	HCl
ácido metanoico ou ácido fórmico	$HCOOH$
ácido fluorídrico	HF
ácido nítrico	HNO_3
ácido nítrico	HNO_2
ácido nítrico	HPO_3^{2-}
hidrogeno-fosfito	HPO_4^{2-}
hidrogeno-fosfato	HS^-
hidrogeno-sulfeto	I^-
iodeto	$K_3[Fe(CN)_6]$
ferricianeto de potássio ou hexacianoferrato(III) de potássio	$K_2HPO_4^{(aq)}$
hidrogenofosfato de potássio	K_2PO_4
di-potássio-fosfato	K_2SO_3
sulfito de potássio	$KAuCl_4$
tetraclorourato(III) de potássio	KCl
cloreto de potássio	$KH_2PO_4^{(aq)}$
di-hidrogeno-fosfato de potássio	$KHPO_4^-$
potássio-hidrogeno-fosfato	KI
iodeto de potássio	KNO_3
nitrate de potássio	KNO_2
nitrito de potássio	KOH
hidróxido de potássio	KPO_4^{2-}
potássiofosfato	$K_2O_3^-$
potássio-tiosulfato	KSO_3^-
potássiosulfito	

Nome	Especie
potássiosulfato	KSO_4^-
sódio 2-hidroxiopropano 1,2,3-tricarboxilato	$Na(C_6H_5O_7)^{2-}$
hidrogeno-fosfato de sódio	$Na_2HPO_4^{(aq)}$
dissodifosfato	$Na_2PO_4^-$
tiosulfato de sódio	$Na_2S_2O_3$
estanho de sódio	Na_2SnO_2
estannato de sódio	Na_2SnO_3
sulfato de sódio	Na_2SO_3
sulfato de sódio	Na_2SO_4
trissódio 2-hidroxiopropano 1,2,3-tricarboxilato ou citrato de sódio	$Na_3C_6H_5O_7$
pirofosfato de sódio	$Na_4(P_2O_7)$
tetraclorurato(III) de sódio	$NaAuCl_4$
sulfurato(I) de sódio	$NaAuSO_3$
cloreto de sódio	$NaCl$
hipofosfito de sódio	NaH_2PO_2
di-hidrogenofosfato de sódio	$NaH_2PO_4^{(aq)}$
sódio-hidrogenofosfato	$NaHPO_4^-$
hidrosulfeto de sódio	$NaHS$
nitrito de sódio	$NaNO_2$
nitrato de sódio	$NaNO_3$
hidróxido de sódio	$NaOH$
sodifosfato	$NaPO_4^{2-}$
sodiosulfito	$NaSO_3^-$
sodiosulfato	$NaSO_4^-$
gás nitrogênio	N_2
hiponitrito	$N_2O_2^-$
tetóxido de nitrogênio	N_2O_4
óxido nítrico	N_2O

Continuação...

Nome	Especie
amônia	NH ₃
amônio 2-hidroxiopropano 1,2,3-tricarboxilato	NH ₄ (C ₆ H ₅ O ₇) ²⁻
amoniosulfato	NH ₄ (SO ₄) ⁻
amônio	NH ₄ ⁺
hidróxido de amônio	NH ₄ OH
óxido nítrico	NO
nitrossônico	NO ⁺
nitroxila	NO ⁻
gás dióxido de nitrogênio	NO ₂
nitrito	NO ₂ ⁻
nitrato	NO ₃ ⁻
espécies de oxigênio	*O
gás oxigênio	O ₂
espécies de hidroxilas	*OH
hidróxido ou hidroxila	OH ⁻
pirofosfato	P ₂ O ₇ ⁴⁻
fosfano	PH ₃
fosfato	PO ₄ ³⁻
sulfeto	S ²⁻
tiosulfato	S ₂ O ₃ ²⁻
ditionito	S ₂ O ₄ ²⁻
ditionato	S ₂ O ₆ ²⁻
dióxido de enxofre	SO ₂
sulfito	SO ₃ ²⁻
sulfato	SO ₄ ²⁻
sulfato de zinco	ZnSO ₄

Conclusão.

Fonte: adaptado de Cardoso (2011, p. 33-38).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	52
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	57
3	MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	79
4	DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO	82
4.1	PROJETO E FABRICAÇÃO DO SENSOR INTEGRADO	82
4.1.1	Projeto	84
4.1.2	Fotografiação e Definição dos Sensores Integrados com Microeletrodos de Medição e Eletrodo de Referência sobre um Substrato Planar de Silício	86
4.2	PROCEDIMENTO DE LIMPEZA QUÍMICA E DE CONDICIONAMENTO ELETROQUÍMICO DOS ELETRODOS	89
4.2.1	Limpeza Química Tradicional	89
4.2.2	Condicionamento Eletroquímico da Superfície de Eletrodos	90
4.3	ESTUDO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS OBTIDAS POR ELETROPOLIMERIZAÇÃO	96
4.4	SOLUÇÃO QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	104
4.5	PROCEDIMENTO DE ESTUDO DE UM SISTEMA DE MEDIÇÃO ELETROQUÍMICA (SME) POR MEIO DOS SOBREPOTENCIAIS E DOS POTENCIAIS DE EQUILÍBRIO REDOX	110
4.6	CANDIDATOS A ESPÉCIES QUÍMICAS INTERFERENTES	117
4.6.1	Prováveis Mecanismos de Interferência Físico-química na Medição Eletroquímica de Nítrito usando Polímeros Condutores	117
4.6.1.1	Por Adsorção Estrutural ou Ligação Química Permanente	118
4.6.1.2	Por Adsorção Superficial ou Dopagem Reversível do Polímero	118
4.6.1.3	Por Atração ou Repulsão Devido ao Campo Elétrico	118
4.6.1.4	Por Oclusão de Superfície	119
4.6.2	Interferentes Intrínsecos à SQR	119
4.6.3	Interferentes por Concentração em Meio Bioquímico e Cálculo do Potencial de Resposta Eletroquímica	119
4.7	ESTUDO PRÉVIO À MEDIÇÃO DE NÍTRITO E DE ALGUMAS ESPÉCIES QUÍMICAS INTERFERENTES	120
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	125
5.1	EXPERIMENTOS DE LIMPEZA E DE CONDICIONAMENTO ELETROQUÍMICO	125

5.2 LIMPEZA QUÍMICA DE MICROELETRODOS	131
5.3 FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MACROS E MICROELETRODOS	132
5.3.1 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos de Medição	133
5.3.2 Eletrodos de Medição: Eletropolimerização de Polímeros Condutores ...	137
5.3.3 Caracterização Física dos Eletrodos de Medição por MEV	139
5.3.4 Caracterização Física dos Polímeros de Medição por Perfilometria e do Óxido de silício por Elipsometria	141
5.4 ELETRODOS DE REFERÊNCIA	143
5.4.1 Fabricação e Caracterização da Junção Redox	144
5.4.2 Eletrodo em Estado Sólido	156
5.4.3 Membrana de Proteção / Contenção e de Contato Iônico	159
5.4.4 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos de Referência	162
5.4.4.1 Reversibilidade	163
5.4.4.2 Medição do Potencial dos Eletrodos de Referência	165
5.5 ELETRODOS AUXILIARES PODEM ALTERAR O POTENCIAL DE RESPOSTA?	175
5.6 COMPORTAMENTOS ELETROQUÍMICOS DOS POLÍMEROS CONDUTORES ESTUDADOS POR DPV E CV: MEDIÇÃO DE NÍTRITO E AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS INTERFERENTES	177
5.7 MEDIÇÃO DO NÍTRITO E AVALIAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES QUÍMICAS INTERFERENTES PRESENTES NO MEIO BIOQUÍMICO	198
5.8 DISCUSSÃO COMPARATIVA DOS RESULTADOS	206
6 CONCLUSÕES	217
7 TRABALHOS FUTUROS	219
REFERÊNCIAS	223
APÊNDICE A	245
APÊNDICE B	249
APÊNDICE C	261
APÊNDICE D	267
APÊNDICE E	287
APÊNDICE F	291
APÊNDICE G	293
ANEXO A	297
ANEXO B	299
ANEXO C	301

1 INTRODUÇÃO

Oliver Smithies - biólogo geneticista e ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2007 - durante uma palestra no Ibirapuera (na cidade de São Paulo - 12/03/2008), falou de três diferentes formas de descobertas científicas: por acidente, oportunidade ou planejamento (MOURA, 2008, p. 56). Somando-se ao fato de que raramente se consiga realizar algo planejado, às vezes ou frequentemente, por acidente (os erros casuais) ocorre uma nova descoberta e uma pesquisa possibilita oportunidades para outras. Nesta ocasião, o geneticista deixou um recado aos jovens pesquisadores: "escolham uma área em que exista uma identificação apaixonada e trabalhem muito, inclusive aos domingos e feriados, e sejam persistentes, se quiserem ter de fato sucesso na carreira científica".

Compartilho da visão de Smithies e acrescento: o sucesso científico também requer uma considerável dose de simplicidade e humildade, além de um desgaste fisiológico. Aprendi com Smithies que a nossa trajetória - percorrida pela formação acadêmica - nos serve para aprender a fazer a boa ciência, salvando-se raras vezes pelas exceções. No meu trabalho de conclusão de curso (TCC), apaixonei-me pelos sensores eletroquímicos, e no meu Mestrado pela espécie química nítrico e pelo sistema FIA-automatizado de medição. Agora, no Doutorado, apaixonei-me sobretudo pelo fazer ciência. Oliver Smithies comentou que ficou orgulhoso de seu doutorado, obteve métodos precisos, mas praticamente ninguém os leu, nem ele os releu. O Pós-doutorado também não foi diferente. Por outro lado, vinte anos depois, seus estudos serviram para Warren Gilson desenvolver uma pipeta de precisão e ficar milionário. Em 2007, foi Oliver Smithies quem ficou milionário, mas isso não o fez indiferente ao seu passado humilde - ler sobre na *Revista Pesquisa FAPESP* n° 146 (MOURA, 2008, p. 57-59).

Corroborando com a visão de Oliver Smithies, discuto a ciência sob uma perspectiva da teoria das "Revoluções Científicas" - uma análise de Kuhn (1962). A ciência em seu curso normal desenvolve, fundamenta, experimenta e amplia um dado paradigma científico; a isso Thomas Samuel Kuhn conceituou como Ciência Normal. No momento em que a Ciência Normal não consegue respostas para determinados problemas (manutenção do paradigma vigente), inicia-se uma Crise Científica que -

por meio da "Revolução Científica" (rompimento total com paradigma vigente) - se desencadeará outro paradigma. Este momento de transição Kuhn chamou de período pré-paradigmático. A tese de Kuhn não é linear, pois um paradigma não gera outro paradigma. Nesse ponto, introduzo a grande polémica pós-Kuhn: a teoria de que os paradigmas são incomensuráveis, ou seja, não há uma forma de medi-los ou avaliá-los (completamente distante da apropriação conceitual da pós-modernidade). Por outro lado, Kuhn descreve que os paradigmas unificam "metafísicamente" a ciência, mediante a seleção de fatos, e restringe o universo das pesquisas científicas. Aqui Kuhn, Oliver e Almeida se complementam. Concluo que a ciência é uma maneira de ver o mundo, não é a única e tampouco é a verdade absoluta ou a beleza inconstestável puramente benéfica.

Considerando minha dissertação de mestrado (ALMEIDA, 2009), a medição do nitrato e a avaliação de algumas espécies interferentes foram realizadas usando um sistema FIA-automatizado. A medição do nitrato foi realizada a partir dos potenciais constantes de medição (+0,300 e +0,500) $V_{Ag/AgCl}^{NaNO_3}$ 117. A escolha desses potenciais foi baseada na avaliação dos efeitos das espécies interferentes - ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e paracetamol (PA) - no sinal de medição do nitrato. Nessa ocasião, macroelétrodos [(4,5 ± 0,2) mm² de ouro (Au)] foram modificados com o polímero condutor 1,2-cis/trans-diaminobenzeno (1,2-DAB), objetivando a repetitividade, a estabilidade e a sensibilidade na medição do nitrato (ALMEIDA, 2009; RAJESHWAR; IBANEZ, 1997; TOMODA; TSUJIT; YONEYAMA, 1981; MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001). No potencial +0,300 $V_{Ag/AgCl}^{NaNO_3}$ 117, as concentrações de nitrato acima de 250 nmol cm⁻³ até 2 μmol cm⁻³ não respondem pronunciadamente; portanto, o sinal de corrente está praticamente relacionado à resposta dos interferentes. Entretanto, no potencial +0,500 $V_{Ag/AgCl}^{NaNO_3}$ 117, ocorre expressiva medição do nitrato, mas também há uma considerável influência das espécies interferentes no sinal amostrado de corrente. Acima deste potencial, ocorre pronunciada degradação do polímero condutor 1,2-DAB (ALMEIDA, 2009, p. 118), expressivo decaimento no sinal de corrente para a resposta eletroquímica do nitrato (ALMEIDA, 2009, p. 122) e acelerada adsorção de íons cloretos sobre o filme polimérico (ALMEIDA, 2009, p. 122-124).

² Lê-se metafísicamente no sentido de crenças e concepções a respeito do mundo.

Diante disso, no presente trabalho de doutorado, os estudos foram centrados nas medições por voltametria cíclica (CV, do inglês, Cyclic Voltammetry) do nitrato a concentrações $\leq 30 \text{ nmol cm}^{-3}$ usando uma solução química de referência (SQR) que permita imitar as condições bioquímicas do sangue humano e avaliar os efeitos das espécies interferentes (AU, AA, PA), sem o tratamento da amostra. Os experimentos foram realizados com solução ligeiramente alcalina (pH 7,4), ou seja, garantindo meio fisiológico controlado *in vitro* (MUCHINDU et al., 2010; JIANG, Junhua; WANG, Xinying, 2012b; TAN; METTERS; BANKS, 2013), imitando as condições bioquímicas do sangue de seres humanos. Por fim, a resposta do nitrato será analisada a potenciais entre (+0,050 e +0,300) $V_{Ag/AgCl}^{3M NaCl}$, diversificando os polímeros condutores e ativando-os com o íon cobre(II) (Cu(II)) (KUMAR; LO; CHEN, Shen-Ming, 2009; ANNAMALAI, PALANI, PILLAI, 2012; DENG, Yue-Yi; LIU; JIN, 2012). Os resultados com os microeletrodos de ouro (Au) recobertos com polí(imidazol)-cobre(II) (PIm-Cu(II)) foram os mais promissores. O procedimento de medição do nitrato por CV somado aos estudos desenvolvidos no mestrado de Almeida (2009) sustenta nossa tese: garantir máxima sensibilidade ao nitrato em concentrações de algumas dezenas de nanomol/cm³ para menos e minimizar os efeitos das espécies interferentes no sinal de medição do nitrato. Esse desafio tem sido perseguido por diversos grupos de pesquisa (KOZUB; REES; COMPTON, 2010; GAMBOA et al., 2010 e 2012; VALENTINI et al., 2012; OJANI; RAOOF; ZAMANI, 2013; ASTORGA et al., 2014) e na indústria.

No decorrer desta tese, o leitor encontrará no item 2 uma revisão bibliográfica, que se inicia com um histórico da eletroquímica direcionado a uma ciência aplicada ao estudo de processos eletroquímicos de eletrodeposição, de corrosão, de eletrocatalise, de eletroanalítica e de eletrotransmissão. No item 3, a motivação na medição do nitrato - em meio fisiológico - será justificada a partir de três aplicações, envolvendo o nitrato quando em concentrações críticas ao organismo humano: infarto do miocárdio, bloqueio da respiração celular mitocondrial e blindagem da hemoglobina (Hb) para o carregamento de gás oxigênio (O₂). Em seguida (no item 4), apresentamos o desenvolvimento metodológico - prévio ao trabalho experimental - que visa à obtenção de um sistema de medição eletroquímica (SME) capaz de medir o nitrato e de analisar algumas espécies interferentes. Para tal, as superfícies de ouro modificadas com a eletropolimerização de filmes condutores de polianilina

(PANI), de polipirrol (PPI), de poli(1,2-cis/trans-diaminobenzeno) (poli(1,2-DAB)), de poli(1,3-diaminobenzeno) (poli(1,3-DAB)) e de poli(imidazol) (PIm) foram estudadas para medição do nitrato. O item 5 apresenta os resultados e as discussões extraídas a partir do SME baseado na configuração com três eletrodos: medição (microeletrodos de ouro modificados com polímero condutor), referência (dois eletrodos em estado sólido integrados sobre um substrato planar de silício) e auxiliar (introduzido externamente à célula eletroquímica). O poli(imidazol), entre os polímeros condutores estudados, permitiu um aprimoramento de sensibilidade e de estabilidade, em acordo com os estudos de Pereira, Santos, Antonio e Kubota (2002). Também proporcionou alta repetitividade e linearidade estável (BADEA et al., 2001). Como conclusão (item 6): o ouro-poli(imidazol)-cobre(II) [Au-PIm-Cu(II)] é sensível ao nitrato (concentrações $\leq 30 \text{ nmol cm}^{-3}$), mesmo na presença das espécies interferentes. Os trabalhos futuros serão delimitados no item 7: o desenvolvimento de uma nova configuração de microeletrodos e de um protocolo que permita extenso mapeamento de alguns interferentes encontrados no sangue de humanos enquanto resposta eletroquímica em meio fisiológico. Por fim, os apêndices: A) uma extensa revisão bibliográfica sobre os procedimentos de medição eletroquímica do nitrato (polímeros condutores-metal 3d) reportados no panorama mundial; B) informações relevantes sobre os sensores integrados e eletrodos, as soluções químicas, os materiais e as ferramentas, que foram empregadas durante a elaboração deste trabalho de Doutorado; C) as informações químicas e físicas dos monômeros estudados; D) um ensaio a respeito do protocolo das espécies interferentes à medição do nitrato; e E) e F) as simulações usando o programa, do inglês, *Chemical Equilibria in Aquatic Systems Pro* (CHEAQS Pro) da SQR com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) (CuSO_4) e pH 7,4; sem e com nitrato a concentrações de (5, 10, 15, 20, 25 e 30 nmol cm^{-3}), respectivamente, e G) as publicações científicas decorrentes dos trabalhos desenvolvidos nesta tese. Os anexos A, B e C correspondem ao *layout Labview* para aferição de potencial, às imagens dos analisadores eletroquímicos e à série eletroquímica parcial, respectivamente.

Até o ano de 2013, nenhum procedimento experimental usando microeletrodos de ouro modificados com polímero condutor imidazol e ativados com cobre(II) foi reportado para medir eletroquimicamente o nitrato, sob as condições: concentração de nitrato na ordem de poucos micromolares, solução de análise próxima ao neutro,

potencial de medição em torno de $(+0,050$ a $+0,300) V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ e na presença de espécies interferentes em até dez vezes as concentrações encontradas em sangue de humanos. Nossa contribuição permite medir o nitrato nessas condições experimentais; um potencial adequado de medição eletroquímica possibilita menor influência das incontáveis espécies interferentes presentes no sangue de humanos e dos efeitos das reações redox envolvendo o íon de hidrogênio (H^+), hidroxilas (OH^-), clorato (ClO_2^-). Além do gás oxigênio (O_2) que está dissolvido na SQR (solução aerada).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A respeito do nascimento da eletroquímica como uma ciência aplicada, um ponto de partida pode ser o final do século XVIII e o início do século XIX. Em 1791, na província de Bolonha, na Itália, Luigi Galvani realizou diversos experimentos com rãs dissecadas buscando comprovar a relação entre a condução de eletricidade e a contração muscular, e a este fenômeno chamou "eletricidade animal". Contemporâneo e xará de Luigi Galvani,

Luigi Valentino Brugnatelli (1761-1818), professor universitário [Universidade de Pavia na Itália] e químico, é considerado a primeira pessoa a aplicar um processo de eletrodeposição para obter revestimentos de ouro (CARDOSO, 2011, p. 42, apud VISCO³; LOWENHEIM, 1974; WILCOX⁴, 2007). Brugnatelli era amigo de Alessandro Volta (cujo nome foi homenageado em uma unidade elétrica, o Volt) que, pouco tempo antes, havia descoberto o princípio químico que tornaria possível o desenvolvimento das "células eletroquímicas". A demonstração desse princípio por Volta recebeu o nome de "pilha voltaica" e, como consequência desse trabalho, Brugnatelli conseguiu realizar experimentos utilizando diversos banhos eletroquímicos. (CARDOSO, 2011, p. 43).

Importante contextualizar, Alessandro Volta também viveu na Itália (Ducado de Milão) e teve acesso ao estudo de Luigi Galvani; ambos disputavam a conceituação da condução de eletricidade em meio aquoso. Na década de 1790, Volta iniciou experimentos entre metais diferentes e separados por um papel umedecido com eletrólito para obtenção de uma diferença de potencial elétrico (ddp). Em 1800, ele encaminhou seu trabalho à *Royal Society*⁵ de Londres; nele considerava a eletricidade observada por Galvani uma "eletricidade metálica" (VOLTA, 1800). No conceito atual de eletroquímica, ambos estavam equivocados quanto à nomenclatura proposta, entretanto o fenômeno observado era o mesmo: um processo eletroquímico. No processo de Galvani se tratava de um processo eletroquímico de eletrotransmissão bioquímica, e no de Volta de um processo eletroquímico de eletrocatalise (geração de energia).

³ VISCO, R. E. in: LOWENHEIM, F. A. *Modern Electroplating 3rd ed.* New York: Wiley, 1974.

⁴ WILCOX, G. D. Electrodeposition – a versatile tool for the surface engineer. *Transactions of the Institute of Metal Finishing*, v. 85, n. 1, p. 8-13, 2007. doi:10.1179/174591907X171945.

⁵ Fundada em 1660, a *Royal Society* é uma associação acadêmica e nacional do Reino Unido que se autogoverna com intuito de reconhecer, promover e auxiliar à ciência de excelência (comunicação com pesquisadores e divulgação de trabalhos científicos em *journals*), à engenharia (inovação e esquemas industriais) e à medicina.

Somando-se aos trabalhos de Galvani, de Volta e de Brugnatelli, na Inglaterra dos anos 1800, Nicholson e Carlisle (HUNT, 1973) desenvolveram estudos de decomposição da água pela aplicação de corrente elétrica que foram imprescindíveis para o avanço de técnicas de separação de elementos químicos. A partir deste momento, deu-se a integração entre a eletricidade e a química, originando a técnica de eletrólise⁶. Portanto, diversos elementos químicos foram processados e/ou isolados, entre eles: do processamento da platina, o paládio (1803) e o ródio (1984) foram descobertos por William Hyde Wollaston (1800-1814); em 1803, o irídio e ósmio foram identificados por Smithson Tennant (McDONALD; HUNT, 1982); e Sir Humphry Davy, entre 1807 a 1808, realizou diversos experimentos usando um circuito voltáico para separar sódio, potássio, bário, estrôncio, cálcio e magnésio (CLAY, 1894, p. 51).

A eletroquímica também recebeu contribuições de diversos cientistas. Por meio de teorias da física e da química foram definidos os conceitos elétricos e químicos, isoladamente ou em conjunto. Também sob a influência de Volta e Galvani, destacam-se os trabalhos de Sir Humphry Davys (1806) com eletrodeposição usando soluções metálicas (HUNT, 1973); de André-Marie Ampère (1820) e John Frederick Daniell (1830-1837) em estudos da pilha de Daniell (HUNT, 1973); e de Georg Ohm (1827) e Michael Faraday (1832) nos processos de decomposição eletroquímica (HUNT, 1973).

No século XX, a partir dos estudos desenvolvidos por Willis R. Whitney (UHLIG, 1952), a corrosão também passou a ser considerada um processo eletroquímico. Em 1932, a teoria elaborada por Thomas Percy Hoare e Ulick Richardson Evans (Cambridge, Inglaterra) permitiu a avaliação quantitativa da corrosão (SHUKLA; KUMAR, 2008). Nesta mesma época, a eletroanalítica também se constitui como outro ramo da eletroquímica, sendo uma ciência que estuda os fenômenos eletroquímicos de sensoramento, de monitoração, de determinação, de análise, de medição, de avaliação e de detecção eletroquímica de uma dada espécie eletroativa, seja química ou bioquímica. Em plena 1ª Guerra Mundial - na cidade de

⁶ Eletrólise é um procedimento eletroquímico de isolamento de elementos químicos por meio da aplicação de potencial ou corrente elétrica a eletrodos inertes. No eletrodo anodo, onde o potencial é positivo, aproximam-se os íons de carga negativa; já no eletrodo catodo, ocorre o contrário.

Praga, República Checa - o método de polarografia foi desenvolvido e publicado posteriormente (1922) por Jaroslav Heyrovský (SHUKLA; KUMAR, 2008). Esse foi considerado o marco inicial na fundamentação dos princípios eletroquímicos nos processos eletroanalíticos. Em 1959, ele foi condecorado com o prêmio Nobel pelo feito (SHUKLA; KUMAR, 2008). Os trabalhos de Heyrovsky fundamentaram os demais métodos voltamétricos (SHUKLA; KUMAR, 2008). Nos anos de 1950, Wiktor Kernula (Varsóvia, Polónia) contribuiu com o desenvolvimento da técnica eletroquímica de voltametria cíclica, do inglês, *cyclic voltammetry* (CV), para a análise de reações eletroquímicas de redução e oxidação (SHUKLA; KUMAR, 2008).

Por meio da técnica eletroquímica voltametria cíclica é possível aplicar no eletrodo de medição um potencial na forma de onda triangular, variando linearmente tanto no sentido anódico (redução) como no catódico (oxidação), e registrar uma corrente de resposta correspondente às espécies eletroativas (BUFFLE; TERCIER-WAEBER, 2005). A partir dos voltamogramas CV é possível realizar análises quantitativas até limites de concentrações em torno de 10^{-4} a 10^{-5} mmol cm⁻³ (ALEIXO, 2003) e qualitativas no estudo de mecanismos de oxidação e redução, procedimentos de limpeza eletroquímica, funcionalização e caracterização do eletrodo de medição e processos de fabricação e caracterização dos eletrodos de referência (ALMEIDA, 2009, p. 58). No caso de medições em que a resposta depende de uma expressão corrente capacitiva, o CV pode ser mais apropriado; porém, se o processo de medição for dominado por correntes faradáticas, a técnica eletroquímica de voltametria por pulso diferencial, do inglês *differential pulse voltammetry* (DPV), pode ser mais indicada devido a maior sensibilidade, cujos limites de concentração detectados estão na ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mmol cm⁻³ (ALEIXO, 2003).

Buffle e Tercier-Waæber (2005) demonstraram a análise eletroquímica de metais usando técnicas voltamétricas pulsadas. Eles reportaram voltamogramas DPV para medições de metais em campo e/ou em laboratório na faixa de concentração entre 10^{-4} e 10^{-7} mmol cm⁻³ (BUFFLE; TERCIER-WAEBER, 2005). A técnica DPV permite obter os potenciais correspondentes às correntes de pico de uma dada reação eletroquímica e calcular as concentrações das espécies químicas por intermédio da corrente amostrada, pois esta é o resultado da diferença entre a corrente medida antes e no final do pulso diferencial de potencial (LOVRIĆ, 1999). Acrescentando,

YANG, Ming; LI, Hu (2002) investigaram o comportamento entre a variação da velocidade de varredura com o alargamento do sinal da corrente de pico em voltamogramas cíclicos. Consequentemente, relacionaram-no a uma discrepância do potencial obtido para a resposta eletroquímica de espécies eletroativas analisadas a partir do aumento da velocidade de varredura. Mais detalhes sobre este fenómeno serão descritos na secção de desenvolvimento metodológico, item 4.7.

Diante do descrito até agora, podemos definir a eletroquímica como uma ciência aplicada ao estudo da eletrodeposição (redução do material em meio aquoso), da corrosão (oxidação do material em meio aquoso), da eletrocatalise (geração de energia por princípios eletroquímicos), da eletroanalítica (sensoriamento, monitoração, determinação, análise, medição, avaliação e detecção de uma espécie eletroativa) e da eletrotransmissão (condução iónica em meio químico ou bioquímico). Nesta tese, os processos eletroanalíticos serão nosso veículo principal de estudo, objetivando a análise de espécies eletroativas presente em meio bioquímico. Lector, após uma breve noção, em linhas gerais, como descrito na literatura, sobre a eletroquímica e algumas técnicas de análises, agora será dissertado a respeito dos sensores eletroquímicos.

Silkscreen (serigrafia), microfabricação e microeletrónica são tecnologias empregadas na obtenção de sensores eletroquímicos (SUZUKI, 2000; STETTER; PENROSE; YAO, 2003; ADHIKARI; MAJUMDAR, 2004; LASCHI; MASCINI, 2006; SZUNERTS; THOUIN, 2007). Normalmente, substratos planares de silício (Si), de vidro e de alumina são amplamente cotados para suporte de fabricação desses sensores, por serem de fácil integração e de alta compatibilidade com as tecnologias citadas (SUZUKI, 2000). Além dos substratos convencionais, a partir da década de 1990, os substratos orgânicos de polietileno (PET), de polipropileno, de silicone e de papel se constituíram como materiais alternativos à consagrada tecnologia de silício, pois apresentam diversas vantagens por serem flexíveis, translúcidos e transparentes, passíveis de fotografação e de alta resposta em frequência (transistores a base de grafeno podem chegar a 1 THz de resposta no chaveamento) (CHANDLER, 2009). Por outro lado, há desafios. Atualmente, a tecnologia de microeletrónica orgânica está limitada ao tempo reduzido de vida dos dispositivos e a adequação das técnicas convencionais de microfabricação para processos de

baixa temperatura. Nos anos 1970 e 1980, Suzuki e Taura (2001) reportaram trabalhos científicos nos quais usaram a combinação das tecnologias de microfabricação e de microeletrônica, com o objetivo de obter sensores em formato de um *chip* integrado e processado sobre uma lâmina de silício. Na década de 1990, a tecnologia de microeletrônica e de microfabricação também foi empregada no processamento de sensores eletroquímicos sobre os substratos planares orgânicos.

Os sensores eletroquímicos fabricados sobre os substratos planares geralmente são compostos por um sistema de dois ou de três eletrodos. Com dois eletrodos, um recebe o nome de anodo, está configurado em polo de potencial positivo e o outro nomeado de catodo, em polo de potencial negativo. Para o conjunto com três eletrodos, ocorre a separação do sinal de potencial e de corrente. A configuração de três eletrodos é composta por: eletrodo de medição, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar. Este último permite preservar o eletrodo de medição e garantir um potencial conhecido, estável e confiável ao longo do tempo no eletrodo de referência (COFFEY et al., 2007). O eletrodo auxiliar tem a função de drenar ou fornecer corrente à reação eletroquímica que ocorre no eletrodo de medição, sendo o potencial aplicado com relação ao potencial do eletrodo de referência praticamente sem influência da corrente de medição. Neste caso, geralmente a corrente que flui para o eletrodo de referência é baixa e costuma ser da ordem de 100 pA para uma resistência interna 1 G Ω (EWING, 1977, p. 224).

A partir do final dos anos 1970, passou a ter grande importância a miniaturização e a integração dos eletrodos de referência Ag/AgCl conjuntamente ao *Ion-Selective Field Effect Transistor* (ISFET) para medição de pH (COMTE; JANARA, 1978; BREHIER; BELFORD, REHM; MCENROE; DIAMOND, 1995; HUANG; I-Yu; HUANG, Ruy-Shing; LO, 2003). Neste sentido, diversos trabalhos foram reportados para a fabricação desses eletrodos empregando filmes finos sobre um substrato de silício (DESMOND et al., 1997; HUANG; I-Yu; HUANG, Ruy-Shing, 2002). Nos anos 2000, os polímeros condutores passaram a ser utilizados durante a fabricação dos eletrodos de referência (KISIEL et al., 2005, 2007, 2010, 2011): polipirrol, poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), acetato de celulose e poliuretano (HA et al., 2005) e poli(acrilato de n-butil) (RIUS-RUIZ et al., 2011). Recentemente, Loran et al. (2012) e Bohnke et al. (2013) reportaram um novo eletrodo de referência em estado sólido

baseado em filmes de lítio e titânio - $\text{Li}_x\text{La}_{2/3-x}\text{TiO}_3$ - (LLTO), cujo potencial de eletrodo obtido foi $(-59,7 \pm 4,5) \text{ mV}_{\text{SCE}}$. Mousavi et al. (2013) empregou o polímero acetato de vinila como membrana de troca iônica; neste caso, o potencial de eletrodo foi de $-220,7 \text{ mV}_{\text{Ag/AgCl}}$ 3 M KCl. Atualmente, o principal desafio está em desenvolver um eletrodo de referência em estado sólido completo com potencial estável e reversível, principalmente, para aplicações biomédicas.

A respeito do eletrodo de medição, este pode ser fabricado na forma de macro, micro ou nanoeletródos, empregando platina, ouro, níquel, cobre, carbono vítreo ou aço inox (COFFEY et al., 2007; SZUNERITS; THOUIN, 2007). Os macroeletródos apresentam vantagens na medição de substâncias presentes em altas concentrações, em contrapartida apresentam maior relação sinal ruído eletroquímico⁷. Por outro lado, os microeletródos são amplamente reportados para medição de espécies eletroativas a baixas concentrações, pois a reação eletroquímica está limitada pela difusão hemisférica e pontual no eletrodo, com a relação sinal ruído eletroquímico minimizada. Porém, usando microeletródos, o ruído eletromagnético torna-se significativo, exigindo uma modulação dos sinais senoidais da voltagem alternada e um aterramento adequado conectado a uma gaiola de Faraday⁸. Szunerits e Thouin (2007) comentam algumas vantagens na medição eletroquímica de espécies eletroativas usando um conjunto (*array*) de microeletródos; entre elas estão: i) a interação entre microeletródos ao longo do tempo pode ser desprezível devido à característica de difusão esférica ou hemisférica individual de cada eletrodo no conjunto; ii) se houver sobreposição das camadas de difusão individuais dos microeletródos, o conjunto pode ser considerado um simples macroeletrodo; iii) os microeletródos permitem medição em limites de detecção mais baixos que com macroeletródos, sendo a relação sinal ruído eletroquímico proporcional à área do eletrodo; e iv) a interação entre microeletródos permite dinamizar o estudo de reações redox e seus subprodutos.

⁷ A relação sinal ruído eletroquímico pode ser definida como a interação entre a resposta das espécies eletroativas presentes na solução e a instabilidade do sistema eletroquímico, principalmente, na interface da dupla camada elétrica do eletrodo de medição.

⁸ Gaiola de Faraday é uma blindagem ao redor de todo experimento, usando uma malha de material férreo capaz de capturar um amplo espectro eletromagnético (similar a uma antena), que conectada a um aterramento adequado, evita a interferência por ondas eletromagnéticas.

A limpeza eletroquímica para ativação de superfícies de eletrodos pode ser confundida com o polimento eletroquímico. Mas, na verdade, a limpeza eletroquímica distingue-se por ser um procedimento de remoção superficial de partículas orgânicos, de impurezas metálicas e de óxidos remanescentes do processo de polimento eletroquímico ou quíça do de fabricação, usando a ação da corrente ou do potencial aplicado em um banho eletroquímico adequado (COTELL;

procedimentos de passivação) (COTELL; SPRAGUE; SMIDT Jr., 1993-1994). de sítios ativos, os quais são formados sobre a superfície do metal quando em técnica metalográfica empregada com solução adequada para promover suavização eletropolimento) (COTELL; SPRAGUE; SMIDT Jr., 1993-1994), sendo o último uma que é controlado pela aplicação de uma corrente elétrica. Ambos se diferenciam do eletroquímico ocorre a ação química do fluido de polimento na superfície do metal tensão residual (COTELL; SPRAGUE; SMIDT Jr., 1993-1994). Durante o polimento polimento eletroquímico permite o polimento da superfície introduzindo menos residual na superfície do eletrodo (MARY et al., 2007). Por outro lado, a técnica de polimento mecânico é empregado com esta finalidade, porém pode induzir tensão ocorrência de sítios super-eletoativos formados durante o processo de fabricação. O homogeneizar a superfície do metal ou do material de eletrodo para minimizar a Após a obtenção de eletrodos, principalmente microeletrodos, se faz necessário

hemisféricos (PAIXÃO; BERTOTTI, 2009; JIANG, Junhua; WANG, Xinying, 2012a). um microeletrodo metálico ou de carbono, geralmente filmes ou eletrodos (eletrodos esféricos) ou uma técnica de deposição eletroquímica de mercúrio sobre miniaturizados podem ser obtidos usando um eletrodo de mercúrio miniaturizado permita o uso da técnica de fotografiação e, por fim, microeletrodos de mercúrio filmes finos metálicos e definidos por um dielétrico adequado, geralmente que al., 2008), micropilares - um conjunto de microeletrodos preparados a partir de dielétrico que cumpre a função de suporte (PAIXÃO; BERTOTTI, 2009; GANJALI et micrométrico ou fibra de carbono impregnada em resina epóxi ou outro material sua extremidade (PAIXÃO; BERTOTTI, 2009), microdiscos - fio metálico microcilíndricos - obtidos pelo polimento da superfície do metal até o afinamento em na preparação. Por exemplo, os procedimentos comumente utilizados são: Obter resultados otimizados com os microeletrodos exige cuidados, que se iniciam

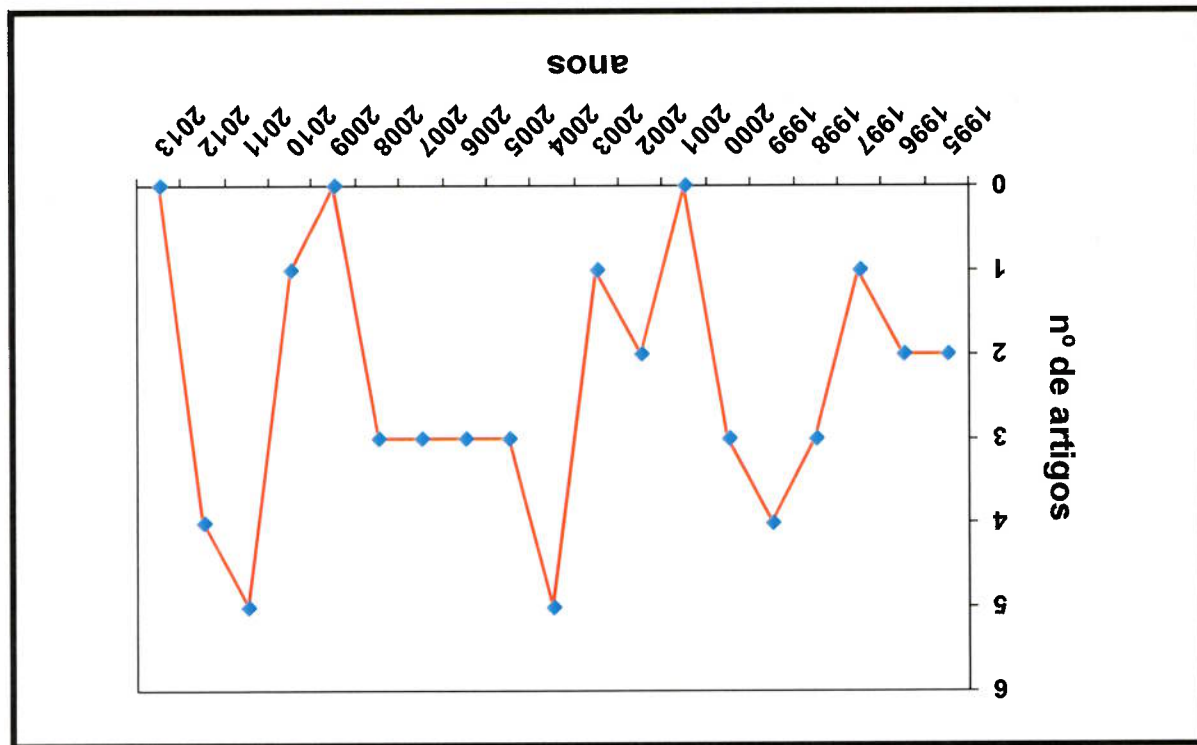
O condicionamento de superfícies de eletrodos pode ser realizado por métodos eletroquímicos que permitem ativar e estabilizar a área efetiva exposta em solução química (FISCHER et al., 2009). Salienta-se que não há um método eletroquímico único. Este é elaborado de acordo com o metal ou tipo de material do eletrodo, as características químicas da solução, a densidade de corrente ou de potencial a ser aplicado e a difusão do gás oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2) em solução aquosa (FISCHER et al., 2009). Os procedimentos comumente utilizados para ativação eletroquímica são compostos por um eletrólito inorgânico, uma faixa potencial cíclica e uma taxa de varredura de potencial adequada (STULIK et al., 2000). O condicionamento eletroquímico é um procedimento de ativação da superfície de eletrodos, que para macroeletrodo é trivial, mas para microeletrodos – em especial os de ouro – há poucos procedimentos que garantem máxima área efetiva exposta

2000; MALJUSCH et al., 2012; COTELL; SPRAQUE; SMIDT Jr., 1993-1994). (STULIK et al., 2000; MARY et al., 2007; NOROUZI et al., 2007; GUISEPPI-ELIE, sônica (SCHOENFISCH; ROSS; PEMBERTON, 2000), e limpeza eletroquímica exemplo: limpeza química (NOGUEIRA; SANTOS FILHO, 2002), limpeza ultra-processamento em microeletrônica e utilizados para fabricação de eletrodos, por limpeza de lâminas de silício, de superfícies de metais e de outros materiais de momento, diversos equipamentos e métodos padrões foram desenvolvidos para uma de limpeza química tradicional. Partindo da década de 1930 até o presente Entre as etapas de polimento e de limpeza eletroquímica, geralmente opta-se por absorvidas (MALJUSCH et al., 2012).

extremamente sensível à morfologia superficial e às impurezas adsorvidas ou superfície de metais está na observação do formato do voltamograma, pois este é Uma abordagem inicial para analisar os efeitos de adsorção química sobre a hidróxido de sódio ou ácido sulfúrico ($HClO_4$, $NaOH$ ou H_2SO_4 , respectivamente). sobre a superfície dos metais, principalmente usando eletrólitos ácido perclórico, espécies de hidrogênio, de hidroxilas e de oxigênio ($*H$, $*OH$ e $*O$, respectivamente) durante os procedimentos de limpeza eletroquímica pode ocorrer a adsorção de estudos de Maljusch et al. (2012) apontaram na mesma direção, eles reportaram que óxido superficial sobre o metal platina, avaliando grupos hidroxilicos adsorvidos. Os SPRAGUE; SMIDT Jr., 1993-1994). Guiseppi-Elie (2000) reportou a formação de

em solução, conforme reportado na literatura. Somente 0,5% ou menos dos trabalhos científicos publicados para microeletrodos reportam algum tipo de procedimento para condicionamento eletroquímico de acordo com a base de dados científicos do *Scopus Sciverse* usando as palavras chave "microelectrodes" e "electrochemical cleaning" ou "surface activation" ou "electrochemical conditioning" ou "electrochemical activation" (Figura 1).

Figura 1 – Números de artigos publicados abordando algum tipo de limpeza ou condicionamento eletroquímico ou ativação superficial para microeletrodos de ouro.



Fonte: *Scopus Sciverse* (2013).

Realizado o condicionamento eletroquímico sobre uma superfície de eletrodo, a caracterização de área efetiva de macro e de microeletrodos é requerida, para avaliá-la e correlacioná-la com a funcionalidade dos eletrodos em relação à corrente medida e, posteriormente, mantê-la estabilizada. Quanto ao equacionamento Randles-Sevcikiano adequado para macroeletrodos (MABBOTT, 1983) e o Cottrelliano para microeletrodos (SZUNERITS; THOURIN, 2007), ambos são empregados para calcular a área efetiva exposta em solução de acordo com a corrente de pico (macroeletrodos) ou a corrente limite ou de saturação (microeletrodos). Em sensoramento, partir de um eletrodo confiável permite aferir valores condizentes de resposta eletroquímica às variações das concentrações das

espécies eletroativas, evitando relacioná-los a alguma adversidade eletro-física⁹ ou química nos eletrodos. Logo, devemos-nos revisar ainda mais nos conceitos dos sensores eletroquímicos.

No universo dos sensores eletroquímicos, podemos classificá-los como voltamétricos, condutométricos, potenciométricos e amperométricos (OLIVER, Sonia, 2006, p. 1), de acordo com a técnica eletroquímica de medição empregada. A cada classificação, os tipos de sensores podem ser químicos de ion-seletivo, de gás, *Ion-Selective Field Effect Transistors* (ISFET), piezoeletrico e biosensor (STEFAN; VAN STADEN; ABUL-ENEIN, 1999). Destaque especial para os sensores amperométricos, que são amplamente cotados, pois são capazes de coletar a corrente de uma dada reação eletroquímica a um potencial constante, a qual está diretamente relacionada à concentração das espécies eletroativas em solução. Portanto, possibilitam qualificar e quantificar substâncias por meio da relação entre a resposta de corrente e a concentração correspondente (YANG, Shanli et al., 2010; ADHIKARI; MAJUMDAR, 2004). Dai et al. (2008) reportaram outras técnicas além da eletroquímica para medição das espécies eletroativas, especialmente ions nitrilo (NO_2^-), por exemplo: espectrofotometria, cromatografia e eletroforese capilar.

Os sensores em questão são empregados para detectar espécies eletroativas. Somando as técnicas eletroquímicas de controle (voltametria linear ou cíclica, cronopotenciometria, cronopotenciometria e impedância), esses sensores apresentam inúmeras vantagens: são de fácil configuração, de baixo custo de fabricação e de alta versatilidade na modificação e no condicionamento de superfícies de eletrodos. Especialmente com os sensores eletroquímicos, tem-se a opção de medições diretas *in situ* e com alta sensibilidade, boa seletividade e rápida resposta, considerando medidas com os menores limites de detecção (ADHIKARI; MAJUMDAR, 2004; MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001).

Neste trabalho de doutorado, o objetivo foi a miniaturização de eletrodos para obtenção de sensores eletroquímicos capazes de medir ions nitrilo como reportado

⁹ O termo eletro-física foi utilizado para conceituar as variações que estão relacionadas a problemas de origem elétrica e que recebem contribuições de outras áreas do conhecimento da física, por exemplo: o eletromagnetismo.

por Wygladacz et al. (2002). Os íons NO_2^- foram escolhidos como análio principal no sensoriaménto, por estarem presentes em vários sistemas fisiológicos de humanos, no meio-ambiente e em diversos outros segmentos (a serem abordados ao longo do texto). A determinação qualitativa e quantitativa da concentração de nitró e interessante, pois proporciona o controle desta espécie quanto à sua capacidade tóxica. Quando em altas concentrações ($> 21,7 \text{ nmol cm}^{-3}$), ele pode causar distúrbios à saúde, tanto alterando o metabolismo humano como a estabilidade ambiental em águas de rio e ar atmosférico (TOMODA; TSUJIT; YONEYAMA, 1981; RAJESHWAR; IBANEZ, 1997; MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001).

Sob uma perspectiva histórica, o nitró é objeto de estudo desde o século XIX. Na sequência, apresentaremos os principais trabalhos que impulsionaram as investigações na quantificação dessa espécie química ao longo dos últimos 20 anos. Os trabalhos de Brunton (1867), Fye (1989) e Ringler e Murrell (1883) representam um marco primordial na pesquisa sobre o nitró, pois desencadearam o interesse investigativo pelo fenômeno de aceleração da ação do coração e pela investigação toxicológica quando se administrava nitró de amila ou de sódio em pacientes, respectivamente. A partir de 1930, cresceu o volume de estudos que buscaram compreender as estruturas físicas ou as propriedades químicas de diversos compostos de nitró, por exemplo: nitró de sódio (ZIEGLER, 1931), nitró de t-butila (COE; DOUMANI, 1948) e nitró alquílicos (R-N=O) (TARTE, 1952). Nas décadas de 1940 a 1960, a análise colorimétrica e os avanços nas técnicas de síntese químicas, principalmente de compostos bioquímicos (proteínas e aminoácidos), impulsionaram as pesquisas envolvendo a determinação de nitró (SHINN, 1941; KERSHAW; CHAMBERLIN, 1942; RIDER; MELLON, 1946; SPIES; CHAMBERS, 1948; BARNES; FOLKARD, 1951; LAMBERT; ZITOMER, 1960) ou a obtenção de novos produtos químicos, usando nitró em meio reacional (BARRY; HARTUNG, 1947; SPIES; CHAMBERS, 1949). Os estudos de quantificação avançaram a partir de 1950; primeiramente por determinação polarográfica (CHOW; ROBINSON, 1953), depois por métodos espectrofotométricos (MULLIN; RILEY, 1955; SAWICKI et al., 1963; WETTERS; UGLUM, 1970; TARAFDER; RATHORE, 1988), em seguida, por análises eletroquímicas (SWOFFORD; MCCORMICK, 1965; NYGAARD, 1981; COX; KULKARNI, 1986), fluorimétricas (OHTA; ARAI; TAKITANI, 1986; MOTOMIZU; MIKASA; TÔEI, 1986; DAMIANI; BURINI, 1986) e, ultimamente,

os métodos de cromatografia (MUSCARÁ; DE NUCCI, 1996) e de eletroforese capilar são os mais utilizados (UEDA et al., 1995; MARSHALL; TRENERRY, 1996).

Donald Nicholas e Nason (1957) publicaram um trabalho sobre a determinação de nitrato e nitrito com ampla citação pela comunidade acadêmica, desencadeando diversos estudos envolvendo o nitrato. O efeito tóxico do nitrato para o plantio agrícola - decorrente do uso excessivo de fertilizantes - foi relatado por Court, Stephen e Waid (1962) em alimentos e na biologia, fungos e nitrobactérias *Winogradskyi* reportado por Boon e Laudelout (1962). O nitrato é uma espécie iônica (NO_2^-) recorrente no ciclo global do nitrogênio (TESKE et al., 1994; MELO FILHO; BISCONTINI, 2004), pois está presente nos solos como fertilizantes, na água potável e de rios atuando como um agente antibacteriano, nos alimentos como um agente de preservação de cor e sabor. Nos sistemas fisiológicos de seres humanos, o nitrato está associado, direta ou indiretamente, à vasodilatação, à neurotransmissão (MATTOS; GORTON, 2001), ao metabolismo energético (DOBLANDER; LACKNER, 1996; ALLEN et al., 2009), aos processos inflamatórios e à proliferação celular descontrolada (células cancerígenas). Após a descoberta da presença do óxido nítrico (NO) no organismo humano (MURAD; FURCHGOTT; IGNARRO, 1998), a detecção do nitrato ganhou destaque na investigação bioquímica indireta do NO.

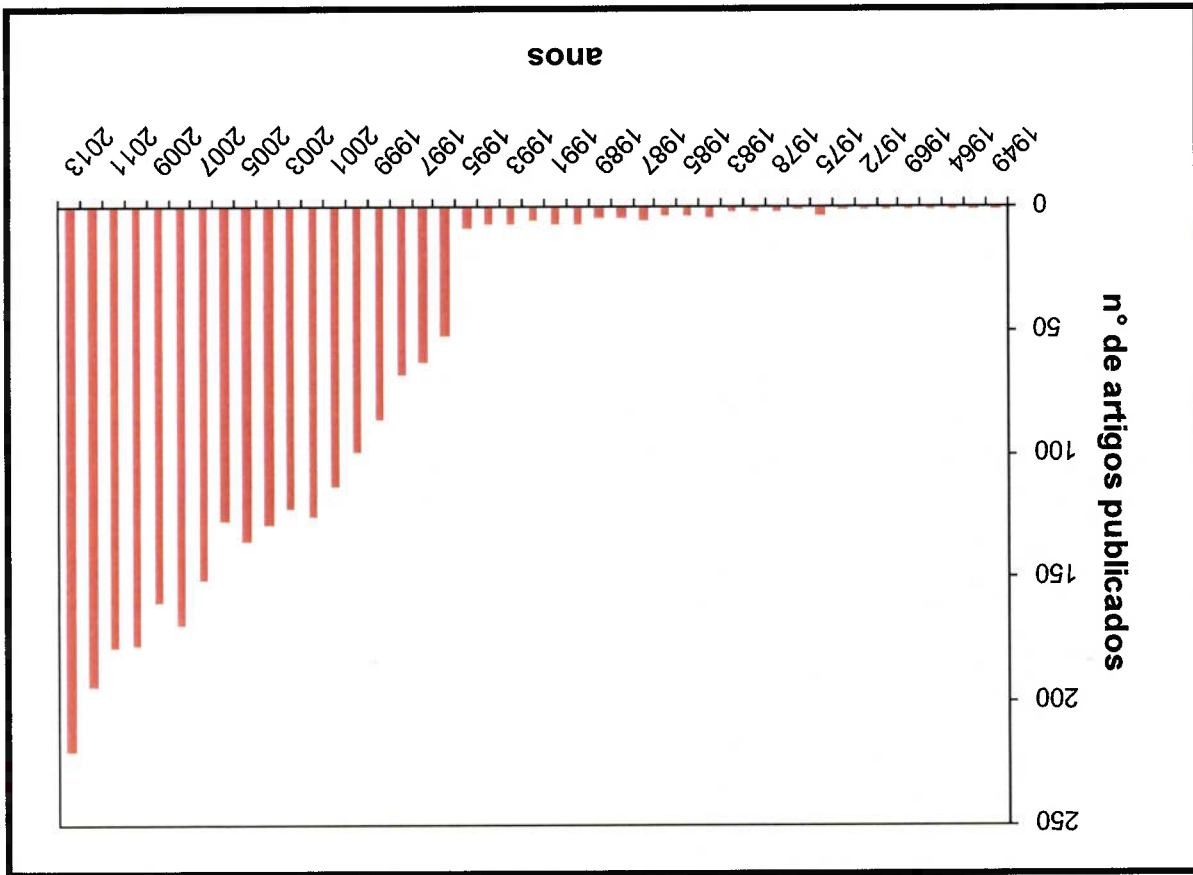
Somado a isso,

(...) já se sabe que o óxido nítrico é um poluente moderadamente tóxico do ar, portanto, não foi surpresa descobrir também que o óxido nítrico produzido por macrófagos contribui para a destruição de microrganismos e células tumorais. Por outro lado, foi inesperado constatar, no final da década de 1980, que o óxido nítrico é um mensageiro difusível das células endoteliais do revestimento de vasos sanguíneos, sendo responsável pelo relaxamento do músculo liso das paredes de artérias; além disso, ele atua como um neurotransmissor não convencional tanto no sistema nervoso central como no periférico. (...) O NO é apenas um dos diversos estados redox rapidamente interconvertíveis do monóxido de nitrogênio, incluindo os ions nitrossônico (NO^+) e nitroxila (NO^-). Embora o óxido nítrico seja estável em água, ele reage imediatamente com oxigênio e possui uma meia-vida de apenas alguns segundos no organismo. (...) Uma grande parte do óxido nítrico é inativada por ligação ao heme da hemoglobina. Por fim, o óxido nítrico é metabolizado, transformando-se em nitrato e nitrito e sendo excretado do organismo. (POLLARD; EARNSHAW, 2006, p. 435, grifos nossos).

O ciclo fisiológico do nitrogênio tem o nitrito como uma espécie de molécula-chave, pois tem um estado de oxidação intermediário ao do ion nitrato (NO_3^-) e ao do óxido

nítrico. Em outras palavras, no organismo humano ele atua na regulação dos níveis de NO. Diante disso, a necessidade na quantificação do ion nítrico é requerida conjuntamente com outras áreas de atuação. Seja na medicina, na bioquímica, na nutrição e na engenharia química, agrícola, civil, ambiental e de controle de poluição. De acordo com a base de dados científicos do *Scopus SciVerse* usando a palavra-chave "nítrico" havia 54.546 artigos publicados até o final do ano de 2013. A primeira publicação abordando o nítrico é datada por Price (1852); atualmente, mais de três mil artigos reportam procedimentos eletroquímicos para medição, análise, determinação, monitoramento ou detecção de nítrico. As pesquisas com nítrico tiveram crescimento moderado até 1995, e *a posteriori* houve um interesse exponencial abrupto (Figura 2) na medição eletroquímica do nítrico e do óxido nítrico, e nova ascensão a partir da descoberta da função fisiológica do NO nos anos 2000.

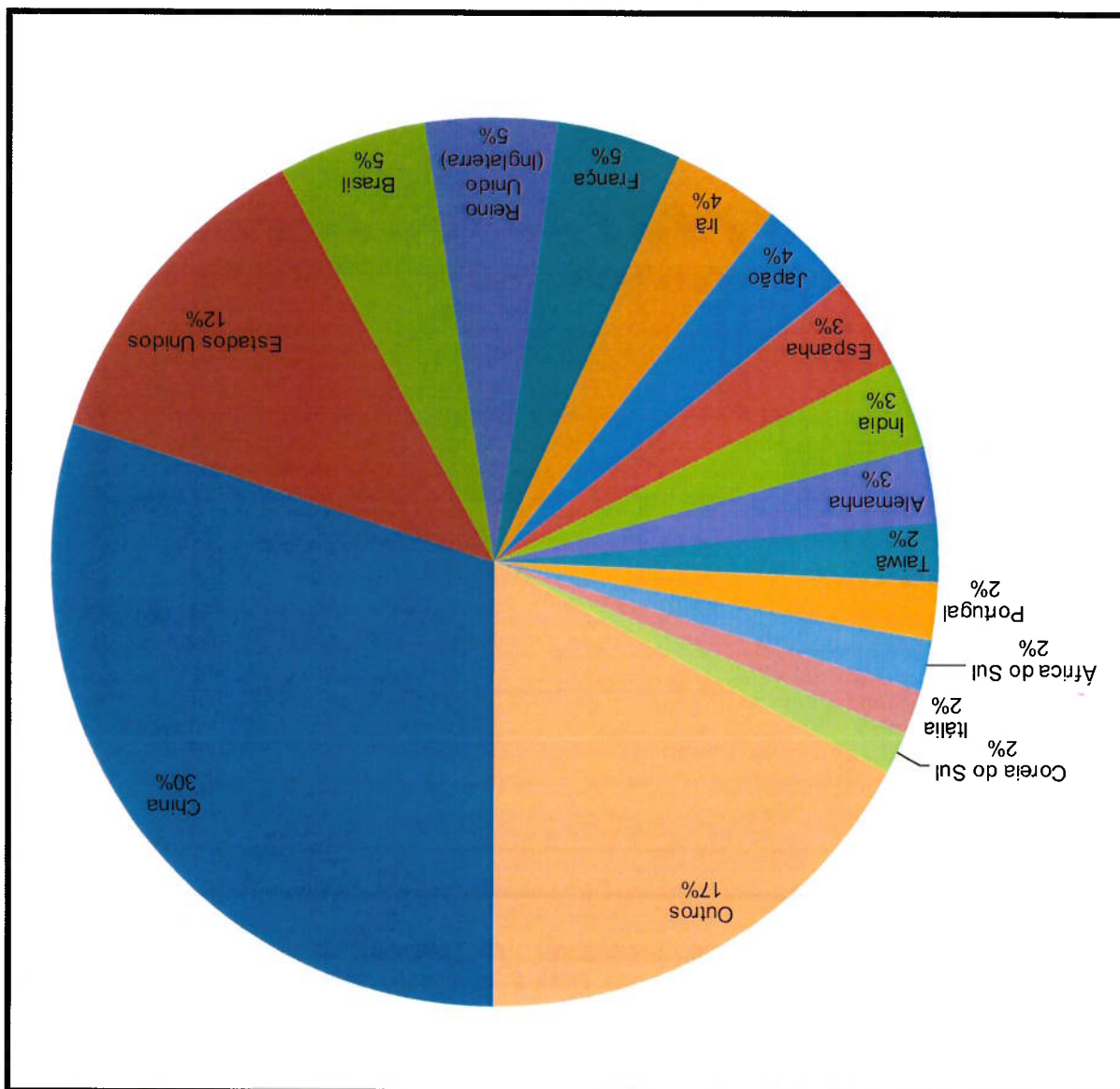
Figura 2 – Números de artigos publicados a cada ano com as palavras-chave "nítrico" e "sensor electrochemical detection" ou "electrochemical determination" ou "electrochemical analysis".



Fonte: Scopus SciVerse (2014).

Atualmente, China, Estados Unidos, Brasil e Inglaterra juntos representam mais de 50% do total de publicação no tema (Figura 3). O Brasil está em terceiro lugar com mais de 60 publicações. Nos últimos cinco anos, os autores brasileiros que mais publicaram no tema foram Bertotti, M., Gushikem, Y., Fontes, M. B. A., Almeida, F. L. e dos Santos Filho, S. G., com 14, 7, 4, 4 e 3 artigos respectivamente. Na Figura 4, apresenta-se a relação dos autores com o número total de publicações usando as palavras-chave "nitrite" e "electrochemical sensor" e a base Scopus SciVerse.

Figura 3 – Porcentagens do total de publicações com as palavras-chave "nitrite" e "electrochemical sensor", distribuídos por países. A China representa 1/3 das publicações mundias, e o Brasil está em terceiro lugar, concorrendo com Reino Unido e França.



Fonte: Scopus SciVerse (2014).

Fonte: Scopus SciVerse (2013).

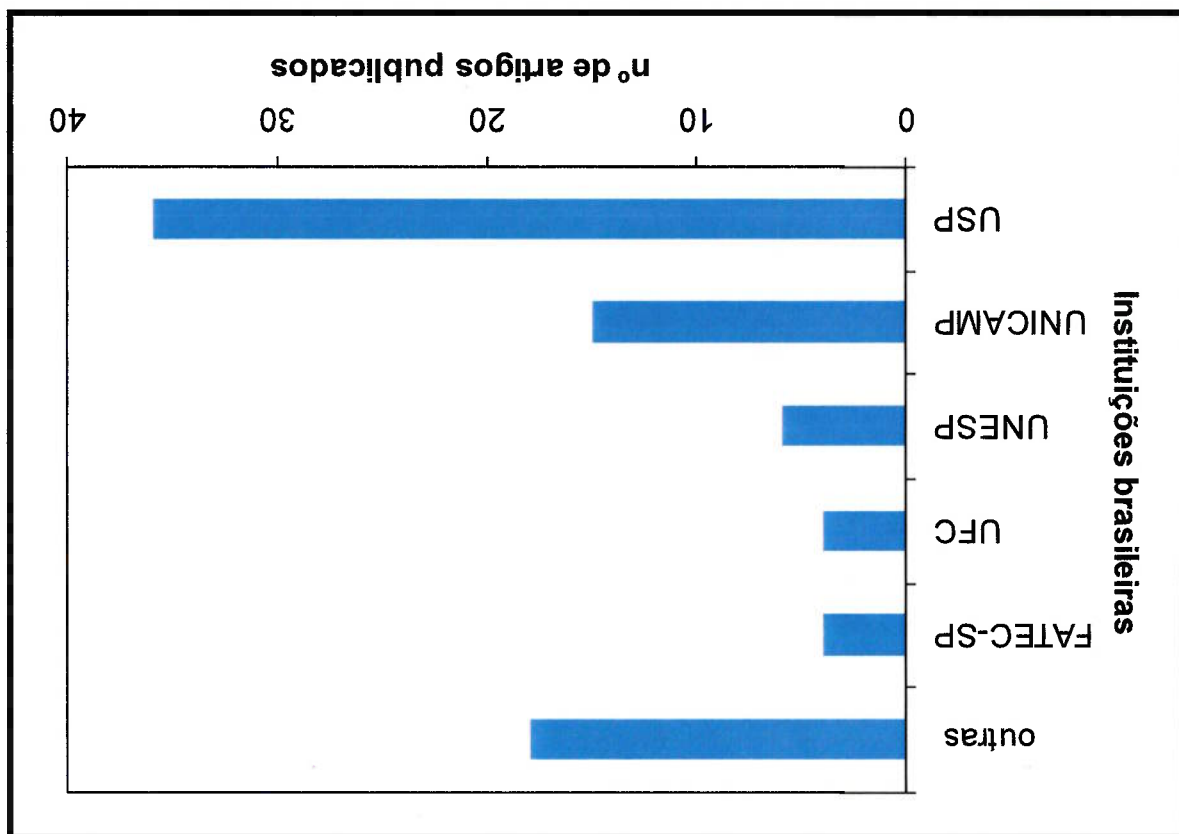


Figura 5 – Números de artigos publicados por universidades brasileiras com as palavras-chave "nitrite" e "sensor" e "electrochemical".

Fonte: Scopus SciVerse (2014).

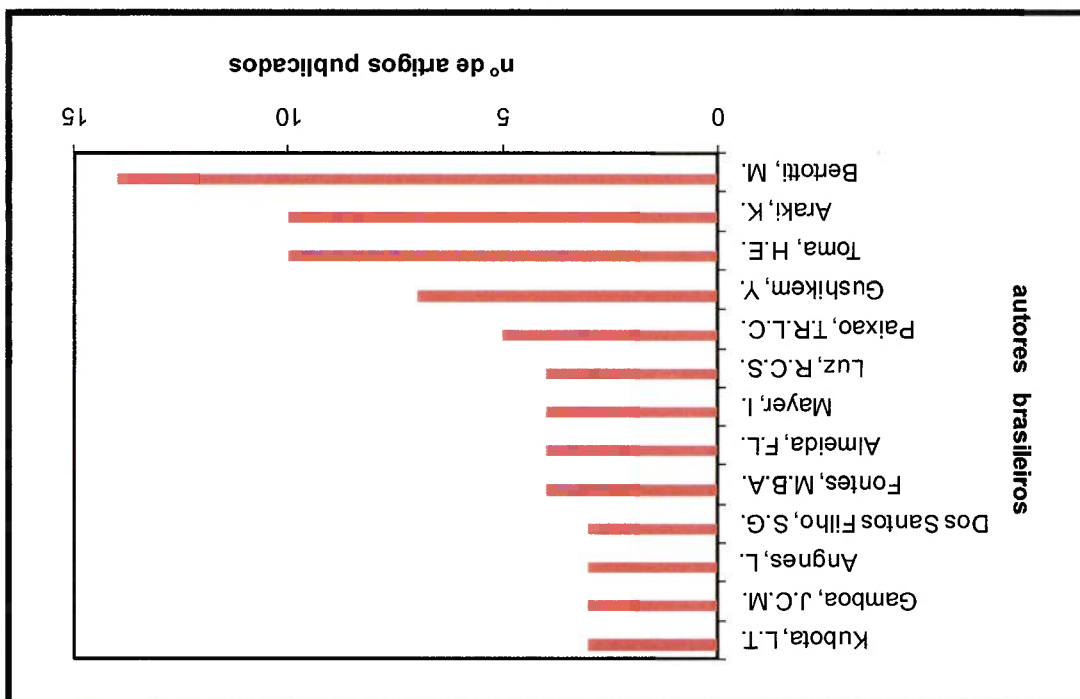


Figura 4 – Números de artigos publicados ao longo do tempo, por autores brasileiros que mais reportaram artigos com as palavras-chave "nitrite" e "sensor" e "electrochemical".

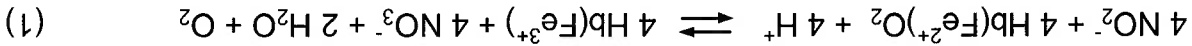
A Figura 5 demonstrou a quantidade de publicações por universidades brasileiras (informações de busca, idem para o gráfico anterior). A Universidade de São Paulo (USP) representa mais de 70% do total de publicações brasileiras.

Letor, até aqui, nós apresentamos informações da literatura a respeito dos sensores eletroquímicos e discorremos sobre a importância do uso da limpeza e do condicionamento eletroquímico - principalmente para microeletrodos - buscando eliminar impurezas aderidas na superfície e homogeneizar os sítios super-eletroativos do material de eletrodo, estabilizando o sinal de corrente. Por fim, uma introdução específica ao nitrito foi apresentada, incluindo dados comparativos de publicação internacional e nacional. A partir deste momento, iremos apresentar mais detalhadamente o nitrito quanto às aplicações e aos sistemas de medição.

Na medicina e bioquímica, a investigação do nitrito está relacionada à vasodilatação, que altera a dinâmica do sistema cardíaco, aos componentes do citocromo c-551 de pseudômonas oxidase¹⁰ (YAMANAKA; OTA; OKUNUKI, 1961) e à reversão da metahemoglobina (metHb, $Hb(Fe^{3+})$ ou $Hb(Fe^{3+})O$) à hemoglobina (BEUTLER; BALUDA, 1963). Por um lado, o nitrito está relacionado à sua ação tóxica à saúde humana quando em altas concentrações (anteriormente comentado). Por outro lado, em baixas concentrações ($< 1 \text{ nmol cm}^{-3}$) há um efeito positivo no tratamento de doenças cardíacas, circulatórias e do metabolismo energético (DOBLANDER; LACKNER, 1996). Considerando, a concentração de nitrito no sangue humano na faixa de não detectável até cerca de 20 nmol cm^{-3} (DEJAM et al., 2005); se o nitrito for administrado a níveis baixos de concentração ($< 1 \text{ nmol cm}^{-3}$), pode reduzir significativamente a ocorrência de ataque cardíaco em aproximadamente 50-67% (SINHA; SHIVA; GLADWIN, 2008). Porém, quando em altas concentrações ($> 21,7 \text{ nmol cm}^{-3}$), no estômago, podem reagir com aminas e amidas formando nitroaminas e nitroamidas, respectivamente, que são bem-conhecidas por serem carcinogênicas (RAJESHWAR; IBANEZ, 1997; MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001; RAYMUNDO, 2007; YANG, Shanli et al., 2010). No sangue, pode reagir com a hemoglobina, formando a metahemoglobina (ALLEN et al., 2009), como mostra a

¹⁰ O citocromo c-551 é um tipo de proteína da família c (com 82 aminoácidos) que complexa o ferro(II) e doa elétrons no processo oxidase de respiração mitocondrial de pseudômonas (uma das bactérias responsáveis pelas infecções hospitalares, apresentando mais de 190 variações).

reação a seguir (equação 1). Neste caso, ocorre a blindagem da hemoglobina para o carregamento de gás oxigênio, o que pode causar sérios danos à saúde humana (GREENBERG; LESTER; HAGGARD, 1943; TOMODA; TSUJIT; YONEYAMA, 1981; FAGO; JENSEN, 2007).



Raymundo (2007) comenta que a blindagem da hemoglobina pelo NO_2^- pode ser revertida pela ação da coenzima NADH-metahemoglobina redutase¹¹ (presente nos eritrócitos), que atua no grupo *heme*¹² da hemoglobina, convertendo a metahemoglobina em hemoglobina, mas o processo é custoso em tempo e em energia para o organismo humano. Diante disso, medir a concentração do nitrato em pacientes, principalmente quando submetidos à Unidade de Terapia Intensiva (UTI), pode ajudar no diagnóstico de uma possível intoxicação devido à dieta, aos medicamentos ou à disfunção do metabolismo energético ou até mesmo prevenir um infarto do miocárdio decorrente da vasodilatação acelerada.

Além da medicina, outras áreas visualizaram o nitrato como uma pesquisa estratégica. Na década de 1980, o estudo de quantificação de nitrato em águas foi intenso (ISKANDARANI; PIETRZYK, 1982; KOUPPARIS; WALCZAK; MALMSTADT, 1982; CHAUBE; BAVEJA; GUPTA, 1982). Na preservação do meio ambiente, a concentração de nitrato deve estar abaixo de $21,7 \text{ nmol cm}^{-3}$ em água de rio (BRASIL, 2005b) ou em água potável (BRASIL, 2005a). Em alimentos, o nitrato é empregado na preservação de cor e sabor, pois é um antimicrobiano em concentrações adequadas. Ele elimina a ocorrência de *Clostridium botulinum* que poderia promover o envenenamento do organismo humano pela ação desse micro-organismo.

A Tabela 1 apresenta dados de faixa de concentração do nitrato em diferentes meios, desde o bioquímico até o ambiental (águas de rio e potável).

¹¹ As espécies químicas de dinucleótido de nicotinamida-adenina (*NAD) são coenzimas que apresentam dois estados de oxidação: o NAD^+ (oxidado) e o NADH (reduzido). O NADH transfere elétrons quando se liga a uma molécula de metahemoglobina (processo redutase), convertendo-a em hemoglobina.

¹² O grupo *heme* é uma notação genérica que se refere às ligações químicas do ferro no núcleo central de algum tipo de proteína, por exemplo: a hemoglobina.

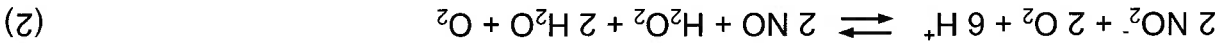
Tabela 1 – Faixa de concentração de nitrato em meio bioquímico, alimentício e ambiental.

Referências	Concentração	nitrato presente em:
(DEJAM et al., 2005)	Não detectável a < 20	sangue de humanos
(RASSAF et al., 2006)	0,15 – 0,60	soro e plasma de humanos
(GREEN et al., 1982)	30 – 210	saliva de humanos
(MORCOS; WIKLUND, 2001)	~0,25	urina de humanos
(WELLER et al., 1996)	~3,4	suor de humanos
(MELO FILHO; BISCONTINI, 2004)	> 300 mg Kg ⁻¹	alimentos carnes
(BRASIL, 2005a)	< 21,7	água potável
(BRASIL, 2005b)	< 21,7	água de rio

Fonte: Almeida (2014).

Diversos processos para quantificar nitrato foram desenvolvidos a partir das necessidades comentadas anteriormente. Kiang, Kuan e Guilbault (1975) reportaram o primeiro biosensor para medir nitrato com alta seletividade, mobilizando a enzima nitrato redutase¹³ sobre um eletrodo de medição. Mas há inconveniências, o controle e estabilização das enzimas sobre a superfície do eletrodo (muitas vezes instáveis) e, geralmente, os biosensores têm tempo de vida restrito a uma medição. Em especial, a quantificação por sensores eletroquímicos oferece vantagens por permitir medição direta a baixos limites de concentração, *in loco* e sem manipulação de amostra. Porém, para medir nitrato em meio bioquímico, depara-se com diversos fatores limitantes: a resposta em potencial geralmente está acima de +0,800 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, recebendo influência de inúmeras espécies interferentes que respondem abaixo do potencial de +0,500 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}; a concentração de nitrato que comparada ao nível milimolar dos interferentes é super-reduzida, abaixo de 20 nmol cm⁻³ (DEJAM et al., 2005). Outro fator limitante é o pH do meio bioquímico em análise, quando o nitrato está em meio ácido na presença de gás oxigênio, ele é reduzido a óxido nítrico. A reação 2 ilustra a formação do NO, que pode ocorrer no corpo humano (MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001).

¹³ Nitrato redutase refere-se a qualquer enzima que promova a redução do nitrato.



A fim de minimizar interferências, durante o processo de fabricação de sensores eletroquímicos, opta-se por depositar um filme polimérico condutor sobre a superfície ativa do eletrodo de medição, seja para reduzir a influência das espécies interferentes e/ou favorecer o efeito eletrocatalítico (amplificação do sinal de medição do analito de interesse). Em estudos prévios (BIAGIOTTI et al., 2007; ALMEIDA; FONTES, 2007; ALMEIDA, 2009, p. 115), a modificação das superfícies de eletrodos de ouro com uma membrana polimérica 1,2- ou 1,3-DAB possibilitou um incremento de seletividade na medição do nitrato e um decréscimo substancial no sinal de resposta das espécies interferentes (ALMEIDA; FONTES, 2007; BADEA et al., 2001; SEYAMA, 1988; CURULLI et al., 1997; ADHIKARI; MAJUMDAR, 2004; LASCHI; MASCINI, 2006). Em meio fisiológico, há inúmeras espécies interferentes. Nesta tese, o ácido úrico (AU), o ácido ascórbico (AA) e o paracetamol (PA) foram avaliados diante das concentrações máximas encontradas no sangue de humanos; 0,52 $\mu\text{mol cm}^{-3}$, 0,11 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ e 0,15 $\mu\text{mol cm}^{-3}$, respectivamente, que estão bem acima da concentração do nitrato (LASCHI; MASCINI, 2006).

Acrescentando, Guimard, Gomez e Schmidt (2007) citam o poliacetileno, polipirrol, politiofeno, poli(3,4-etileno-dioxitiofeno) e polianilina como outros polímeros comumente aplicados em engenharia bioquímica. Os autores descreveram algumas vantagens na obtenção de polímeros pela técnica de eletropolimerização dos monômeros, a saber: i) síntese de filme finos, ii) entrelaçamento de moléculas de polimerização química, iii) fácil configuração experimental para deposição, iv) possível dopagem simultânea à obtenção do polímero e v) boa aderência¹⁴. Como desvantagens, dificuldade para remover o filme da superfície do eletrodo e modificação covalente no interior do filme dificultada.

Outros polímeros de alta biocompatibilidade estão descritos na literatura. O PCL - poli(caprolactona), PDLLA - poli(DL-ácido láctico) ou poli(DL-lactato), PDS - poli(p-dioxanona), PET - poli(tereftalato de etileno), PGA - poli(ácido glicólico), PLA - poli(ácido láctico) ou poli(lactato), PLLA - poli(L-ácido láctico) ou poli(L-lactato),

¹⁴ Quando se tem densidade de corrente ou potencial de eletrodeposição adequado, que evite a influência da evolução de gás hidrogênio ou da redução de gás oxigênio.

PMMA - poli(metil metacrilato), PTFE - poli(tetrafluoretileno) e PU-PCL - poli(uretano-caprolactona) foram mencionados nos trabalhos de Jahno (2009).

Os polímeros condutores têm a capacidade de se ligar aos íons metálicos, fixando-se na estrutura química do polímero por complexação de acordo com as propriedades químicas e físicas do polímero e do metal (MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001). Diversos estudos foram reportados na literatura usando diferentes metais de transição 3d (Mn, Mo, Fe, Co, Ni, Zn, Bi, Pb, Ag e Cu) para medir nitrato por meio de reação eletroquímica de redução ou oxidação (BIAGIOTTI et al., 2007; ROCHA et al., 2001; DAVIS et al., 2000; OJANI; RAOOF; ZAREI, 2006; KO et al., 2009; BADEA et al., 2001). Quando esses metais são absorvidos na estrutura de polímeros condutores, ocorre incremento da sensibilidade e/ou seletividade na medição do nitrato (BADEA et al., 2001; BIAGIOTTI et al., 2007). Em outras palavras, observa-se geralmente um efeito eletrocatalítico na resposta de corrente (CHEN, Shen-Ming et al., 2006). Empregando polímeros condutores, sejam funcionalizados com metais 3d ou não, os potenciais de medição se alteram de acordo com a concentração do nitrato. No APÊNDICE A, o leitor tem a oportunidade de verificar diversos trabalhos que usaram polímeros condutores e metais 3d para medição do nitrato que, geralmente, empregaram potenciais extremamente positivos, soluções ácidas e faixas de concentrações na ordem micromolar.

Em sistemas eletroquímicos, há muitas vantagens (apresentadas no parágrafo anterior) quando se modifica eletrodos com polímeros condutores. Por outro lado, considerando filmes finos poliméricos, o sistema eletroquímico tornar-se mais complexo - pois além do transporte de elétrons - os efeitos de absorção de íons (positivos e negativos) na estrutura polimérica estão somados (transporte de cargas). Nesse sentido, a teoria para o transporte de elétrons foi fundamentada a partir de reações superficiais envolvendo as atividades iônicas e, para o transporte de cargas, existe uma teoria relacionada principalmente a mobilidade iônica no interior do filme polimérico (HALLINAN Jr.; BALSARA, 2013). Nos dois casos, considera-se um gradiente de concentração e de potencial eletroquímico (HALLINAN Jr.; BALSARA, 2013), e o coeficiente de difusão dos íons positivos e negativos (KULESZA; COX, 1998; HALLINAN Jr.; BALSARA, 2013). Especialmente em eletroquímica do estado sólido (por técnicas voltamétricas), a taxa global de

transporte de cargas obedece à lei de difusão de Fick (KULESZA; COX, 1998), sendo que o coeficiente de difusão efetivo se relaciona com a troca de elétrons sítio a sítio no material polimérico, com a concentração de espécies oxidadas e reduzidas, com o fator geométrico tridimensional e com a distância entre o sítio redox e o tempo de transferência de elétrons até esse sítio (KULESZA; COX, 1998).

Recentemente, diversos eletrodos baseados em polímeros condutores foram reportados para a medição do nitrato. Os trabalhos publicados abordaram eletrodos recobertos com membrana de náilon (HASNAT et al., 2012) ou com polímeros híbridos (JANÁKY; VISY, 2013), *indium tin oxide* (ITO) modificado com nanofibras híbridas de $\alpha\text{-K}_6[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]$ (CAO, Fei et al., 2012), filme *silsesquioxane* com nanopartículas de ouro imobilizadas sobre superfícies de Al-SiO_2 (MENEZES et al., 2012) e polímeros sobre nanotubos de carbono ou carbono vítreo (DENG, Chunyan et al., 2012; DREYSE et al., 2011; KAZIMIERSKA; SMYTH; KILLARD, 2009; VALENTINI et al., 2012; UNNIKRISSHAN et al., 2013). A maioria desses trabalhos apresenta faixa de medição do nitrato entre milimolares e algumas centenas de micromolares.

Também há trabalhos que utilizam eletrodos baseados em complexos metal-polímero (WANG, Hui et al., 2012; SABER-TEHRANI et al., 2012; ZHANG, Ya et al., 2013; HASNAT et al., 2010; LIN, Ai-ling et al., 2011). Complexos metal-PEDOT (WANG, Qi; YUN, 2012; LIN, Chia-Yu et al., 2010; ZHANG, Ou et al., 2013) permitiram medir nitrato em baixas concentrações (dezenas de micromolares) e reduzir o potencial de medição $+0,450 \text{ V}_{\text{SCE}}$ (cobalto) (WANG, Qi; YUN, 2012) e $+0,380 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}}$ (ferro) (LIN, Chia-Yu et al., 2010). Na demanda pelo incremento de sensibilidade na medição do nitrato, destacam-se os trabalhos com microeletrodos de ouro nanoporoso modificados com zinco (JIANG, Junhua; WANG, Xinying, 2012a), arranjo de microeletrodos de carbono serigrafados (TAN; METTERS; BANKS, 2013) e nanosensor construído sobre polianilina a partir camadas de poliestireno funcionalizadas com amina e sulfato (MUCHINDU et al., 2010). Eletrodos modificados com cobre(II) são sensíveis ao nitrato (ANNAMALAI; PALANI; PILLAI, 2012) em soluções fisiológicas. Complexos de cobre(II) baseado em eletrodos modificados com *1,2-bis(2-benzimidazolyl)benzene* (DENG, Yue-Yi; LIU; JIN, 2012) e 1,2-DAB (KUMAR; LO; CHEN, Shen-Ming, 2009) permitiram incrementar

sensibilidade a nitrato em meio fisiológico a um pH controlado (JIANG, Junhua; WANG, Xinying, 2012b; TAN; METTERS; BANKS, 2013; MUCHINDU et al., 2010).

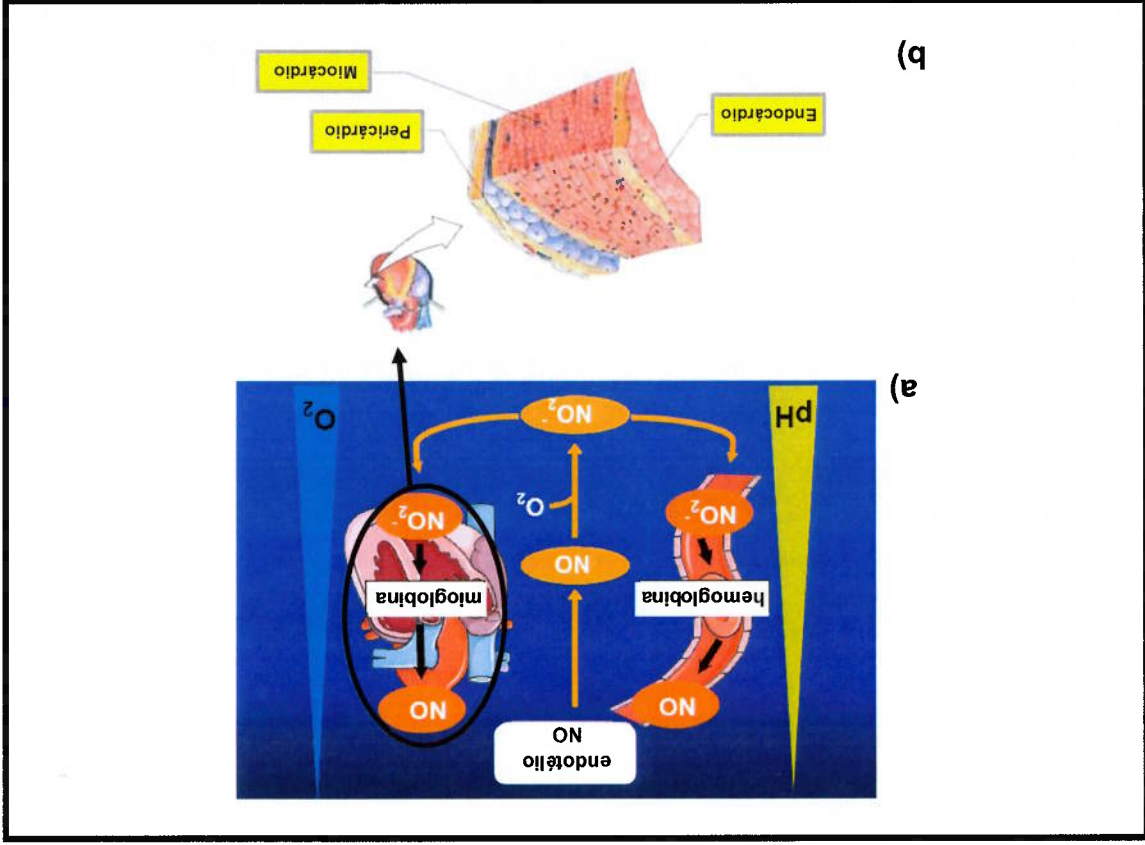
No campo bioquímico, há um número reduzido de trabalhos científicos envolvendo nitrato quando comparado às aplicações ambientais e alimentícias. Provavelmente, devido à elevada quantidade de espécies eletroativas que atuam como interferentes e à concentração reduzida de nitrato no sangue humano. Aumentando, a medição de nitrato em meio fisiológico requer soluções de análise próximas ao neutro (LI, Xiao-Rong et al., 2012; MENG et al., 2011). A maior parte da literatura reporta trabalhos usando soluções ácidas, porém Deng, Chunyan et al. (2012) constataram uma relação inversa do sinal de nitrato com o pH (o sinal de corrente decresce para valores de pH mais próximos a 1). O mesmo ocorre para pHs acima de 7 (ROCHA et al., 2001). Portanto, se os procedimentos reportados fossem empregados diretamente na medição de nitrato em meio fisiológico de seres humanos, seria necessário um tratamento da amostra para ajustar o pH ou isolar os interferentes, visando incrementar seletividade e sensibilidade à medição de nitrato.

Por fim, nesta tese defendemos a medição de concentrações de alguns nanomolares/cm³ de nitrato a um potencial entre (+0,050 e +0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, por meio de microeletrodos de ouro modificados com polímeros condutores funcionalizados ou não com metal de transição 3d - cobre(II) - e de uma solução fisiológica que imite o pH 7,4 do sangue de humanos e que contenha espécies interferentes (cloratos, íons de hidrogênio e hidroxilas, gás oxigênio, ácido úrico, ácido ascórbico e paracetamol). Desta forma, estabeleceu-se um protocolo que imita as condições bioquímicas do sangue humano e visa à análise clínica do nitrato, visando futuro emprego no monitoramento de doenças que envolvam disfunções cardíacas.

3 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O crescente interesse pela análise clínica do nitrato, correlacionada às disfunções cardíacas, foi um "norte" motivador e recorrente durante a elaboração do projeto e dos trabalhos deste doutorado. A partir dos anos 1990, inúmeros estudos relacionaram concentrações do ion nitrato a diferentes disfunções do organismo humano. As disfunções cardíacas ganharam especial destaque, principalmente o estudo relacionado ao infarto do miocárdio, que podem estar vinculados ao consumo de oxigênio pela mitocôndria (HENDGEN-COTTA; KELM; RASSAF, 2010), à vasodilatação e às variações do pH sanguíneo (MODIN et al., 2001). A Figura 6a (RASSAF et al., sem data) apresenta um esquema que vislumbra relacionar o óxido nítrico (NO) advindo do endotélio, das hemoglobinas e das mioglobinas com as variações do pH sanguíneo e do consumo de oxigênio total no corpo de seres humanos.

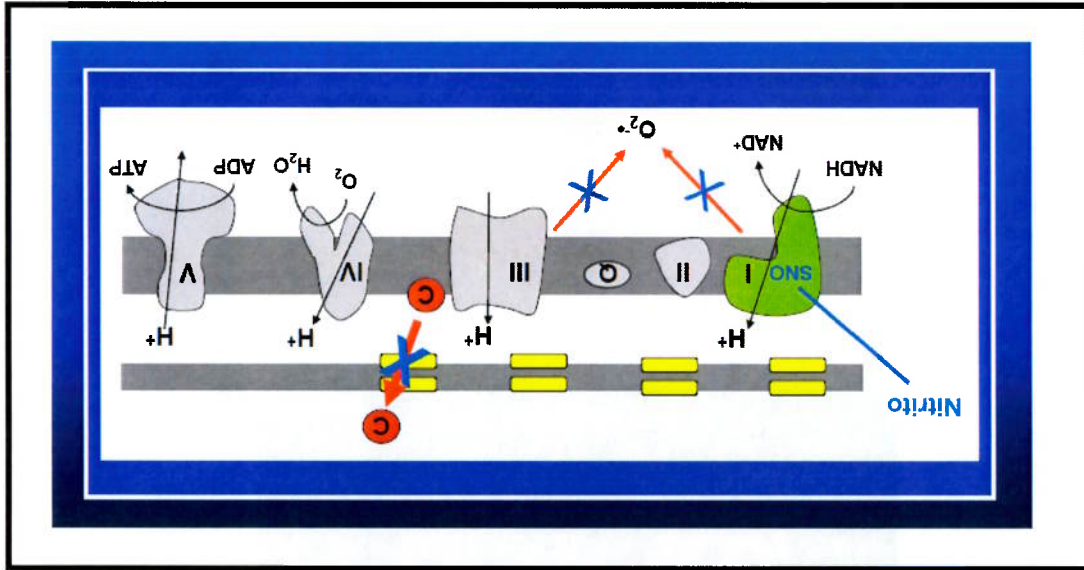
Figura 6 – Em (a), a representação da variação do pH sanguíneo e da concentração de gás oxigênio pela ação do óxido nítrico convertido a partir do nitrato, seja pelas células endoteliais, hemoglobinas ou mioglobinas. Em (b), o detalhe da parede muscular do coração, endocárdio (tecido interno), miocárdio (tecido intermediário) e pericárdio (tecido externo).



Quanto ao infarto do miocárdio (tecido intermediário entre o endocárdio e o pericárdio, veja a Figura 6b), a Figura 6a ilustra um esquema de conversão do nitrato a óxido nítrico pela ação da hemoglobina (Hb) e da mioglobina (Mb). A hemoglobina tem grupos protéicos contendo nitrato redutase do tipo cobre e *heme cd1* que são responsáveis pela redução do nitrato a óxido nítrico e do tipo *sitoheme* e o citocromo c que reduzem o nitrato a amônia (SILVA, Serge et al., 2004). No caso específico do coração, as mioglobinas realizam processo similar ao da hemoglobina (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Também, pela ação das células endoteliais, a enzima NO sintetase (eNOS) gera óxido nítrico no endotélio localizado nas paredes internas dos vasos sanguíneos (RASSAF; FEELISCH; KELM, 2004) e do coração, o endocárdio (BRUTSAERT et al., 1998). O óxido nítrico liberado pelas células endoteliais cardíacas e pelas mioglobinas se difunde até o miocárdio iniciando um processo de vasodilatação pela ação do NO (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Logo, temos a primeira justificativa para o trabalho deste doutorado: medir as concentrações de nitrato e correlacioná-las às disfunções cardíacas, por exemplo: o infarto do miocárdio.

A segunda justificativa baseia-se na ação do nitrato durante a geração de energia bioquímica pelas mitocôndrias. A Figura 7 mostra que o nitrato convertido ao NO age no complexo I, interrompendo a geração de oxigênio e a ação do citocromo c.

Figura 7 – Esquema ilustrativo do processo de geração de energia bioquímica pela fosforilação oxidativa na mitocôndria e a ação de descontinuidade quando na presença de nitrato.

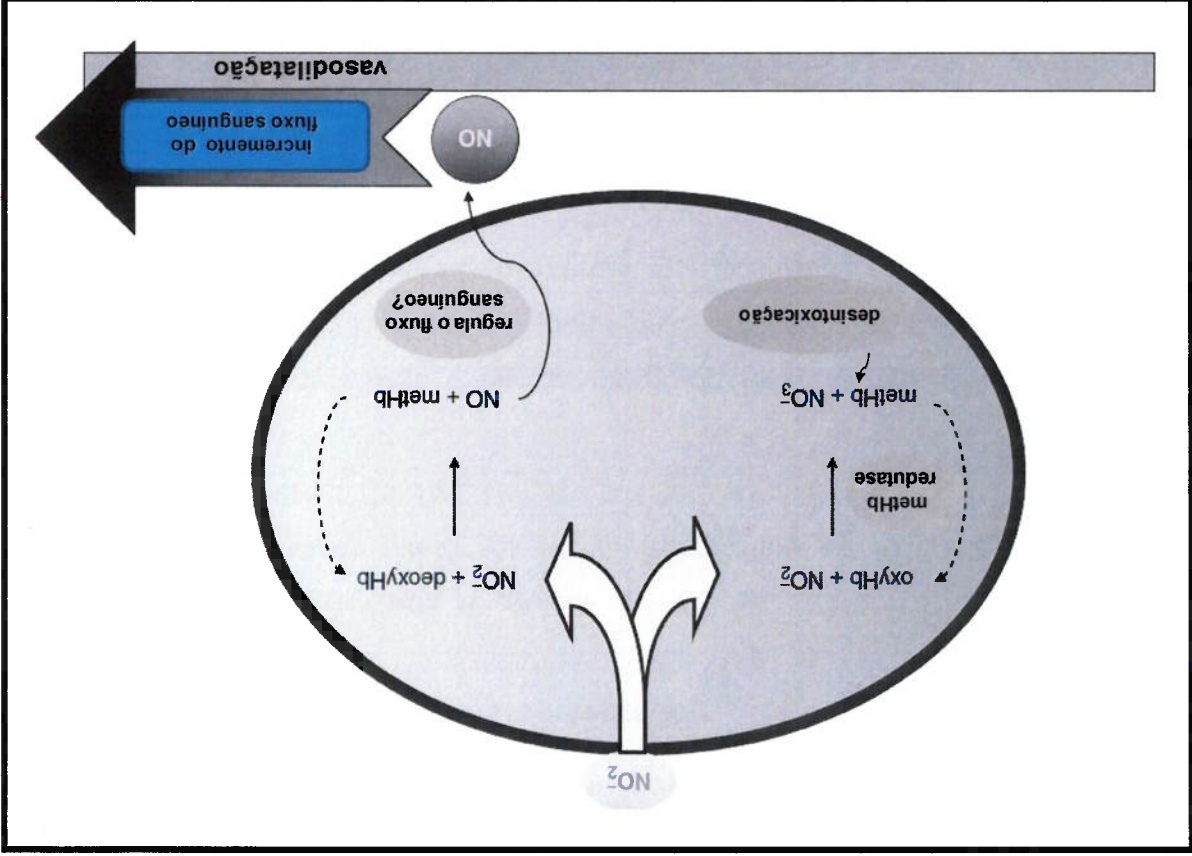


Fonte: adaptado de Rassaf et al. (sem data).

Como consequência da ação do nitrato nas mitocôndrias, há diminuição da taxa de respiração celular e, consequentemente, intoxicação celular com o aumento das concentrações de nitrato (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

A terceira e última justificativa, o aumento da concentração de nitrato no organismo humano pode intensificar a reação do nitrato com a hemoglobina (Hb), formando quantidade excessiva de metahemoglobina (metHb ou $Hb(Fe^{3+})$ e $Hb(Fe^{3+})O$) – como já mencionado na revisão bibliográfica (item 2) e, agora, também pode ser visualizado por meio da ilustração na Figura 8. Diante disso, requer-se o controle da concentração de nitrato no organismo humano, seja por alimentação, medicação ou metabolismo.

Figura 8 – Esquema do mecanismo de reação do nitrato com a hemoglobina.



Fonte: adaptado de Fago e Jensen (2009).

A Figura 8 demonstra os possíveis mecanismos entre o nitrato, NO, metHb, oxyHb ou $Hb(Fe^{2+})O_2$ (hemoglobina com oxigênio) e $deoxyHb$ ou $Hb(Fe^{2+})$ (hemoglobina sem oxigênio) que causam blindagem no carregamento de O_2 pela Hb.

4 DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO

A seção 4 tem por objetivo apresentar, resumidamente, ao leitor as informações que foram relevantes para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado. Nesta seção, iremos discutir o desenvolvimento metodológico prévio ao trabalho experimental. Serão fundamentados e sistematizados os procedimentos experimentais de fabricação e caracterização dos eletrodos e sensores, e também será apresentada a configuração do sistema de medição eletroquímica (SME).

No APÊNDICE B estão descritos, em detalhe, os equipamentos, as soluções químicas e os sensores integrados e eletrodos de prova empregados no decorrer do presente trabalho. O APÊNDICE B será referenciado ao longo deste capítulo, permitindo que a compreensão do desenvolvimento metodológico deste trabalho de doutorado seja expandida.

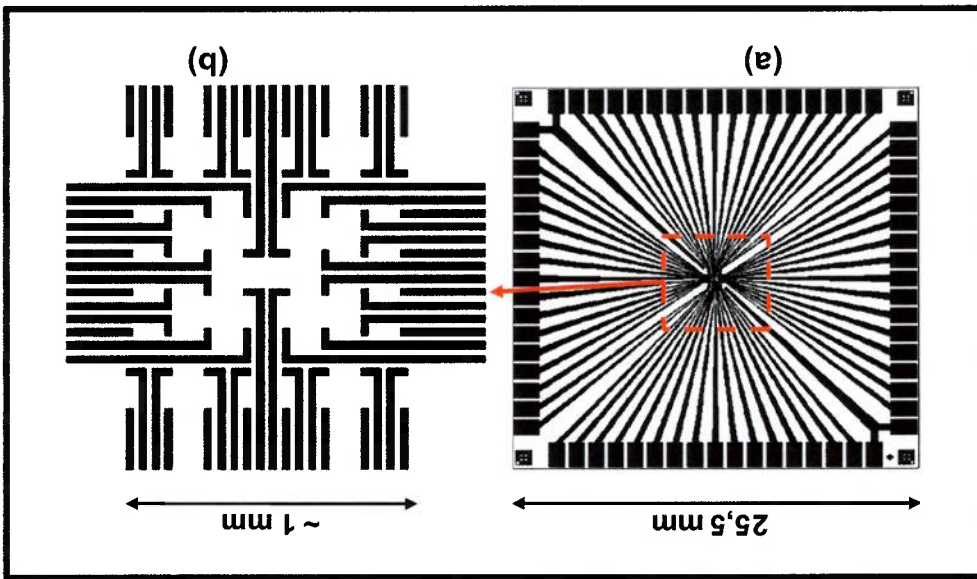
4.1 Projeto e Fabricação do Sensor Integrado

Neste item será apresentado o projeto, as etapas de fabricação dos sensores integrados em substrato planar de silício (mostrados no APÊNDICE B.2.3) e a configuração geométrica do SME (detalhes no próximo item 4.1.1).

Os eletrodos que constituem o sensor integrado foram definidos sobre substrato planar de silício por técnicas convencionais de microeletrônica e de microfabricação. As máscaras de fotografação utilizadas na construção dos sensores foram projetadas por Fontes (2004), as quais foram confeccionadas pelo Centro de Pesquisas Renato Archer (CENPRA).

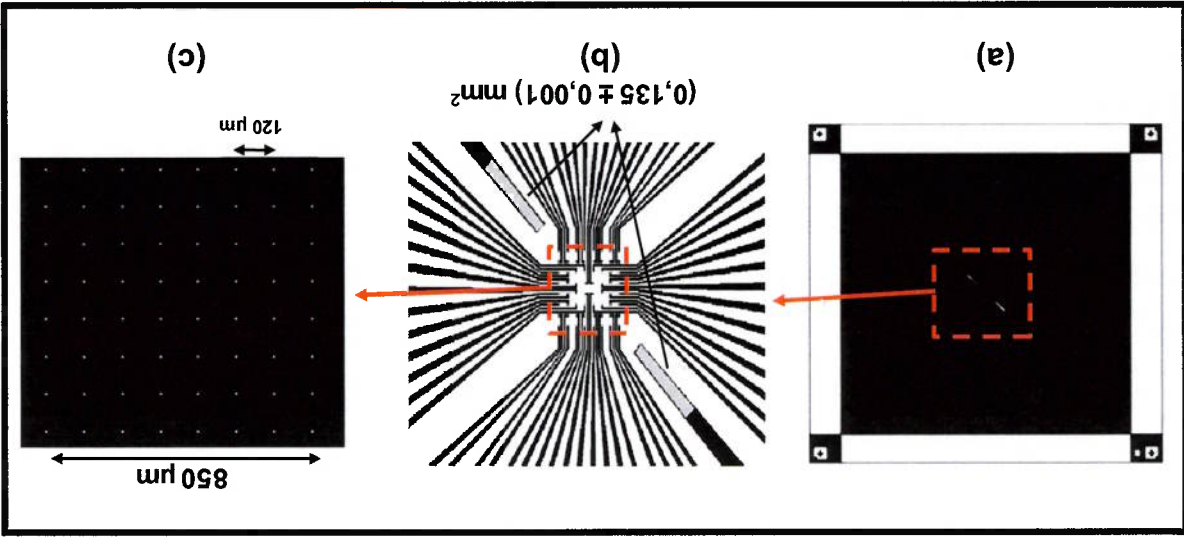
O sensor integrado em substrato planar de silício foi confeccionado com dimensões finais de 25,5 mm de largura e 25,5 mm de comprimento (Figura 9a). Em sua estrutura, 64 microeletrodos de ouro [(2 a 7,5) μm de raio] estão concentrados em uma região de área aproximada a 1 mm^2 (Figura 9b). Eles serão modificados com polímeros condutores para medição de nitrato. Conjuntamente, dois eletrodos de referência integrados foram litografados usando o polímero SU-8 e a máscara apresentada na Figura 10 (define-se a área dos eletrodos).

Figura 9 – Máscara fotolitográfica I: a) desenho da visão geral do sensor e b) detalhe da região central e das trilhas para definição dos 64 microeletrodos.



Fonte: adaptado de Fontes, Mazetto e Cestari (2004).

Figura 10 – Máscara fotolitográfica II: a) desenho geral dos dois eletrodos de referência; e os detalhes: b) dos eletrodos de referência e c) da região central mostrando os 64 microeletrodos de medição.



Fonte: adaptado de Fontes, Mazetto e Cestari (2004).

A máscara fotolitográfica II (Figura 10a) foi utilizada para litografar, além dos dois eletrodos de referência com dimensões miniaturizadas de $(0,135 \pm 0,001) \text{ mm}^2$ (Figura 10b), os 64 microeletrodos que não estão visíveis na Figura 10a (pois são de dimensões micrométricas; eles estão mostrados no APÊNDICE B.2.3). No detalhe da Figura 10c, observa-se, na região central do sensor integrado, a configuração e geometria dos 64 microeletrodos, estes espaçados entre si de 120 μm .

4.1.1 Projeto

O objetivo central do projeto foi estabelecer um procedimento para obtenção dos eletrodos e dos sensores integrados sobre um substrato planar de silício.

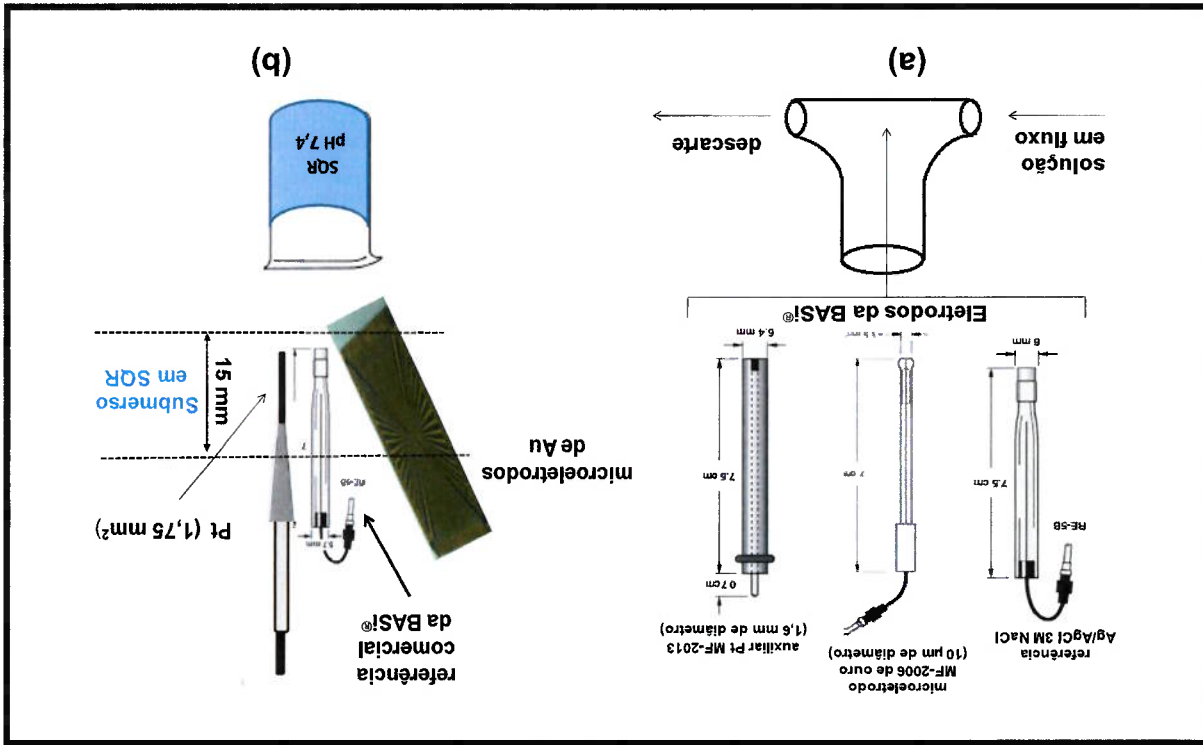
Alguns requisitos foram considerados para o desenvolvimento do projeto e da construção dos sensores integrados do SME, a saber:

- i. construção que permite limpeza do sensor com facilidade;
- ii. os materiais de eletrodos devem ser cuidadosamente limpos, para eliminar impurezas;
- iii. o sistema deve ser versátil de forma a permitir a troca de sensores com facilidade (ou sistema descartável); e
- iv. sistema integrado (microeletrodos de medição e eletrodo de referência).

O projeto, para a medição do nitrato com o sensor integrado, foi baseado em um conjunto de três eletrodos, que permite minimizar os efeitos de degradação sobre os eletrodos de medição. Esse sistema de três eletrodos assegura estabilidade a partir de um potencial de referência fixo e conhecido, permitindo a otimização da drenagem ou do fornecimento de corrente pelo eletrodo auxiliar, necessária à reação química que ocorre no eletrodo de medição (ALMEIDA, 2009, p. 53). Em sensores sobre substratos planares, a área do eletrodo auxiliar costuma ser igual ou superior à do eletrodo de medição (COFFEY et al., 2007, grifo nosso). Neste projeto, o eletrodo auxiliar (também chamado de terceiro eletrodo) de platina, com área de $(1,75 \pm 0,01) \text{ mm}^2$, foi introduzido externamente (na parte superior de célula eletroquímica) e um eletrodo de referência comercial BASI[®] foi previsto para comparação dos resultados.

Completando o SME, o sensor integrado e os eletrodos (referência da BASI[®] e eletrodo auxiliar de platina) foram introduzidos (até a altura de 15 mm em solução, cobrindo a região de microeletrodos) em um bquer contendo uma solução química de referência (SQR) a $\text{pH } 7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ \text{C}$ para medição voltamétrica do nitrato. A SQR encontra-se descrita no item B.3.3 do APÊNDICE B e no item 4.4. A seguir, o SME com três eletrodos está apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Em (a), o esquema dos eletrodos da BASI® em uma célula eletroquímica em formato de T para testes de condicionamento eletroquímico usando solução em fluxo (descrita no APÊNDICE B e resultados apresentados em 5.1); e em (b), a configuração do sensor introduzidos em um béquer contendo SQR a pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C. da BASI® e do eletrodo auxiliar de platina com área de (1,75 ± 0,01) mm²; todos foram introduzidos em um béquer contendo SQR a pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C.



Fonte: Almeida (2014).

O esquema apresentado (Figura 11b) para compor o SME foi baseado na análise eletroquímica com três eletrodos composto de:

i. microeletrodos de medição de ouro, depositado por técnica *e-beam* ou *sputtering*, com área geométrica entre (12,56 ± 0,25) µm² e (176,62 ± 0,25) µm², local onde ocorre as reações eletroquímicas;

ii. eletrodo de referência de ouro - depositado por técnica *e-beam* ou *sputtering*; com área geométrica de (0,135 ± 0,001) mm²

modificada por absorção de cloretos para formar a junção redox Au/Au_xCl_y, posteriormente, eletropolimerização de polipirrol com cloretos para obter o eletrólito em estado sólido PPI-Cl e, por fim, eletrodeposição de poliuretano para obter uma membrana de proteção/contenção que permita contato (transporte) iônico controlado; e

iii. eletrodo auxiliar fio de platina, com área de (1,75 ± 0,01) mm².

4.1.2 Fotografiação e Definição dos Sensores Integrados com Microeletrodos de Medição e Eletrodo de Referência sobre um Substrato Planar de Silício

Neste item mostramos os procedimentos de fabricação dos sensores integrados com microeletrodos de ouro e eletrodo de referência miniaturizado sobre um substrato planar de silício. As etapas de fabricação foram:

- i. limpeza padrão RCA¹⁵ de 10 lâminas de silício;
- ii. oxidação térmica seca das 10 lâminas de silício;
- iii. deposição de 10 µm de fotorresistive termorrígido positivo SU-8;
- iv. fotografiação¹⁶ do SU-8 para exposição da estrutura do sensor;
- v. deposição de 20 nm de titânio e 100 nm de ouro por técnica *e-beam* ou *sputtering*;
- vi. remoção¹⁷ do polímero SU-8 para definição dos contatos e trilhas de conexão do sensor pelo método *lift-off*;
- vii. deposição de 4 µm de fotorresistive termorrígido positivo SU-8, a fotografiação expõe os contatos e define os microeletrodos de medição e eletrodos de referência miniaturizado;
- viii. corte dos sensores com 25,5 mm x 25,5 mm;
- ix. limpeza química com IPA a 60 °C durante 30 min;
- x. limpeza química em 3 mmol cm⁻³ de H₂SO₄ por 100 s;
- xi. enxágue com IPA a (24 ± 2) °C;
- xii. sensor em substrato planar de silício foi colado sobre uma placa de acrílico ou alumina como suporte mecânico; e
- xiii. com a pasta polimérica de ouro¹⁸, foi colocado um fio nos *pads* de conexão permitindo o contato elétrico entre os microeletrodos e o analisador eletroquímico (Autolab apresentado no ANEXO B).

¹⁵ Etapas e parâmetros da limpeza padrão RCA:

(i) H₂SO₄ + H₂O₂ (4:1) a 80 °C durante 10 min;

(ii) HF + H₂O (1:10) a frio durante 30 s;

(iii) NH₄OH + H₂O₂ + H₂O (1:1:5) a 70 °C durante 10 min; e

(iv) HCl + H₂O₂ + H₂O (1:1:5) a 70 °C durante 10 min.

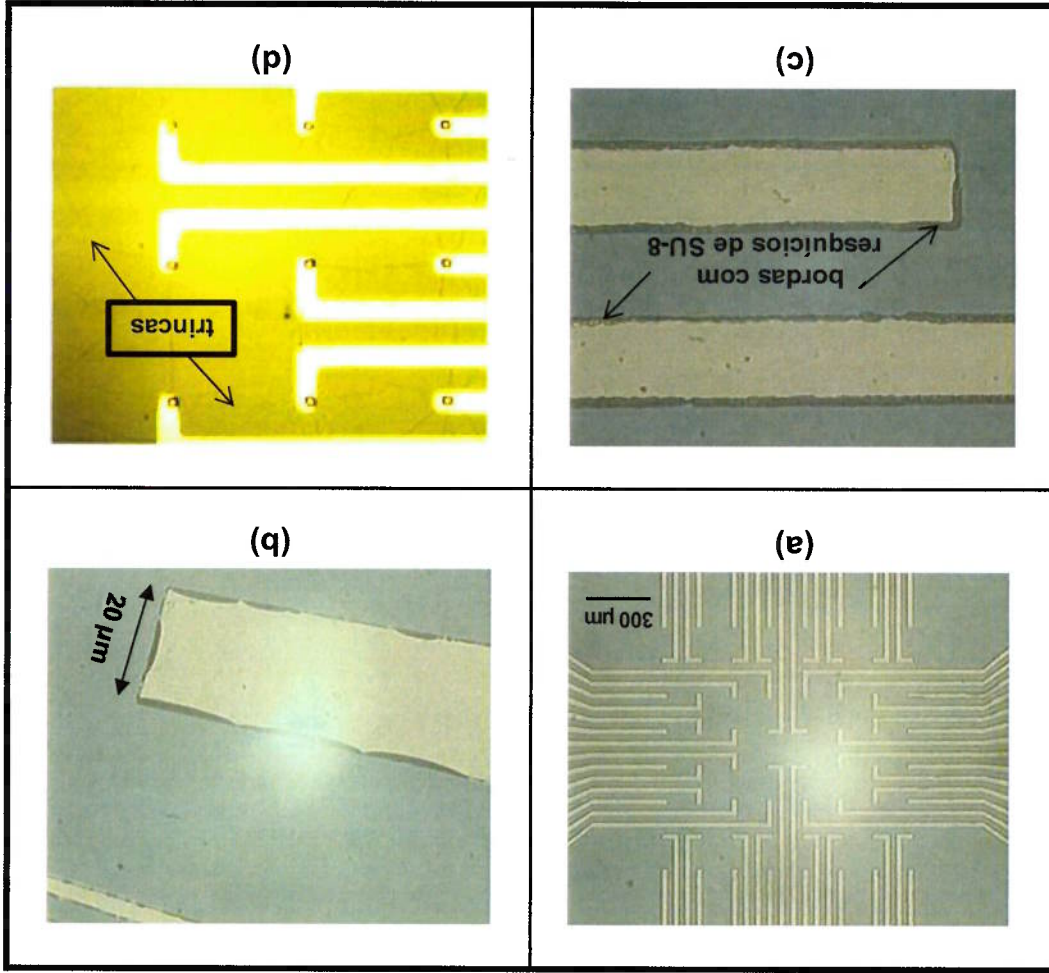
Entre as etapas houve enxágue em água DI e ao final houve secagem em jato de gás nitrogênio ultrapur.

¹⁶ Revelação com SU-8 *developer* da MicroChem seguido de limpeza em IPA.

¹⁷ Removedor "Remover PG" da MicroChem.

¹⁸ Pasta polimérica de ouro (C2041206P2) da Gwent Electronic Materials Ltd..

Figura 12 – Imagens de algumas etapas de fabricação do sensor integrado em substrato planar de silício. a) litografia do SU-8 e a definição das regiões de trilhas sobre as quais foram definidos os microeletrodos. As demais imagens ilustram alguns problemas recorrentes durante a fabricação dos sensores: b) 10 min em acetona a 80 °C, onde o polímero se despegou da lâmina de silício oxidada; c) bordas com resquícios de revelação do SU-8 (tempo insuficiente); e d) SU-8 com trincas devido ao estresse térmico (processo realizado a 95 °C e resfriado rapidamente a 25 °C).



Fonte: Almeida (2014).

Diante dos problemas na fotografação do SU-8 apresentados na Figura 12 (despexamento do SU-8 quando em acetona aquecida, bordas com resquícios do polímero e trincas no SU-8 devido ao estresse térmico), duas observações: não usar o IPA a temperaturas superiores a 60 °C, pois o IPA se oxida a 2-propanona (WANG, Li et al., 2003) podendo remover o SU-8. Ao término dos processos à quente, as amostras devem ser resfriadas gradativamente para evitar o estresse térmico.

A seguir, diante da melhor condição experimental (microeletrodos fotografados com

sucesso e mínima ocorrência de resíduos), descrevemos as etapas e os parâmetros usados na deposição, fotografação/revelação e remoção do SU-8:

- i. deposição de 10 µm de SU-8:
 - velocidade = 1000 rpm;
 - rampa = 500 rpm s⁻¹; e
 - tempo = 30 s;
- ii. deposição de 4 µm de SU-8:
 - velocidade = 3000 rpm;
 - rampa = 500 rpm s⁻¹; e
 - tempo = 30 s;
- iii. fotografação:
 - pré-cura: (95 ± 0,5) °C durante 3 min;
 - exposição UV: 27 s; e
 - cura: (95 ± 0,5) °C durante 3 min;
- iv. revelação: 40 s em SU-8 *developer*;
- v. limpeza química em IPA, a ocorrência de regiões brancas (resquício de SU-8) indica que o tempo de revelação foi insuficiente; e
- vi. remoção: *remover PG da MicroChem* a 80 °C durante 2 horas.

Ao final, o sensor integrado em silício planar foi cortado com serra diamantada de acordo com os parâmetros:

- i. espessura do disco de corte = 40 µm;
- ii. rotação do disco = 40.000 rpm;
- iii. avanço do corte = (1 a 2) mm min⁻¹; e
- iv. vazão da água (fluido de limpeza e lubrificação de corte) = média.

Após diversos testes, a combinação dos parâmetros apresentados permitiu obter sensores cortados com minimização das lascas no corte e dos despegamentos do filme de ouro depositado, além dos sensores saírem com menos resíduos de corte.

4.2 Procedimento de Limpeza Química e de Condicionamento Eletroquímico dos Eletrodos

A seguir serão descritos os procedimentos de limpeza química e de condicionamento eletroquímico utilizados ao longo deste trabalho de doutorado.

Antes de utilizar os sensores integrados, os microeletrodos fabricados para a medição do nitrato devem ser testados, verificando o contato elétrico, as condições da superfície do metal e a isolação dielétrica. Desse modo, foi possível garantir as condições adequadas de uso e prevenir problemas ou quaisquer equívocos durante os procedimentos, que se inicia por uma limpeza química tradicional.

4.2.1 Limpeza Química Tradicional

Por meio da limpeza química tradicional foi possível eliminar ou minimizar as contaminações metálicas ou orgânicas e os possíveis resíduos advindos dos processos fotolitográficos.

A limpeza química tradicional utilizada nos eletrodos e nos sensores integrados consistiu das seguintes etapas:

- i. enxágue em água DI;
- ii. imersão em IPA a temperatura ambiente (24 ± 2 °C por 3 min;
- iii. enxágue em água DI;
- iv. imersão em ácido sulfúrico (3 mmol cm^{-3}): temperatura ambiente (24 ± 2 °C) por 100 s (limpeza de orgânicos aderidos na superfície do metal, óxidos superficiais e remoção de uma monocamada de óxido de ouro);
- v. enxágue em IPA a temperatura ambiente (24 ± 2 °C (limpa resíduos de orgânicos remanescentes); e
- vi. enxágue em água DI.

As soluções químicas foram preparadas conforme os procedimentos relatados no APÊNDICE B.3 e B.3.1, usando os reagentes descritos no APÊNDICE B.4.

4.2.2 Condicionamento Eletroquímico da Superfície de Eletrodos

A seguir é descrito um procedimento de condicionamento eletroquímico para a estabilização das superfícies dos macro e microeletrodos de ouro.

Após a fabricação, o condicionamento eletroquímico da superfície dos eletrodos se faz necessário para garantir a estabilidade da área efetiva e o incremento de sensibilidade (maior sinal de corrente medida para uma mesma faixa de concentração e de potencial aplicado). Portanto, será apresentado um procedimento de condicionamento eletroquímico que permita uma limpeza eficiente e a estabilidade da superfície do eletrodo de ouro (ALMEIDA; SANTOS FILHO, 2013).

O condicionamento eletroquímico, em condições adequadas de concentração e de espécies químicas presentes na solução, permite remover impurezas presentes na superfície do material de eletrodos. Em outras palavras, é possível minimizar a ocorrência de partículas aderidas que atuam como elementos passivantes, obstruindo área ativa do eletrodo; neste caso, poderia implicar na diminuição do valor medido de corrente. As partículas aderidas em grande parte são remanescentes do processo de fotografação do polímero termorrígido SU-8 (a maioria eliminada pela limpeza química). Por meio do condicionamento eletroquímico promove-se um ganho de área efetiva traduzido no incremento de corrente medida (após a estabilização superficial do ouro). O processo de condicionamento eletroquímico também possibilita aumentar a rugosidade e, consequentemente, proporcionar mais sensibilidade na medição ou ser promotor de aderência em processos de deposição eletroquímica, por exemplo: depositar polímeros condutores sobre o ouro.

A. Estudo das Soluções Químicas

Garantir um procedimento eficaz de condicionamento eletroquímico na estabilização das superfícies dos eletrodos de ouro inicia-se com a escolha das espécies químicas presentes em solução e com a definição de suas concentrações. De acordo com os compostos presentes na solução, esta pode atuar sobre a superfície do eletrodo evitando, controlando ou intensificando efeitos de oxidação do material ou agir sobre

suas características físico-químicas por meio, por exemplo, de reações de redução. Soluções químicas preparadas com alta concentração de espécies eletroativas, a princípio pode contribuir para a aceleração da limpeza eletroquímica dos eletrodos. Porém, ao longo dos ciclos voltamétricos, torna-se um fator limitante devido à adsorção de espécies químicas sobre a superfície do material, podendo ocorrer um decaimento da corrente. Nos macroeletrodos, este efeito é compensado pelo aumento significativo de rugosidade, mas em microeletrodos pode ocorrer expressiva diminuição de corrente (ALMEIDA; SANTOS FILHO, 2013), decorrente da redução das áreas efetivas.

Algumas soluções ácidas, alcalinas e salinas são usadas em condicionamentos eletroquímicos para a limpeza e estabilização da superfície de eletrodos compostos de nanotubo de carbono (NTC), de ouro e de platina, e foram estudadas sob seus efeitos físico-químicos. As soluções ácidas estudadas foram (1, 0,10 e 0,05) mmol cm⁻³ de ácido sulfúrico - H₂SO₄ - (WANG, Yi et al., 2008; SCHOENFISCH; ROSS; PEMBERTON, 2000), 1 mmol cm⁻³ de ácido nítrico - HNO₃ - (HERAS et al., 2009), 0,10 mmol cm⁻³ de ácido perclórico - HClO₄ - (ZHU et al., 2007), 0,05 mmol cm⁻³ de ácido clorídrico - HCl - (FISCHER et al., 2009) e 0,4 mmol cm⁻³ de ácido fluorídrico - HF - (HAMELIN, 1985). As alcalinas: 0,10 mmol cm⁻³ de hidróxido de sódio - NaOH - (SCHOENFISCH; ROSS; PEMBERTON, 2000), 0,05 mmol cm⁻³ de hidróxido de potássio - KOH - (FISCHER et al., 2009) e as soluções salinas de nitrato de potássio - KNO₃ - (OROZCO; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ-JORQUERA, 2010) e 0,10 mmol cm⁻³ de ferricianeto de potássio - K₃Fe(CN)₆] - em 0,10 mmol cm⁻³ de cloreto de sódio - NaCl - (OLIVEIRA; FONTES, 2001).

Outras espécies químicas podem ser adicionados a soluções ácidas (NOGUEIRA; SANTOS FILHO, 2002; FISCHER et al., 2009), por exemplo, o IPA e H₂O₂, apresentando vantagens e desvantagens. O IPA minimiza a tensão superficial entre as impurezas aderidas e o ouro, mas o IPA quando associado ao oxigênio dissolvido em solução pode oxidar-se a 2-propanona (WANG, Li et al., 2003), causando a oclusão de superfície (um nano filme formado sobre a superfície do eletrodo durante a limpeza, pode passivá-lo). O H₂O₂ é comumente usado durante as etapas de microfabricação em silício, pois permite um controle da concentração do gás

oxigênio dissolvido em solução. Consequentemente, quando se estreita a janela de potencial utilizada para o condicionamento eletroquímico, se evita a ocorrência de subprodutos advindos das reações eletroquímicas a potenciais superiores em módulo (ALMEIDA, SANTOS FILHO, 2013).

A oclusão de superfície também pode ocorrer pela ação dos produtos das reações eletroquímicas da água (ion hidrogênio, gás oxigênio e hidroxila) sobre a superfície dos eletrodos e pela intensificação ou controle conforme o potencial aplicado. Para potenciais abaixo de +0,200 V_{Ag/AgCl} 3M NaCl, predomina a redução do ion hidrogênio a gás hidrogênio (VANYEK, 2012-2013) e a potenciais positivos (VANYEK, 2012-2013), a oxidação da água forma gás oxigênio que pode atuar na diminuição de área efetiva dos eletrodos por absorção.

B. Potenciais Termodinâmicos e Complexação Iônica

Os estudos com respeito aos potenciais termodinâmicos foram baseados nos potenciais redox (*electrochemical series*) publicados no *CRC Handbook Chemical and Physics* (VANYEK, 2012-2013) e nas reações de ionização química. Desses potenciais redox, foi subtraído o valor do potencial do eletrodo de referência Ag/AgCl 3M NaCl da BASI® (RE-5B) com relação ao eletrodo de referência primário de hidrogênio igual a 0,196 V_H (BOTT, 1995). Em conjunto com o estudo de potenciais, a investigação de complexação iônica também será analisada para verificar a ação química de produtos e subprodutos sobre a superfície de microeletrodos de ouro.

A seguir, a Tabela 2 mostra procedimentos reportados na literatura para a ativação de superfície de microeletrodos de ouro.

Tabela 2 – Alguns procedimentos encontrados na literatura para o condicionamento eletroquímico de microeletrodos de ouro. ND: não descrito.

Soluções químicas	Potenciais (V)	Velocidade de varredura (número de ciclos) mV s ⁻¹	Referências
H ₂ SO ₄ (0,10)	-0,20 a +1,40 (vs. Ag/AgCl)	100 (10)	(WANG, Yi et al., 2008)
H ₂ SO ₄ (0,05)	-0,40 a +1,40 (vs. Ag/AgCl)	100 (~12)	(FISCHER et al., 2009)

Continua...

Continuação...

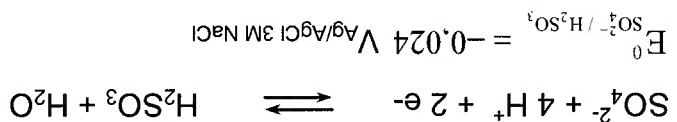
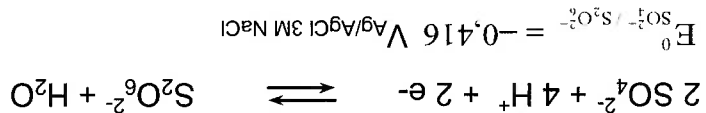
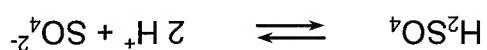
Solúções químicas	Potenciais (V)	Velocidade de varredura (numero de ciclos) mV s^{-1}	Referências
H_2SO_4 (1)	-0,20 a +1,20 (vs. Ag/AgCl)	100 (~10)	(SCHOENFISCH; ROSS; PEMBERTON, 2000)
HCl (0,05)	-0,50 a +1,50 (vs. Ag/AgCl)	50 (10)	(FISCHER et al., 2009)
HClO_4 (0,10)	-0,50 a +1,65 (vs. SCE)	20 (ND)	(ZHU et al., 2007)
HClO_4 (0,10)	-0,75 a +1,20 (vs. SCE)	20 ou 50 (ND)	(BROLO; JIANG, Z.; IRISH, 2003)
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0,10) em NaCl (0,10)	-0,50 a +0,95 (vs. Ag/AgCl)	500 (10)	(OLIVEIRA; FONTES, 2001)

Conclusão.

Fonte: Almeida (2014).

A partir do estudo desses procedimentos, analisamos diversas soluções químicas, diferentes faixas de potenciais e velocidades de varreduras, e números de ciclos distintos durante a polarização.

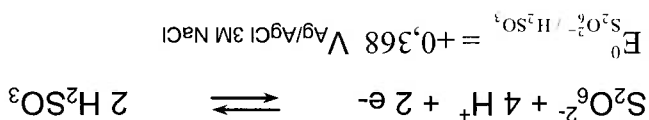
A partir de produtos químicos derivados do ácido sulfúrico (H_2SO_4) é possível descrever cerca de quinze reações redox (VAN'YEK, 2012-2013). Inicialmente ocorre a ionização do ácido sulfúrico (equação 3) que produz SO_4^{2-} e H^+ (considerando a ionização total do ácido), e pode formar $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ (equação 4) ou H_2SO_3 (equação 5); por fim, com a redução de $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ obtém-se H_2SO_3 (equação 6).



(5)

(4)

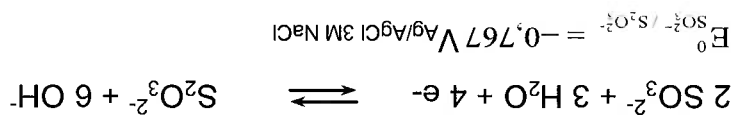
(3)



$$E^0_{\text{S}_2\text{O}_6^{2-}/\text{H}_2\text{SO}_3} = +0,368 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$$



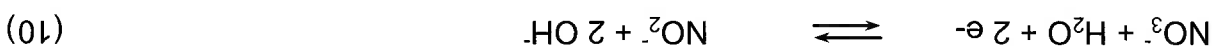
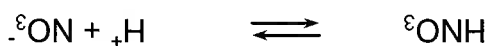
A redução do sulfito (aproximadamente a $-0,767 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$) gera hidroxilas (equação 8), que também podem atuar na complexação do ouro. Fischer et al. (2009); Wang, Yi et al. (2008); e Schoenfish, Ross e Pemberton (2000) reportaram resultados de condicionamento eletroquímico com poucos ciclos voltamétricos que pode ser explicado por meio da adsorção do sulfito sobre a superfície do ouro.



$$E^0_{\text{SO}_3^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} = -0,767 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$$

Quando a potenciais positivos, os sulfitos (produto da ionização do H_2SO_3 , equação 7) podem complexar com o ouro iônico e removê-lo. Cardoso e Santos Filho (2011) desenvolveram trabalhos que corroboram para a compreensão deste efeito.

Da ionização do ácido nítrico (HNO_3) (equação 9), do nitrato potássio (KNO_3) e do gás nitrogênio (N_2), encontra-se vinte reações redox (VANÝEK, 2012-2013). O ion de potássio praticamente não se reduz, pois tem potencial redox bastante negativo ($\approx -3,127 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$), compatível à faixa de potencial reportada por diversos trabalhos (VANÝEK, 2012-2013; OLIVEIRA; FONTES, 2001). Por outro lado, termodinamicamente a redução do gás nitrogênio pode ocorrer a potencial próximo de $-0,104 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$, sendo consistente com (VANÝEK, 2012-2013) e as reações de redução do nitrato podem ser descritas pelas equações 10 e 11.

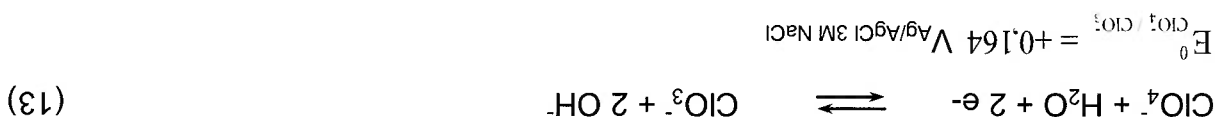
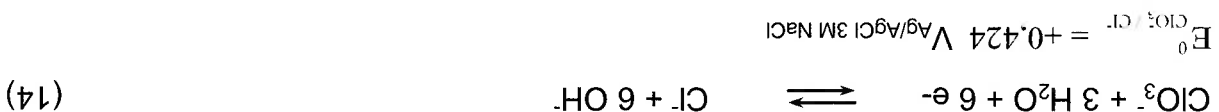


$$E^0_{\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-} = -0,186 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$$

Como um resultado da complexação ou dos processos de oxidação, as áreas efetivas dos eletrodos decrescem, invalidando a estabilização da superfície por condicionamento eletroquímico. O procedimento elaborado por Oliveira e Fontes (2001) - utilizando a solução 0,10 mmol cm⁻³ de ferricianeto de potássio diluído em 0,10 mmol cm⁻³ de NaCl - indicou que com o aumento de potencial positivo há uma diminuição de área efetiva exposta em solução. Isto justifica a faixa de potencial e o número de voltamogramas cíclicos escolhidos pelos autores.

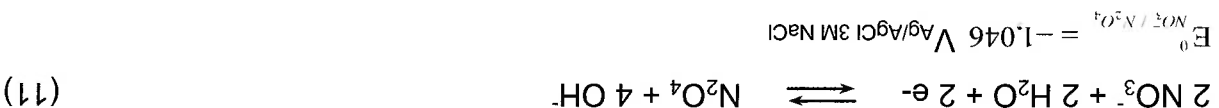


Se solução alcalina, grupos hidroxilas podem reagir sobre o ouro metálico formando um composto oxidado AuO (NOROUZI et al., 2007). Na presença de cloretos, o ouro metálico também pode oxidar, formando um complexo de ouro de acordo com a equação 15 (VAN'YEK, 2012-2013).



(equações 12 a 14).

Aproximadamente vinte reações se relacionam, direta ou indiretamente, à redução do ácido perclórico ou de seus produtos químicos (VAN'YEK, 2012-2013). O cloreto pode advir da ionização do ácido ou do processo de redução do perclorato



O processo de condicionamento eletroquímico como limpeza (ativação da superfície) de eletrodos pode ser efetivo de acordo com a influência dos íons hidrogênio, da oxidação da água e da absorção de gás oxigênio. A potenciais mais negativos, há uma evolução expressiva de H^+ a gás hidrogênio (ZHU et al., 2007) e, a potenciais acima de +0,200 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, ocorre menos redução de H^+ , prevalecendo a redução de gás oxigênio a peróxido de hidrogênio, estudos de Rodríguez, Melián e Peña (2000). E, por fim, conforme o potencial positivo aumenta, a reação de oxidação da água predomina no processo. Portanto, a faixa mais adequada de potenciais para o condicionamento eletroquímico pode ser definida entre (-0,200 e +0,600) V_{Ag/AgCl 3M NaCl} e a solução ácida usando nitratos apresenta menos influência de complexação com o ouro; portanto, mais indicada para os testes.

4.3 Estudo das Membranas Poliméricas Obtidas por Eletropolimerização

A seguir descrevemos o processo de eletropolimerização de monômeros sobre eletrodos de ouro, objetivando reduzir a influência das espécies interferentes e aumentar a sensibilidade na medição do nitrato.

Inicialmente, partiremos do estudo da membrana polimérica 1,2-DAB. O filme eletropolimerizado sobre eletrodos de ouro permite minimizar a reatividade de superfície e incrementar repetitividade, seletividade e estabilidade no sinal de medição do nitrato (IZUMI, 1989, p. 141-153) e a escolha foi motivada devido aos estudos prévios reportados (SUZUKI; TAURA, 2001; LASCHI; MASCINI, 2006; ALMEIDA, SANTOS FILHO; FONTES, 2009). A medição do nitrato ou a avaliação das espécies interferentes (AU, AA e PA), que foram administradas ao dobro (2x) ou a dez vezes (10x) das concentrações máximas encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos (MATTOS; GORTON, 2001; LASCHI; MASCINI, 2006), a saber: 0,52 $\mu\text{mol cm}^{-3}$, 0,11 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ e 0,15 $\mu\text{mol cm}^{-3}$, respectivamente.

Outros monômeros também foram investigados para a eletropolimerização de membranas poliméricas condutivas (APÊNDICE C). A fim de direcionar nosso estudo na medição do nitrato, alguns requisitos que permitiram eleger monômeros de maneira mais adequada foram elencados:

- i. o monômero deve estar referenciado pela literatura na medição eletroquímica direta ou indireta do nitrato ou das espécies interferentes em meio bioquímico;
 - iii. apresentar estrutura química com cadeia cíclica ou aromática ou linear (alternando entre ligações simples do tipo σ e duplas do tipo π – polímero conjugado), necessariamente, com nitrogênio como heteroátomo ou em grupos aminos como radical;
 - iv. monômero com baixa massa molecular;
 - v. ser solúvel em solução aquosa permitindo o preparo em $0,10 \text{ mmol cm}^{-3}$ de solução tampão fosfato de potássio monobásico (STF) em concentração de 5 ou $0,50 \mu\text{mol cm}^{-3}$ do monômero condutor;
 - vi. o pH da solução de deposição em STF igual a $7,2 \pm 0,05$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ (para que não ocorra integração entre outros orgânicos);
 - vii. resposta estável do polímero em STF (meio reativo com cloretos);
 - viii. permitir a eletropolimerização dos monômeros em potenciais próximos de $+0,600 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$ (evitar a oxidação do eletrodo de ouro durante o processo de deposição);
 - ix. o potencial de degradação do polímero, por oxidação, deve ser superior a $+0,650 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$, pois a medição do nitrato deve ocorrer em potenciais desta ordem para menos;
 - x. seletividade ao nitrato, a resposta ao nitrato deve ser mais pronunciada com relação à resposta das espécies interferentes; e
 - xi. valores de toxicidade, de ponto de fusão e ebulição e de cor e odor, conformes as especificações de segurança (IQ-USP, 2004).
- Os monômeros investigados na literatura, a partir dos requisitos listados, foram: 1,2-cis/trans-diaminobenzeno (1,2-DAB), 1,3-diaminobenzeno (1,3-DAB), pirrol (PI), anilina (ANI), 1,4-diaminobenzeno (1,4-DAB), 1,8-diaminonafaleno (1,8-DAN), 2-amionafaleno (2-ANA), 4-vinilpiridina (4-VIP), 2-vinilpiridina (2-VIP), quinolina (Qui), indol (Ind), imidazol (Im), 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), piridazina (PID), pirimidina (PIM) e 3-aminopiridina (3-API).

Após um estudo criterioso de viabilidade quanto ao custo-benefício, à facilidade na preparação de soluções aquosas a pH $7,2 \pm 0,05$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, às necessidades especiais para manipulação, à toxicidade ao organismo humano e à sensibilidade e seletividade ao nitrato, concentramos os nossos esforços em trabalhos empíricos com os monômeros: imidazol, anilina, pirrol, 1,2-cis/trans-diaminobenzeno e 1,3-diaminobenzeno.

A partir dos estudos com as membranas poliméricas, iremos descrevê-las considerando os efeitos de adsorção e absorção de espécies, a influência da espessura do filme na medição eletroquímica e outros fatores pertinentes ao nosso trabalho. Diversos artigos abordaram a adsorção de gás hidrogênio ou adsorção de ions de hidrogênio em polímeros condutores (CHO et al., 2007; TIAN et al., 2005; BOSSI et al., 2000). LI, JING e LIN, Xiangqin (2007) estudaram os efeitos da variação do pH na resposta de corrente usando o polipirrol, em que se observou que quanto menor o pH, maior a corrente de resposta. Este resultado também é observado em outros polímeros condutores (O'CONNELL et al., 2001). Outro parâmetro estudado pelos autores foi a relação da espessura do filme com o máximo de corrente. Para o polipirrol, a espessura de 60 nm indica maior valor do sinal de corrente (LI, JING; LIN, Xiangqin, 2007). Cada polímero condutor tem um comportamento eletroquímico específico com a espessura do filme traduzido em um sinal máximo de corrente. Diante disso, não podemos generalizar a espessura de 60 nm para todos os polímeros, mas podemos tê-la como uma espessura de referência.

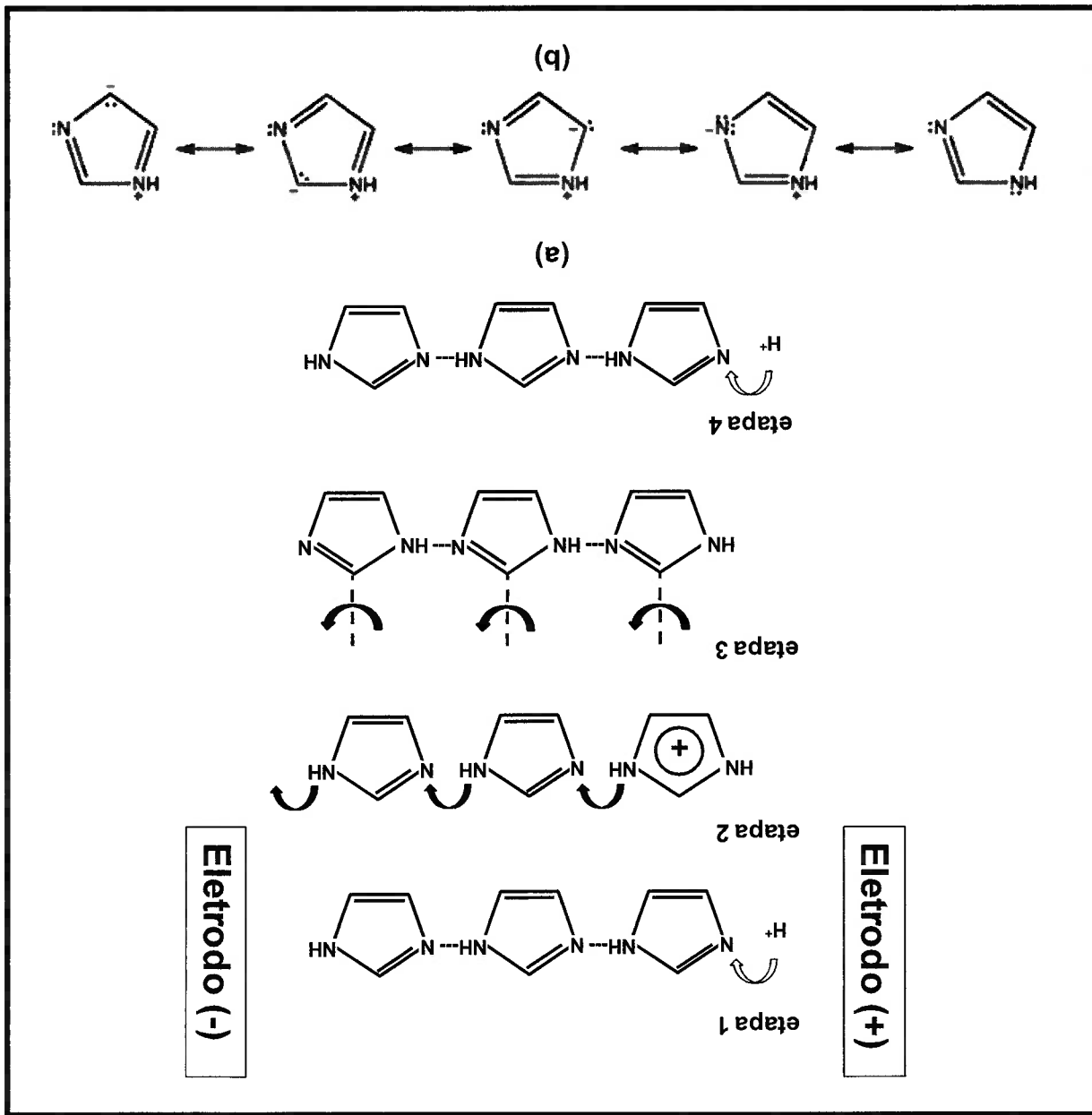
A. Polí(imidazol)

Os efeitos dos ions hidrogênio sobre o polímero imidazol foram explicados por Mangiatordi et al. (2012). Amparados nos estudos de Bozkurt e Meyer (MANGIATORDI et al. 2012), eles propuseram a condução elétrica em filmes baseado em "azole" a partir do transporte de um próton doador a ser capturado por um grupo receptor (transporte favorecido por ocorrência de pontes de hidrogênio), realizados em 4 etapas, de acordo com o esquema apresentado na Figura 13a. Primeiro, os ions de hidrogênio chegam aos "imidazoles" livres e inicia-se a geração de carga pela estrutura do polímero. Na segunda etapa, ocorre uma replicação dos prótons ao longo da cadeia polimérica (efeito em cascata do mecanismo de

transferência de prótons). Na próxima etapa, há uma reorientação dos "imidazoles" envolvendo diferentes prótons e, por fim, um novo íon de hidrogênio reinicia o processo (última etapa).

Os polímeros de imidazol têm uma capacidade de alterar os estados de oxidação, como pode ser observado na Figura 13b. Isto acontece devido ao imidazol ter dois nitrogênios, duas duplas ligações (tipo π) e três ligações simples (tipo σ) na cadeia carbônica do tipo fechada.

Figura 13 – a) efeitos dos íons de hidrogênio na condução elétrica em polímeros de imidazole e b) capacidade de alterar os estados de oxidação.

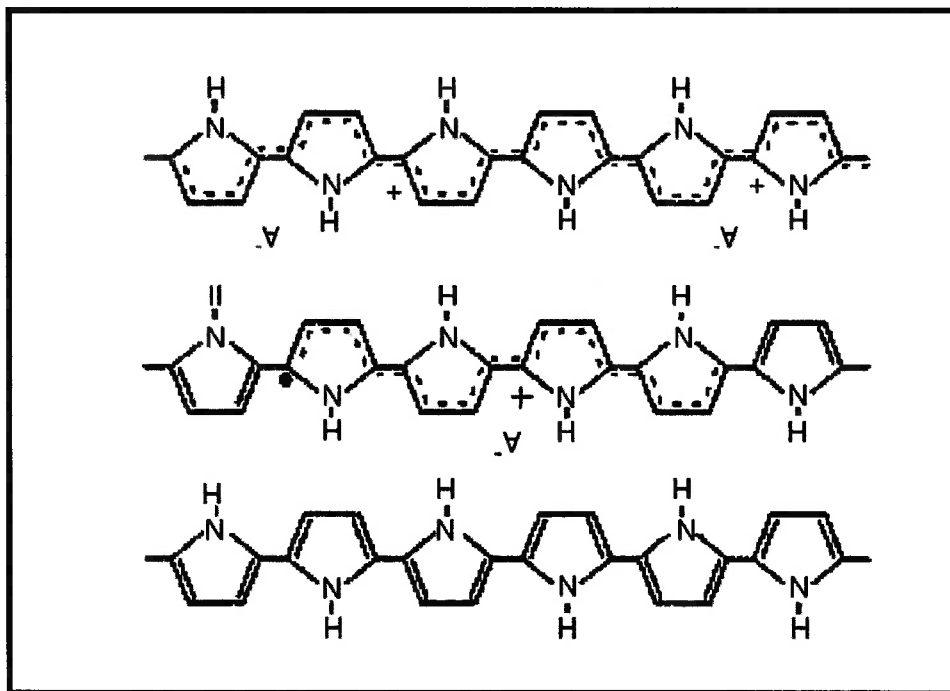


A combinação entre ligações duplas e simples permite o deslocamento das ligações duplas ao longo da cadeia, conforme a configuração altera o estado de oxidação do imidazol. Pode ser neutro, carregado com sítios ativos nos nitrogênios ou carregado positivamente no nitrogênio e negativamente no carbono; ver a sequência, respectivamente, da esquerda para a direita na Figura 13b. Portanto, a alteração do estado de oxidação confere algumas vantagens ao imidazol: eficiência no transporte de cargas e na reversibilidade do polímero.

B. Polipirrol

A capacidade redox do polipirrol (Figura 14) permite usá-los em aplicações que exigem reversibilidade, por exemplo: o eletrólito em estado sólido.

Figura 14 – Esquema representativo dos efeitos de dopagem (mais pronunciado usando soluções ácidas) com íons de hidrogênio e ânions em filmes de polipirrol.



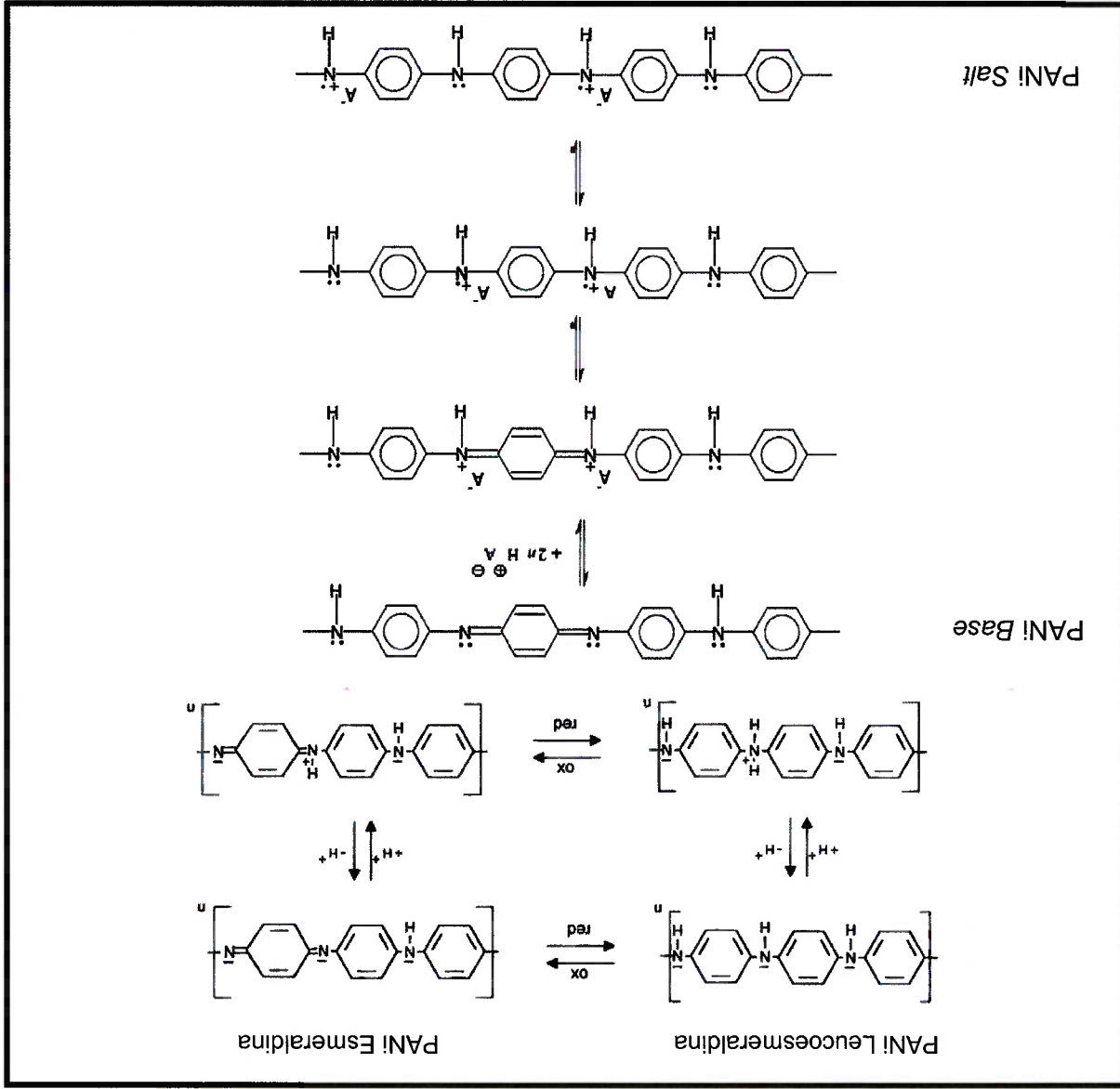
Fonte: adaptado de Geetha et al. (2006).

Os filmes de polipirrol têm inúmeras aplicações, desde imobilização de enzimas, obtenção de nanopartículas e formação de nanocapsulas ou nanofios (LI, JING; LIN, Xiangqin, 2007; TIAN et al., 2004), até atividade redox e eficientes processos de carga e descarga de íons (Figura 14) dependendo do método de eletropolimerização do filme (RAMANAVÍCIUS; RAMANAVÍCIENE; MALINAUSKAS, 2006).

C. Polianilina

Mallik, Witcom e Scurrill (2006) reportaram que a condutividade da polianilina resulta de um processo que envolve redução e oxidação parcial do polímero (Figura 15). Os autores apresentaram diversas aplicações relacionadas a esta característica da polianilina, entre elas: evitar descargas eletrostáticas, empacotamento de produtos eletrônicos, proteção contra a radiação eletromagnética e proteção contra a corrosão em eletrônicos que compõem partes de um carro ou casa.

Figura 15 – Esquema demonstrativo do processo de oxidação e de redução da polianilina esmeraldina (condutor) e leucoesmeraldina (isolante), respectivamente, e de dopagem com íons de hidrogênio e ânions (da polianilina Base para a Salt).



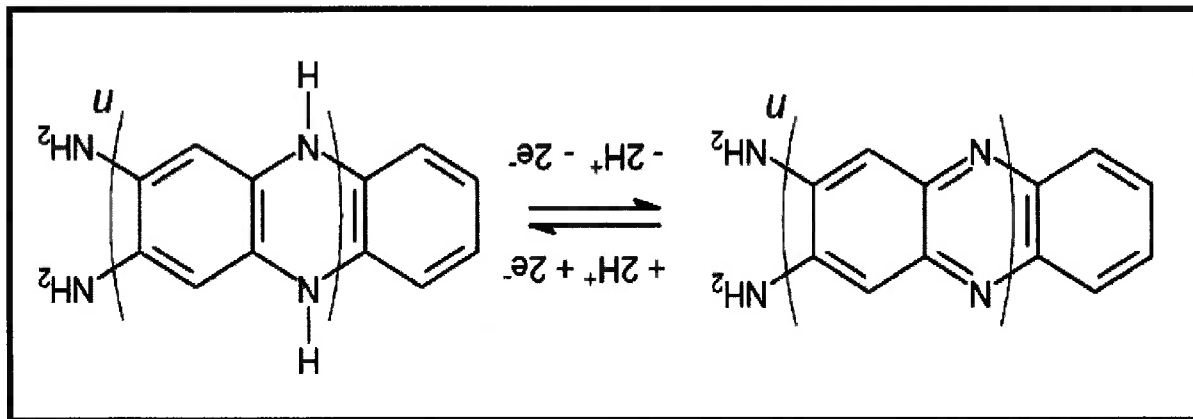
Fonte: adaptado de Stejskal, Prokeš e Trchova (2008), de Paterno (2010) e de Bossi et al. (2000).

A Figura 15 demonstra o esquema para exemplificar o processo de protonação do polianilina (ions de hidrogênio absorvido na estrutura do filme) de leucoemeraldina e a esmeraldina e seus estados de oxidação e redução, incluindo desprotonação e protonação, respectivamente (BOSSI et al. 2000). Também apresenta a reprotonação usando soluções ácidas de PANi Base para PANi Salt, reportado pelos autores Stejskal, Prokeš e Trchova (2008).

D. Polii(1,2-DAB)

O polii(1,2-DAB) é um tipo de polímero condutor que apresenta dois grupos aminas na estrutura do monômero. De acordo com o preparo da solução de deposição e do método de eletropolimerização, os filmes poliméricos de 1,2-DAB podem liberar ions de hidrogênio ligados ao nitrogênio ou desprotonar mediante solução química ou processos eletroquímicos (Figura 16).

Figura 16 – Esquema proposto por Long et al. (2003) para reação eletroquímica do polii(1,2-DAB) envolvendo ions de hidrogênio.



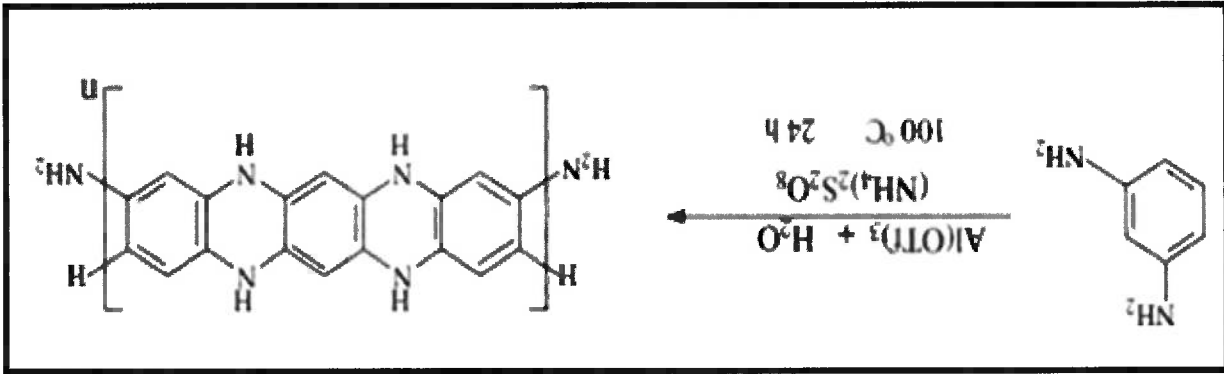
Fonte: Long et al. (2003).

Na forma desprotonada, o polii(1,2-DAB) pode ficar em estado compensado de cargas (Figura 16) ou pode ativar cargas por reação de oxidação e redução, perdendo dois prótons ligados ao nitrogênio e tornam-se carregado negativamente (elétrons livres no nitrogênio). Neste caso, a modificação da superfície do eletrodo com o 1,2-DAB pode agir repelindo as espécies químicas carregadas negativamente (principalmente grandes moléculas).

E. Polii(1,3-DAB)

O polímero 1,3-DAB difere do 1,2-DAB quanto ao número de hidrogênios presentes na unidade de "mero"¹⁹: observe a Figura 17 (10 hidrogênios na cadeia polimérica) comparada à Figura 16 (com 6 hidrogênios), respectivamente.

Figura 17 – Mero do 1,3-DAB na formação do polímero de 1,3-diaminobenzeno.



Fonte: adaptado de Amer, Young e Vosloo (2013).

O alinhamento da cadeia polimérica entre ambos é similar, conforme o estudo de Amer, Young e Vosloo (2013).

Neste trabalho de doutorado, os filmes poliméricos foram eletropolimerizados sobre a superfície dos macro ou microeletrodos de ouro usando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica e o equipamento Autolab.

As condições empregadas na eletrodeposição foram:

- potencial inicial = +0,200 V_{Ag/AgCl 3M KCl};
- potencial final = +0,850 V_{Ag/AgCl 3M KCl};
- velocidade de varredura = 0,050 V s⁻¹; e
- números de ciclos = 70.

Na seção 5 de resultados e discussões, os resultados serão apresentados e uma avaliação a respeito dos potenciais de eletropolimerização será discutida.

¹⁹ Mero é o nome dado à matriz de repetição ("n" vezes) ao longo da cadeia química do polímero.

4.4 Solução Química de Referência (SQR)

Neste item apresentamos a SQR a ser utilizada nos procedimentos de medição por voltametria cíclica do nitrato e de avaliação de algumas espécies interferentes (usando macro e microeletrodos modificados com polímeros condutores) e que tenha as seguintes propriedades:

- i. ter pH 7,4 e espécies químicas em concentração compatível às encontradas em sangue de humanos (APÊNDICE D);
- ii. ser anticoagulante e minimizar efeitos de adsorção de moléculas orgânicas sobre a superfície dos microeletrodos; o etilendiamino-tetra-acético (EDTA) foi usado com este propósito; e
- iii. ter um elemento metálico de complexação intermediária com o ligante EDTA e intermediária à forte com os demais ligantes bioquímicos (Tabela 3). O íon cobre (II) foi a opção mais adequada, pois além de cumprir o requisito, também é um íon já participante dos processos fisiológicos em seres vivos (em especial os humanos).

As informações de preparação da SQR estão descritas no APÊNDICE B.3.3.

Observação: A temperatura da solução na medição foi de $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$. Porém, os potenciais redox das espécies eletroativas foram estudados matematicamente considerando a temperatura de 37°C , a fim de adequá-lo às condições bioquímicas presentes no sangue de humanos (ver APÊNDICE D).

O EDTA é uma molécula quelante que forma complexos principalmente com os metais de transição 3d (CHEAQS Pro, 2013). Se o EDTA for protonado (soluções ácidas), isto auxilia na limpeza da superfície de eletrodos pelo arraste de moléculas orgânicas aderidas. Já em meio neutro, o EDTA forma um complexo quelado com ferro(II), ferro(III), cobre(II), cobalto(III), níquel(II), chumbo(II), zinco(II) e manganês(II), minimizando os efeitos de interferência durante a medição eletroquímica. Principalmente, ajuda na preservação do sangue pela quebração do cálcio(II), evitando a coagulação sanguínea quando o EDTA for administrado a uma concentração de $7\ \mu\text{mol cm}^{-3}$ (BRUNS; ASHWOOD; BURRIS, 2007, p. 31). A Tabela

3 sistematiza os valores das constantes de estabilidade ($\log k$) de metais com o EDTA e também apresenta a estrutura do complexo para cada caso.

Tabela 3 – Constantes de estabilidade ($\log k$) do ligante EDTA com diversos metais que foram preferencialmente obtidas a uma temperatura de 25 °C, e à razão de 1 de ligante para 1 de metal ou na condição experimental de concentração.

Metais	Constante de estabilidade ($\log k$)	Estrutura do complexo	Referências
alumínio (III)	16,13	[ML]	FURIA, 2006
bário	7,78	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
berílio	9,30	[ML] ²⁻	CHEAQS Pro, 2013
cádmio	15,99	[ML] ²⁻	CHEAQS Pro, 2013
cálcio	10,70	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
chumbo (II)	17,60	[ML] ²⁻	CHEAQS Pro, 2013
cobalto (II)	16,21	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
cobalto (III)	40,79	[ML]	CHEAQS Pro, 2013
cobre (II)	18,80	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
cromo (III)	22,80	[ML]	CHEAQS Pro, 2013
estôncio	8,63	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
ferro (II)	14,30	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
ferro (III)	25,70	[ML]	FURIA, 2006
lítio	2,75	[ML] ³⁻	CHEAQS Pro, 2013
magnésio	8,69	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
manganes	13,56	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
mercúrio (II)	21,50	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
níquel (II)	18,56	[ML] ²⁻	FURIA, 2006
potássio	0,60	[ML] ³⁻	CHEAQS Pro, 2013
sódio	1,66	[ML] ³⁻	CHEAQS Pro, 2013
zinco	16,50	[ML] ²⁻	FURIA, 2006

Conclusão.

Fonte: Almeida (2014).

Diante das constantes de estabilidade metal-EDTA, escolhemos o cobre(II) devido ao valor intermediário (18,80) da constante de estabilidade²⁰ dentro da faixa de 0,60 a 40,79 (Tabela 3), permitindo equilíbrio químico mais dependente das concentrações químicas presentes na solução²¹. Porém, neste sentido o níquel, zinco, cobalto(II), alumínio(III), chumbo(II), cádmio, cromo(III) e mercúrio(II) podem influenciar mais assiduamente sobre a constante de equilíbrio do cobre(II)-EDTA (Cu(II)-EDTA), pois deslocaria a concentração de EDTA ao complexar com esses metais. Já o lítio, magnésio, bário e berílio pouco se complexam com EDTA ficando a maior parte livre em solução. O potássio e o sódio, praticamente, não estabelecem complexos com EDTA (APÊNDICE E).

A Tabela 4 mostra as constantes de estabilidade (log k) para diferentes ligantes - presentes em meio bioquímico - com o cobre(II). A ideia central está em comparar essas constantes com a constante de estabilidade cobre(II)-EDTA de 18,80.

Tabela 4 – Constantes de estabilidade (log k) de alguns ligantes com cobre(II) que foram preferencialmente obtidas à temperatura de 25 °C e à razão de 1 de ligante para 1 de metal ou na condição experimental de concentração. ND: não descrito.

Ligantes	Constante de estabilidade	log k	Estrutura do complexo	Referências
hidroxila, OH	[Cu(II)L] ⁺	6,50		CHEAQS Pro, 2013
	[Cu(II)L ₂] ^[aq]	10,70		CHEAQS Pro, 2013
	[Cu(II)L ₃]	14,20		CHEAQS Pro, 2013
	[Cu(II)L ₄] ²⁻	16,40		CHEAQS Pro, 2013
	[Cu(II)L ₃] ³⁺	8,05		CHEAQS Pro, 2013
	[Cu(II)L ₂] ²⁺	17,50		CHEAQS Pro, 2013
	[Cu(II)L ₄] ²⁺	35,20		CHEAQS Pro, 2013

Continua...

²⁰ Na tabela 3, as constantes de estabilidade (log k) têm valores entre 0,60 e 40,79. Para os menores valores, significa baixa estabilidade do composto metal-EDTA, ou seja, praticamente todo metal e EDTA estão livres em solução. Para os maiores valores de log k, acontece o contrário, uma fração mínima do composto metal-EDTA estará livre em solução. No caso cobre(II)-EDTA, a constante de estabilidade é 18,80; valor intermediário aos outros comentados. Diante disso, nesta tese, referimo-nos ao log k do cobre(II)-EDTA como um valor intermediário da constante de estabilidade.

²¹ Indica que se houver outras espécies químicas presentes na solução química, estas podem deslocar a constante de estabilidade do cobre(II)-EDTA, sendo pouco provável isso ocorrer quando se tem uma constante de estabilidade muito alta.

Continuação...	Ligantes	Constante de estabilidade	log K	Estrutura do complexo	Referências
	amônia, NH ₃		4,02	[Cu(II)L] ²⁺	CHEAQS Pro, 2013
			7,40	[Cu(II)L ₂] ²⁺	CHEAQS Pro, 2013
			10,20	[Cu(II)L ₃] ²⁺	CHEAQS Pro, 2013
			12,30	[Cu(II)L ₄] ²⁺	CHEAQS Pro, 2013
	cianeto, CN		16,30	[Cu(II)L ₂] ^(aq)	CHEAQS Pro, 2013
			21,60	[Cu(II)L ₃] ⁺	CHEAQS Pro, 2013
			23,10	[Cu(II)L ₄] ²⁻	CHEAQS Pro, 2013
	nitrito, NO ₂ ⁻		2,02	[Cu(II)L] ⁺	CHEAQS Pro, 2013
			3,03	[Cu(II)L ₂] ^(aq)	CHEAQS Pro, 2013
	nitrito, NO ₃ ⁻		0,50	[Cu(II)L] ⁺	CHEAQS Pro, 2013
			-0,40	[Cu(II)L ₂] ^(aq)	CHEAQS Pro, 2013
	imidazol		4,21	Cu(II)L	NEELAKANTAN et al., 2011
			7,55	Cu(II)L ₂	NEELAKANTAN et al., 2011
			10,73	Cu(II)L ₃	NEELAKANTAN et al., 2011
			12,91	Cu(II)L ₄	NEELAKANTAN et al., 2011
	acetato		1,67	[Cu(II)L] ⁺	CHEAQS Pro, 2013
			2,60	[Cu(II)L ₂] ^(aq)	CHEAQS Pro, 2013
			3,14	[Cu(II)L] ³⁺	CHEAQS Pro, 2013
	acetona		19,88	Cu(II)L	XUE; TRAINA, 1996
	ácido adipico		3,25	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido aspártico		8,57	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido cítrico		6,10	Cu(II)L	FURIA, 2006
	etileno-diamino-tetra-acético (EDTA)		18,80	[Cu(II)L] ²⁻	CHEAQS Pro, 2013
	ácido fórmico		1,98	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido fumárico		2,51	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido glicólico		2,81	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido glucônico		18,29	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido glutâmico		7,85	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido láctico		3,02	Cu(II)L	FURIA, 2006
	ácido L-ascórbico		2,47 (pH 7)	[Cu(II)L] ^(aq)	SACHAN et al., 2011
			5,40 (pH 9)	[Cu(II)L] ^(aq)	KLESZCZEWSKA, 1999
			9,77 (pH 9)	[Cu(II)L ₂] ²⁻	KLESZCZEWSKA, 1999
	ácido maleico		3,90	Cu(II)L	FURIA, 2006

Continua...

Continuação...

Referências	Estrutura do complexo	Constante de estabilidade log K	Ligantes
FURIA, 2006	Cu(II)L	3,40	ácido DL-málico
FURIA, 2006	Cu(II)L	2,14	ácido <i>n</i> -bútrico
FURIA, 2006	Cu(II)L	2,12	ácido <i>n</i> -valérico
FURIA, 2006	Cu(II)L	2,08	ácido isovalérico
FURIA, 2006	Cu(II)L	6,30	ácido oxálico
FURIA, 2006	Cu(II)L	2,20	ácido pírvico
FURIA, 2006	Cu(II)L	3,2	ácido tartárico
ND	ND	ND	ácido úrico
FURIA, 2006	Cu(II)L	3,3	ácido succínico
FURIA, 2006	Cu(II)L	5,90	ADP
FURIA, 2006	Cu(II)L	8,18	alanina
FURIA, 2006	Cu(II)L	6,13	ATP
CHEAQS Pro, 2013	Cu(II)L	-0,04	brometo, Br-
FURIA, 2006	Cu(II)L	19,20	cisteína
CHEAQS Pro, 2013	[Cu(II)L]+	0,3	cloreto, Cl-
CHEAQS Pro, 2013	Cu(II)L	1,70	fluoreto, F-
FURIA, 2006	Cu(II)L	8,22	glicina
STRIEGLER; DITTEL, 2003	Cu(II)L	2,56 (pH 12,4)	D-glicose
FURIA, 2006	Cu(II)L	9,55	histamina
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)LH	13,46	
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)L	9,24	
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)L2H	21,82	
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)L2	16,16	
FURIA, 2006	Cu(II)L	10,60	histidina
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)LH	14,38	
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)L	10,27	
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)L2H	23,96	
NEELAKANTAN et al., 2011	Cu(II)L2	18,49	
FURIA, 2006	Cu(II)L	6,90	L-ornitina
FURIA, 2006	Cu(II)L	5,00	inosina

Continuação...

Continua...

Ligantes	Constante de estabilidade	log K	Estrutura do complexo	Referências
paracetamol	14,60		Cu(II)L	KAUR; SINGLA, 2010
	17,45		Cu(II)L ₂	KAUR; SINGLA, 2010
polifosfato	3,50		Cu(II)L	FURIA, 2006
purina	6,90		Cu(II)L	FURIA, 2006
sarcosina	7,83		Cu(II)L	FURIA, 2006
sulfato, SO ₄ ²⁻	2,36		Cu(II)L	CHEAQS Pro, 2013
sulfito, SO ₃ ⁻	4,26		Cu(II)L ₂	CHEAQS Pro, 2013
tetrametfosfato	3,18		Cu(II)L	FURIA, 2006
trifosfato	9,80		Cu(II)L ₃	FURIA, 2006
trimetfosfato	1,55		Cu(II)L	FURIA, 2006
valina	7,92		Cu(II)L	FURIA, 2006
ureia	-0,7		Cu(II)L	OKOCHI; BRIMBLECOMBE, 2002
β-alanina	7,13		Cu(II)L	FURIA, 2006
xantossina	3,40		Cu(II)L	FURIA, 2006

Fonte: Almeida (2014).

Na Tabela 4, observamos que hidroxilas, histidina e histamina (em alta concentração) e cianetos, ácido gluconico, acetona, cisteina e paracetamol (1:1) têm constante de estabilidade (log k) próxima ao valor intermediário (18,80). Imidazol e amônia apresentam log k na ordem de 7,5 (metade do valor intermediário), e as demais espécies bioquímicas estão com log k abaixo de 10. Com isso, podemos usar o filme de poli(imidazol) com cobre(II) absorvido/adsorvido que apresenta estabilidade química adequada com o complexante EDTA em solução.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados usando a SQR [0,10 mmol cm⁻³ de STF, 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl, 7 μmol cm⁻³ de ácido EDTA dissódico diidratado e (20, 200 ou 400) nmol cm⁻³ de CuSO₄.5H₂O]. A partir desta solução, permitiu-nos obter amostras com concentrações bem conhecidas dos íons de potássio, de sódio, fosfatos, cloretos e sulfatos encontradas no sangue de humanos (HAYNES, 2012-2013), exceto de cobre.

A seguir, a Tabela 5 mostra as concentrações testadas e os potenciais redox para as espécies químicas presentes na SQR.

Tabela 5 – Descrição das espécies químicas presentes na SQR e suas concentrações administradas, assim como os valores de potencial redox - em relação ao eletrodo de referência primário de hidrogênio. ND: não disponível.

Referências	Potencial redox	Concentração administrada	Espécies químicas
	V_H	mmol cm^{-3}	
(VANYEK, 2012-2013)	0,00	$3,98 \cdot 10^{-5}$	íons hidrogênio (pH 7,4)
(VANYEK, 2012-2013)	-2,93	0,10	íons de potássio
(VANYEK, 2012-2013)	+1,36	0,15	cloretos
(VANYEK, 2012-2013)	-0,22 a 0,17	0,40	sulfatos
(VANYEK, 2012-2013)	-2,71	> 0,25	íons de sódio
(VANYEK, 2012-2013)	0,15 a 0,52	0,40	íons de cobre
(VANYEK, 2012-2013)	-0,15 a 1,23	ND	gás oxigênio
(VANYEK, 2012-2013)	-3,09 a 0,09	ND	gás nitrogênio
(VANYEK, 2012-2013)	2,02	$2,51 \cdot 10^{-4}$	hidroxilas
ND	ND	$7,00 \cdot 10^{-3}$	ácido EDTA dissódico
(VANYEK, 2012-2013)	-1,05	0,10	fosfatos

Fonte: Almeida (2014).

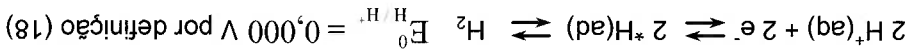
O estudo da SQR permitiu-nos realizar experimentos de medição do nitrato com mais confiabilidade, além de ser uma solução estável quimicamente por mais de um ano.

4.5 Procedimento de Estudo de um Sistema de Medição Eletroquímica (SME) por meio dos Sobrepotenciais e dos Potenciais de Equilíbrio Redox

A partir dos estudos de Wolynec (2003), descrevemos o sobrepotencial correspondente a uma meia-célula de reação eletroquímica ($\eta^{1/2}$) - se esta ocorre no anodo, polarização de meia-célula anódica ($\eta_a^{1/2}$), ou se no catodo, polarização de meia-célula catódica ($-\eta_c^{1/2}$). Ambos sobrepotenciais recebem a contribuição da polarização da ativação da reação correspondente ao análio (η^A), da polarização devida à concentração do análio (η^C), da polarização de cristalização decorrente ao efeito relacionado à migração dos íons nos sítios ativos (η^X) e da polarização de

mesmo potencial, sem histerese associada).
 de uma reação redox reversível (as espécies oxidadas e reduzidas ao
 um eletrodo [praticamente] não polarizável. Esse eletrodo tem característica
 O potencial de referência E(0), na prática, é um potencial de equilíbrio de
 de referência primário.

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



HORWOOD, 2001, p. 360):
 pela reação redox do hidrogênio (equação 18) (JANZ; IVES, 1961; COBBOLD, 1974;
 fundamentados no eletrodo de referência primário de hidrogênio, o qual é obtido
 É importante destacar que os principais estudos de equilíbrio termodinâmico estão
 cabos ou trilhas, conexões e contatos.

sendo que, além dos sobrepotenciais de meia-célula anódica e catódica atribuídos
 as reações eletroquímicas há um sobrepotencial (*η)²² devido à polarização de

$$\eta = \eta_a^{1/2} - \eta_c^{1/2} + * \eta \quad (17)$$

respectivamente. O sobrepotencial total (η) pode ser expresso por:
 É possível atribuir um sobrepotencial η^{1/2} ao eletrodo anodo e outro ao eletrodo

junção eletrólito-eletrodo (Almeida, 2009, p. 48).
 O sobrepotencial obedece à fundamentação da distribuição de cargas no modelo

$$\eta^{1/2} = \eta_a^{1/2} = -\eta_c^{1/2} = * \eta_A + * \eta_C + * \eta_X + * \eta_{Re} \quad (16)$$

sobrepotencial é dado por:
 resistência entre o eletrólito e o eletrodo (*η_{Re}). Assim, pode-se dizer que o

Em sistemas de medição, o potencial de referência é normalmente descrito pela equação de Nernst (EWING, 1977, p. 199).

$$E = E(0) = E_0 - \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{a_{red}}{a_{ox}} \right) \quad (19)$$

Onde E é o potencial de eletrodo igual a $E(0)$ é o potencial de referência, E_0 é o potencial de redução padrão ou potencial de eletrodo padrão, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta (K), z é o número de elétrons trocados entre a reação eletroquímica de oxidação e de redução, F é a constante de Faraday e a_{ox} e a_{red} são as atividades das espécies em oxidação e redução, respectivamente.

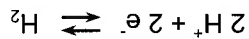
O efeito do pH em soluções eletrolíticas pode ocorrer através da contribuição da reação catódica do hidrogênio e oxigênio na dissolução anódica do material (WOLYNEC, 2003) que compõe a junção eletrolítico-eletrodo do referência. Sabendo que a água tem produto iônico igual a 10^{-14} (a 25 °C), tem-se:

$$a^{H^+} \times a^{OH^-} = 10^{-14}, \text{ aplicando o log, resulta:}$$

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

$$\log a^{OH^-} = pH - 14 \quad (20)$$

A influência do H^+ a partir da reação simplificada abaixo, à temperatura de 298,15 K e E_0^H é nulo por definição.



Convenção a equação do hidrogênio no sentido da redução e usando a equação de Nernst, resulta: $E_{H^+/H_2} = \frac{2}{0.059} \log \frac{P_{H_2}}{a_{H^+}^2}$, onde P_{H_2} é a pressão

parcial de hidrogênio, na maioria dos casos desprezível (WOLYNEC, 2003), pois o valor é próximo a 1 atm e, como $pH = -\log a^{H^+}$, temos:

$$E_{H^+/H_2} = -0.059 pH \quad (22)$$

A influência do OH^- a partir da reação abaixo, à temperatura de 298,15 K e $E_{\text{O}_2/\text{OH}^-}^0$ igual a +0,401 V_{H} .



Convenção a equação no sentido da redução do oxigênio e usando a

equação de Nernst, resulta: $E_{\text{O}_2/\text{OH}^-} = 0,401 - \frac{0,059}{4} \log \frac{a_{\text{OH}^-}^4}{P_{\text{O}_2}}$, onde

P_{O_2} é a pressão parcial de oxigênio, na maioria dos casos é desprezível, pois o valor é próximo a 1 atm e, como $\log a_{\text{OH}^-} = pH - 14$, temos:

$$E_{\text{O}_2/\text{OH}^-} = 1,227 - 0,059 pH \quad (V_{\text{H}}) \quad (24)$$

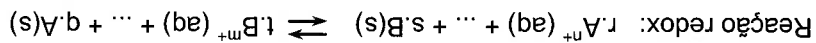
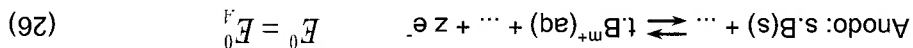
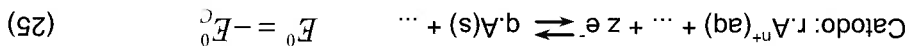
Esse caso, é semelhante à contribuição do hidrogênio, porém com potencial acrescido de 1,227 V_{H} (ALMEIDA, 2009, p. 47).

Além da influência da reação de redução das espécies de H^+ e de oxidação das espécies de OH^- no eletrodo de referência, também ocorre ambas as reações nos eletrodos catodo e anodo do SME. A intensidade das reações a cada situação varia de acordo com o potencial (se mais positivo, privilegia as reações anódicas, se mais negativo, as catódicas) e o tipo de material que denota um potencial característico do eletrodo.

O potencial de célula eletrolítica (E_{cell}) consiste em considerar todo o sistema de medição, ou seja, contabilizar as duas meias-células (...), isto é, a reação de oxidação e de redução das espécies que fornece a reação global redox. Um dos eletrodos é definido como ânodo; é onde ocorre a reação de oxidação, com transferência de elétrons das espécies reduzidas. O outro eletrodo é chamado de catodo; é onde ocorre a reação de redução, em que os elétrons são transferidos para as espécies oxidadas (EWING, 1977, p. 198). O eletrodo tem função primordial em conduzir a corrente iônica; sendo que através do circuito elétrico, fluem elétrons do ânodo para o catodo (sentido real) (ALMEIDA, 2009, p. 63).

Partindo do exemplo de Galen Ewing (1977), apresenta-se um modelo adaptado de uma reação eletroquímica redox (redução e oxidação) generalizada para infinitas espécies, utilizando dois eletrodos inertes, em que ocorrem as reações de redução e oxidação conforme as equações 25 e 26, respectivamente, as quais somadas

resultam na reação eletroquímica redox a partir de uma situação de equilíbrio padrão.



$$E_0^G = -E_0^C + E_0^F \quad (27)$$

Onde A e B são espécies a serem oxidadas ou reduzidas; r, q, s e t são os índices estequiométricos; n é o número de elétrons transferidos na reação redox; E_0^F é o potencial de eletrodo-padrão; E_0^C é o potencial de eletrodo-padrão para reação de meia-célula de oxidação; $-E_0^C$ é o potencial de eletrodo padrão da reação de meia-célula de redução; E_0^G é o potencial de eletrodo padrão para a reação global redox.

Indicou-se o potencial de eletrodo padrão no equilíbrio termodinâmico para as meias-célas, porém há necessidade de atribuir a esses potenciais os efeitos de temperatura, de atividade iônica e de pH. Por considerações termodinâmicas, pode-se mostrar que a variação da energia livre de Gibbs (trabalho máximo à pressão e à temperatura constantes) é dada por Ewing (1977):

$$\Delta G = zRT \ln \bar{Q} + \Delta G_0 \quad (28)$$

Na expressão acima, R é a constante universal dos gases (8,316 J) e T é a temperatura em Kelvin, ΔG_0 é a energia livre de Gibbs padrão e \bar{Q} é

dado por:

$$\bar{Q} = \frac{(a_{r_1}^{n_1})^{red} (a_{r_2}^{n_2})^{red} \dots (a_{s_1}^{m_1})^{red} \dots}{(a_{t_1}^{m_1})^{red} (a_{t_2}^{m_2})^{red} \dots (a_{q_1}^{n_1})^{red} \dots} \quad (29)$$

Na situação de equilíbrio, os produtos e os reagentes têm a mesma energia

livre total e $\Delta G = 0$. Logo, temos:

$$\Delta G_0 = -zRT \ln \bar{Q} \quad (30)$$

Nas reações eletroquímicas redox, a variação da energia de Gibbs padrão (ΔG^0) relaciona-se às quantidades elétricas através da expressão:

$$\Delta G^0 = -zFE_0^G \tag{31}$$

Na equação 31, E_0^G é o potencial da célula eletrolítica padrão em Volts (V); F é a constante de Faraday, aproximadamente 96,500 C; z é o número de elétrons transferidos na reação redox global. Então, substituindo 31 em 30, tem-se:

$$E_0^G = -\frac{\Delta G^0}{zF} = -\frac{zF}{RT} \ln \tilde{Q}_c \tag{32}$$

Substituindo o valor de Q_c , resulta:

$$E_0^G = -\left[\frac{zF}{RT} \ln \left(\frac{a_{I^{B_{m+}}}^{real}}{a_{I^{A(s)}}^{real}} \right) \left(\frac{a_{I^{B_{m+}}}^{real}}{a_{I^{A(s)}}^{real}} \right) \dots \right] = -\left[\frac{zF}{RT} \ln \left(\frac{a_{I^{A(s)}}^{real}}{a_{I^{B_{m+}}}^{real}} \right) + \frac{zF}{RT} \ln \left(\frac{a_{I^{A(s)}}^{real}}{a_{I^{B_{m+}}}^{real}} \right) \dots \right]$$

Definimos o potencial de eletrodo padrão $-E_0^C = \frac{zF}{RT} \ln \left(\frac{a_{I^{A(s)}}^{real}}{a_{I^{B_{m+}}}^{real}} \right)$ e

$$E_A^0 = \frac{zF}{RT} \ln \left(\frac{a_{I^{B_{m+}}}^{real}}{a_{I^{A(s)}}^{real}} \right) \dots$$

tem-se um potencial de célula eletroquímica redox, conhecido por $E_{célula}$. Como o $E_{célula}$ é composto por duas meias-células eletrolíticas, sendo E_C potencial de meia-célula no eletrodo catodo e E_A potencial de meia-célula no eletrodo anodo. Substituindo $-E_0^C$ e E_A^0 na equação de Nernst (equação

19), podemos separar E_C e E_A :

$$E_C = -E_0^C - \frac{zF}{RT} \ln \frac{a_{I^{A(s)}}^{real}}{a_{I^{B_{m+}}}^{real}} \quad e \quad E_A = E_0^A - \frac{zF}{RT} \ln \frac{a_{I^{A(s)}}^{real}}{a_{I^{B_{m+}}}^{real}}$$

Sabendo que $a^{H(s)} = a^{B(s)} = 1$, resulta nas equações:

$$E_C = -E_0^C + \frac{z_F}{RT} \ln a^{F^+} \quad (33)$$

$$E_A = E_0^A - \frac{z_F}{RT} \ln a^{B_m} \quad (34)$$

Portanto, o potencial de célula eletrolítica é igual a:

$$E_{\text{célula}} = -E_C + E_A \quad (35)$$

[...] O potencial de célula depende da natureza e da concentração da solução de análise, dos materiais com que os eletrodos são fabricados, das características físicas (tamanho e espaçamento dos eletrodos têm efeito na variação da impedância), da presença ou ausência de agitação, da temperatura, das propriedades do circuito elétrico (tipo de filtros, amplificadores e conversores) e da direção e do sentido do fluxo de corrente (EWING, 1977).

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

$$E(S) = E^{célula} + \eta + E(0) \quad (36)$$

A célula eletrolítica tem eletrodos confeccionados com material inerte (medição e auxiliar), portanto, as reações de oxidação e de redução ficam restritas às espécies químicas de análise. Essas serão referenciadas a um potencial de referência, cujo eletrodo é não polarizável, com potencial fixo conhecido que independe da solução de análise. [...] Geralmente, nos sistemas de medição eletroquímica há preferência por uma das células eletroquímicas de reação redox. Nesse caso, aplica-se sobrepotenciais adequados no eletrodo de trabalho da célula potenciostática com três eletrodos. Nessa célula, tem-se um eletrodo com características não polarizáveis (eletrodo de referência) ou com polaridade reduzida (eletrodo de pseudo-referência). O outro, um eletrodo de medição, confeccionado com material inerte ou pouco reativo, é onde ocorre a oxidação ou redução das espécies que se deseja medir. E, por fim, um terceiro eletrodo inerte (eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo) que deve somente drenar ou fornecer a corrente de reação, sem participar do potencial de célula (ALMEIDA, 2009, p. 66).

A conceituação descrita será utilizada no estudo do SME com sensor integrado que foi configurado com três eletrodos e imerso em SQR (os resultados foram

sistemizados no APÊNDICE D). O potencial de anodo é composto pelo potencial de equilíbrio redox dos microeletrodos de ouro recobertos com polímero condutor imidazol em SQR com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl 3M NaCl. No momento da medição, o potencial de anodo recebe a contribuição de um sobrepotencial devido à redução ou oxidação das espécies químicas em análise, e o potencial de catodo é composto pelo potencial de equilíbrio da platina em SQR com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl 3M NaCl. Este potencial recebe influência do potencial de redução do hidrogênio e do oxigênio e do potencial de oxidação da platina pela água de cloratos e hidroxilas.

4.6 Candidatos a Espécies Químicas Interferentes

Os candidatos a espécies interferentes foram estudados considerando três abordagens de interferência: i) intrínseca à SQR que aparece no sinal de linha base, ii) por potencial de resposta eletroquímica, condição de contorno entre potenciais de $-0,350$ a $+0,350$ V_H, correlacionando-o à influência da concentração em nível máximo, condição de contorno deve ser maior que $0,10 \text{ nmol cm}^{-3}$ das espécies químicas presentes em meio bioquímico de humanos e iii) por mecanismos físico-químicos de interferências atuantes sobre as membranas poliméricas.

4.6.1 Prováveis Mecanismos de Interferência Físico-química na Medição Eletroquímica de Nítrito usando Polímeros Condutores

Os polímeros condutores são amplamente empregados em SME por apresentarem algumas vantagens: permitem minimizar a reatividade na superfície do eletrodo (introdução de um efeito capacitivo em série), possibilitam ganho de sensibilidade (polímeros eletrocatalíticos) e podem proporcionar seletividade (sensíveis a uma determinada espécie química) e estabilidade no sinal de medição com variação moderada para uma mesma condição experimental. Por outro lado, há desvantagens que estão relacionadas à adsorção e à adsorção química e à atração e à repulsão por campo elétrico que podem ocultar completamente ou parcialmente a superfície do eletrodo.

4.6.1.1 Por Absorção Estrutural ou Ligação Química Permanente

Nesta tese, o processo de absorção química será considerado como todo efeito estrutural ou de ligação química permanente que ocorra no interior do polímero condutor. A espécie química se difunde pela estrutura do polímero. Ele pode se estabilizar em carga (ion de carga oposta presente no filme) ou se ligar na cadeia do monômero, tornando-se um composto estável e com capacidade de ligação permanente (irreversível para as condições iniciais do polímero). Por exemplo, os aminoácidos doadores (C=O) podem atuar como interferentes por ligação peptídica (O=C-N-H) em filmes polímeros com base nitrogenada (NICKELS; SCHMIDT, 2013), por exemplo: polipirrol.

4.6.1.2 Por Adsorção Superficial ou Dopagem Reversível do Polímero

Define-se a adsorção superficial ou dopagem reversível por um fenômeno de adesão superficial de uma determinada espécie química na interface polímero e solução química. Geralmente, a adsorção ocorre em monocamadas, sendo possível reverter à dopagem do polímero, voltando às condições iniciais ou similares do polímero.

4.6.1.3 Por Atração ou Repulsão Devido ao Campo Elétrico

A atração ou a repulsão de cargas iônicas ocorre de acordo com o carregamento elétrico de carga positiva ou negativa na interface polímero-solução química. Quando o polímero é intrinsecamente carregado com cargas negativas, por campo elétrico negativo, ele estará mais suscetível à interferência de ions positivos (sódio, potássio, cálcio e outros). Por outro lado, no polímero intrinsecamente carregado com cargas positivas, acontece justamente o contrário. O campo elétrico positivo atrai ions negativos e repele ions positivos. Portanto, este filme sofre mais influência de espécies químicas iônicas como o cloreto, o iodeto, sulfeto, sulfato, fosfato, brometo e outros (HALLINAN Jr.; BALSARA, 2013).

4.6.1.4 Por Oclusão de Superfície

A oclusão de superfície do eletrodo pode ocorrer quando na presença de biomoléculas grandes (proteínas e macromoléculas em geral) ou de saturação de espécies químicas na superfície do eletrodo (principalmente de gases). Quando em sangue, algumas espécies em meio bioquímico estão relacionadas aos fatores coagulantes que podem ser interferentes por adsorção, causando a oclusão total da superfície do eletrodo. Para minimizar este efeito, devemos usar anticoagulantes (por exemplo, EDTA que já foi discutido para este fim).

4.6.2 Interferentes Intrínsecos à SQR

O gás oxigênio, hidroxilas, cloretos, sulfatos e/ou íons de hidrogênio e de cobre são espécies interferentes de acordo com o potencial aplicado. Para potenciais abaixo de 0 V_H (VANÝEK, 2012-2013), ocorre evolução do H⁺ a H₂ e o cobre(II) reduz-se a cobre metálico e cobre(II) a cobre(I), nos respectivos potenciais de (+0,340 e +0,150) V_H (VANÝEK, 2012-2013). Para potenciais acima de 0 V_H (VANÝEK, 2012-2013), a adsorção de cloretos pode ser observada mais pronunciadamente, além da oxidação da água a gás oxigênio, todos atuando como espécies interferentes intrínsecas à SQR (KUCERNAK; OFFER, 2008; GAO et al., 2010).

4.6.3 Interferentes por Concentração em Meio Bioquímico e Cálculo do Potencial de Resposta Eletroquímica

A seguir, vamos esboçar um protocolo para o mapeamento dos potenciais eletroquímicos na medição do nitrato e de algumas espécies interferentes, que seja parametrizado pela concentração e pelo potencial de equilíbrio redox²³.

Os candidatos a espécies interferentes foram pré-selecionados mediante a duas condições de contorno:
 i. quanto à concentração máxima encontrada em meio bioquímico de humanos, deve ser maior que 0,10 nmol cm⁻³; e

²³ Potencial de equilíbrio redox indica a situação em que a velocidade da reação eletroquímica no sentido catódico e anódico são constantes.

ii. quanto à faixa de potenciais de equilíbrio das espécies eletroativas que respondam eletroquimicamente na faixa de potencial entre $(-0,350 V_H$ e $+0,350) V_H$.

No APÊNDICE D, na primeira coluna da tabela lêem-se os nomes, as estruturas químicas ou símbolos atômicos e as massas molares iônicas ou atômicas das espécies químicas. Na segunda coluna, apresenta-se a concentração em meio bioquímico (nmol cm^{-3}), depois descrevemos os potenciais de redução padrão ou de meia-onda no sentido da redução obtidos por voltametria, dados em V_H . Por fim, um estudo dos potenciais de equilíbrio redox calculado ($V_{Ag/AgCl}^{3M NaCl}$) foi realizado a partir das concentrações das espécies interferentes e da temperatura de 37°C ($310,15 \text{ K}$), ambas encontradas em meio bioquímico de humanos saudáveis. Portanto, a partir deste estudo (APÊNDICE D), foi desenvolvido um protocolo de mapeamento das prováveis espécies interferentes na medição de nitrito em meio bioquímico, considerando as referências bibliográficas (APÊNDICE D).

De acordo com os dados descritos no APÊNDICE D, a concentração total dos metais encontrados no sangue (exceto magnésio e cálcio) está na ordem de $60,50 \text{ nmol cm}^{-3}$. Os dois metais citados não foram contabilizados, pois os potenciais são extremamente negativos, sem resposta na faixa de potencial de medição do nitrito. Para outros detalhes, principalmente sobre outros bioquímicos orgânicos, o leitor poderá ler o APÊNDICE D.

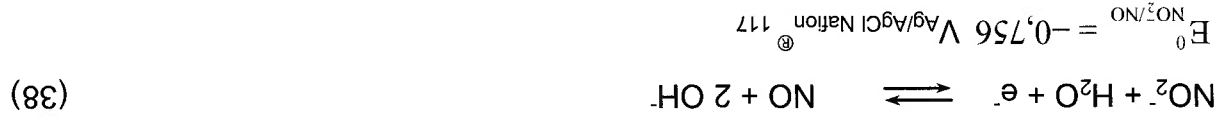
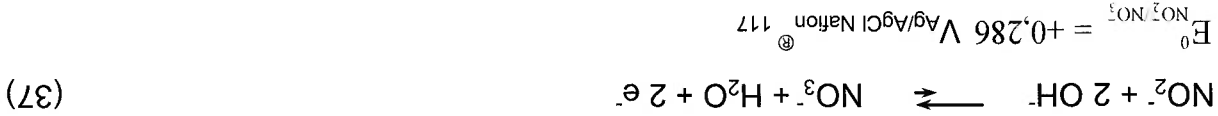
4.7 Estudo Prévio à Medição de Nitrito e de algumas Espécies Químicas Interferentes

A seguir apresentamos um procedimento para analisar os potenciais termodinâmicos das reações redox, relacionando-os com o equacionamento de Nernstiano (válido para reações redox muito rápidas e reversíveis) e avaliando a cinética de transporte das espécies químicas a partir da extração dos potenciais usando a técnica eletroquímica DPV.

Os potenciais redox foram estudados com relação ao potencial do eletrodo de pseudo-referência $\text{Ag/AgCl Nation}^{\text{®}}$ 117 com o valor próximo a $+0,100 V_{Ag/AgCl}^{3M NaCl}$

(BASI® RE-5B). O potencial do eletrodo secundário de referência Ag/AgCl em 3 mmol cm⁻³ de NaCl com relação ao eletrodo primário de hidrogênio está na ordem de +0,196 V_H (BOTT, 1995). Portanto, os valores de potenciais em relação ao eletrodo de hidrogênio expressos no *Handbook* foram subtraídos pelo valor do potencial do eletrodo de referência da BASI® e pelo potencial do eletrodo Ag/AgCl Nafion® 117.

Primeiramente, a partir dos resultados do estudo de mestrado (ALMEIDA, 2009, p. 121-134), a medição do nitrato pode ser realizada entre os potenciais²⁴ (+0,190 e +0,650) V_{Ag/AgCl Nafion® 117}, usando macroeletrodos modificados com polímero condutor 1,2-DAB. A série eletroquímica de potenciais redox, publicada no *CRC Handbook Chemical and Physics* (VAN'YEK, 2012-2013), apresenta uma reação provável de oxidação do nitrato (equação 37) e uma reação provável de redução do nitrato (equação 38), as quais estão descritas a seguir.



Na condição de reação eletroquímica rápida e reversível (PACHECO, 2013), os potenciais redox podem ser corrigidos em termos da atividade e da temperatura por meio da equação de Nernst (WOLYNEC, 2003):

$$E_e^{\text{Ox/Red}} = E_0^{\text{Ox/Red}} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_x^{\text{red}}}{a_x^{\text{ox}}} \quad (39)$$

²⁴ O potencial 0,190 V_{Ag/AgCl Nafion® 117} somente aplicável na medição para altas concentrações de nitrato (acima de 1 μmol cm⁻³) usando um macroeletrodo de ouro modificado com polímero condutor 1,2-DAB.

Onde, $E_{Ox/Red}^0$ é o potencial de equilíbrio redox, $F_{Ox/Red}^0$ é o potencial padrão redox, R é a constante dos gases ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura absoluta em Kelvin ($298,15 \text{ K}$) e, F é a constante de Faraday ($96485,34 \text{ C mol}^{-1}$), z é o número de elétrons e $\frac{Q_{red}}{Q_{ox}}$ é a razão de atividades químicas entre o produtos e reagentes da reação eletroquímica em estudo, sabendo que o "x" e "y" são coeficientes estequiométricos.

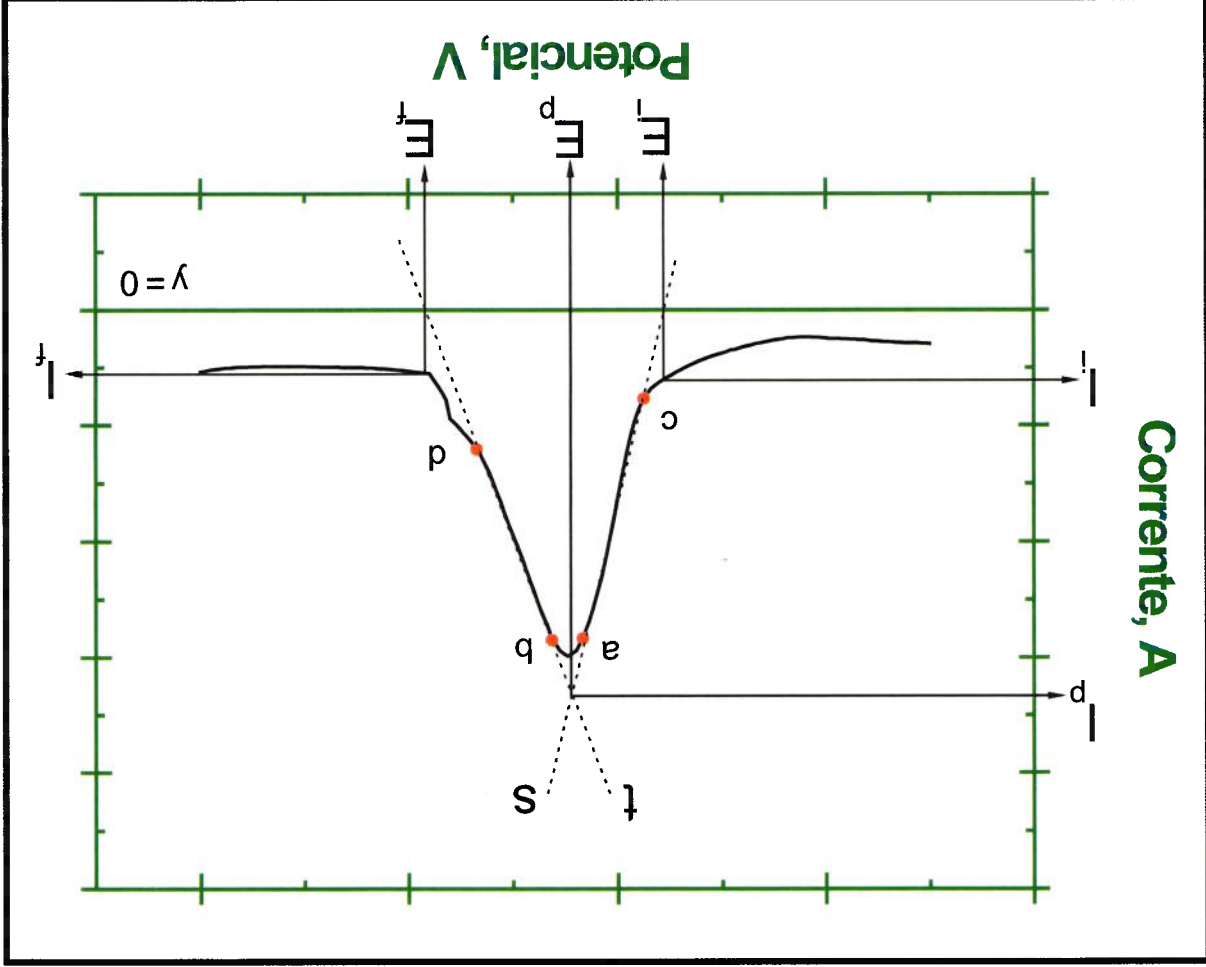
A atividade do nitrato foi considerada numericamente igual a sua concentração, uma vez que a solução é muito diluída. A mesma consideração foi feita para as demais espécies químicas, cujas concentrações foram estimadas por meio das constantes de estabilidade química das reações eletroquímicas (equações 37 e 38). Diante disso, o estudo dos potenciais foi realizado por meio da análise dos voltamogramas do tipo DPV que permitiu identificar a resposta cinética na medição do nitrato e a avaliação de algumas espécies interferentes: ácido ascórbico, paracetamol e ácido úrico.

Buffie e Tercier-Waeber (2005) descrevem as informações técnicas e os limites de detecção que envolvem a voltametria por pulso diferencial (DPV, do inglês, differential pulse voltammetry). Nessa técnica, a corrente é amostrada em dois intervalos de tempo. Primeiramente, antes da aplicação do pulso em potencial e, em seguida, na amplitude máxima do pulso. Então, registra-se a diferença entre essas duas correntes com relação ao potencial aplicado, este varia de acordo com a velocidade de varredura definida. O voltamograma DPV resultante tem a forma de picos, cuja altura é proporcional à concentração do analito (ALMEIDA, 2009, p. 58). Uma recomendação: as velocidades de varredura adequadas para obter um voltamograma DPV deve ser menor ou igual a $0,010 \text{ V s}^{-1}$, o que evita possíveis discrepâncias no sinal de corrente dos voltamogramas (TIAN et al., 2004).

A Figura 18 mostra o procedimento adotado como padrão para obtenção dos potenciais de início (E_i), de pico (E_p) e de fim (E_f) das reações eletroquímicas estudadas. As correntes de início, de pico e de fim correspondentes aos potenciais citados também serão mostradas: I_i , I_p e I_f , respectivamente. O E_p foi extraído a partir

do cruzamento de duas linhas assintóticas (retas pontilhadas "s" e "t" na Figura 18) que tangenciam o voltamograma DPV em dois pontos (uma reta com maior linearidade possível), imediatamente antes das inflexões de máximo e de mínimo (indicações de "a", "b" e "c", "d"; respectivamente). Cada linha assintótica cruza com a reta que indica o zero em corrente (reta $y = 0$). No sentido crescente do voltamograma DPV, extrai-se o potencial de início (E_i) da reação eletroquímica (cruzamento da reta "s" com "y = 0") e, no sentido decrescente do voltamograma DPV, extrai-se o potencial de fim (E_f) da reação eletroquímica (cruzamento da reta "t" com "y = 0").

Figura 18 – Imagem ilustrativa do gráfico padrão DPV que indica as correntes de pico (I_p) e de início de reação (I_i) e os respectivos potenciais (E_p) e (E_i).



Fonte: Almeida (2014).

Ainda na Figura 18, no potencial de pico (E_p), a resposta eletroquímica de redução ou oxidação de uma espécie química está associada a uma corrente de pico (I_p)

relacionada a uma determinada concentração das espécies eletroativas em solução. Também para o potencial de início (E_i) de reação eletroquímica - limitado por reação das espécies químicas sobre a interface eletrodo-solução - há uma corrente de início de reação. Idem ao potencial de fim (E_f) de reação eletroquímica - ocorre pouca influência das espécies químicas sobre a superfície do eletrodo - portanto, uma corrente de fim (I_f) de reação eletroquímica é amostrada.

Na sequência desse trabalho de doutorado, seguiremos o procedimento experimental:

- i. estudo das superfícies dos macro e microeletrodos de ouro, limpeza química e condicionamento eletroquímico;
- ii. caracterização dos eletrodos de medida quanto à área efetiva exposta em solução química de análise;
- iii. estudos de eletropolimerização dos polímeros condutores;
- iv. fabricação e caracterização dos EPRES;
- v. avaliação da funcionalidade do eletrodo auxiliar; e
- vi. por fim, o comportamento eletroquímico dos polímeros condutores (estudado por DPV e CV) na medição eletroquímica do nitrato e na avaliação dos efeitos de interferência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, apresentamos os resultados e as discussões sobre a fabricação e caracterização dos sensores integrados e sobre as medições de nitrato.

5.1 Experimentos de Limpeza e de Condicionamento Eletroquímico

Inicialmente, exibimos os resultados sobre a limpeza, ativação e condicionamento eletroquímico da superfície dos eletrodos de ouro. Esses resultados possibilitaram o desenvolvimento de um procedimento para remoção de impurezas adsorvidas sobre a superfície dos eletrodos, de forma a evitar a passivação total ou oclusão parcial da superfície eletroativada que poderia reduzir o valor de corrente medida do eletrodo de ouro.

O condicionamento eletroquímico para macro e microeletrodos de ouro em soluções químicas foi realizado de acordo com o procedimento descrito no item 4.2. Na Tabela 6 (solução estacionária) apresentamos os resultados iniciais.

Tabela 6 – Experimentos para definição da solução química e do número de ciclos voltamétricos no condicionamento eletroquímico em solução estacionária de macro e microeletrodos, a partir da avaliação da razão entre a área efetiva e a área geométrica. NA: não analisado.

Soluções	Faixa de potencial (V)	Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	Observações	(A _o / A _g) x 100 (%)
KNO ₃ (0,10)	-2,20 a +0,80	50	H ₂ O a O ₂ ²⁶	< 50 (a)
KNO ₃ (0,10)	-1,70 a +0,80	50	H ₂ O a O ₂	< 50 (a)
KNO ₃ (0,10)	-1,30 a +0,80	50	Ions H ⁺ e H ₂ O a O ₂ ²⁶	< 70 (a)
KNO ₃ (0,10)	-1,20 a +0,80	300	Ions H ⁺ e H ₂ O a O ₂	< 80 (a)
HNO ₃ (0,50)	-0,40 a +0,95	50	limitado por concentração ²⁷	> 70 (b)

Continua...

No item 4.2.2, as reações eletroquímicas em potenciais mais positivos há a oxidação da água a gás oxigênio e a potenciais mais negativos há intensa redução de ions hidrogênio a gás hidrogênio. Idem à nota 25, exceto que para potenciais menos negativos há menos evolução na superfície do eletrodo de gás hidrogênio. Portanto, há mais ions de hidrogênio adsorvidos no eletrodo. Dos experimentos, quando se emprega soluções químicas com concentrações 0,5 mmol cm⁻³ há um decaimento de corrente durante o processo de condicionamento eletroquímico. Isto indica que a superfície do eletrodo está se passando.

Continuação...

Soluções	[I] mmol cm ⁻³	Faixa de potencial (V)	Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	Observações	(A _o / A _g) x 100 (%)
HNO ₃ (0,50)		-0,60 a +0,95	50	limitado por concentração	> 75 ^(b)
HNO ₃ (0,10)		-2,20 a +0,80	300	oclusão de superfície ²⁸	NA ^(a)
HNO ₃ (0,10)		-1,70 a +0,80	300	oclusão de superfície	NA ^(a)
HNO ₃ (0,10)		-1,30 a +0,80	300	oclusão de superfície	NA ^(b)
HNO ₃ (0,50) + IPA (20%)		-0,60 a +0,40	50	oxidação do IPA ³⁰	> 50 ^(b)
HNO ₃ (0,50) + IPA (0,05)		-0,60 a +1,20	50	oxidação do IPA	> 50 ^(b)
HNO ₃ (0,05) + IPA (0,05)		-0,60 a +1,00	50	oxidação do IPA	> 65 ^(b)
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,05)		-0,60 a +1,20	50	favorecido pelo H ₂ O ₂ ³¹	> 80 ^(b)
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,20)		-0,60 a +1,20	50	favorecido pela concentração de H ₂ O ₂	> 90 ^(b)
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,20)		-0,70 a +0,58	50	procedimento estabelecido	> 100 ^(b)
1 H ₂ SO ₄ : 20 H ₂ O + IPA (20 a 50%)		-1,30 a +0,80	300	oxidação do IPA	~ 85 ^(a)
1 H ₂ SO ₄ : 20 H ₂ O + IPA (20 a 50%)		-1,20 a +0,90	300	oxidação do IPA	> 90 ^(a)
H ₂ SO ₄ (0,05) + IPA (0,05)		-0,60 a +1,20	50	oxidação do IPA	NA ^(b)
K ₃ Fe(CN) ₆ (0,001) em KNO ₃ (0,1)		-0,40 a +0,95	50	oclusão de superfície	> 60 ^(b)

Conclusão.

^(a) macroeletrodo de ouro depositado por *e-beam* (área geométrica ≈ 4,507 mm²)
^(b) microeletrodo comercial de ouro (MF-2006) da BASI[®] (10 μm de diâmetro)

Fonte: Almeida (2014).

A partir dos testes descritos, definimos a velocidade de varredura e a faixa adequada de potenciais dos ciclos voltamétricos no condicionamento eletroquímico,

²⁸ A oclusão de superfície ocorre quando algum material adsorvido sobre a superfície do eletrodo promove a passivação total ou parcial da superfície eletroativada. Geralmente, esse efeito é observado pela redução da corrente medida.

²⁹ A potenciais mais positivo pode desencadear diversas reações eletroquímicas (oxidação da água e oxirredução de subprodutos da reação principal), deste modo, pode limitar a limpeza da superfície do eletrodo pelo condicionamento eletroquímico.

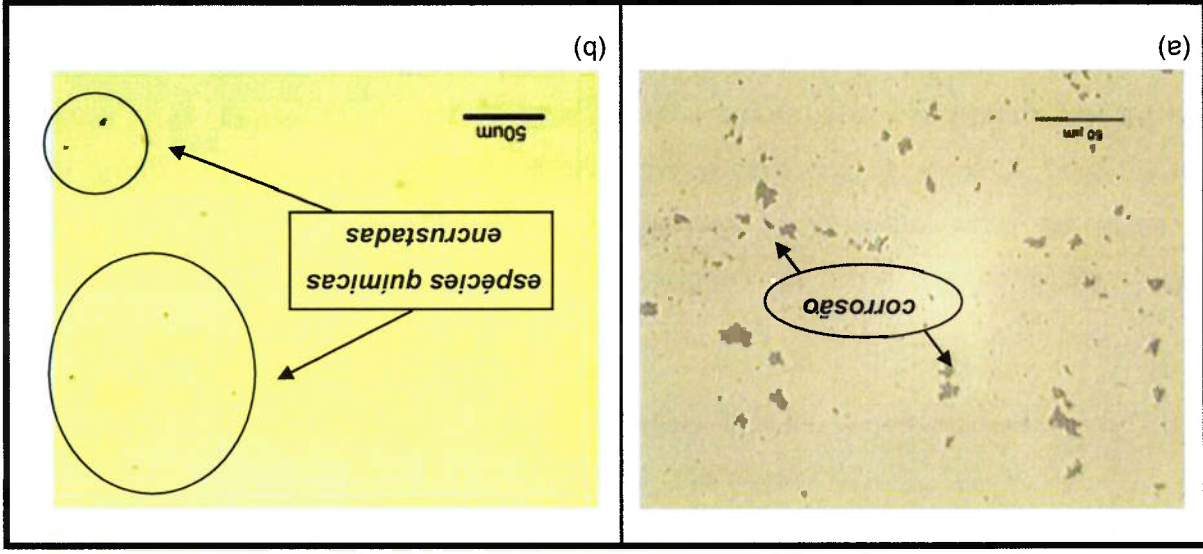
³⁰ O IPA pode oxidar-se a 2-propanona (WANG, Li et al., 2003), formando uma monocamada passivante sobre a superfície do eletrodo de ouro que pode reduzir o valor de corrente medida.

³¹ Usar o H₂O₂ permitiu o incremento de oxigênio dissolvido em solução, garantindo mais eficiência ao procedimento de condicionamento eletroquímico.

que estão indicados nas tarjas cinzas em destaque nas Tabelas 6 (solução estacionária) e 7 (solução em fluxo). Para estes casos, consideramos os possíveis efeitos de adsorção ou absorção dos produtos químicos advindos das reações redox que podem ocultar ou reduzir a área efetiva do eletrodo de ouro. Também, observamos a ação das espécies químicas complexantes que podem remover uma fina camada de ouro (de acordo com o potencial aplicado). Deste modo, estabelecemos um procedimento apropriado para o condicionamento eletroquímico que permita máxima área efetiva dos eletrodos.

Os resultados de condicionamento eletroquímico para superfícies de macroeletrodos de ouro usando $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{IPA}$ e $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ permitiram estabilizar a área efetiva entre 80% e 100%, respectivamente. Usando $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{IPA}$, após o décimo terceiro voltamograma cíclico começa a corrosão do filme de ouro (Figura 19a) ou incrustamento de possíveis espécies químicas na superfície do macroeletrodo de ouro (Figura 19b), reduzindo o valor de corrente medida. O incrustamento pode ocorrer devido aos estudos da oxidação do IPA, os quais foram desenvolvidos por Wang, Li et al. (2003).

Figura 19 – Imagens do macroeletrodo de ouro [$4,51 \pm 0,01 \text{ mm}^2$] obtidas por Microscopia Óptica; a) ouro corroído a potenciais positivos, empregando a solução de $1 \text{ H}_2\text{SO}_4$: 20 (20% IPA e água DI) e b) limpeza de ouro em mesma solução de ácido sulfúrico e IPA, efeitos de oxidação do IPA (WANG, LI et al., 2003).

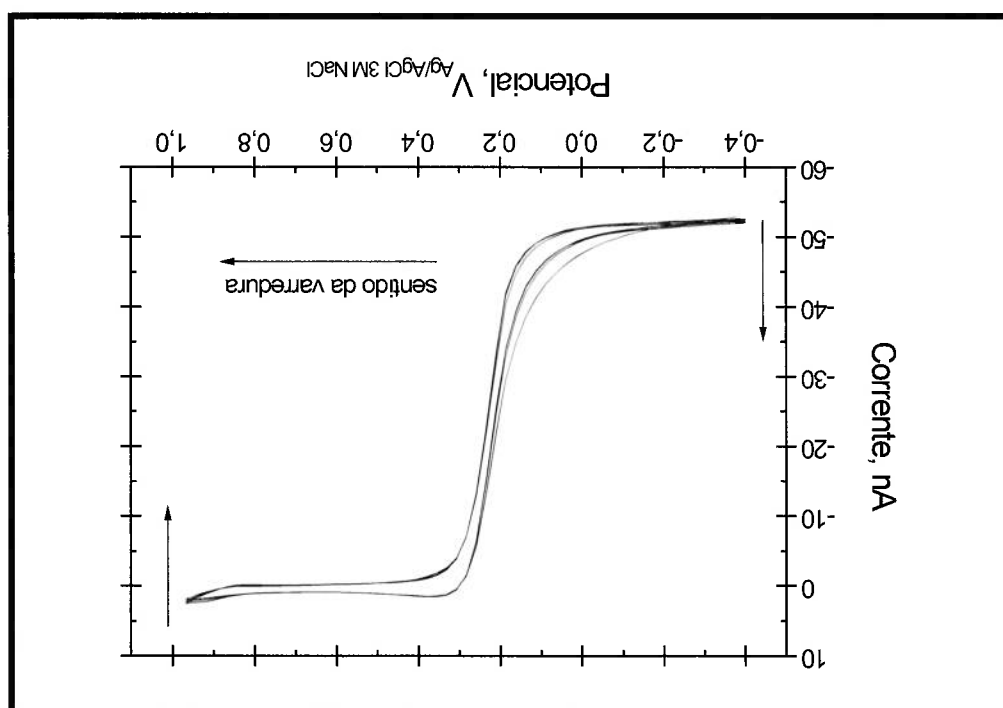


Fonte: Almeida (2014).

Concomitantemente ao estudo anterior, também foram desenvolvidos experimentos

empregando a solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ ($1 \mu\text{mol cm}^{-3}$) em KNO_3 ($0,10 \text{ mmol cm}^{-3}$). Porém, o condicionamento eletroquímico para microeletrodo de ouro usando procedimento similar ao de Oliveira e Fontes (2001) permitiu obter como resultado um ligeiro aumento de áreas efetivas se comparado à solução contendo NaCl (OLIVEIRA; FONTES, 2001); porém, na sequência dos voltamogramas há um decaimento de corrente. A Figura 20 mostra 12 ciclos obtidos a partir da solução descrita anteriormente.

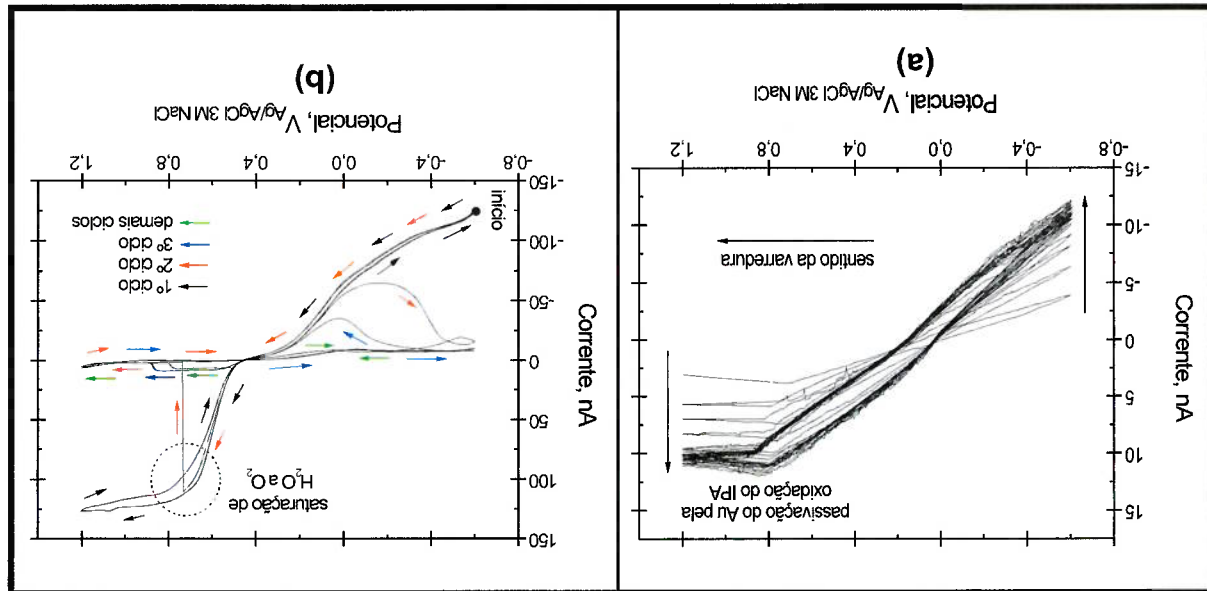
Figura 20 – Condicionamento eletroquímico de microeletrodos de ouro empregando uma solução com $1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ferricianeto de potássio em $0,10 \text{ mmol cm}^{-3}$ de KNO_3 ; as setas na vertical indicam o comportamento de decrescimento da corrente eletroquímica.



Fonte: Almeida (2014).

A Figura 21a indica a limpeza a limpeza de microeletrodo de ouro (MF-2006 da BASI®) realizada em ácido nítrico e álcool isopropílico ($0,05 \text{ mmol cm}^{-3}$ de HNO_3 + $0,05 \text{ mmol cm}^{-3}$ de IPA). Não ocorre corrosão substancial do filme de ouro após o décimo ciclo voltamétrico, mas há oclusão de superfície provavelmente devido aos efeitos de oxidação do IPA a 2-propanona (comentado no item 4.2.2). Este fenômeno pode ser percebido no voltamograma (Figura 21a) por meio dos níveis reduzidos de corrente quando comparado ao voltamograma da Figura 21b e dos perfis correspondentes à redução do hidrogênio e à oxidação da água, que não são visíveis na Figura 21b, porém pode ser observados na Figura 22.

Figura 21 – Condicionamento eletroquímico dos microeletrodos de ouro (MF-2006 da BASI®) em solução de ácido nítrico e álcool isopropílico (0,05 mmol cm⁻³ de HNO₃ + 0,05 mmol cm⁻³ de IPA). a) os efeitos da oxidação do IPA em uma solução em estado estacionário (50 ciclos) e, em b) para uma solução pressurizada por ar atmosférico, onde ocorre saturação de gás oxigênio pela oxidação da água (12 ciclos).



Fonte: Almeida (2014).

A Figura 21b mostra que, após o procedimento de condicionamento eletroquímico usando a mesma solução com IPA e pressurizada por ar atmosférico (Tabela 7), ocorre um decaimento abrupto de corrente (2º ciclo de varredura, setas em vermelho) e os próximos ciclos voltamétricos estão em níveis reduzidos de corrente (3º ciclo em diante, setas azuis e verdes). O decaimento de corrente pode ser atribuído aos efeitos de adsorção excessiva de gás oxigênio, os quais são intensificados pela solução em baixo fluxo (1,5 – 2 ml min⁻¹).

Tabela 7 – Idem a Tabela 6, exceto: os experimentos foram realizados para definir os parâmetros do condicionamento eletroquímico usando uma solução em fluxo e microeletrodos de ouro.

Soluções [mmol cm ⁻³]	gás / fluxo	Faixa de potencial (V)	Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	Observações (A _o / A _g) x 100 (%)
HNO ₃ (0,05) + IPA (0,05)	Ar 1,5 - 2 ml min ⁻¹	-0,60 a +1,20	50	oxidação do IPA > 70
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,10)	Ar 1,5 - 2 ml min ⁻¹	-0,60 a +1,20	50	limitado pelo fluxo > 80
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,20)	Ar 1,5 - 2 ml min ⁻¹	-0,60 a +1,20	50	limitado pelo oxigênio > 70
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,10)	nitrogênio 1,5 - 2 ml min ⁻¹	-0,60 a +1,20	50	limitado pelo fluxo > 80

Continua...

Continuação...

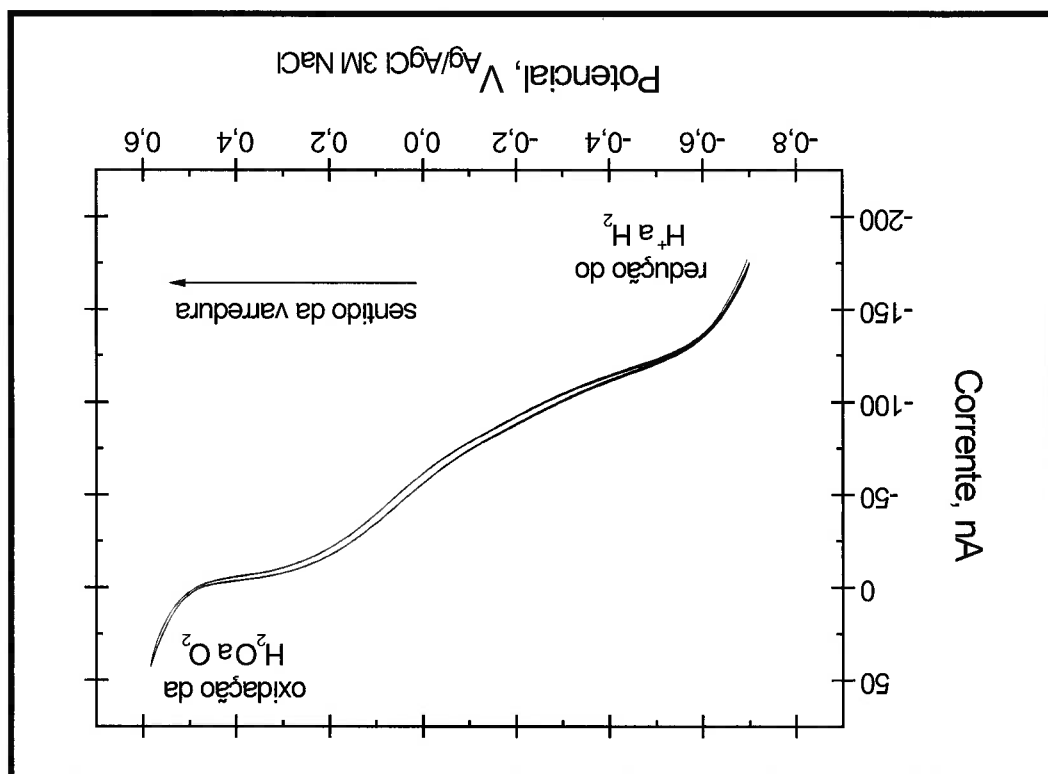
Soluções	gás / fluxo	Faixa de potencial (V)	Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	Observações (A _o / A _p) x 100 (%)
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,20)	nitrogênio / 1,5 - 2 ml min ⁻¹	-0,60 a +1,20	50	limitado pelo fluxo ~ 100
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,20)	nitrogênio / ≥ 5 ml min ⁻¹	-0,60 a +0,58	50	incremento de área efetiva > 300
HNO ₃ (0,05) + H ₂ O ₂ (0,20)	nitrogênio / ≥ 5 ml min ⁻¹	-0,70 a +0,58	50	incremento de área efetiva > 300

Conclusão.

Fonte: Almeida (2014).

Após diferentes procedimentos de limpeza eletroquímica investigados, foi proposta uma nova receita baseada no condicionamento eletroquímico de superfícies de microeletrodos de ouro usando a solução 0,05 mmol cm⁻³ de HNO₃ + 0,20 mmol cm⁻³ de H₂O₂ em alto fluxo (≥ 5 ml min⁻¹) pressurizada com gás nitrogênio ultrapuro. A Figura 22 mostra os voltamogramas cíclicos para a condição experimental identificada pela tarja cinza destacada na Tabela 7.

Figura 22 – Condicionamento eletroquímico dos microeletrodos de ouro em solução ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (0,05 mmol cm⁻³ de HNO₃ + 0,20 mmol cm⁻³ de H₂O₂), pressurizada por gás nitrogênio ultrapuro configurando um fluxo ≥ 5 ml min⁻¹.



Fonte: Almeida (2014).

O condicionamento eletroquímico indicado na Tabela 7 (tarja cinza) foi empregado após a limpeza *solution powdered micropipetter* (SPM) preliminar para remover impurezas orgânicas (ALMEIDA; SANTOS FILHO, 2013), conforme segue:

- i) Limpeza química: enxágue em fluxo de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ com solução SPM diluída ($0,10 \text{ mmol cm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4 + 0,05 \text{ mmol cm}^{-3} \text{ de H}_2\text{O}_2$) durante 10 min; e
- ii) Limpeza eletroquímica por CV: imersão em solução ácida oxidante ($0,05 \text{ mmol cm}^{-3} \text{ de HNO}_3 + 0,20 \text{ mmol cm}^{-3} \text{ de H}_2\text{O}_2$) em fluxo de $\geq 5 \text{ ml min}^{-1}$ ciclando em potenciais de $-0,700 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ a $+0,580 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M KCl}}$ com velocidade de varredura $0,050 \text{ V s}^{-1}$ por 50 ciclos.

Os efeitos relevantes associados ao condicionamento eletroquímico dos eletrodos são:

- i) Na oxidação: acima de $+0,400 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$, predominam a oxidação da água a gás oxigênio, e a potenciais mais elevados ocorre a corrosão eletroquímica do ouro; e
- ii) Na redução: há formação de gás hidrogênio a potenciais abaixo de $-0,400 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$, a partir da redução dos H^+ .

A receita da Tabela 7 (tarja cinza) foi aplicada ao condicionamento eletroquímico de microeletrodos de ouro, resultando no incremento da razão de área (A_e / A_g) x 100 (razão entre a área efetiva e geométrica, respectivamente, por porcentagem) superior a 300%. Isto pode ser atribuído ao aumento de rugosidade após os ciclos voltamétricos sobre a superfície do Au (BROLO; JIANG, Z.; IRISH, 2003). Com o ganho de área efetiva exposta em solução, foi possível aumentar a sensibilidade dos eletrodos na medição.

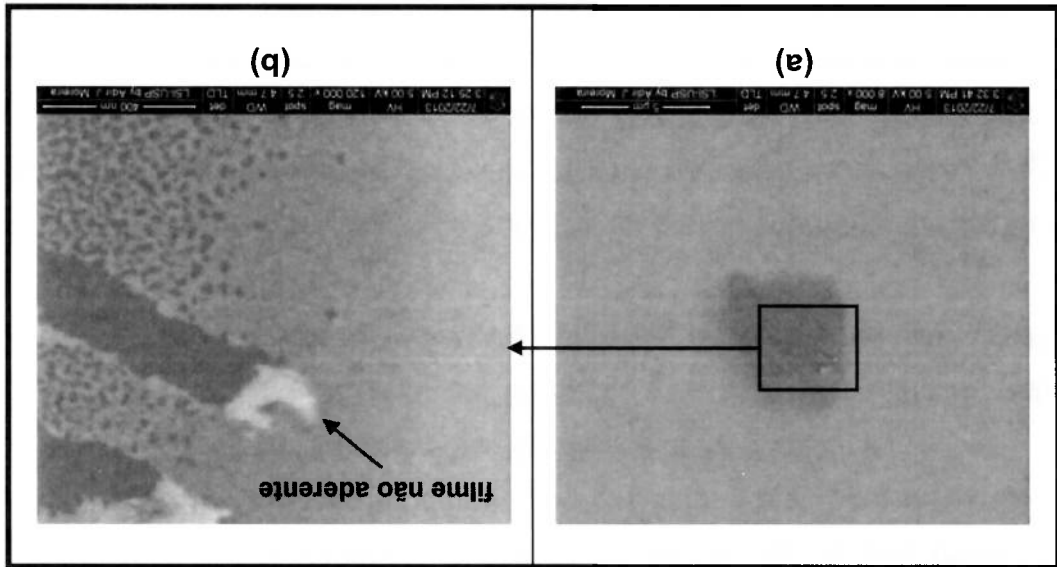
5.2 Limpeza Química de Microeletrodos

O procedimento de condicionamento eletroquímico não pode ser aplicado em todos os eletrodos e, principalmente, nos sensores integrados sobre o substrato planar de silício. O processo de fotografação do SU-8 deixa um degrau ($4 \mu\text{m}$ de altura) em formato de chapéu chinês (no filme de ouro a abertura de área é maior que acima do

polímero). Isto impossibilita que a solução fua e arraste impurezas, permitindo a limpeza completa da superfície do ouro.

Nestes casos, uma limpeza química tradicional foi empregada de acordo com o item 4.2.1. A limpeza da superfície do ouro foi similar ao procedimento de condicionamento eletroquímico. No geral, usando macroeletrodos não se observou quaisquer avarias, e usando microeletrodos, foi observada a superfície do ouro homogênea e limpa, com exceção de um caso isolado de avaria; houve despegamento do filme de ouro. O caso isolado de avaria sobre a superfície de um microeletrodo de ouro pode ser observado na Figura 23a e no detalhe do despegamento (Figura 23b).

Figura 23 – O filme de ouro depositado seja por *e-beam* ou *sputtering* tem morfologia compatível com a literatura, mínima rugosidade e boa aderência (a). Em caso de exceção, o filme se despegou de acordo com a imagem (b).



Fonte: Almeida (2014).

Na Figura 23, a mancha observada em (a) é um caso atípico de avaria, que pode ser visualizada em detalhes em (b).

5.3 Fabricação e Caracterização de Macros e Microeletrodos

A seguir, apresentamos a fabricação e caracterização dos microeletrodos de medição (eletrodeposição de filmes poliméricos sobre superfície de ouro) e eletrodos

de referência em estado sólido, para permitir a integração em substratos planares de silício. Deste modo, este tópico irá corroborar para a compreensão da funcionalidade dos sensores integrados, em especial, o comportamento eletroquímico das membranas poliméricas depositadas.

5.3.1 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos de Medição

Inicialmente, será apresentada a caracterização eletroquímica dos microeletrodos e macroeletrodos quanto à área efetiva exposta em solução $1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,10 \text{ mmol cm}^{-3}$ de KNO_3 .

O procedimento de obtenção da curva voltamétrica para caracterização eletroquímica foi estabelecido imergindo o eletrodo de medição em solução, por CV em um sistema de três eletrodos. Os parâmetros empregados na voltametria cíclica foram:

- potencial inicial = $+0,600 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$
- potencial final = $-0,200 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$
- velocidade de varredura = $0,050 \text{ V s}^{-1}$; e
- números de ciclos = 6.

A célula de análise foi desligada automaticamente após o teste. Em seguida, o sensor foi enxaguado em água DI durante 1 min e depois seco em nitrogênio gasoso ultra-puro.

A área efetiva para macroeletrodos de medição foi calculada a partir do pico catódico do voltamograma cíclico (Figura 24) e por meio da equação de Randles-Sevcik (MABBOTT, 1983; BADEA et al., 2001):

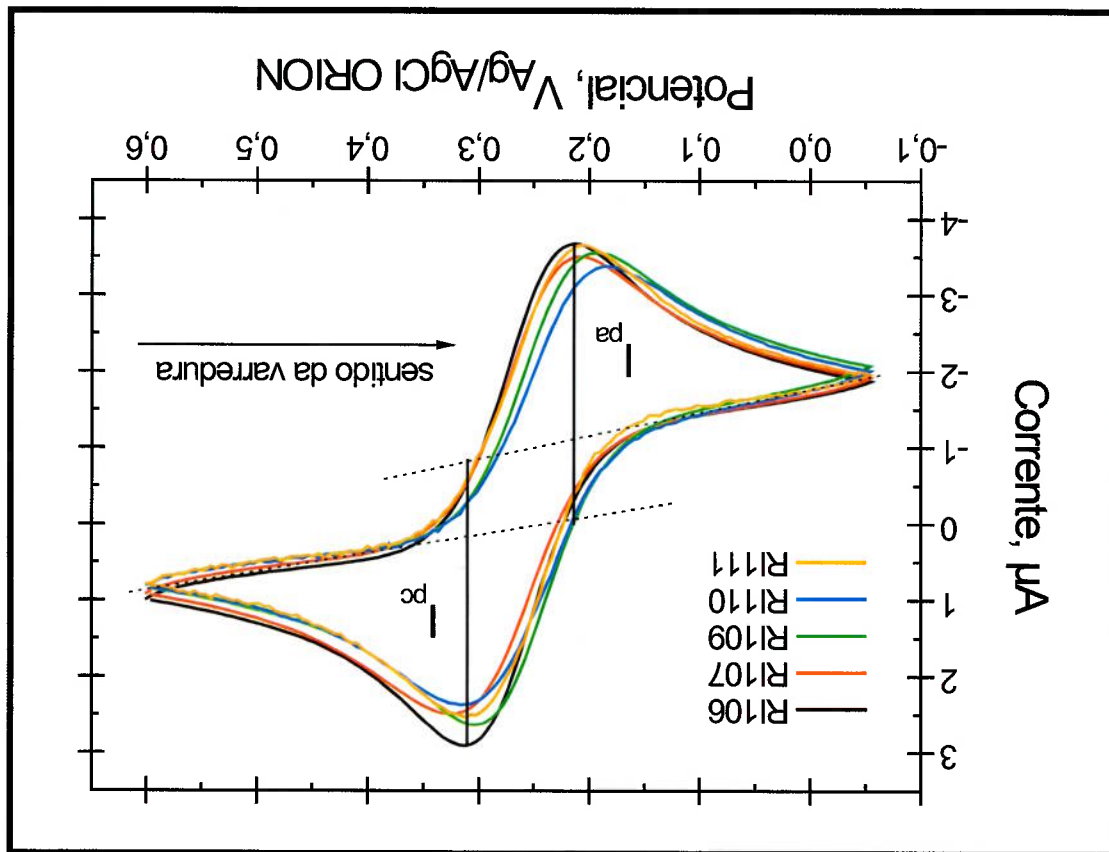
$$I_p = (2,69 \cdot 10^5) z^{3/2} A_e D_o^{1/2} C v^{1/2} \quad (40)$$

Nesta equação, z é o número de elétrons transferidos, D_o é o coeficiente de difusividade ($7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para as espécies de ferricianeto de potássio a 25°C), A_e (cm^2) é a área do eletrodo, C (mol cm^{-3}) é a concentração da espécie química

eletroativa e v ($V s^{-1}$) é velocidade de varredura.

A Figura 24 apresenta os voltamogramas cíclicos padrão após o procedimento de condicionamento eletroquímico. Neste último foi extraída a corrente de pico catódica (i_{pc}) para o cálculo da área efetiva exposta em solução ($1 \mu mol cm^{-3}$ de $K_3Fe(CN)_6$) em $0,10 mmol cm^{-3}$ de KNO_3) - ver mais informações no APÊNDICE B.3.2. As variações entre a área geométrica e a área efetiva exposta em solução, geralmente, estão associadas à presença de macro impurezas na superfície dos eletrodos ou relacionadas à rugosidade da superfície do eletrodo, ocasionada durante os procedimentos de limpeza, de condicionamento eletroquímico ou de caracterização da área efetiva.

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o cálculo de área efetiva exposta em solução ($1 \mu mol cm^{-3}$ de $K_3Fe(CN)_6$ em $0,10 mmol cm^{-3}$ de KNO_3).



Fonte: Almeida (2014).

A Tabela 8 mostra a relação entre os valores médios de área efetiva depois do condicionamento eletroquímico para um conjunto de trinta macroeletrodos, indicando a eficiência do processo em termos de ganho de área expressa em porcentagem.

Pela equação de Randles-Sevcik (MABBOTT, 1983) para macroeletrodos RI de área geométrica de $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$, a área efetiva calculada foi de $2,39 \text{ mm}^2$.

Tabela 8 – Valores médios de área efetiva (A_e), os parâmetros de reversibilidade (corrente de pico anódica (I_{pa}) dividida pela corrente de pico catódica (I_{pc}); potencial de pico catódico (E_{pc}) menos o potencial de meia-onda ou de metade de pico ($E_{p1/2}$) - mediana) e a variação de área com relação à área geométrica (A_g). Os resultados apresentados compõem uma amostra representativa de um conjunto de dez macroeletrodos com referência integrada (RI), limpos por condicionamento eletroquímico discorrido pelo item 4.2.2.

Eletrodos	I_{pa} / I_{pc}	mediana	Área efetiva (mm^2)	Variação ($A_e / A_g \times 100$ %)
R1106	0,976	0,0675	2,551	92,097
R1107	1,170	0,0690	2,249	81,211
R1109	0,995	0,0610	2,474	89,323
R1110	1,009	0,0610	2,433	87,826
R1111	1,063	0,0635	2,243	80,967

Fonte: Almeida (2014).

No caso específico de obtenção da área efetiva dos microeletrodos, Paixão e Bertotti (2009) descrevem o equacionamento para cálculo de área efetiva exposta em solução de acordo com o equacionamento Cottrelliano em estado estacionário (SZUNERITS; THOURIN, 2007):

No estado estacionário, a superfície do microeletrodo é envolvida por uma camada de difusão hemisférica. Com isso, a resposta para a alteração do potencial de um valor onde $j = 0$, para um valor onde o processo eletroquímico é controlado por difusão, pode ser descrita para um microeletrodo de disco pela equação 41:

$$j_l = \frac{zFD^{1/2}c}{4zFDc} + \frac{\pi^{1/2}t^{1/2}}{\pi} \quad (41)$$

onde, j_l é definido como densidade de corrente no estado estacionário, z é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa, c é a concentração da espécie eletroativa no seio da solução, t é o tempo após a alteração para o potencial onde o processo eletroquímico é governado por difusão e r corresponde ao raio do microeletrodo. O primeiro termo da equação é idêntico ao definido para um degrau de potencial para eletrodos de tamanho convencional e o segundo termo é o que define a condição de estado estacionário. Nota-se pela análise da equação 41 que o primeiro termo é dominante em tempos curtos e o segundo, em tempos longos. Além disso, existe um valor intermediário, com

relação ao tempo, onde a equação deve ser utilizada na sua forma completa. Vale salientar que essas condições de contorno na equação 41 são dependentes do raio do microeletrodo. Dessa forma, na condição de estado estacionário a equação é descrita pela equação 42:

$$j_L = \frac{4zFDc}{\pi} \quad (42)$$

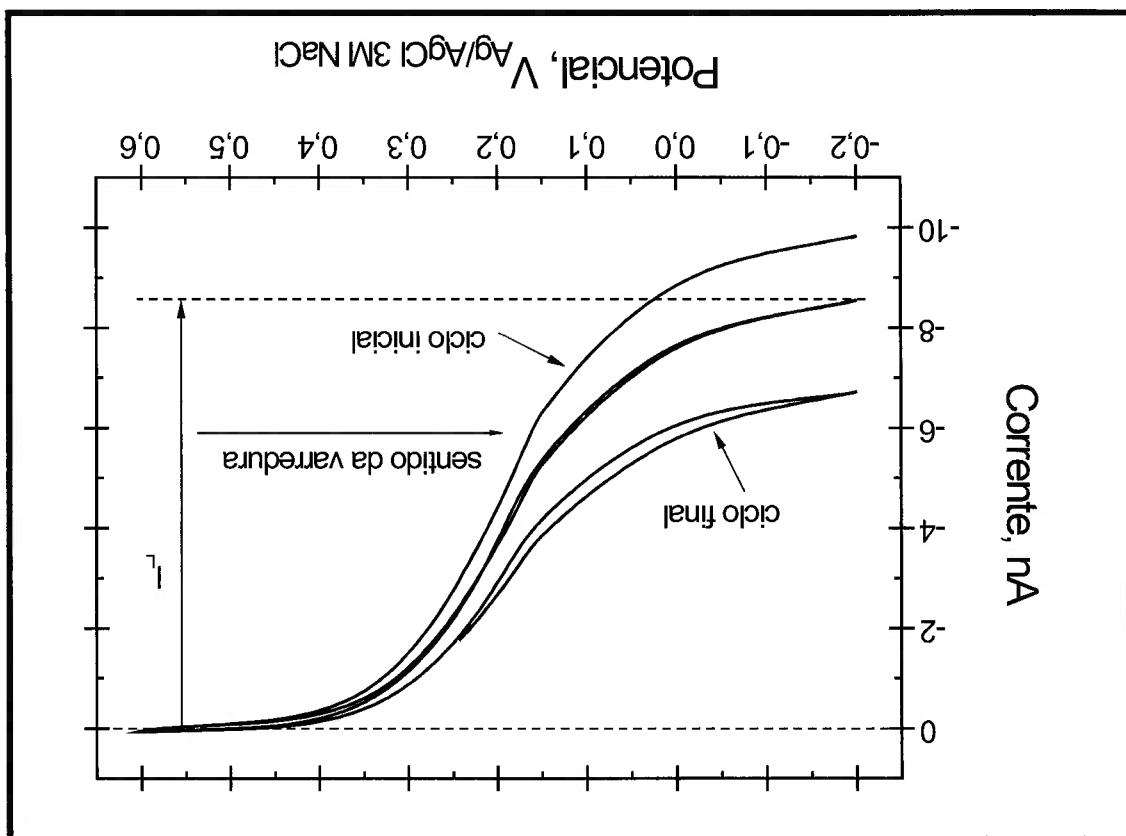
e a corrente pela equação 43:

$$I_L = 4zFDcr \quad (43)$$

onde I_L é definido como corrente no estado estacionário. Extraído de Paixão e Bertotti (2009).

A área efetiva dos microeletrodos de medição (MF-2006 da BASI®) foi calculada a partir do voltamograma cíclico, de onde foi extraída a corrente de saturação (também chamada de corrente limite I_L) - ver Figura 25.

Figura 25 - Voltamogramas padrão à velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$ em solução ($1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,10 \text{ mol cm}^{-3}$ de KNO_3), após o condicionamento eletroquímico.



Em geral, para microeletrodos de ouro, a área efetiva triplica com o procedimento de condicionamento eletroquímico (ALMEIDA, 2009, p. 77-80; ALMEIDA; SANTOS FILHO, 2013). Neste caso, o incremento de área foi observado na ordem de 300% (voltamograma estabilizado, ciclo final na Figura 25). Por outro lado, os microeletrodos fotografados com SU-8 (sensores integrados) têm uma geometria no formato de degrau (4 µm de altura), isto não permitiu utilizar o condicionamento eletroquímico em fluxo ($\geq 5 \text{ ml min}^{-1}$). O degrau impede que a solução em fluxo atue por toda a superfície do microeletrodo de ouro. Para resolver esse problema, a limpeza química tradicional - descrita no item 4.2.1 e comentada no item 5.2 - foi empregada e os resultados de área efetiva foram similares aos extraídos com o procedimento de condicionamento eletroquímico - ver Tabela 9.

Tabela 9 – Os resultados apresentados comõem uma amostra representativa de um conjunto de vinte microeletrodos de ouro fotografados com SU-8, limpos por limpeza química tradicional descrita no item 5.2.

Microeletrodos	Área geométrica estimada (µm ²)	Área efetiva calculada (µm ²)	Variação (A _e / A _g) x 100 (%)
µE A	78,50	233,70	297,71
µE B	78,50	131,46	167,46
µE C	78,50	178,93	227,94
µE D	19,62	58,42	297,76
µE E	12,56	22,82	181,69

Fonte: Almeida (2014).

A área efetiva média calculada empregando a equação de Cottrell (SZUNERTS; THOUIN, 2007) para microeletrodos ($r = 5 \text{ µm}$) limpos em condicionamento eletroquímico (não mostrado na Tabela 9) e limpos com limpeza química tradicional foi de 260 µm^2 (MF-2006 da BASI®) e 182 µm^2 (sensor integrado), respectivamente.

5.3.2 Eletrodos de Medição: Eletropolimerização de Polímeros Condutores

A seguir, apresentamos os voltamogramas cíclicos para eletropolimerização dos monômeros. Após o estudo das faixas de potenciais para a eletrodeposição dos

polímeros (Tabela 10), os gráficos PANI, poli(1,2-DAB), poli(1,3-DAB) e PPI (Figura 26a,b,c,d, respectivamente) indicaram uma situação de influência de espécies químicas comentadas no comportamento eletroquímico durante a eletrodeposição desses polímeros. Polímeros nessa situação inviabiliza a sensibilidade para a situação adequada (Figura 26e,f) para aplicá-lo na medição de nitrato.

Após testes intensivos de eletropolimerização dos monômeros sobre a superfície de macroeletrodos de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$), chegamos à conclusão que depositar polímeros na faixa de potencial com menor influência de ions hidrogênio (início das correntes catódicas) e de hidroxilas (corrente catódica ao final da eletropolimerização mínima possível) permite otimizar a sensibilidade na medição de nitrato. A seguir, os resultados empíricos estão apresentados na Figura 26 e na Tabela 10.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos de eletropolimerização dos filmes poliméricos (70 ciclos a $0,050 \text{ V s}^{-1}$, as setas na vertical indicam decaimento de corrente durante a eletrodeposição dos polímeros ou o sentido da varredura). a) polianilina, b) poli(1,2-cis/trans-diaminobenzeno), c) poli(1,3-diaminobenzeno) e d) polipirrol foram polimerizadas usando uma faixa de potencial entre (0 e $+0,700$) $\text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$; e entre ($+0,200$ e $+0,850$) $\text{V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ para eletrodepositar e) poli(imidazol) um microeletrodo e f) poli(imidazol) três microeletrodos.

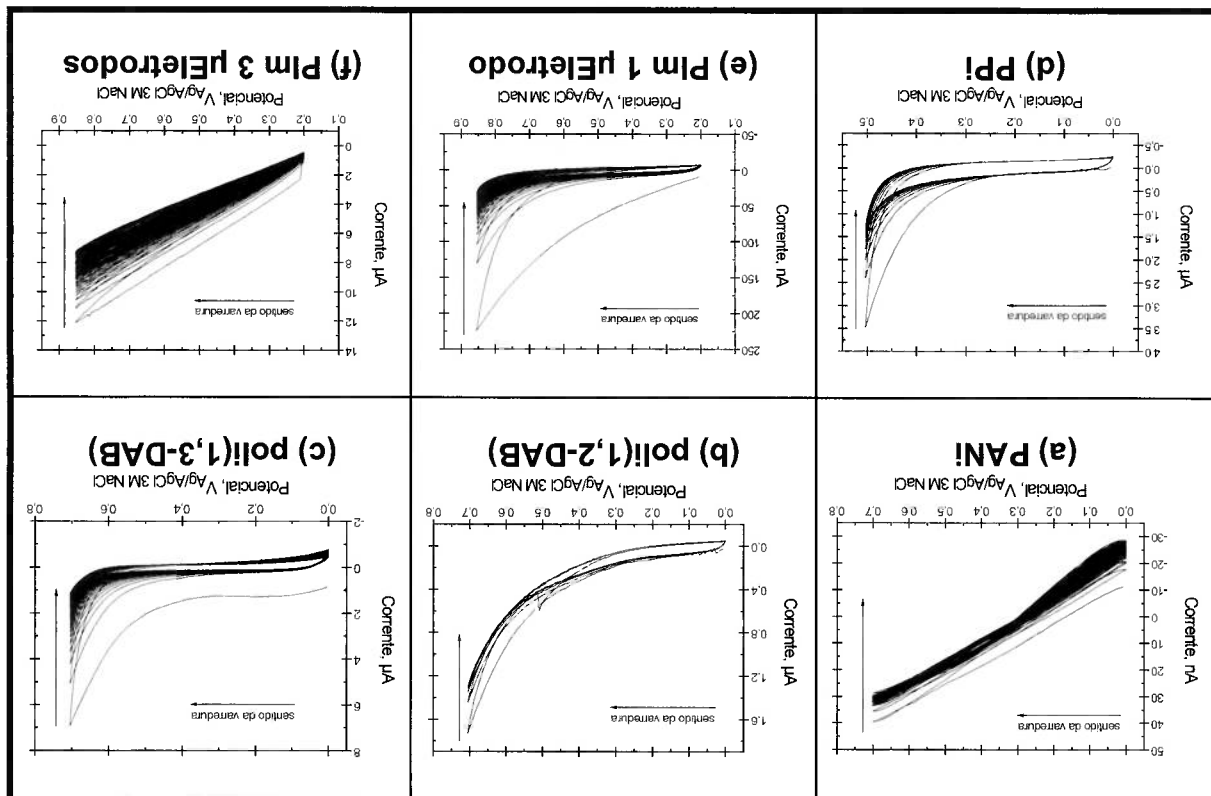


Tabela 10 – Faixa de potenciais, sob a influência dos íons hidrogênio a gás hidrogênio, da oxidação da água, das hidroxilas e do gás oxigênio, para a melhor condição de eletropolimerização dos monômeros.

Monômeros	Influência do H^+ a H_2	Influência redox de H_2O , OH^- e O_2	Faixa de deposição
1,2-DAB	$\leq +0,20$	$+0,20 \geq +0,50$	$+0,20$ a $+0,70$
1,3-DAB	$\leq +0,30$	$+0,30 \geq +0,60$	$+0,30$ a $+0,70$
anilina	$\leq +0,30$	$+0,30 \geq +0,50$	$+0,30$ a $+0,70$
pirrol	$\leq +0,30$	$+0,30 \geq +0,60$	$+0,30$ a $+0,75$
imidazol	$\leq +0,20$	$+0,20 \geq +0,50$	$+0,20$ a $+0,85$

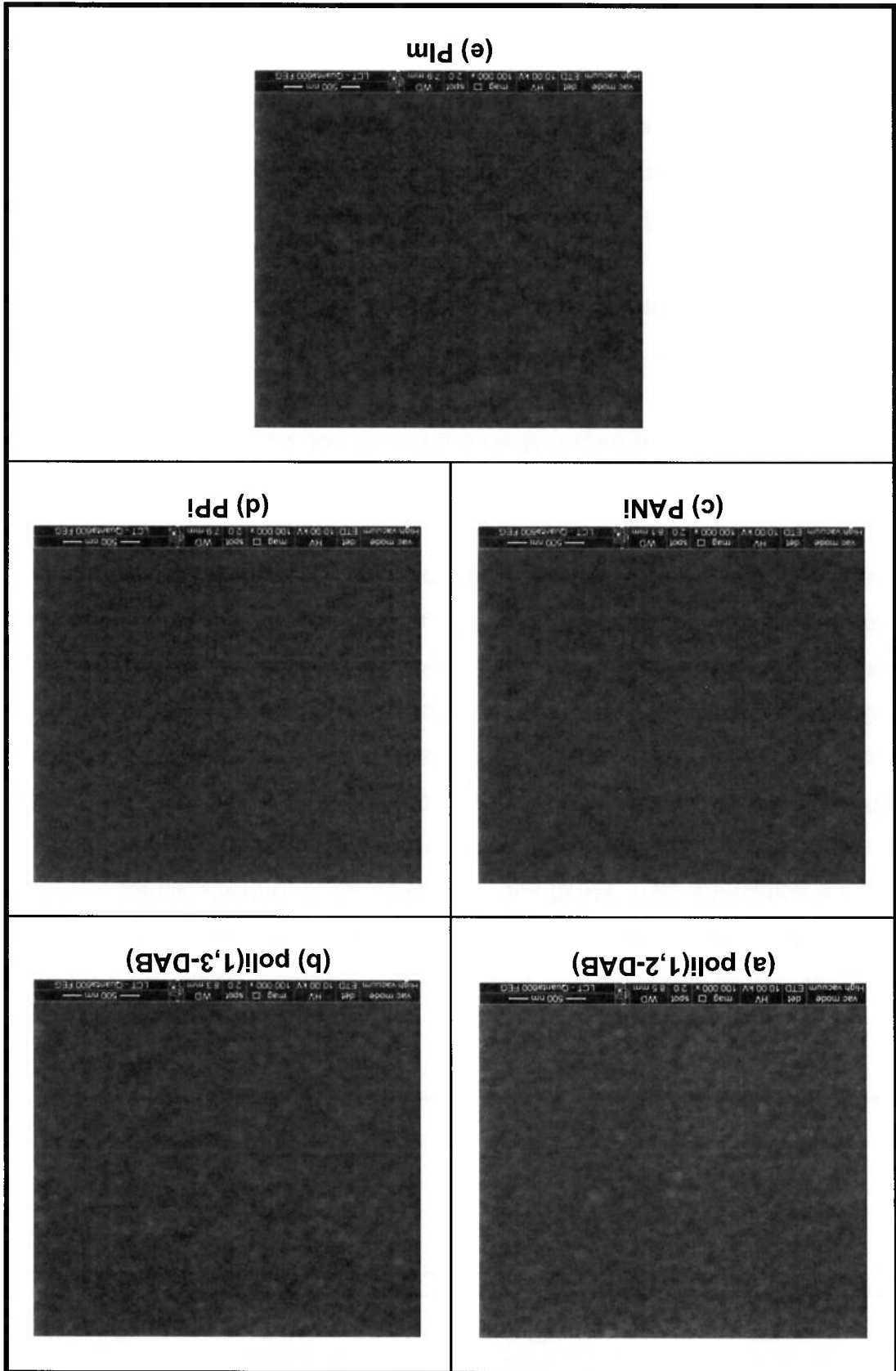
Fonte: Almeida (2014).

A Figura 26 mostrou os voltamogramas padrões com 70 ciclos de varredura para a eletropolimerização dos polímeros condutores. Utilizar um número maior de ciclos não interfere significativamente na espessura dos filmes, mas intensifica a influência de H^+ , OH^- e O_2 . O contrário, poucos ciclos de varredura, têm-se filmes muito delgados (< 5 nm), sendo inadequado para medição eletroquímica do nitrato (os efeitos de adsorção e absorção das espécies químicas são mais pronunciados). Diante disso, as faixas adequadas de potenciais para eletrodeposição dos polímeros foram estabelecidas de acordo com a influência de íons de hidrogênio reduzidos a gás hidrogênio e a influência da água ou dos íons hidroxilas oxidados a gás oxigênio que permanece dissolvido na solução de deposição. Deste modo, evitando a influência dos íons de hidrogênio, hidroxilas e oxigênio.

5.3.3 Caracterização Física dos Eletrodos de Medição por MEV

A seguir (Figura 27) serão apresentadas as imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície dos polímeros condutores com a finalidade de compreender as propriedades morfológicas. As imagens MEV foram gravadas com o detector *Everhart-Thornley Detector* (ETD) de alto vácuo, energia de 10 kV e *spot 2*, cujas escalas estão com barra de 500 nm. Observa-se que PANI, poli(1,2-DAB), poli(1,3-DAB) e poli(imidazol) apresentam morfologias superficiais muito similares e o PPI difere ligeiramente. Os nódulos poliméricos são compactos e homogêneos, entre 5 e 10 nm de diâmetro. Os filmes têm rugosidade moderada [da ordem de (10 a 30) nm extraídas por perfilometria no perfil de vale-pico].

Figura 27 – Imagens da superfície dos polímeros condutores obtidas por MEV com detector ETD de alto vácuo, energia de 10 kV e spot 2. a) poli(1,2-cis/trans-diaminobenzeno), b) poli(1,3-diaminobenzeno), c) polianilina, d) polipirrol e e) poli(imidazol).



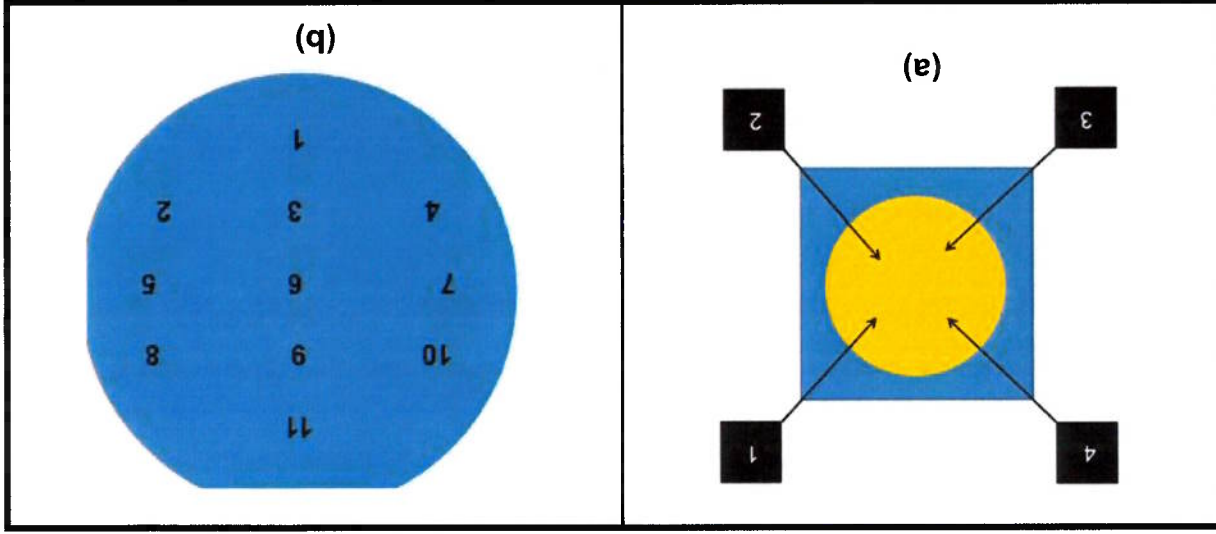
As espessuras médias serão discutidas a seguir, considerando os polímeros condutores relevantes ao trabalho de doutorado (poli(imidazol), poliuretano e polipirrol). PANI, poli(1,2-DAB) e poli(1,3-DAB) não foram caracterizados quanto às espessuras dos filmes, pois não foram utilizados na obtenção dos resultados finais desta tese, pelos seguintes motivos:

- i. significativa influência dos interferentes intrínsecos à SQR (itens 4.6.2 e 5.6);
- ii. baixa ou nenhuma sensibilidade ao nitrato (itens 5.6 e 5.7); e
- iii. a funcionalização desses polímeros com cobre(II) não possibilitou resultados conclusivos na medição do nitrato (item 5.6).

5.3.4 Caracterização Física dos Polímeros de Medição por Perfilometria e do Óxido de silício por Elipsometria

A seguir, apresentamos os resultados de espessuras obtidos por perfilometria (Tabela 11) e por elipsometria (Tabela 12). A técnica de perfilometria foi utilizada para medir as espessuras dos filmes poliméricos, de acordo com os quatro pontos indicados na Figura 28a. Por outro lado, a técnica de elipsometria foi utilizada para obter os valores da espessura do óxido de silício, crescido sobre a lâmina de silício. Depois da oxidação térmica do óxido de silício foi medido a espessura do filme SiO_2 de acordo com os pontos indicados na Figura 28b.

Figura 28 – Em (a), o esquema - para eletrodos quadrados e circulares com a indicação dos pontos de medição de espessura, realizadas com a técnica perfilométrica e em (b), o esquema para medição por elipsometria.



A Tabela 11 apresenta os valores médios dos filmes poliméricos eletrodepositados sobre macroeletrodos de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$). As espessuras foram calculadas de acordo com as cargas eletrodepositadas (ALMEIDA, 2009, p. 86). As espessuras médias são da ordem de 193,8 nm (0,52 mC), 619,5 nm (204 mC) e 24,0 nm (0,40 mC) para poli(imidazol), poliuretano e polipirrol, respectivamente. Para o imidazol, o incremento de carga depositada está diretamente relacionada ao aumento de espessura do filme. No caso do pirrol e uretano, observamos resultados adversos entre a carga depositada e a espessura dos filmes (não mostrados); portanto, nada podemos concluir.

Tabela 11 – Por perfilometria, os valores das espessuras dos polímeros condutores depositados, de acordo com a marcação na Figura 28a, em macroeletrodos de ouro.

Eletrodo	Polímero	Carga depositada mC	Espessura média nm
PXXVIII	imidazol	0,24	39,5 \pm 3,5
PVI	imidazol	0,52	193,8 \pm 5,3
PVII	imidazol	9,96	705,3 \pm 4,2
PXVI	pirrol	204	619,5 \pm 10,4
PXIX	uretano	0,40	24,0 \pm 2,2

Fonte: Almeida (2014).

Tabela 12 – Valores das espessuras medidas do óxido de silício foram extraídos de acordo com a Figura 28b, justamente com os índices de refração.

Medida	Espessura nm	Índice de refração
1	181,1	1,453
2	181,6	1,451
3	180,8	1,453
4	181,0	1,453
5	182,4	1,452
6	181,8	1,452
7	181,6	1,453
8	182,7	1,453
9	182,8	1,452
10	183,5	1,452
11	183,8	1,452

Fonte: Almeida (2014).

É importante destacar que não foi possível estabelecer uma relação confiável entre as espessuras medidas e as espessuras calculadas (ALMEIDA, 2009, p. 86) para os macroeletrodos, pois estudos adjacentes serão necessários para modelar o comportamento eletroquímico na eletrodeposição dos filmes poliméricos. No geral, a espessura calculada pela carga depositada foi 10 vezes menor que a espessura média medida. Para os microeletrodos, a teoria para o cálculo de espessura por eletrodeposição não se aplica, pois o erro está na ordem de 12 10%. Outro agravante, a geometria dos microeletrodos fotografados [4 µm de altura do degrau (SU-8 fotografado) por (2 a 7,5) µm de raio] não permitiu, por perfilometria e por Microscopia Confocal, medir as espessuras dos polímeros depositados.

5.4 Eletrodos de Referência

Neste item apresentamos um procedimento de construção e de caracterização de um macroeletrodo planar de referência em estado sólido (macroEPRES), com potencial conhecido e estável em solução de análise e que permita integrá-lo a microeletrodos de medição de ouro, possibilitando desenvolver sensores encapsulados em lâmina de silício.

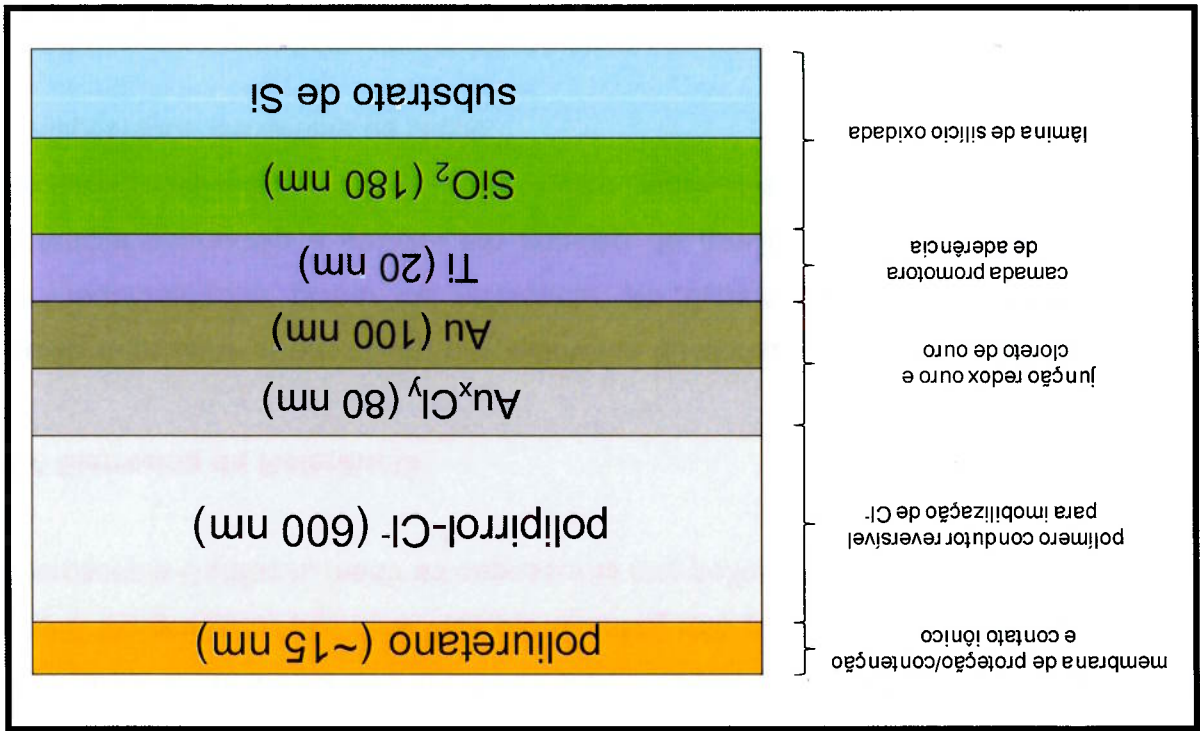
Para tal, seguimos três abordagens:

- i. eletrodo de pseudo-referência (EPER) de junção redox prata / cloreto de prata (Ag/AgCl);
- ii. macroEPRES de junção redox Ag/AgCl, eletrólito em estado sólido PFI com cloretos e membrana de proteção/contenção e de contato iônico de TEOS, TEOS-HFE ou PU; e
- iii. macroEPRES de junção redox ouro / cloreto de ouro (Au/Au^xCl_y), eletrólito em estado sólido PFI com cloretos e membrana de proteção/contenção e de contato iônico de TEOS, TEOS-HFE ou PU.

O EPER difere dos demais eletrodos de referência completos pelo fato de filme de Ag/AgCl - que tem a função de junção redox - estar em contato direto com a solução química de análise, sem controle da concentração de cloretos. Também, recebe influência direta da variação de pH e de outros íons presentes na solução de análise.

Buscando evitar essas ocorrências, desenvolvemos eletrodos macroEPRES neste doutorado, os quais têm eletrólito em estado sólido preservando a junção redox. A Figura 29 ilustra as camadas para obtenção de um macroEPRES para uma junção redox Au/Au_xCl_y.

Figura 29 – Esquema de camadas para obtenção do eletrodo de referência em estado sólido com junção redox Au/Au_xCl_y.



Fonte: Almeida (2014).

O próximo tópico apresentará as abordagens I e II para obtenção dos macroEPRES. Isto é, além da junção redox há um eletrólito em estado sólido com uma concentração conhecida de Cl⁻, permitindo a preservação da junção redox na forma oxidada. Por fim, uma membrana foi depositada para proteção/contenção dos Cl⁻ no interior do eletrólito em estado sólido e que, ao mesmo tempo, permita contato iônico do eletrodo com o meio externo (solução de análise).

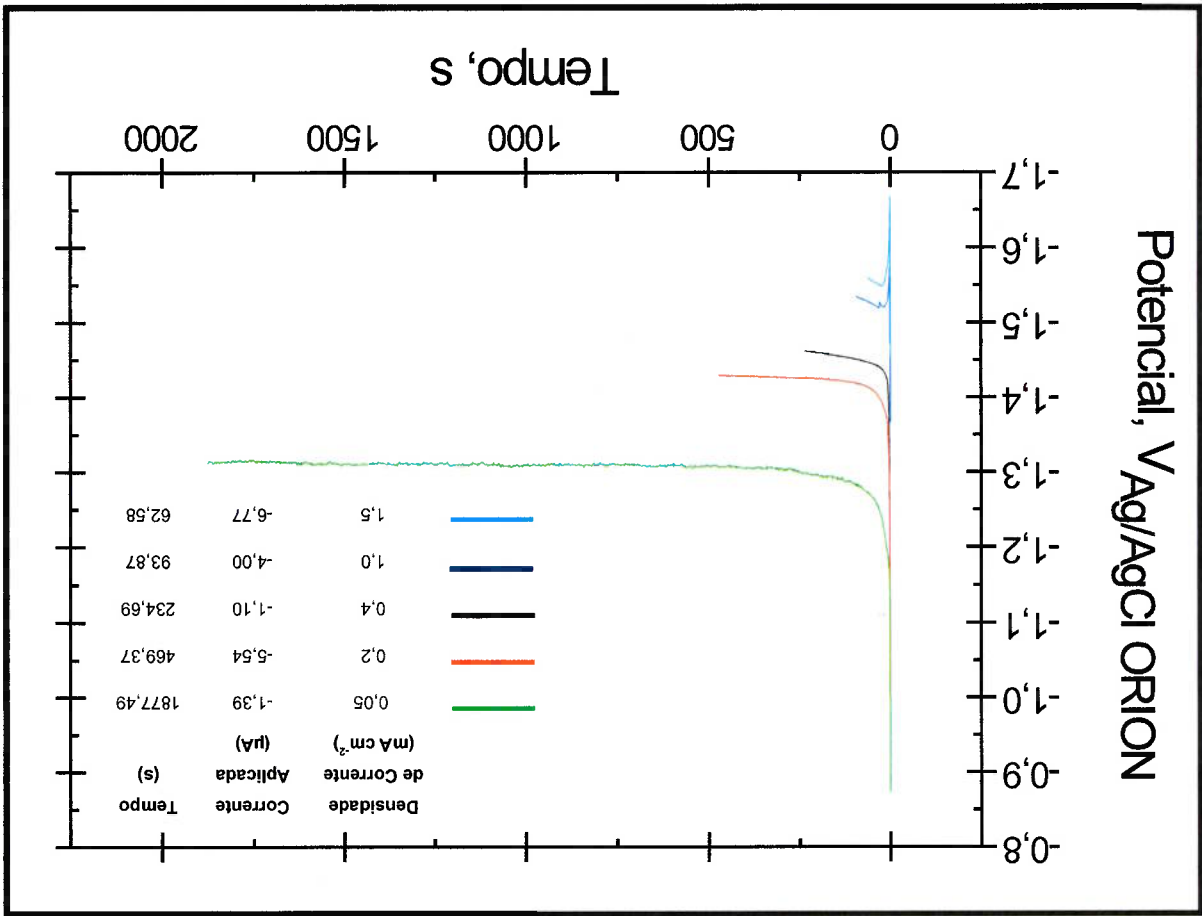
5.4.1 Fabricação e Caracterização da Junção Redox

A seguir apresentamos a fabricação e caracterização das junções de oxirredução Ag/AgCl e Au/Au_xCl_y quanto à espessura, à rugosidade e ao erro do processo de fabricação.

Abordagem I: EPER com junção redox Ag/AgCl.

Considerando os eletrodos de ouro limpos de acordo com o procedimento descrito anteriormente no item 5.1, primeiramente, foi realizada a deposição de prata sobre o macroeletrodo de ouro em suporte PCI [$4,51 \pm 0,01$ mm²] em solução comercial SILVREX-S agitada a 400 rpm e com uma célula eletroquímica fechada, em ambiente contínuo de fluxo de nitrogênio. Por cronopotenciometria³², a corrente foi aplicada com relação ao eletrodo anodo de platina (1 cm²). Uma sequência de experimentos foi realizada para verificar a densidade de corrente adequada, empregando-a nas eletrodposições de prata (Figura 30). As densidades de corrente investigadas foram (0,05; 0,2; 0,4; 1,0 e 1,5) mA cm⁻².

Figura 30 – Experimentos para averiguar a densidade de corrente adequada na eletrodposição de prata (100 nm de espessura), utilizando a solução química SILVREX-S.



Fonte: Almeida (2014).

³² Cronopotenciometria corresponde à técnica eletroquímica em que um dado valor de corrente eletroquímica é fixado e a resposta em potencial eletroquímico é gravada no decorrer do tempo.

Os testes estão sistematizados na Tabela 13, considerando a espessura teórica calculada de 100 nm e os valores de espessura média medida, o teste IV se aproxima mais do valor teórico calculado.

Tabela 13 – Medições das espessuras dos filmes de prata e comparações da espessura teórica calculada e os valores de espessura média medida.

Eletródos	Densidade	Espessura	Espessura	Erro
	(mA cm ⁻²)	teórica	calculada	
		(nm)	(nm)	(%)
Teste I	0,05	100	217,15	117,15
Teste II	0,20	100	271,23	171,22
Teste III	0,40	100	236,13	136,12
Teste IV	1,00	100	131,78	31,78
Teste V	1,50	100	246,95	146,95

Fonte: Almeida (2014).

A partir dos experimentos realizados, a densidade de corrente mais adequada para a eletrodeposição de prata foi de 1,0 mA cm⁻². O erro pertinente ao processo de fabricação foi da ordem de 30%, bem abaixo dos demais entre 117% e 170% (Tabela 13).

Usando a densidade de corrente estudada, a eletrodeposição de prata foi realizada para espessuras de 1 µm (pois a 100 nm se observou considerada ocorrência de defeitos pontuais - pontos escuros - na superfície do filme e deposição não homogênea de prata, veja a Figura 32a). Nos gráficos indicados na Figura 31 para eletrodeposição de prata, observam-se um decaimento do potencial eletroquímico e, posteriormente, após 300 s, ocorre a estabilização aproximada do potencial permanecendo constante ao longo do tempo. Portanto, verificou-se que o processo de eletrodeposição de prata é bem controlado (Figura 31).

Dez eletródos de área geométrica (2,77 ± 0,01) mm² foram usados para eletrodepositar prata utilizando uma solução química SILVREX-S agitada a 400 rpm e uma corrente eletroquímica de 27,7 µA (que corresponde a 1 mA cm⁻²) durante 938,74 s para obter filmes de 1 µm de espessura (a Figura 31 apresenta uma

amostragem de cinco eletrodos que representam o comportamento padrão de eletrodeposição).

Figura 31 – Filme de prata eletrodepositado a $1,0 \text{ mA cm}^{-2}$ de densidade de corrente, com espessura de $1 \mu\text{m}$ sobre macroeletrodos de ouro cuja área geométrica é de $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$.

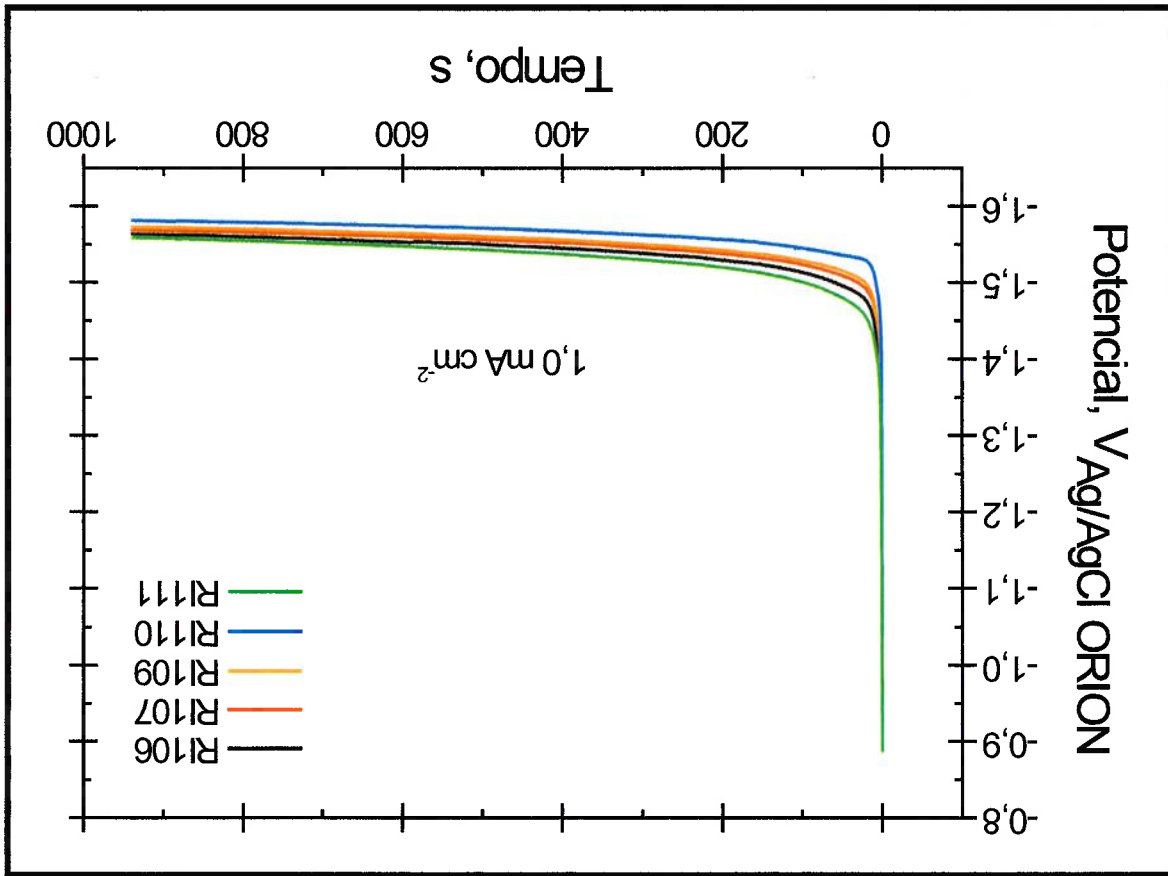


Tabela 14 – Eletrodeposição cronopotométrica de prata sobre ouro. Mostram-se os valores de área efetiva exposta em solução de ferricianeto de potássio calculada a partir do equacionamento de Randles-Sevick, a comparação entre a espessura teórica esperada e a espessura média medida e erro sobre o valor de espessura teórica esperada (ϵ_{esp}).

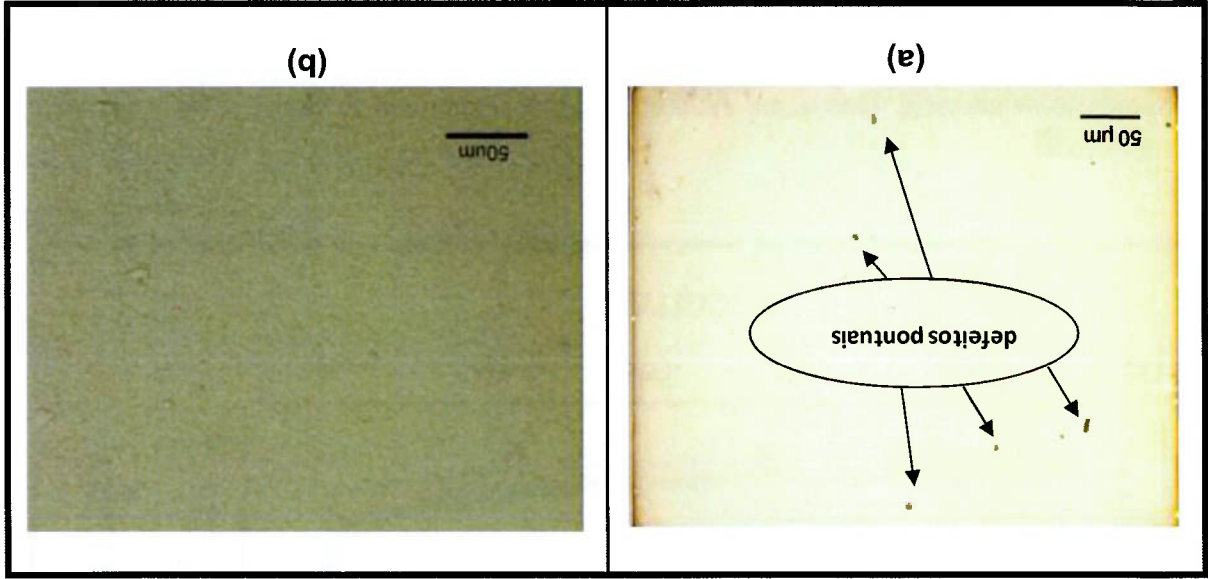
Eletrodos	Área Efetiva (mm^2)		Espessura Teórica (μm)		Espessura Média (μm)		Erro ϵ_{esp} (%)
	Área Efetiva	Área Aplicada	Corrente	Corrente	Esperada	Médida	
R1106	2,551	27,7	1,09	1,04	1,08	1,04	-4,7
R1107	2,249	27,7	1,23	1,08	1,08	1,08	-11,9
R1109	2,474	27,7	1,12	1,00	1,12	1,00	-11,1
R1110	2,433	27,7	1,14	1,05	1,14	1,05	-8,3
R1111	2,243	27,7	1,23	1,07	1,23	1,07	-12,8

Fonte: Almeida (2014).

Na Tabela 14, as espessuras teóricas calculadas e esperadas (para variação de área efetiva exposta em solução química) e as espessuras médias medidas foram sistematizadas.

A obtenção de filme eletrodepositado de prata com boa aderência, homogêneo, livre de impureza e defeitos pontuais é a chave para desenvolver EPER com alta eficiência (mínima variação de potencial ao longo do tempo, a ser discutido em detalhes). De acordo com as imagens, a Figura 32b (filme de prata eletrodepositado com 1 μm de espessura) tem qualidade de superfície superior a do filme (100 nm) apresentado na Figura 32a, demonstrando que filmes de prata com 1 μm de espessura atendem às condições de eletrodeposição supracitadas.

Figura 32 – Imagens obtidas por Microscopia Óptica do filme de prata. a) espessura de 100 nm com ocorrência de defeitos pontuais na superfície da prata b) prata com 1 μm de espessura, na mesma escala de ganho, não se observa uma quantidade significativa de defeitos.



Fonte: Almeida (2014).

Na Figura 33, observam-se as impurezas que advêm do eletrodo de ouro não limpo e do processo de eletrodeposição de prata, quando ocorre alguma avaria (Figura 33c).

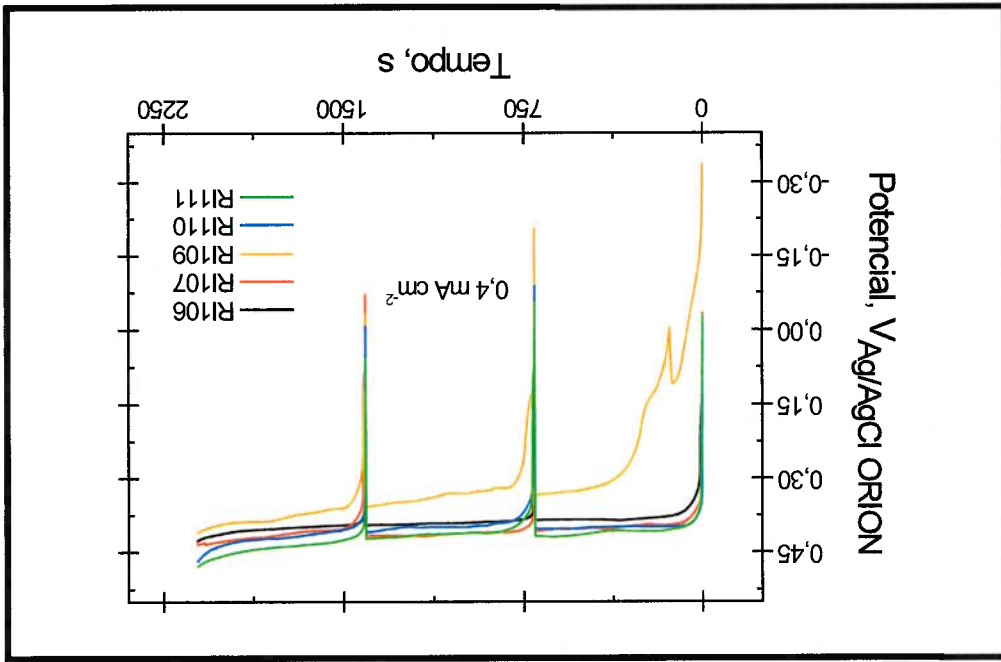
Figura 33 – Imagens obtidas por Microscopia Óptica dos filmes de ouro e de prata. a) superfície de ouro não limpa, b) ouro após a limpeza química (já comentado no item 5.1 e 5.2) e c) a ocorrência de particulado sobre a prata eletrodepositada.



Fonte: Almeida (2014).

Após superar os problemas decorrentes da eletrodeposição da prata, a solução $0,1 \text{ mmol cm}^{-3}$ de HCl sem agitação foi utilizada para reagir cloreto sobre a prata eletrodepositada, eletroformando³³ o filme cloreto de prata (AgCl) que comporá a junção redox Ag/AgCl do EPER. A seguir, apresentamos os gráficos de comportamento padrão durante os processos de cloretação da prata (Figura 34).

Figura 34 – Cloreto reagido sobre a prata em três etapas de forma a permitir melhor aderência e maior estabilidade do filme AgCl eletroformado.



Fonte: Almeida (2014).

³³ O conceito de eletroformação se refere à reação eletroquímica de cloretação sobre um metal (prata ou ouro) para formar o filme AgCl ou AuCl₂.

Um eletrodo de platina (1 cm^2) foi usado como anodo e uma densidade de corrente de $0,4 \text{ mA cm}^{-2}$ ($11,1 \mu\text{A}$ para uma área ativa de $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$) foi aplicada no eletrodo com prata eletrodepositada para cloretação por três etapas de 701,5 s cada. A Tabela 15 mostra os valores de espessuras calculadas e medidas, o erro experimental e as rugosidades, do inglês *root mean square* (RMS), para cada eletrodo amostrado.

Tabela 15 – Parâmetros para reagir cloreto sobre prata e comparações entre a espessura teórica calculada e espessura medida e a rugosidade RMS obtida por técnica de Microscopia Confocal.

Eletrodos	Densidade de corrente (mA cm^{-2})	Corrente aplicada (μA)	Tempo (s)	Espessura teórica calculada (μm)	Espessura medida (μm)	Erro (%)	Rugosidade RMS Confocal (nm)
R1106	0,4	11,1	2104,5	2,50	2,63	5,40	113
R1107	0,4	11,1	2104,5	2,50	2,07	-17,36	56
R1109	0,4	11,1	2104,5	2,50	2,58	3,28	50
R1110	0,4	11,1	2104,5	2,50	2,55	1,88	93
R1111	0,4	11,1	2104,5	2,50	2,49	-0,32	124

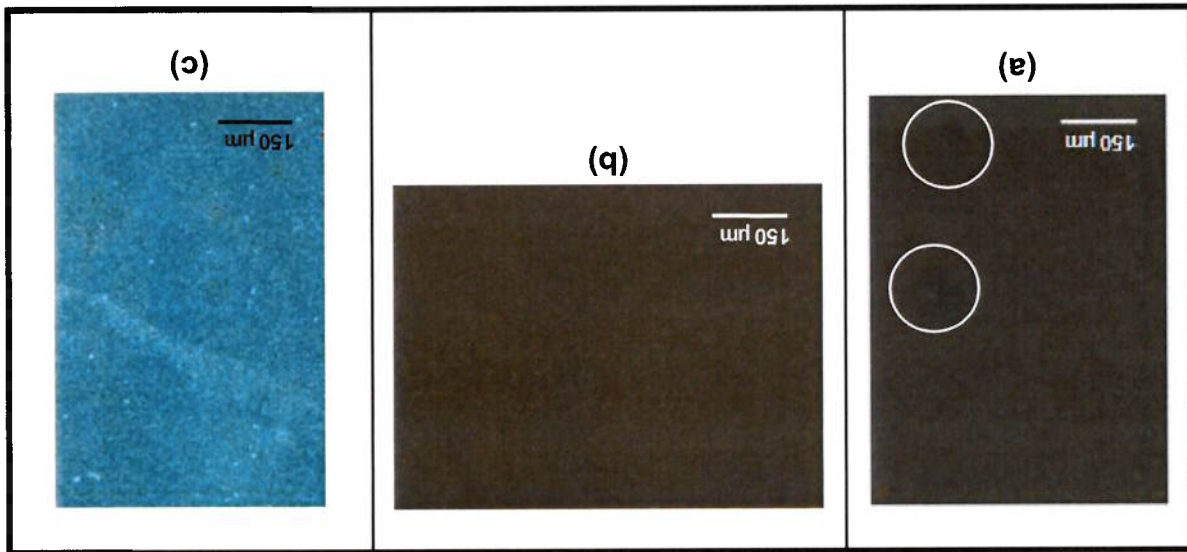
Fonte: Almeida (2014).

As Tabelas 14 e 15 indicaram que a espessura da prata e a espessura total do filme cloreto de prata estão em conformidade com os cálculos teóricos (ALMEIDA, 2009, p. 86). O erro correspondente à diferença da espessura calculada e da espessura média medida que varia de -17,36% a 6% para cloreto de prata, sendo um erro médio recorrente de 2,56% e para filme somente com a prata de -0,4% até 8,4%, sendo o erro médio recorrente de 4,74%.

O filme de cloreto reagido sobre a prata apresentou boa homogeneidade e aderência (campo claro, Figura 35b e campo escuro, Figura 35c), com rugosidade quadrática média RMS entre (50 e 200) nm (obtida por Microscopia Confocal, ver Figura 36). Por outro lado, a Figura 35a apresenta a ocorrência de alguns defeitos pontuais (círculos em branco) que pode ocasionar variação do potencial de referência ao longo do tempo. Na Figura 35c, observando o filme de cloreto de prata em campo escuro, notam-se regiões mais claras que indicam possíveis problemas. De acordo com trabalho anterior (ALMEIDA, 2009), a ocorrência de defeitos pontuais

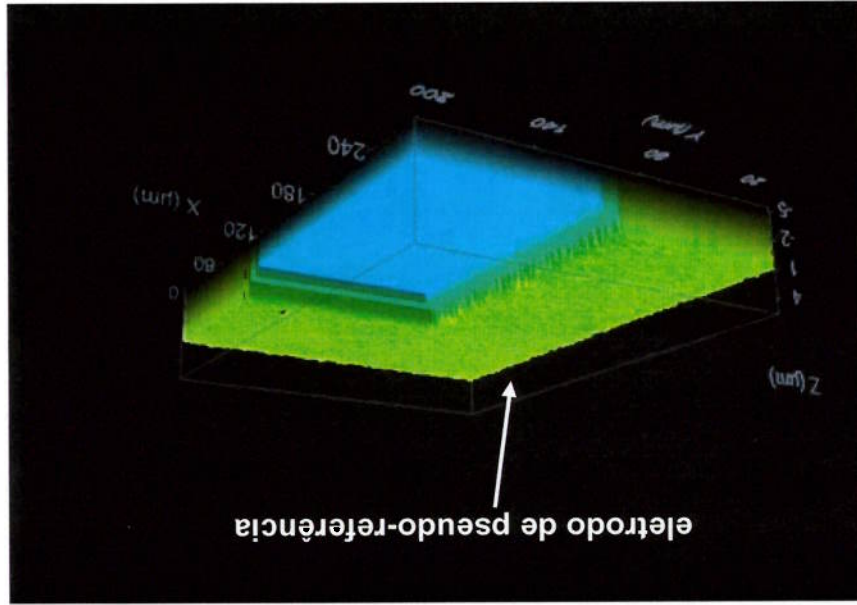
pode ser minimizada deixando o eletrodo acondicionado por 3 dias em soro fisiológico (0,15 mmol cm⁻³ a pH 7,2); detalhes mais adiante. No geral, 90% dos experimentos com os filmes de cloreto de prata - com 2,5 µm de espessura - foram satisfatórios. Não se despegaram do eletrodo e tiveram rugosidade e homogeneidade adequadas.

Figura 35 – Imagens por Microscopia Óptica do cloreto de prata (espessura total do filme de 2,5 µm). (a) filme AgCl com a ocorrência de alguns defeitos pontuais (círculos em branco), (b) filme AgCl com homogeneidade adequada (aumento: 20x / 0,40) e (c) campo escuro em filme AgCl de 2,5 µm de espessura.



Fonte: Almeida (2014).

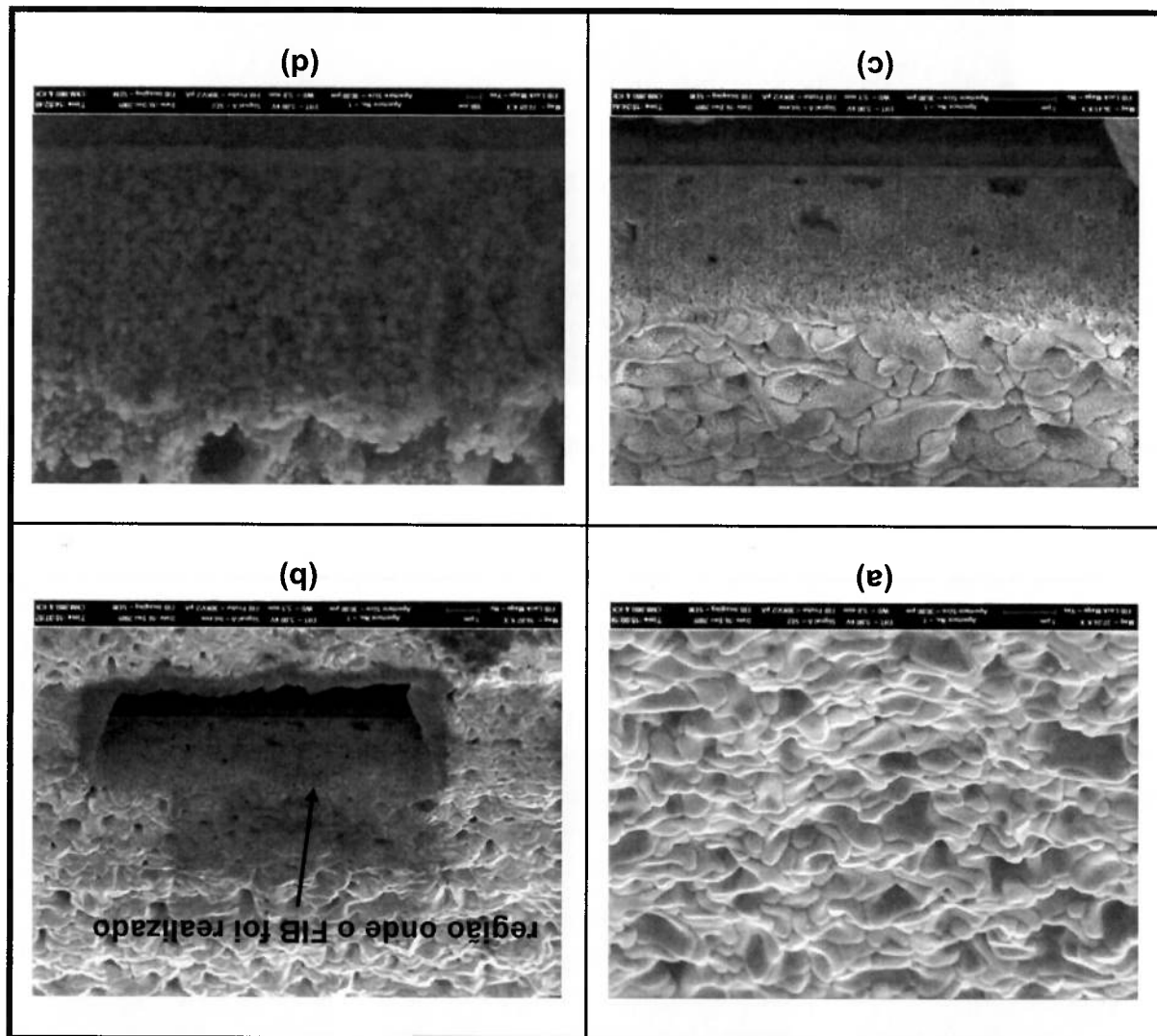
Figura 36 – Imagem obtida por Microscopia Confocal para obtenção das rugosidades RMS dos filmes de AgCl.



Fonte: Almeida (2014).

A superfície do filme cloreto de prata também foi analisada por MEV - energia *electron high tension* (EHT) de 5 kV e detector *secondary electron* (SE2) - com a técnica *Focused Ion Beam* (FIB) acoplada. O filme AgCl foi perfurado verticalmente até o silício com um comprimento de 10 µm usando a energia de 30 kV:2pA. Nosso objetivo foi estudar o filme AgCl em seu perfil (Figura 37b,c,d), e a morfologia superficial também pode ser vista na Figura 37a.

Figura 37 – Imagens obtidas por MEV (energia EHT de 5 kV e detector SE2) com técnica FIB acoplada (comprimento de 10 µm feito com energia de 30 kV:2pA). a) morfologia superficial do filme AgCl, b) região onde foi aplicado o FIB, c) perfil na vertical do filme AgCl e d) efeito de carregamento de elétrons no filme AgCl.



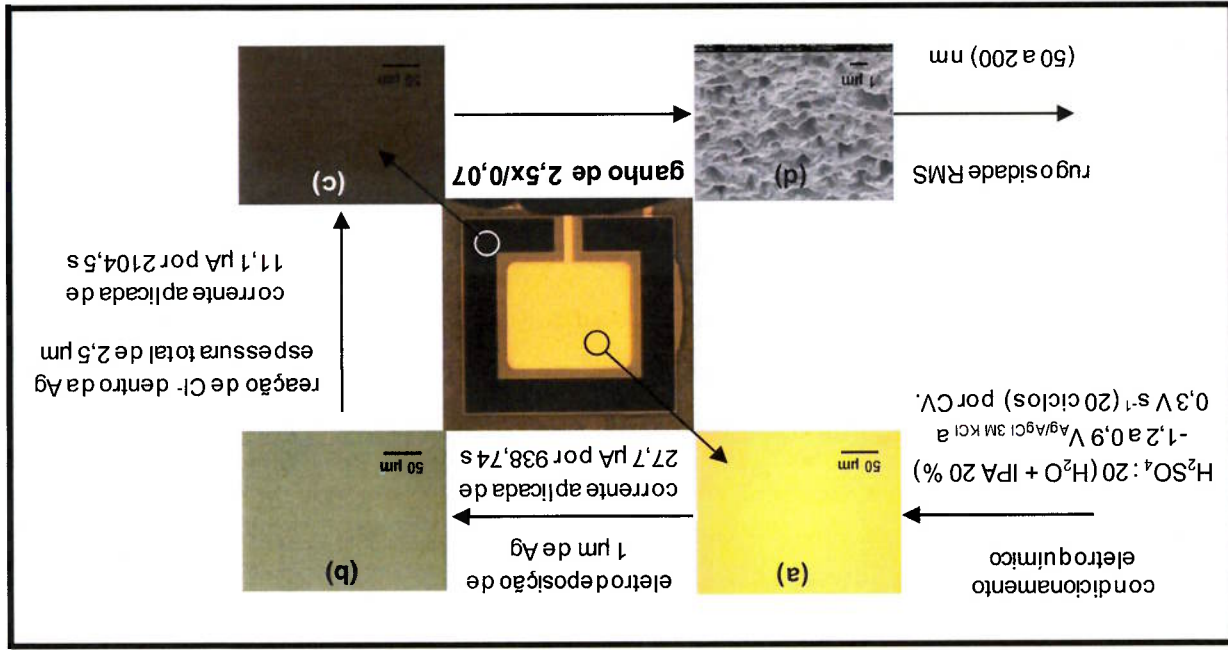
Fonte: Almeida (2014).

O filme AgCl se apresenta, em perfil (Figura 37c), com alguns vazios (pequenas cavidades próximas à interface do filme de prata sobre o ouro e do filme AgCl),

ocorridos principalmente nas primeiras camadas de deposição. No geral, as imagens MEV-FIB mostraram que na estrutura do filme AgCl é compacta para as camadas superiores da cloretação da prata (Figura 37c).

Na Figura 38, é apresentada a sequência de fabricação dos EPER Ag/AgCl. A partir de um macroeletrodo de ouro limpo (a), por meio do condicionamento eletroquímico escrito em detalhes nos itens 4.2.2 e 5.1, um filme de prata de 1 µm de espessura foi eletrodepositado a uma corrente de 27,7 µA por 938,74 s (b); depois este filme de prata foi reagido em solução contendo cloretos para formar o filme AgCl, aplicando Microscopia Confocal, cujo valores estiveram entre (50 e 200) nm. A cada etapa, os filmes foram caracterizados quanto à espessura de acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16.

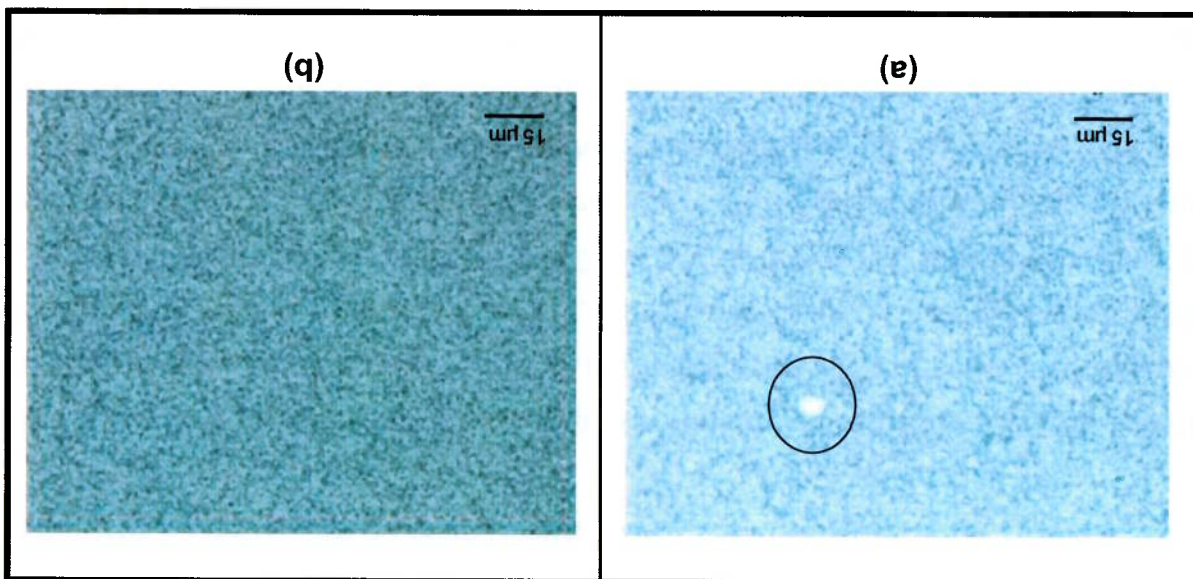
Figura 38 – Sequência de fabricação dos macroEPER de junção redox Ag/AgCl. (a) ouro limpo de acordo com o procedimento de condicionamento eletroquímico para macroeletrodos, (b) prata eletrodepositada, (c) filme de cloreto de prata e (d) imagem por MEV da superfície do filme cloreto de prata.



Fonte: Almeida (2014).

É importante destacar que os eletrodos recém-fabricados foram guardados por três dias em solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 7,2 para promover a estabilização do filme de cloreto de prata (Figura 39b).

Figura 39 – Por Microscopia Ótica em campo escuro. (a) antes do procedimento de acondicionamento e (b) após.



Fonte: Almeida (2014).

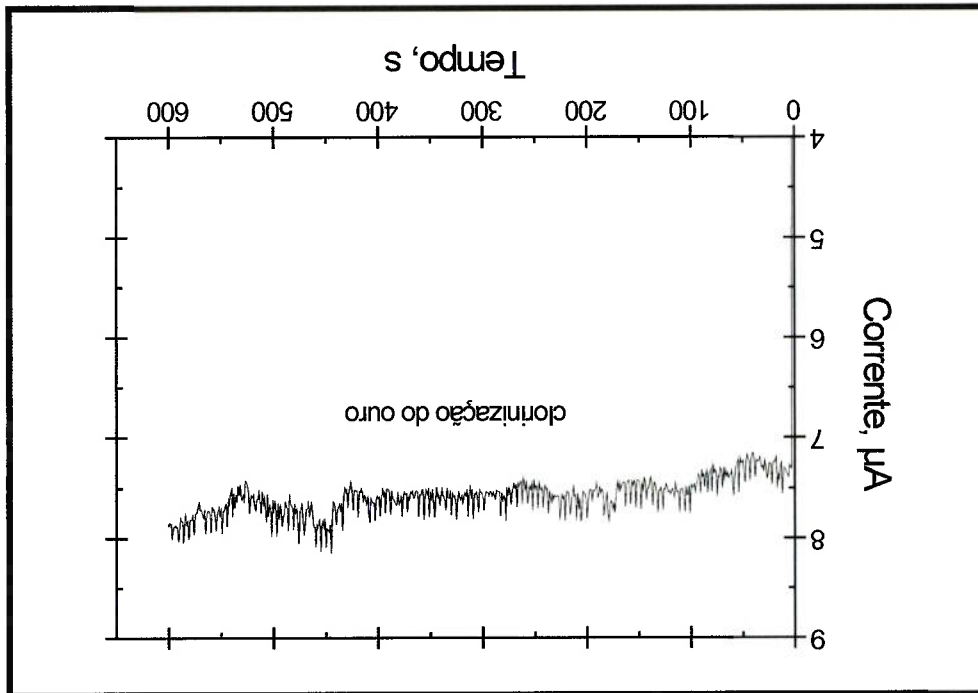
Foi observado que o procedimento de acondicionamento em solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,2 proporciona a complexação do filme AgCl pelos cloretos, privilegiando os sítios ativos da prata (ALMEIDA, 2009, p. 51 e 92-94). Isto permite um filme mais homogêneo e compacto, com redução de defeitos pontuais na superfície (veja dentro do círculo preto na Figura 39a). Após o acondicionamento (Figura 39b), os cloretos absorvidos no filme AgCl (superfície do eletrodo com coloração mais escura, principalmente nos vales) promovem uma estabilização do mesmo. Geralmente, o potencial dos eletrodos com filme AgCl não estabilizado é instável ao longo do tempo. O contrário ocorre com os eletrodos com filme AgCl acondicionado (ver os resultados descritos no item 5.4.4.2).

Abordagem II: fabricação da junção redox Au/Au_xCl_y, para compor a primeira etapa na construção do macroEPRES a partir de um macroeletrodo de ouro ($4,51 \pm 0,01 \text{ mm}^2$), limpo de acordo com a limpeza química tradicional (3 mmol cm^{-3} de H_2SO_4 e IPA) descrita no item 5.2.

Para obter o filme Au_xCl_y, o cloreto foi reagido sobre a superfície de ouro para formar a junção redox Au/Au_xCl_y que compõe o macroEPRES. A reação de cloração foi realizada em solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,2, a um potencial fixo de $+0,850 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ (densidade de corrente de $0,3 \text{ mA cm}^{-2}$) durante 10 min (Figura

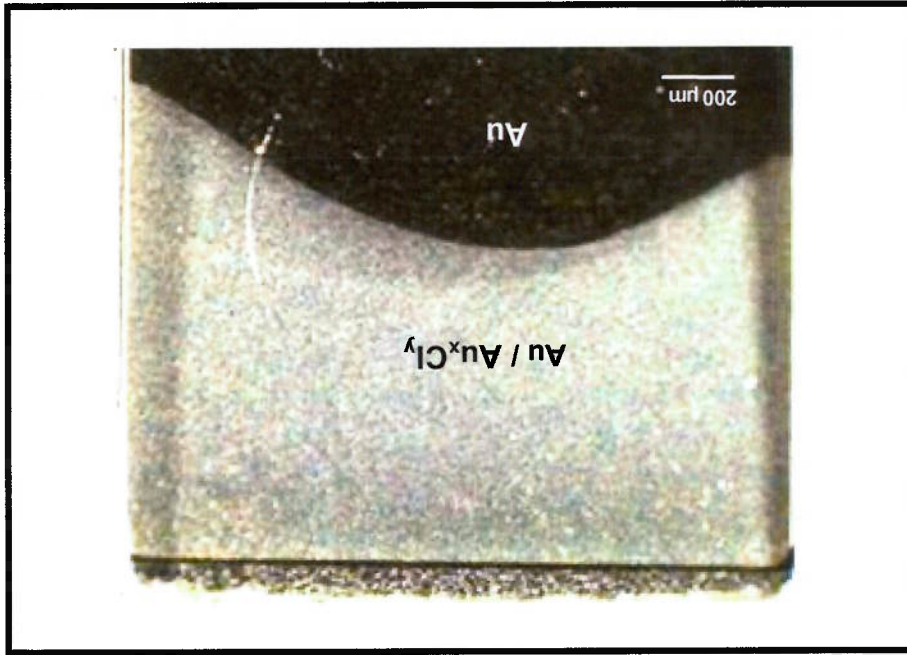
40). A carga integrada registrada durante o experimento de cloração foi de 4,5 mC, que permitiu uma espessura média calculada de 78,1 nm do filme de Au_xCl_y .

Figura 40 – Comportamento eletroquímico típico durante a reação de cloração de superfície de ouro, a um potencial fixo de +0,850 V_{Ag/AgCl} 3M NaCl durante 10 min em solução 0,15 mol cm⁻³ de NaCl com pH 7,2.



Fonte: Almeida (2014).

Figura 41 – Por Estereoscopia Óptica, imagens dos filmes de ouro clorado. Comparação entre o ouro clorado e ouro não modificado.



Fonte: Almeida (2014).

O macroeletrodo de ouro [(4,51 ± 0,01) mm²] foi limpo mediante os procedimentos de limpeza química tradicional, descrito em 4.2.1. Posteriormente, de acordo com os parâmetros descritos acima, cloretos reagiram com ouro utilizando cronopotenciometria³⁴ (Figura 40). Potencial aplicado de +0,850 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} para eletrodepositar Au_xCl_y está em conformidade com os estudos de Tunuli (1988). Corroborando com os resultados eletroquímicos, o filme Au_xCl_y foi analisado por Estereoscopia Óptica (Figura 41) em que se observam regiões acinzentadas a amarelo-acinzentadas que representam a presença de espécies de cloreto de ouro de acordo com a literatura (DAS; RAJ, 2011).

5.4.2 Eletrodo em Estado Sólido

A seguir apresentamos os resultados da obtenção de um eletrodo em estado sólido que seja reversível eletroquimicamente³⁵ e permita o confinamento do íon cloreto com concentração conhecida dentro do eletrodo.

Para obtenção do eletrodo em estado sólido duas abordagens foram investigadas: por fotografação ou por eletrodeposição de polímero, contendo cloretos em concentração conhecida na solução química de deposição.

A. Por Fotografação

Os experimentos iniciais, para obtenção do eletrodo em estado sólido, foram realizados de acordo com a abordagem de fotografação. A solução do monômero acrilamida utilizada tem as seguintes características físico-químicas:

- ponto de fusão: (84 a 86) °C;
- ponto de ebulição: 241 °C;
- solubilidade em água: 2,04 kg l⁻¹ a 20 °C;
- polímero: hidrofílico; e
- toxicidade³⁶ = 1.

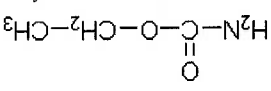
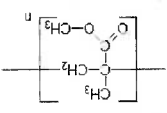
³⁴ Cronopotenciometria corresponde à técnica eletroquímica em que um dado valor de potencial eletroquímica é fixo, e a resposta em corrente eletroquímica é gravada no decorrer do tempo. ³⁵ A razão da corrente eletroquímica medida para o potencial de oxidação e para o potencial de redução deve ser igual a 1. ³⁶ Valor de toxicidade a partir de experimentos por via oral em ratos (GESTIS, sem data).

Por meio do procedimento de fotografação (exposição em lâmpada 12 W UV-C durante 3 min), a acrilamida fotocurada apresentou-se inadequada para a definição do eletrólito em estado sólido sobre os eletrodos, pois o filme se despegou com a absorção de água.

Segundo com a abordagem de fotografação, trocamos os materiais. O poliuretano (PU) - hidrofóbico - e o polimetilmetacrilatos (PMMA) - hidrofílico (em menor grau que a acrilamida) - em diferentes misturas (Tabela 16), contendo 0,10 mmol cm⁻³ de NaCl - foram processadas de acordo com os seguintes parâmetros de pré-cura, de exposição a UV-C e de cura:

- pré-cura a (70,0 ± 1,5) °C por 3 h (polímero firme mecanicamente);
- exposição em lâmpada 12 W UV-C durante 25 s; e
- cura a (95,0 ± 1,5) °C por 10 min.

Tabela 16 – Estrutura e as propriedades químicas dos compostos uretano e metilmetacrilato (MMA) são apresentadas. As porcentagens dos compostos, do fotopolimerizador e do solvente para a preparação das membranas de proteção iônica estão sistematizadas. NA: não analisado e ND: não descrito.

	Uretano	MMA	Durocur 1172	Solvente
	Massa Molar: 89,09 g mol ⁻¹ Toxidade ³⁷ : 1810 mg kg ⁻¹ Forma: cristais Cor: sem cor Odor: sem cheiro Solubilidade: 2 kg l ⁻¹ a 20 °C Polímero: hidrofóbico PF: 49 °C PE: 185 °C PF: 230 °C (poliuretano)		Massa Molar: 100,12 g mol ⁻¹ Toxidade ³⁸ : 7870 mg kg ⁻¹ Forma: ND Cor: sem cor Odor: pungente Solubilidade: 15 g l ⁻¹ a 20 °C Polímero: hidrofílico PF: 48,2 °C PE: 101 °C PF: 150 °C (PMMA)	
	48%	48%	4%	4%
	64%	32%	4%	4%
	72%	24%	4%	4%
	80%	16%	4%	4%
	82%	14%	4%	4%
	86%	10%	4%	4%
	88%	8%	4%	4%
	92%	4%	4%	4%
				H ₂ O/IPA
				H ₂ O/gliceroi
				H ₂ O/gliceroi
				H ₂ O/IPA
				NA
				NA
				NA

Fonte: Almeida (2014).

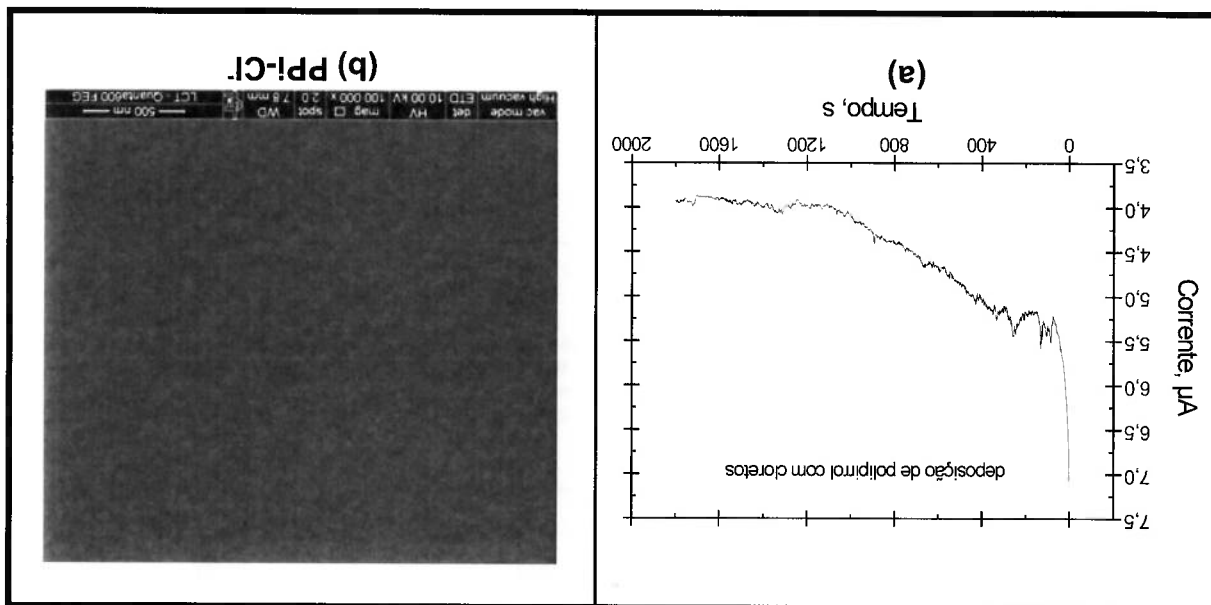
³⁷ Idem à nota 36.
³⁸ Idem à nota 36.

As misturas de PU com o PMMA sem solventes não permitiram uma fotografação adequada, pois não foi possível definir com precisão a região ativa dos eletrodos (o polímero apresentou-se muito viscoso). Mesmo para as misturas com solventes, em especial com IPA, os resultados não possibilitaram fotografação adequada sobre os eletrodos. Logo, os trabalhos seguiram de acordo com a segunda abordagem, por eletropolimerização.

B. Por Electrodeposição

A abordagem de electrodeposição de polímero contendo cloretos permitiu uma deposição seletiva do polímero na região ativa do eletrodo de referência miniaturizado [$0,135 \pm 0,001 \text{ mm}^2$], sem adesão nos demais microeletrodos, pois usamos soluções diluídas). Porém, o desafio estava em obter camadas com boa aderência, que possibilitasse eletrodos com alta impedância, adequada reversibilidade e potencial estável ao longo do tempo.

Figura 42 – Comportamento eletroquímico na eletropolimerização do filme de polipirrol com cloretos (a) e imagem obtida por MEV da superfície do polímero PPI-Cl (b).



Fonte: Almeida (2014).

O procedimento de eletropolimerização (veja o gráfico na Figura 42a) que se mostrou mais adequado para obtenção do eletrodo em estado sólido foi o seguinte:

Primeiramente, as deposições dos filmes de TEOS e de compostos TEOS-HFE, por plasma DC, foram realizadas. Todos os parâmetros de deposição, as características

o eletrólito em estado sólido (PPI-Cl). estável dentro do PPI; portanto, faz-se necessário uma membrana de proteção sobre redox Au/Au_xCl_y tem pouca eficiência para manter os íons cloretos em concentração experimentos demonstraram que o filme polipirrol eletrodepositado sobre a junção fabricado. No item 5.4.4.2 (medição potenciométrica dos eletrodos de referência), os permitir o contato iônico entre a solução e a interface do eletrodo de referência externo) podem adentrar no filme (não desejado). Por outro lado, a membrana deve proteção de íons em geral. Em relação a este último, os cloretos da solução (meio meio da contenção dos cloretos em meio interno do eletrólito em estado sólido e eletrólito em estado sólido de forma a minimizar a influência da variação do pH, por estado sólido), outro desafio foi garantir a confinção do cloreto no interior do Após a deposição do polímero pirrol com cloretos (funcionalizado como eletrólito em macroEPRES.

adequado para servir de membrana de proteção/contenção e de contato iônico em eletrodeposição de uretano; e, portanto, é apresentado o material escolhido mais por deposição por plasma DC de TEOS e de TEOS composto com HFE e outro por A seguir apresentamos os resultados de um estudo com três diferentes filmes, dois

5.4.3 Membrana de Proteção / Contenção e de Contato Iônico

(Figura 42b).

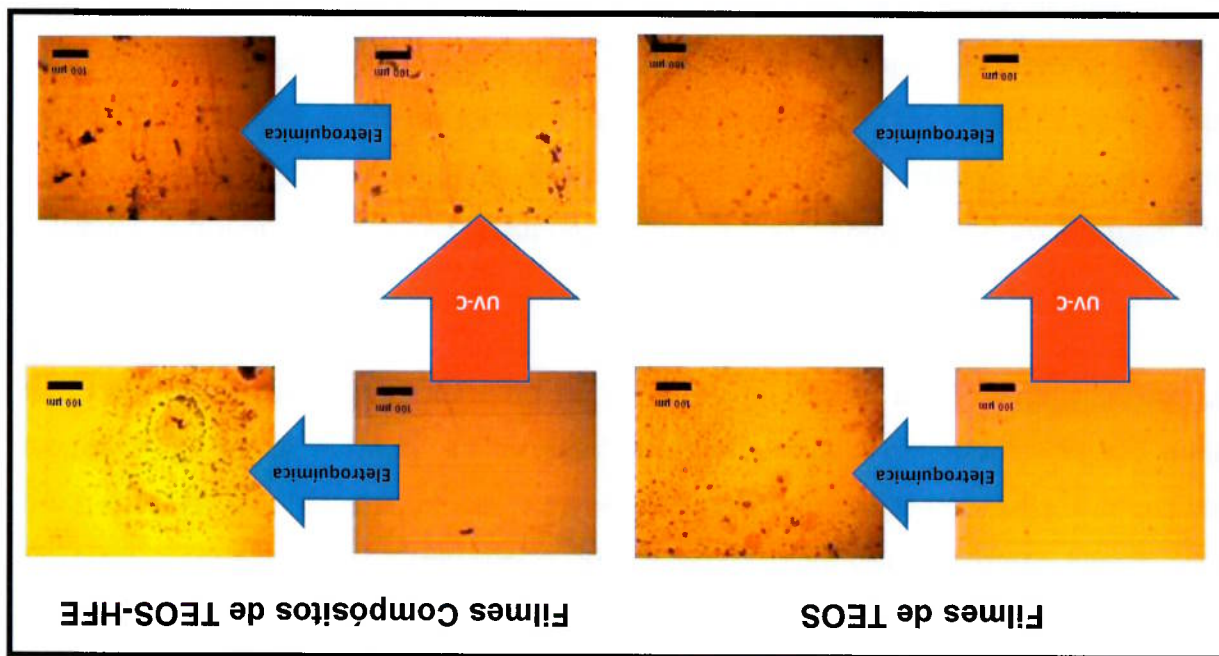
Observamos que o filme de PPI-Cl tem uma morfologia compacta com formação de grãos na ordem de 50 nm de diâmetro e altamente uniformes ao longo do filme

polipirrol com cloretos (PPI-Cl). da área sob a curva na Figura 42a, a espessura média foi calculada de 603,5 nm de corrente igual a 99,78 $\mu\text{A cm}^{-2}$. Usando a carga integrada de 8 mC, obtida a partir um potencial constante de +0,650 V_{Ag/AgCl 3M KCl} por 30 min (densidade média de uma solução de NaCl (0,15 mmol cm⁻³ e pH 7,2) com 0,5 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de pirrol diluído e

físico-químicas e a teoria envolvida encontram-se no artigo de Almeida et al. (2013) e Hernandez et al. (2013) e na tese de doutorado de Hernandez (2012).

Na Figura 43, as imagens - obtidas por Microscopia Óptica - demonstraram resultados adversos para a adsorção de espécies químicas sobre a superfície dos filmes não expostos a UV-C durante os experimentos eletroquímicos para afeição de potencial dos eletrodos (será discutido em detalhes no item 5.4.4).

Figura 43 – Imagens por Microscopia Óptica dos filmes de TEOS e de compostos TEOS-HFE recém-depositados e após exposição à UV-C (setas vermelhas). No final dos experimentos eletroquímicos (setas azuis), as superfícies dos filmes com e sem exposição UV-C também foram analisadas.



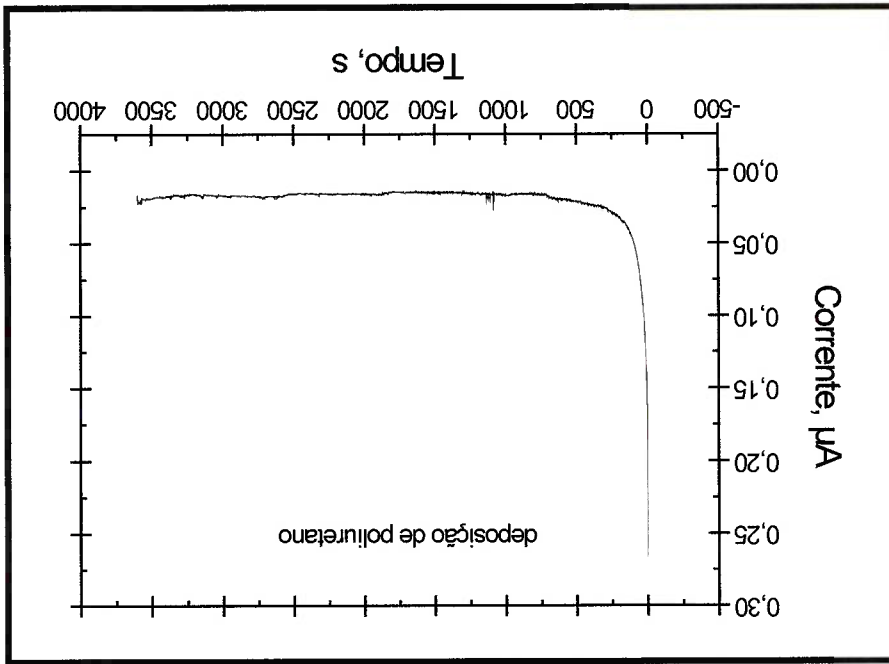
Fonte: Almeida (2014).

Os trabalhos com os filmes de TEOS e de compostos TEOS-HFE foram interrompidos devido à manutenção técnica do equipamento de plasma DC.

Paralelamente ao trabalho de deposição por plasma DC, foi empregada a eletropolimerização de poliuretano. Usando $0,01 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de STF com $\text{pH } 7,4 \pm 0,05$ a $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e $5 \mu\text{mol cm}^{-3}$ do monômero uretano, o polímero foi eletrodepositado por cronopotenciometria, aplicando um potencial constante de $+0,650 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ durante 1 h (Figura 44). A carga integrada de eletrodeposição de

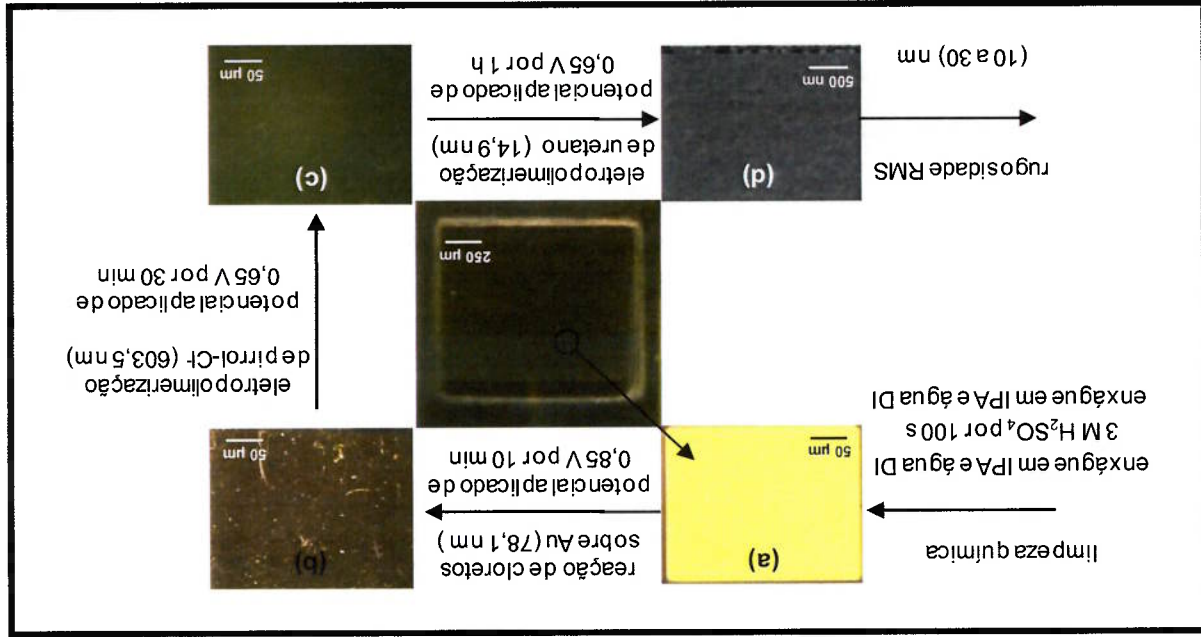
uretano foi 71,4 μC , resultando em uma espessura média calculada corresponde a aproximadamente 14,9 nm.

Figura 44 – Comportamento eletroquímico típico durante a eletrodeposição de poliuretano sobre PPI-Cl⁻ a um potencial fixo de +0,650 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} durante 1 h, solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 7,2.



Fonte: Almeida (2014).

Figura 45 – Sequência de fabricação dos macroEPRES de junção redox Au/AuCl₂. (a) Au limpo de acordo com o procedimento de condicionamento eletroquímico desenvolvido, (b) cloreto reagido sobre superfície de ouro, (c) filme de polipirrol com cloretos e (d) imagem por MEV da superfície do filme de poliuretano depositado sobre o polipirrol com cloretos.



Fonte: Almeida (2014).

A Figura 45 ilustra a sequência de fabricação dos macroEPPRES Au/Au₂Cl₂. As imagens de Microscopia Óptica apresentam: (a) a partir de um macroeletrodo de ouro limpo por meio da limpeza química tradicional descrita em detalhes nos itens 4.2.1 e 5.2, (b) o filme de ouro cloretado (78,1 nm de espessura média calculada) por um potencial fixo de +0,850 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} durante 10 min, (c) filme de polipirrol com cloretos (603,5 nm de espessura média calculada) eletropolimerizado com potencial constante de +0,650 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} durante 30 min, e (d) o poliuretano (14,9 nm de espessura média calculada) foi eletropolimerizado sobre o filme de PPi-Cl⁻ usando um potencial constante de +0,650 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} durante 1 h.

5.4.4 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos de Referência

Inicialmente, verificamos os potenciais das referências comerciais (Digimed, Orion e BASI[®] eletrodo I e II), a fim de comprovar a funcionalidade do eletrodo em função do tempo, ou seja, sem ocorrência de avarias (Tabela 17 e Figura 46). Portanto, a verificação do potencial dos eletrodos de referência em solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 a 24,3 °C permitiu empregá-los no SME, de maneira confiável, durante os procedimentos de medição.

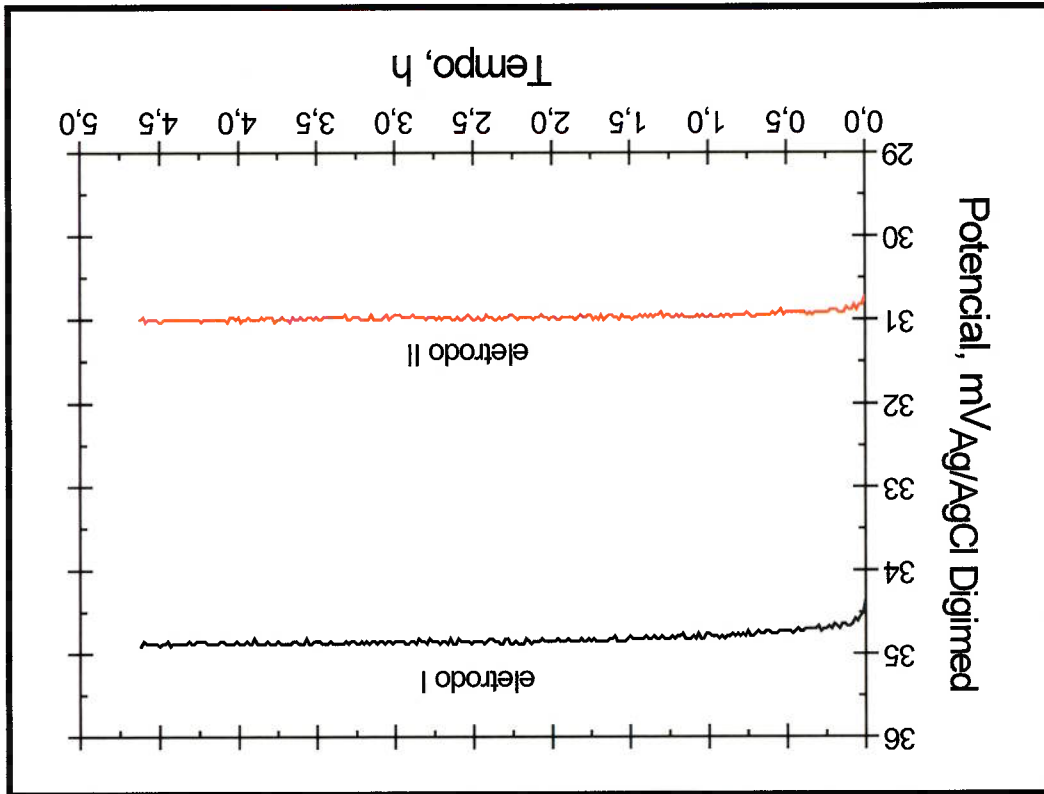
Tabela 17 – Aferição do potencial de eletrodos com relação ao eletrodo de referência comercial Orion ou Digimed. NA: não analisado.

Eletrodo de referência	Potencial de eletrodo com relação ao potencial de referência:			
	Digimed	Orion	BASI [®] - eletrodo I	BASI [®] - eletrodo II
Digimed	NA	+ (10,45 ± 0,02)	+ (31,0 ± 0,2)	+ (35,0 ± 0,2)

Fonte: Almeida (2014).

Antes de realizar os testes eletroquímicos para aferição dos potenciais de eletrodos de referência fabricados, os potenciais dos eletrodos comerciais foram verificados em relação ao outro. Na Figura 46, os potenciais de referência dos eletrodos I e II da BASI[®] foram medidos com relação ao potencial do eletrodo Digimed (estável respectivamente, por mais de 4 h), e os valores obtidos foram (+34 e +31) mV_{Ag/AgCl 3M KCl}.

Figura 46 – Potenciais medidos entre eletrodos de referência RE-5B da BASI® (eletrodos I e II) e o eletrodo de referência comercial Digimed.



Fonte: Almeida (2014).

Sabe-se que

o potencial do eletrodo de referência pode ser corrigido quanto ao efeito da temperatura, da concentração das espécies iônicas oxidadas ou reduzidas, do pH (reação catódica do hidrogênio e oxigênio), das membranas porosas (ponte salina) e dos filmes poliméricos sobre o metal (FERNANDES; OLIVEIRA NETO, KUBOTA, 2001). Adaptado de Almeida (2009, p. 45-46).

A correção de potencial, comentada por Almeida (2009), pode ser realizada empregando o equacionamento Nernstiano (já descrito no item 4.5).

5.4.4.1 Reversibilidade

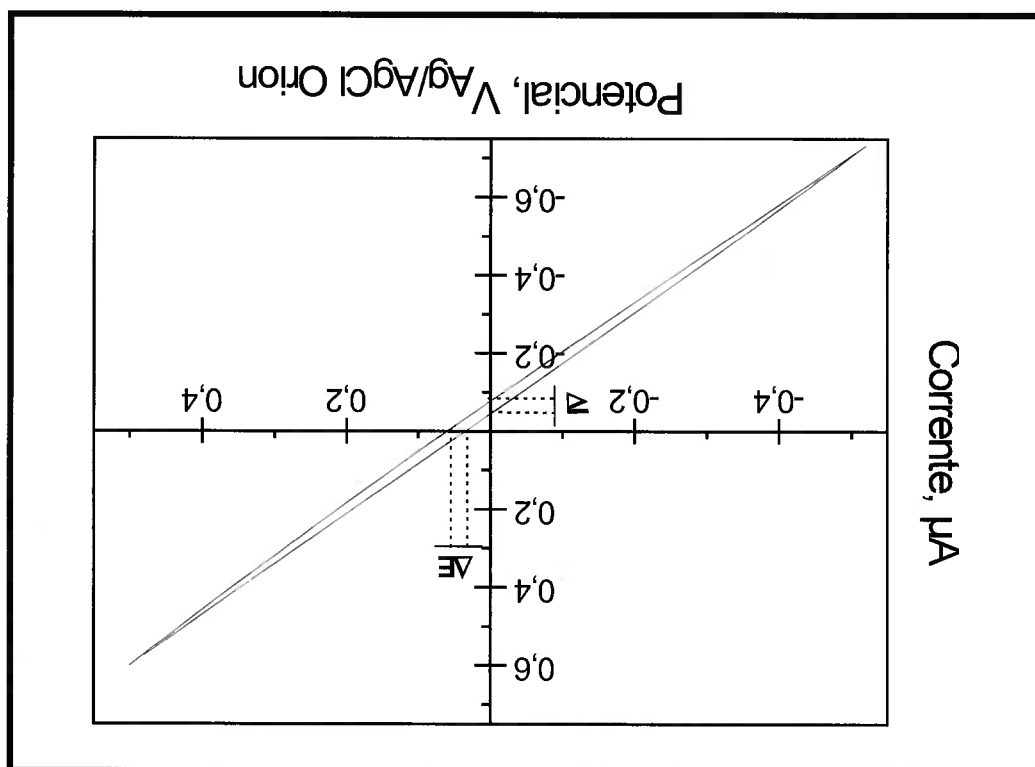
A caracterização do eletrodo de referência foi realizada após acondicionamento e estabilização da junção redox Ag/AgCl ou Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU. Foi extraída do gráfico de reversibilidade, a histerese associada ao potencial (ΔE) e a corrente (ΔI) do eletrodo de referência fabricado. A Figura 47 mostra um gráfico padrão na obtenção desses valores. Para o fim proposto, o teste foi realizado pela técnica eletroquímica de voltametria cíclica usando uma solução de NaCl (0,15 mmol cm⁻³

com pH 6,36 a 24,3 °C) e o equipamento Autolab (ANEXO B). Os voltamogramas foram obtidos a partir de uma rampa de potencial entre o eletrodo de referência fabricado (Ag/AgCl ou Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU) e o eletrodo comercial (Orion ou BASI®), em um sistema de dois eletrodos (eletrodo de referência cortocircuitado ao cabo de conexão do eletrodo auxiliar) e das especificações de entrada a seguir:

- potencial inicial = -0,500 V_{Ag/AgCl 3M KCl};
- potencial final = +0,500 V_{Ag/AgCl 3M KCl};
- velocidade de varredura = 0,100 V s⁻¹; e
- números de ciclos = 6.

Célula desligada automaticamente, via *software*, após os ciclos de varreduras.

Figura 47 – Curva padrão de reversibilidade obtida entre o eletrodo de referência fabricado e comercial Orion.



Fonte: Almeida (2014).

Na maioria dos casos, a histerese final apresentada para os eletrodos de referência fabricados ficaram na ordem de $\Delta V = (+0,050 \text{ a } +0,060) \text{ V}_{\text{Ag/AgCl 3M KCl}}$ e $\Delta I = (+0,1 \text{ a } +4,0) \text{ µA}$ (Figura 47). Esse resultado está consistente com os testes de reversibilidade de Horwood (2001, p. 360) e de Almeida (2006, 2009, p. 106).

Acréscenta-se a importância da correlação do potencial de referência com a estabilidade do filme AgCl ou Au^xCl_y, ou seja, a boa aderência e a homogeneidade estão associadas a um efeito discreto de histerese e mínima degradação do potencial de referência em função do tempo, que foi de 8,3 μV h⁻¹ (o melhor caso).

5.4.4.2 Medição do Potencial dos Eletrodos de Referência

A seguir é apresentada a caracterização dos potenciais de EPER Ag/AgCl e de macroEPRES de junção redox Ag/AgCl ou Au/Au^xCl_y. Este último, com um filme intermediário de eletrólito em estado sólido PPI-Cl e recobertos com TEOS, TEOS-HFE ou PU. Por fim, foi calculado o coeficiente de degradação do potencial medido ao longo do tempo para as condições experimentais a seguir:

Os potenciais dos eletrodos de referência foram medidos com relação ao eletrodo de referência Ag/AgCl 3M NaCl da BASI[®] ou Orion em solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl (preparada similarmente ao soro fisiológico) com pH 5,35 a 25 °C ou 6,36 a 24,3 °C, conforme as seguintes etapas:

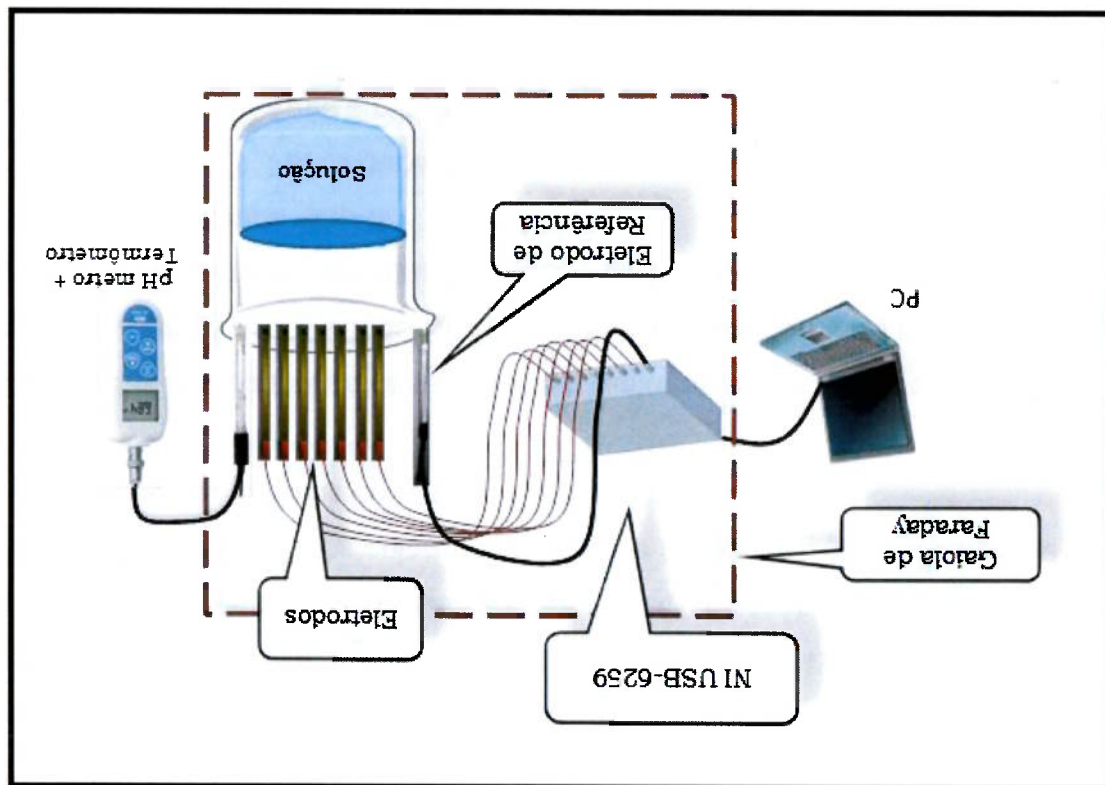
- i. imediatamente após a fabricação completa do eletrodo;
- ii. após 5 min em solução;
- iii. 30 min e 1 h guardados em solução (valores não apresentados); e
- iv. monitoração do potencial ao longo de três dias em solução, gravando o potencial a cada 30 s.

A última etapa foi repetida diversas vezes de acordo com a necessidade de validação da estabilidade do potencial dos referências fabricados, mediante as condições experimentais pré-estabelecidas para a medição do potencial ao longo do tempo.

A configuração experimental para aferir os potenciais dos eletrodos de referência fabricados foi composta pelo equipamento NI USB-6259 e pelo componente NRSE (ANEXO A) como terminal de entrada (Figura 48), com exceção dos experimentos demonstrados pela Figura 49 e pelas Tabelas de 18 a 20, que foram executados com o equipamento Autolab (ANEXO B). Os sinais dos potenciais dos eletrodos

modificados foram medidos com relação ao potencial de referência do eletrodo RE-5B da BASI® ou Ag/AgCl de dupla junção da Digimed. Os eletrodos foram imersos em solução soro fisiológico ($0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 6,36 a 25°C).

Figura 48 – Esquema da configuração experimental para medição dos potenciais de eletrodos modificados. O equipamento NI USB-6259, os eletrodos de referência, o pH metro e a solução fisiológica ($0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 6,36 a 25°C) são apresentados.



Fonte: adaptado de Lima (2013).

Após a fotografação do polímero termorrígido SU-8 e antes da aferição do potencial dos eletrodos de referência em função do tempo, o potencial dos eletrodos somente de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$) foi medido, com valor médio aproximadamente de $-0,150 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ (com relação ao potencial do eletrodo de referência BASI®). E as resistências elétricas dos eletrodos foram obtidas entre (9 e 60Ω). Após a caracterização elétrica, os eletrodos de ouro foram modificados com cloretos e eletropolimerizados com polipirrol e cloretos. Por fim, a deposição de TEOS e de TEOS-HFE (plasma DC) ou de PU (eletrodeposição) como uma membrana de proteção/contenção e de contato iônico (procedimento final na construção dos eletrodos de referência em estado sólido).

Observou-se que para os filmes fotocurados de poliuretano / acrilamidas - não foi possível extrair resultados de aferição de potencial de eletrodo, pois os filmes se destacaram dos eletrodos em meio aquoso.

A. Eletrodos de Pseudo-referência (EPR)

Inicialmente, os testes de aferição do potencial de eletrodos ao longo do tempo foram realizados com os EPR de junção redox Ag/AgCl. A variação do potencial com relação ao potencial de referência comercial da Orion foi observada usando a solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 inicialmente a 24 °C. Na Figura 49, apresentam-se os gráficos que representam o comportamento padrão para aferição da variação do potencial dos EPR de junção redox Ag/AgCl ao longo do tempo (Tabela 18). Com a variação de temperatura ambiente (ar condicionado) entre (18 e 26) °C, há variação do potencial eletroquímico dos EPR. Uma amostra com quatro macroeletrodos RI representa um conjunto de 20 eletrodos fabricados macroeletrodos RI [(4,51 0, ± 01) mm² - macroeletrodos PCl ou (2,77 ± 0,01) mm² - macroeletrodos RI].

Figura 49 – Aferição, ao longo do tempo, dos potenciais de EPR de junção redox Ag/AgCl com relação a um eletrodo de referência comercial Orion.

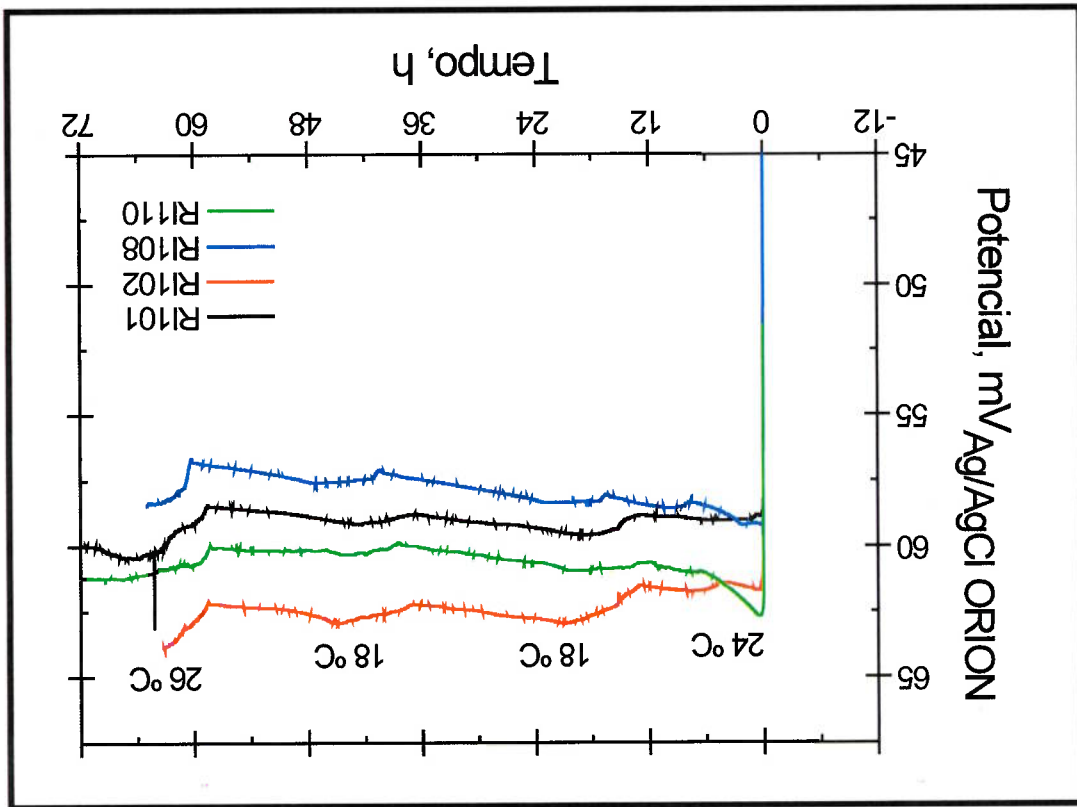


Tabela 18 – Sistematização dos resultados de aferição dos potenciais de EPR de junção redox Ag/AgCl. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo de referência comercial Orion.

Eletródos Ag/AgCl	Aferição do potencial de eletrodo com relação à referência Orion e à solução 0,15 mmol cm ⁻³ de NaCl com pH 6,36 (24,3 °C)		
	Após cloração	Após 5 min em solução	3 dias em solução
R1101	+ (48,5 ± 0,05)	+ (58,5 ± 0,05)	+ (60,1 ± 0,05)
R1102	+ (44,6 ± 0,05)	+ (61,1 ± 0,05)	+ (63,9 ± 0,05)
R1108	+ (44,6 ± 0,05)	+ (59,2 ± 0,05)	+ (58,3 ± 0,05)
R1110	+ (51,6 ± 0,05)	+ (62,5 ± 0,05)	+ (60,4 ± 0,05)

Fonte: Almeida (2014).

Da curva de reversibilidade do filme AgCl, a histerese do potencial e da corrente em solução 0,10 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 a 24,3 °C foi extraída. Além dos valores de histerese, o potencial inicial aferido e o coeficiente de degradação também foram analisados e estão sistematizados na Tabela 19.

Tabela 19 – Resumo dos parâmetros de caracterização dos EPR de junção redox Ag/AgCl.

Eletródos	Variação do potencial em função do tempo	Reversibilidade (Histerese)	Potencial inicial		
			Potencial (mV _{Orion})	Degradação (µV h ⁻¹)	Potencial (mV _{Orion})
R1104	+ (43,4 ± 0,01)	+ (60,4 ± 0,01)	+ (8,33	+ (62,1 ± 0,01)	+ (43,4 ± 0,01)
R1108	+ (58,4 ± 0,01)	+ (62,1 ± 0,01)	+ (26,67	+ (62,1 ± 0,01)	+ (58,4 ± 0,01)
R1109	+ (61,0 ± 0,01)	+ (62,1 ± 0,01)	+ (15,00	+ (62,1 ± 0,01)	+ (61,0 ± 0,01)
R1110	+ (59,0 ± 0,01)	+ (62,8 ± 0,01)	+ (6,67	+ (62,8 ± 0,01)	+ (59,0 ± 0,01)
R1111	+ (43,1 ± 0,01)	+ (59,4 ± 0,01)	+ (16,67	+ (59,4 ± 0,01)	+ (43,1 ± 0,01)

Fonte: Almeida (2014).

O eletrodo RI - após ser quimicamente limpo (como descrito no item 4.2.1) - foi introduzido em uma solução 0,50 µmol cm⁻³ de pirrol em 0,1 mmol cm⁻³ de HCl e pela técnica eletroquímica de voltametria cíclica foi aplicado 50 ciclos de potências entre (0 e +0,650) V_{Ag/AgCl} 3M NaCl a uma velocidade de varredura de 0,050 V s⁻¹ para eletrodepositar o filme de PPI-Cl.

EPER de junção Ag/AgCl recobertos com polipirrol apresentaram potenciais estáveis ao longo do tempo e parâmetros de caracterização adequados (Tabela 20). Entretanto, para usá-los em procedimentos de integração com microeletrodos há três inconvenientes, a saber: complexidade para deposição dos filmes de prata com adequada qualidade de superfície, espessura total mínima da ordem de 2,5 µm da junção redox Ag/AgCl dificultando os processos de fabricação e de integração a microeletrodos e alta sensibilidade com variações de temperatura (Figura 49 mostrada). Para os eletrodos polipirrol com cloretos, os resultados de aferição do potencial de referência ao longo do tempo estão sistematizados na Tabela 20.

Tabela 20 – Aferição do potencial dos EPER de ouro com prata eletrodepositada e cloretos reagidos com a prata para eletroformar a junção redox Ag/AgCl, na sequência, eletropolimerizado PPI-Cl. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo I de referência comercial da BASI®.

Eletrodos Ag/AgCl	Aferição do potencial de eletrodo com relação à referência BASI® e à solução 0,15 mmol cm ⁻³ de NaCl com pH 6,36 (24,3 °C)	
	Após cloração	Após deposição PPI-Cl
R104	+ (53 ± 2)	+ (50 ± 2)
R105	+ (53 ± 2)	+ (49 ± 2)
R106	+ (64 ± 2)	+ (54 ± 2)
R107	+ (51 ± 2)	+ (49 ± 2)
R108	+ (40 ± 2)	+ (49 ± 2)

3 dias em solução PPI-Cl confinado por

Fonte: Almeida (2014).

Após a deposição dos filmes poliméricos de pirrol com cloretos em macroeletrodos de ouro ($2,77 \pm 0,01$) mm², os eletrodos foram guardados em solução de 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 (24,3 °C) por quatro semanas para aferição do potencial desses EPER (neste procedimento, o potencial foi registrado a cada 20 min durante 3 dias; também, este procedimento foi repetido várias vezes). O resultado foi um decréscimo substancial do potencial dos eletrodos (tornando-se mais negativo, ver Tabela 21), indicando que no filme polimérico de pirrol houve variação da concentração dos cloretos; portanto, processos de absorção e desorção de cloretos no polipirrol que acaba deixando-o mais condutivo ou resistivo.

Tabela 21 – Aferição do potencial dos eletrodos PCI de ouro com cloreto reagido e eletropolimerizado com polipirrol em solução 0,10 mmol cm⁻³ de HCl para obter a junção redox Au/Au_xCl_y/PPi-Cl. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo I de referência comercial BASI[®]; NA: não analisado.

Eletrodos	Aferição do potencial com relação ao eletrodo I da BASI [®]		
	Au/Au _x Cl _y /PPi-Cl	Au/Au _x Cl _y	Após deposição PPi-Cl
			Após 3 dias em solução
TI	+ (377 ± 2)	+ (108 ± 2)	NA
TIII	+ (380 ± 2)	+ (64 ± 2)	- (126 ± 2)
TIV	+ (418 ± 2)	+ (62 ± 2)	- (185 ± 2)
TV	+ (392 ± 2)	+ (57 ± 2)	- (123 ± 2)
TXV	+ (373 ± 2)	+ (71 ± 2)	NA

Fonte: Almeida (2014).

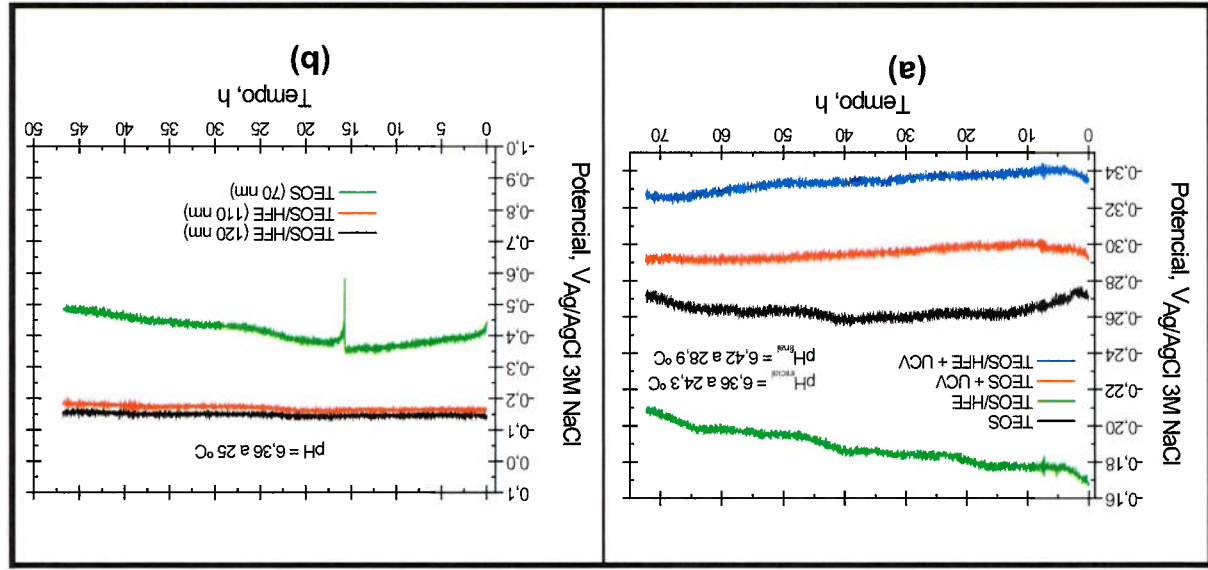
A variação expressiva de potencial não nos permite usar o eletrodo Au/Au_xCl_y/PPi-Cl como um eletrodo referência convencional. Logo, outras membranas poliméricas foram estudadas com o objetivo de proteção/contenção e contato iônico entre o eletrodo e a solução. No tópico B e C, descreveremos os trabalhos realizados com os filmes de TEOS e compostos TEOS-HFE e de PU, respectivamente.

B. macroPPRES Recobertos com TEOS ou TEOS-HFE

Os eletrodos recobertos com TEOS e TEOS-HFE foram guardados em solução fisiológica (0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 a 24,3 °C) durante duas semanas, verificando a estabilidade dos filmes em solução e gravando os potenciais. A Figura 50a mostra o sinal de potencial entre (-0,260 e -0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl} para os filmes de TEOS e (-0,180 e -0,340) V_{Ag/AgCl 3M NaCl} para os filmes compostos de TEOS-HFE. Ambos os casos, os filmes foram analisados com e sem exposição UV-C.

Filmes de TEOS (290 nm) e compostos de TEOS-HFE (250 nm) não expostos a UV-C apresentaram maior variação de potencial, em torno de ±0,050 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Por outro lado, para filmes expostos a UV-C, a variação máxima foi da ordem de ±0,010 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Portanto, houve maior estabilidade do sinal medido de potencial com o tratamento UV-C dos filmes de TEOS e compostos de TEOS-HFE (Figura 50a).

Figura 50 – (a) Experimentos eletroquímicos realizados em soro fisiológico (0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 a 25 °C) para eletrodos com espessura maior que 100 nm. (b) O comportamento eletroquímico dos filmes finos de TEOS (70 nm de espessura ou menos) e dos compostos de TEOS-HFE (com espessura média de 100 nm).



Fonte: Almeida (2014).

Filmes de TEOS ultrafinos (aproximadamente 70 nm de espessura ou menos) podem permear ions adentro do filme, alterando os valores de resistência elétrica e, consequentemente, a variação de potencial medido (Figura 50b). Este efeito não foi observado para compostos TEOS-HFE com espessura superior a 100 nm. Os valores aferidos dos potenciais estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22 – Aferição do potencial de macroeletrodos de ouro modificados com TEOS e TEOS-HFE com e sem tratamento por UV-C. O potencial foi medido com relação ao eletrodo I de referência comercial BASI[®].

Aferição do potencial de eletrodo com relação ao eletrodo I de referência da BASI[®] e à solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH de 6,36 a 24,3 °C. Eletrodos de ouro recoberto com: mV_{Ag/AgCl 3M NaCl}

	Após deposição	5 min em solução	Confinado por 3 dias em solução
TEOS	-(271,3 ± 0,2)	-(271,4 ± 0,2)	-(273,9 ± 0,2)
TEOS UV-C	-(292,7 ± 0,2)	-(293,3 ± 0,2)	-(290,3 ± 0,2)
TEOS-HFE	-(167,6 ± 0,2)	-(168,2 ± 0,2)	-(209,3 ± 0,2)
TEOS-HFE UV-C	-(334,2 ± 0,2)	-(335,7 ± 0,2)	-(326,7 ± 0,2)

Fonte: Almeida (2014).

A Tabela 23 demonstrou os valores sistematizados das variações do potencial dos eletrodos recobertos com TEOS e TEOS-HFE e as respectivas degradações ao longo do tempo. Para esses filmes, parâmetros de reversibilidade quanto à histerese em potencial e corrente (após aferição do potencial de eletrodo confinado por três dias em solução) também foram analisados e estão descritos na mesma Tabela 23.

Tabela 23 – Resumo dos parâmetros de caracterização dos eletrodos de referência recobertos com filme de TEOS e de compostos TEOS-HFE.

Eletrodos	Variação do potencial em função do tempo	Reversibilidade (Histerese)	Potencial		
			Potencial inicial (mV)	Degradação ($\mu\text{V h}^{-1}$)	Potencial Corrente (mV)
TEOS	$(-271,4 \pm 0,2)$	$\pm 15,6$	$\pm 15,6$	$-34,7$	$\pm 1,76$
TEOS UV-C	$(-293,3 \pm 0,2)$	$\pm 8,6$	$\pm 8,6$	$+41,7$	$\pm 0,12$
TEOS-HFE	$(-168,2 \pm 0,2)$	$\pm 22,8$	$\pm 22,8$	$-570,8$	$\pm 0,04$
TEOS-HFE UV-C	$(-335,7 \pm 0,2)$	$\pm 125,0$	$\pm 15,1$	$+125,0$	$\pm 0,06$

Fonte: Almeida (2014).

Os resultados com os filmes de TEOS e de composto TEOS-HFE foram promissores. A utilização desses filmes ainda demandará a necessidade de caracterizá-los quanto à reprodutibilidade das medidas usando outros eletrodos.

C. EPRES Recobertos com Poliuretano

Após a eletropolimerização de uretano como membrana de proteção/contenção de cloretos e de contato iônico, foi realizada aferição de potencial de acordo com o procedimento descrito no item 5.4.4.2 usando um eletrodo de referência comercial Digimed e solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,2 a 25°C . O pH foi modificado para adequá-lo ao valor mais compatível ao pH sanguíneo.

No final da fabricação e da caracterização, os macroEPRES Au/Au $^{x}\text{Cl}_y$ /PPi-CI/PU foram guardados em solução $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 7,2 a 25°C com o objetivo de garantir as características iniciais do eletrodo e verificar quaisquer avarias ao longo da armazenagem. Os resultados de aferição dos potenciais dos macroEPRES Au/Au $^{x}\text{Cl}_y$ /PPi-CI/PU estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 – Aferição dos potenciais dos EPRRES de junção redox Au/Au_xCl_y/PPi-Cl⁻ eletropolimerizado poliuretano que atuou como membrana de proteção/contenção e contato iônico. O potencial foi aferido com relação ao eletrodo de referência comercial da Digimed.

Carga de cloro depositada por área	Eletrodos	Aferição do potencial de eletrodos		
		Após deposição	Após 5 min em solução	Contido por 3 dias em solução
0,009	TXII	-118,9 ± 0,2	-112,7 ± 0,2	-204,3 ± 0,2
0,650	TXX	+17,2 ± 0,2	-14,7 ± 0,2	-112,3 ± 0,2
0,022	PXIII	+119,5 ± 0,2	+119,8 ± 0,2	+108,4 ± 0,2
0,430	TXVI	+3,6 ± 0,2	+83,8 ± 0,2	-75,9 ± 0,2
0,078	TXXI	-139 ± 0,2	-114,6 ± 0,2	-196,6 ± 0,2
0,008	TXVIII	-93,8 ± 0,2	-94,9 ± 0,2	-165,2 ± 0,2
0,162	REF1	-431,7 ± 0,2	-118,9 ± 0,2	+193,1 ± 0,2
0,001	REF2	-38,3 ± 0,2	+40,6 ± 0,2	+207,1 ± 0,2
0,093	REF3	-11,7 ± 0,2	-128,5 ± 0,2	-138,3 ± 0,2

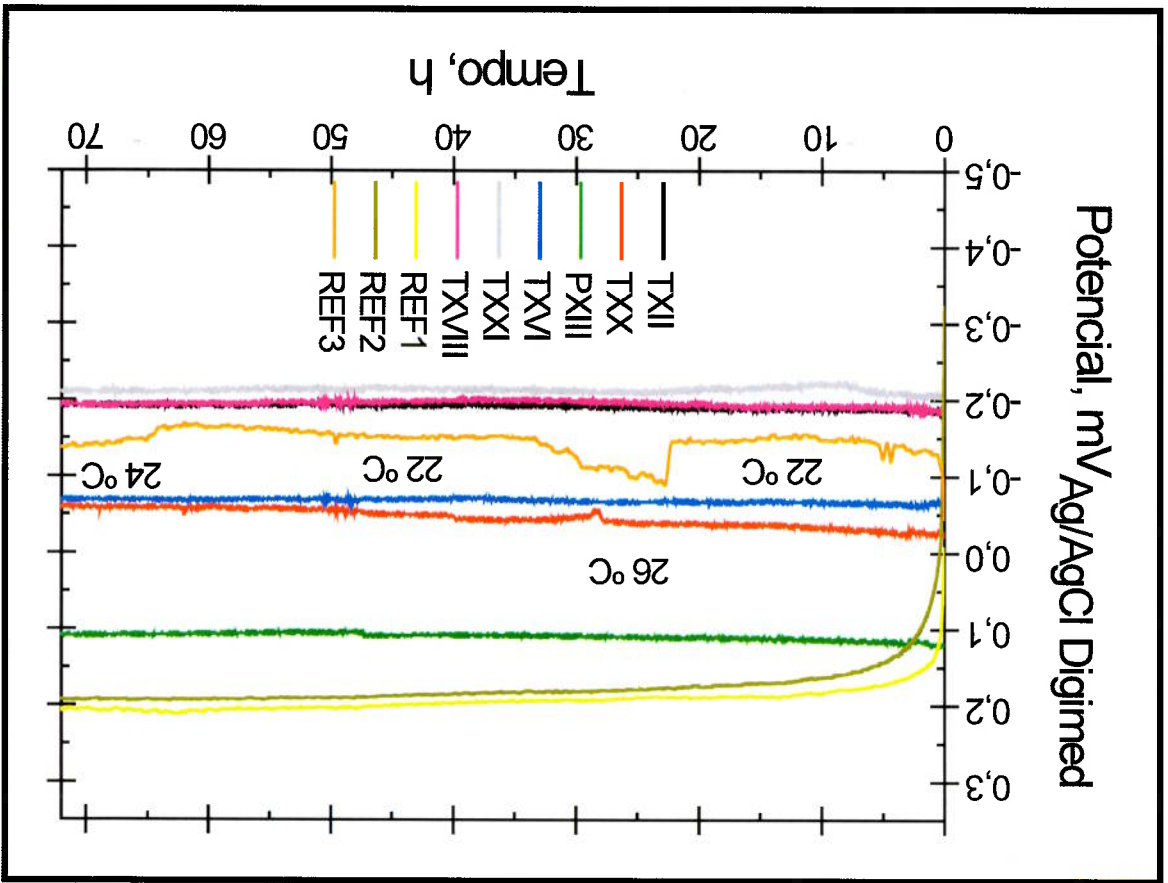
Fonte: Almeida (2014).

A Figura 51 demonstrou os resultados experimentais de aferição de potencial ao longo do tempo para macroEPRRES³⁹ e EPRRES miniaturizados⁴⁰. Após um mês em solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl (pH 7,2 a 25 °C), o potencial estável do macroEPRRES Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU (PXIII) foi medido em valor aproximadamente igual a +108,39 mV_{Ag/AgCl Digimed} durante três dias consecutivos; idem para o eletrodo TXVI, que teve seu potencial medido igual a -0,076 V_{Ag/AgCl Digimed}. Portanto, o potencial deste eletrodo esteve praticamente inalterado ao longo do tempo. Os EPRRES miniaturizados REF1 e REF2 apresentaram um carregamento capacitivo até a décima quinta hora do experimento e depois se estabilizou a um potencial médio de +0,200 V_{Ag/AgCl Digimed}; já o eletrodo REF3 foi sensível à variação de temperatura entre (22 e 26) °C (Figura 51). Os macroEPRRES TXX e TXXI tiveram uma estabilização adversa de potencial e também estabilizaram a (-0,112 e -0,197) V_{Ag/AgCl Digimed}. A variação das espessuras do polipirrol (entre 400 nm a 600 nm) e do poliuretano (entre 20 nm a 40 nm) e das

³⁹ Eletrodos nomeados de TXII, TXX, PXIII, TXVI, TXXI e TXVIII.
⁴⁰ Eletrodos nomeados de REF1, REF2 e REF3.

concentrações de íons cloretos também podem contribuir para as adversidades na medição dos potenciais dos macroEPRES. Por fim, para experimentos similares há reprodutibilidade, ver macroEPRES TXII e TXVIII na Figura 51.

Figura 51 – Aferição dos potenciais eletroquímicos dos macroEPRES após 30 dias em solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 7,4 a 25 °C.



Fonte: Almeida (2014).

Os valores condizentes à caracterização dos potenciais dos eletrodos de referência foram sistematizados na Tabela 25, seja empregando a variação do potencial em função do tempo, resultando na degradação, ou a reversibilidade para extrair a histerese com relação ao potencial e à corrente. Alguns eletrodos não foram analisados devido à ocorrência de não aderência da fita Scotch^{MR} da 3M sobre a superfície do ouro; com isso, a vedação do eletrodo ficou comprometida, consequentemente, os resultados foram adversos para a medição dos potenciais dos eletrodos Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU.

Tabela 25 – Resumo dos parâmetros de caracterização dos macroEPRES e EPRES Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU (miniaturizados). NA: não analisado.

Eletrodos	Variação do potencial em função do tempo		Reversibilidade (Histerese)	
	Potencial Inicial (V)	Degradação (µV h ⁻¹)	Potencial (mV)	Corrente (µA)
TXII	-112,7 ± 0,2	-127,2	NA	NA
TXIX	-14,7 ± 0,2	-135,5	NA	NA
PXIII	+119,8 ± 0,2	-15,8	±200	±1,8
TXVIII	-94,9 ± 0,2	-97,6	NA	NA
TXVI	+83,8 ± 0,2	+2,2 10 ⁵	NA	NA
TXXI	-114,6 ± 0,2	+1,2 10 ⁵	±205	±1,5
REF1	-118,9 ± 0,2	+1,0 10 ⁵	+50	-3,4
REF2	+40,6 ± 0,2	+2,5 10 ⁵	+43	-4,2
REF3	-128,5 ± 0,2	-13,6	+42	-2,2

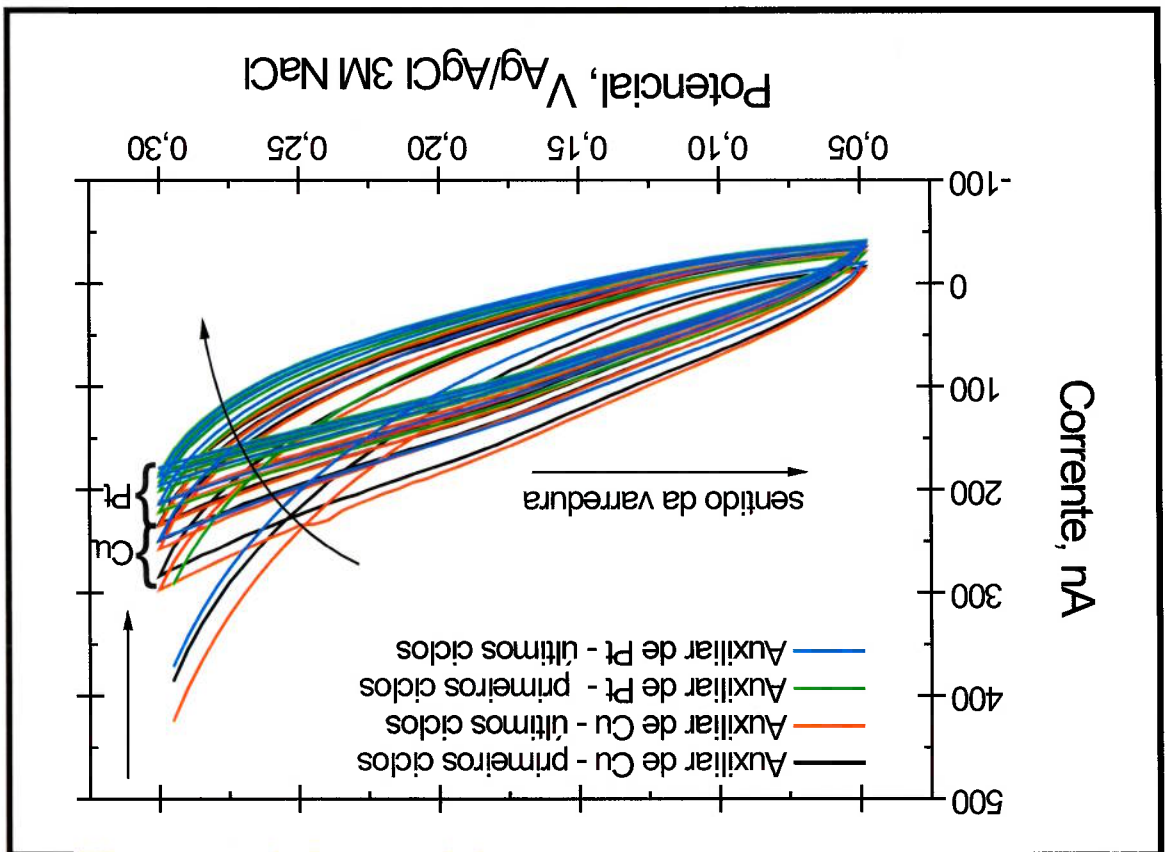
Fonte: Almeida (2014).

O eletrodo PXIII e REF3 apresentaram os menores índices de degradação, (-15,8 e -13,6) µV h⁻¹, respectivamente. Quanto aos parâmetros de reversibilidade, os eletrodos REF1, REF2 e REF3 indicaram os menores valores de histerese quanto ao potencial e adequados valores de histerese com relação à corrente.

5.5 Eletrodos Auxiliares Podem Alterar o Potencial de Resposta?

Neste tópico, objetiva-se a caracterização da funcionalidade do eletrodo auxiliar. Na Figura 52, são apresentados os voltamogramas cíclicos para um SME com três eletrodos, sendo empregado o ouro-poli(imidazol)-cobre(II) (Au-PI_m-Cu(II)) como microeletrodo (r = 7,5 µm) de medição (sensor integrado), eletrodo de referência comercial Ag/AgCl 3M NaCl da BASI[®] e o eletrodo auxiliar foi alternado entre platina e cobre. Utilizando a técnica eletroquímica de voltametria cíclica aplicou-se uma faixa de potencial de (+0,300 a +0,050) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, foi realizado quatro sequências de experimentos para avaliar o comportamento eletroquímico dos eletrodos auxiliares: cobre e platina. A funcionalidade dos eletrodos auxiliares foram analisada empregando a SQR com pH 7,4 e 400 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II), interferentes (0,22 µmol cm⁻³ de ácido ascórbico, 1,1 µmol cm⁻³ de ácido úrico e 0,34 µmol cm⁻³ de paracetamol) e mais 30 nmol cm⁻³ de nitrato.

Figura 52 – Voltamogramas cíclicos para avaliação comparativa do comportamento do SME alterando o eletrodo auxiliar. Linhas em vermelho e preto representam o eletrodo auxiliar de cobre e o eletrodo auxiliar. Linhas em azul e verde representam o eletrodo auxiliar de platina. A velocidade de varredura foi de $0,050 \text{ V s}^{-1}$ e a faixa de potencial de (+0,300 a +0,050) $\text{V}_{\text{Ag/AgCl}} 3\text{M NaCl}$. Sentidos dos voltamogramas cíclicos estão indicados no gráfico.



Fonte: Almeida (2014).

O perfil do voltamograma cíclico é típico de eletrodos imersos em STF com influências de íons sulfatos (MAZEIKIENE; NIAURA; MALINAUSKAS, 2002; PENG, 2008; ZHANG, Ya et al., 2013). Esse formato será observado nos outros gráficos CV, com as devidas variações de potenciais; há decaimento de correntes a potenciais mais negativos e incremento de corrente a potenciais mais positivos.

O resultado obtido na Figura 52 demonstrou que não há uma dispersão significativa entre os eletrodos auxiliares. A platina (material inerte) e o cobre (material que se dissolve por oxidação), nos potenciais usados, têm comportamentos similares aos de corrente usando a SQR. A repetitividade dos voltamogramas cíclicos também esteve de acordo com o esperado, e para os últimos ciclos, eles são coincidentes (ver a indicação da seta que transpassa os voltamogramas na Figura 52). Portanto, a análise comparativa válida o uso dos eletrodos auxiliares de platina ou de cobre e,

considerando as condições experimentais, não houve discrepâncias condizentes nos potenciais de resposta do nitrato.

5.6 Comportamentos Eletroquímicos dos Polímeros Condutores Estudados por DPV e CV: Medição de Nitrato e Avaliação das Espécies Químicas Interferentes

A seguir, apresentamos os potenciais de equilíbrio redox⁴¹ na resposta eletroquímica, correspondentes ao analito principal nitrato e a algumas espécies interferentes na medição voltamétrica do nitrato, os quais foram medidos ou avaliados usando a técnica eletroquímica de voltametria por pulso diferencial, do inglês DPV - *differential pulse voltammetry*, ou de voltametria cíclica, do inglês CV - *cyclic voltammetry*.

A partir da teoria nernstiana e dos potenciais redox publicados no *CRC Handbook Chemical and Physics* (VAN'YERK, 2012-2013) para a termodinâmica e da técnica eletroquímica DPV para a cinética, foi realizado um estudo observando o comportamento eletroquímico das espécies eletroativas, verificando se há correlação do potencial de equilíbrio redox com potencial de resposta do DPV.

Os experimentos com os voltamogramas DPV foram configurados no SME com três eletrodos, a saber:

- i. eletrodo de medição: macroeletrodo de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$ de área), limpo quimicamente de acordo com o procedimento descrito em 4.2.1 e 5.2, condicionado eletroquimicamente conforme o item 5.1 e modificado com polímeros como especificado no item 5.3.2;
- ii. eletrodo de referência: Ag/AgCl Nafion[®] 117 fabricado⁴² (ALMEIDA, 2009, p. 97-111) ou Ag/AgCl 3M NaCl (RE-5B) da BASI[®]; e
- iii. eletrodo auxiliar: platina (2 mm^2 de área).

Após a configuração acima dos eletrodos, a técnica eletroquímica DPV foi empregada inicialmente para estudar o comportamento eletroquímico de

⁴¹ Potencial de equilíbrio redox indica a situação em que a velocidade da reação eletroquímica no sentido catódico e anódico são constantes e idênticas.

⁴² Todos eletroquímicos com o valor somado de $+0,100 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl}} \text{ NaCl}$ 3M (ALMEIDA, 2009, p. 95).os experimentos usando o eletrodo de referência Ag/AgCl Nafion[®] 117 têm os potenciais.

macroeletrodos de ouro modificados com 1,2-DAB (Au-1,2-DAB) em solução 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36. Estes experimentos foram desenvolvidos de acordo com as especificações de entrada:

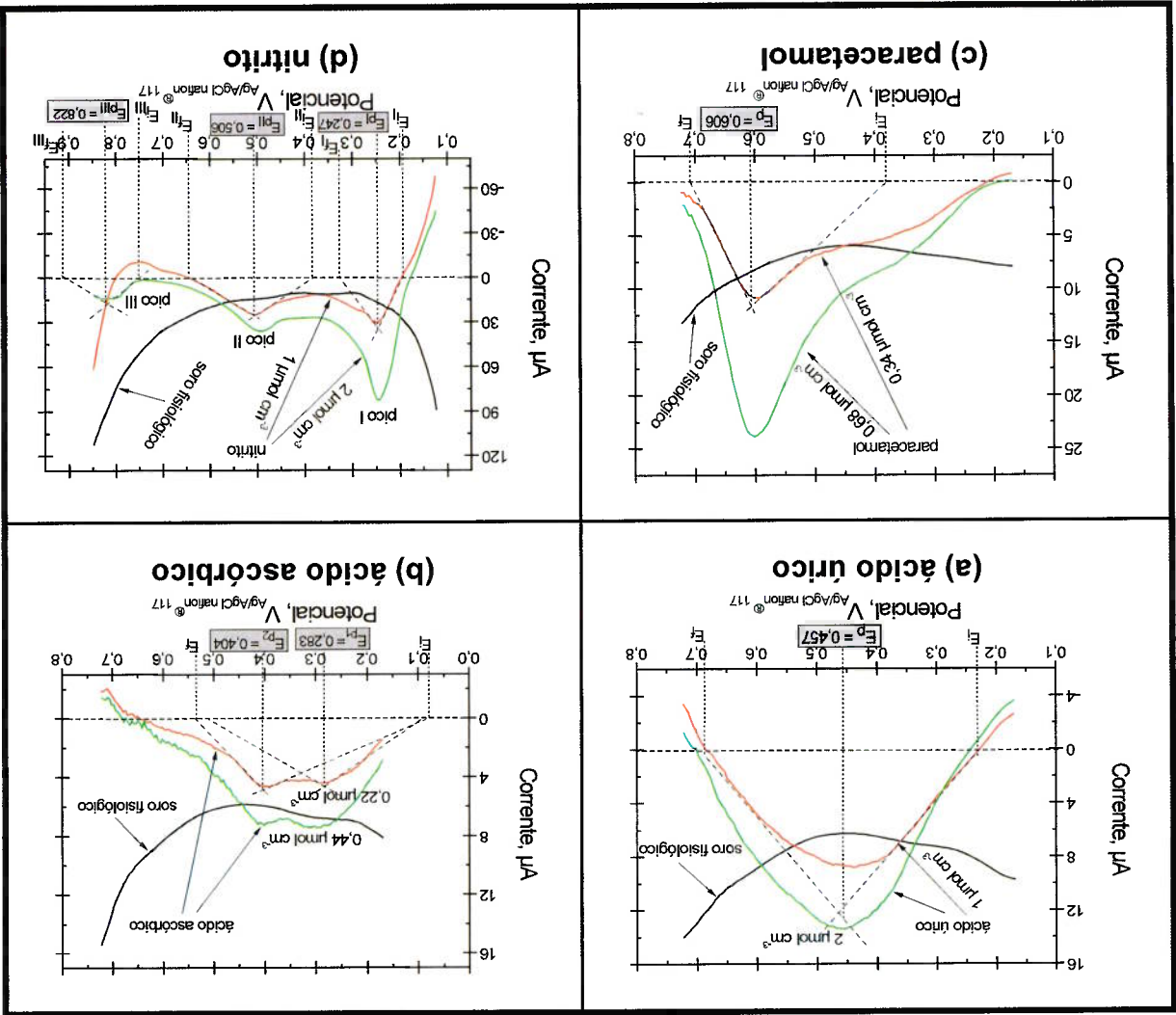
- potencial inicial = +0,150 V_{Ag/AgCl NaCl¹¹⁷};
- potencial final = (+0,700 ou +0,850) V_{Ag/AgCl NaCl¹¹⁷}; e
- velocidade de varredura = 0,010 V s⁻¹.

O sentido dos voltamogramas foi do potencial de +0,150 V_{Ag/AgCl NaCl¹¹⁷} para os potenciais mais positivos, ao final do voltamograma, a célula foi desligada automaticamente, via *software*, após o ciclo de varredura.

Na sequência, a Figura 53 mostra os voltamogramas DPV utilizando os macroeletrodos Au-1,2-DAB. A partir do procedimento descrito no item 4.7 para extração dos potenciais e analisando os voltamogramas DPV (Figura 53), observam-se os E_p correspondentes aos valores de corrente máxima e os potenciais de início (E_i) e de fim (E_f) da reação eletroquímica, conforme as respectivas concentrações de nitrato [(1 e 2) μmol cm⁻³], de ácido ascórbico [(0,22 e 0,44) μmol cm⁻³], de ácido úrico [(1 e 2) μmol cm⁻³] e de paracetamol [(0,34 e 0,68) μmol cm⁻³]. As concentrações das espécies interferentes (AA, UA e PA) foram extrapoladas ao dobro e ao quádruplo das concentrações encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos (MATTOS; GORTON, 2001; LASCHI; MASCINI, 2006), permitindo uma margem de confiabilidade experimental.

Comentando os resultados apresentados na Figura 53. Das espécies interferentes, o ácido ascórbico foi o único que apresentou dois potenciais de picos com valores de (+0,280 e +0,404) V_{Ag/AgCl NaCl¹¹⁷}, os quais são coerentes com os potenciais descritos no APÊNDICE D (PATNAIK, 2004; ALMEIDA, 2009). O ácido úrico e paracetamol com potenciais de pico único igual a (+0,472 e +0,606) V_{Ag/AgCl NaCl¹¹⁷}, respectivamente. Os potenciais citados estão de acordo com os outros valores publicados (CAO, Xiaomei et al., 2009; ALMEIDA, 2009; KEELEY et al., 2012). Os E_i e E_f das reações eletroquímicas condizentes às espécies interferentes podem ser visualizados na Figura 53a,b,c (ácido úrico, ácido ascórbico e paracetamol, respectivamente), e também estão sistematizados na Tabela 26.

Figura 53 – Gráficos DPV em soro fisiológico (sinal de linha base) de acordo com as concentrações de: a) (1 e 2) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, b) (0,22 e 0,44) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico, c) (0,34 e 0,68) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol e d) (1 e 2) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato.



Fonte: Almeida (2014).

Tabela 26 – Sistematização dos potenciais obtidos por DPV no início, no pico e no fim da reação eletroquímica do nitrato e das espécies interferentes (considerando o dobro das concentrações reportadas para a concentração máxima em fluidos sanguíneos).

Concentração	Potencial de início (E _i)	Potencial de pico (E _p)	Potencial de fim (E _f)	Corrente de pico (I _p)
1,00 $\mu\text{mol cm}^{-3}$	0,193	0,247	0,327	34,5
1,00	0,383	0,506	0,645	25,5
2,00	0,750	0,822	0,912	14,1
0,22	0,079	0,280 e 0,404	0,534	4,6 a 4,9
1,00	0,231	0,472	0,687	11,7
0,34	0,386	0,606	0,708	11,7

Fonte: Almeida (2014).

Importante destacar, todos os voltamogramas DPV foram subtraídos aos valores de linha base (linha preta nos gráficos), correspondentes ao sinal de corrente para a solução contendo somente $0,15 \text{ mmol cm}^{-3}$ de NaCl com pH 6,36.

No caso do nitrato, a Figura 53d apresenta o pico I do nitrato (ao redor de $+0,247 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$ para o sinal máximo de corrente) foi extraído cineticamente do voltamograma DPV, que se inicia aproximadamente em $+0,190 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$ e termina com o potencial em torno de $+0,330 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$. Observa-se também que os potenciais deslocam-se com o aumento da concentração de nitrato (que pode ser atribuído pela variação de resistência devido ao transporte de cargas iônicas no filme polimérico). Em concentrações tão baixas quanto 500 nmol cm^{-3} , o sinal de nitrato não é visível, pois está sobreposto aos sinais das espécies interferentes (não mostrado pela Figura 53d).

A partir do estudo dos potenciais termodinâmicos de equilíbrio redox condizentes à reação eletroquímica (considerada-a rápida, reversível e no sentido da oxidação), constata-se que a equação 37 (item 4.7) permite calcular o potencial termodinâmico em termos da temperatura e das atividades iônicas empregando o equacionamento de Nernstiano (descrito pela equação 44), resultando $+0,248 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$ ($1 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato).

Para equação 37 $E_{\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-}^{\text{e}} = E_0_{\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-} - \frac{zF}{RT} \ln \frac{a_{\text{NO}_2^-} a_{\text{OH}^-}}{a_{\text{NO}_3^-}}$ (44)

Sendo: a atividade aproximada das hidroxilas obtida a partir do OH usando a equação 20 (pH 6,36) e a atividade aproximada do nitrato foi calculada a partir da concentração do nitrato e da constante de equilíbrio químico relacionado ao potencial termodinâmico de equilíbrio redox (equação 37).

Na Figura 53d, o valor de potencial calculado ($+0,248 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$) está correlacionado ao potencial cinético extraído do voltamogramas DPV ($+0,247 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$) para a mesma concentração ($1 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato).

Porém, a relação só é direta se a cinética for dominada por reação superficial, e não dominada por transporte de cargas.

No pico II do nitrato, o potencial foi obtido a partir dos voltamogramas DPV, cujo valor está em +0,506 V_{Ag/AgCl} Nafion[®] 117 (Figura 53d). Neste pico II, os potenciais no início e no fim da reação eletroquímica estão entre +0,380 V_{Ag/AgCl} Nafion[®] 117 e +0,650 V_{Ag/AgCl} Nafion[®] 117, respectivamente. Por meio do potencial termodinâmico de equilíbrio redox calculado a partir do equacionamento Nernstiano (equação 45), do potencial redox da reação eletroquímica apresentada pela equação 38 do item 4.7 (considerando-a rápida, reversível, no sentido da redução e em ambiente fechado) e das concentrações descritas anteriormente para o nitrato, o potencial estimado foi +0,493 V_{Ag/AgCl} Nafion[®] 117 (1 μmol cm⁻³). Este potencial pode ser correlacionado com o pico II do nitrato, mas novamente estudos corroborativos da cinética deverão ser realizados para afirmar precisamente a relação entre eles. Considerando a concentração de 2 μmol cm⁻³ de nitrato, o pico II desloca-se levemente no sentido de decréscimo do potencial, indicando possivelmente uma variação na resistência do eletrodo ao transporte de cargas iônicas no filme polimérico ou uma ligeira variação do potencial termodinâmico.

Para equação 38.....
$$E_{NO_2^-/NO}^0 = E_{NO_2^-/NO}^0 - \frac{zF}{RT} \ln \frac{a_{NO_2^-}^{OH^-} a_{NO}^2}{a_{NO_2^-}^{NO}} \quad (45)$$

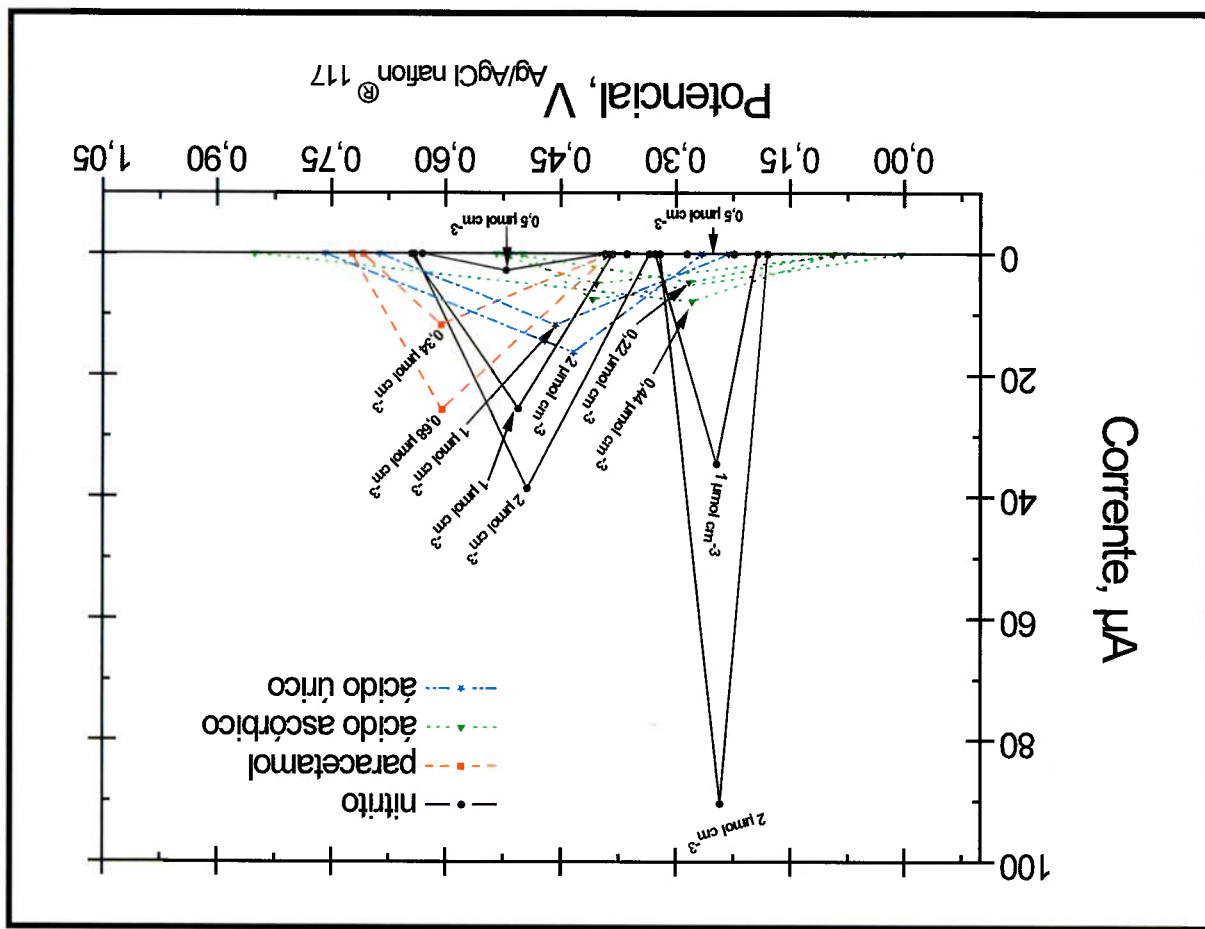
Sendo: a atividade aproximada das hidroxilas obtida a partir do pOH usando a equação 20 (pH 6,36) e a atividade aproximada do óxido nítrico foi calculada a partir da concentração do nitrato e da constante de equilíbrio químico relacionado ao potencial termodinâmico de equilíbrio redox (equação 38).

Para o pico III do nitrato (aproximadamente +0,820 V_{Ag/AgCl} Nafion[®] 117 obtido do voltamograma DPV) que aparece para altas concentrações de nitrato (acima de 2 μmol cm⁻³), ainda não possível identificar uma possível reação dominante envolvendo o nitrato. Por outro lado, considerando que nos potenciais acima de +0,500 V_{Ag/AgCl} Nafion[®] 117, ocorre pronunciada degradação do eletrodo de Au-1,2-DAB (efeito também observado para os outros polímeros estudados). Neste caso, a

oxidação do polímero torna o eletrodo insensível ao nitrito (ALMEIDA, 2009, p. 118). Diante disso, medir nitrito a partir do pico III do nitrito torna-se um procedimento inadequado.

A seguir, apresentamos um mapeamento em formato de triangular (Figura 54) que corrobora com o estudo dos potenciais obtidos dos voltamogramas DPV. Neste mapa, os potenciais e correntes foram descritos em função de triângulos para cada reação eletroquímica de acordo com a concentração das espécies químicas e do método de extração dos potenciais por meio dos voltamogramas DPV (comentado no item 4.7). Além do nitrito, também foi extraído por DPV os potenciais das espécies interferentes (AA, AU e PA), mas não os estudamos quanto às reações eletroquímicas de oxirredução e aos potenciais redox padrão (termodinâmicos).

Figura 54 – Mapeamento em formato triangular da corrente eletroquímica em função do potencial a partir dos gráficos DPV e dos cálculos matemáticos, usando o equacionamento de Nernstiano.



Para o nitrato, foram seis triângulos que representam os picos I e II do nitrato (Figura 53d) e três concentrações distintas [(0,50, 1 e 2) $\mu\text{mol cm}^{-3}$]. Já as espécies interferentes: ácido úrico [(1 e 2) $\mu\text{mol cm}^{-3}$] e paracetamol [(0,34 e 0,68) $\mu\text{mol cm}^{-3}$], são dois triângulos por cada e ácido ascórbico [(0,22 e 0,44) $\mu\text{mol cm}^{-3}$], são quatro triângulos. Os valores de potenciais de equilíbrio redox correspondentes aos picos máximos de correntes foram sistematizados na Tabela 26.

Neste mapeamento de potenciais e correntes, a medição do nitrato pode ser realizada entre (+0,190 e +0,650) $V_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$. Considerando as concentrações micromolares/ cm^3 de nitrato, os potenciais de equilíbrio redox correspondente ao pico I e II do nitrato se deslocam para em torno de (+0,250 e +0,500) $V_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$, respectivamente. No potencial entre (+0,300 e +0,350) $V_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$, a resposta de nitrato é praticamente nula, pois está em entre os potenciais de fim e de início da reação eletroquímica correspondente ao pico I e II do nitrato, respectivamente. Os potenciais para o sinal do nitrato sempre está somado aos sinais das espécies interferentes e quando o nitrato está em baixas concentrações o sinal não é visível (mascarado pelos sinais dos interferentes). No potencial +0,500 $V_{\text{Ag/AgCl Nafion}}^{\text{® 117}}$, o sinal do nitrato também está adicionado aos das espécies interferentes, mas o sinal correspondente à concentração de 0,50 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ pode ser observado. Das espécies interferentes, somente o ácido ascórbico responde em toda faixa de potencial estudada (ver linha verde na Figura 54).

O estudo dos potenciais com macroeletrodos Au-1,2-DAB norteou os primeiros delineamentos desta tese, pois o desafio estava posto: medir nitrato em baixas concentrações com sensibilidade superior à das espécies interferentes.

Os próximos resultados foram obtidos usando macroeletrodos de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$ de área) recobertos com PPI, polil(1,2-DAB), polil(1,3-DAB), PANI e PIm, também o PIm funcionalizado com Cu(II). Os potenciais de equilíbrio redox foram estudados também por DPV a partir da faixa de potencial entre (-0,150 e +0,450) $V_{\text{Ag/AgCl 3M NaCl}}$, o estreitamento da faixa de potencial permitiu um ganho de eficiência nos procedimentos de medição do nitrato (a partir dos próximos experimentos, mais detalhes serão apresentados). Adiantando resultados, potenciais acima de +0,150 $V_{\text{Ag/AgCl 3M NaCl}}$ empregando o microeletrodo Au-PIm-Cu(II) recebem moderada

influência das espécies interferentes com máxima sensibilidade ao nitrato em concentrações $\leq 20 \text{ nmol cm}^{-3}$. Os demais polímeros não apresentaram sensibilidade ao nitrato nessas concentrações, além das influências das espécies interferentes serem substanciais, principalmente dos íons de hidrogênio e íons cloratos (detalhes na sequência).

Após a configuração dos eletrodos, a técnica eletroquímica DPV, como descrita no item 4.7, foi empregada para avaliar as influências de adsorção e absorção das espécies interferentes intrínsecas à SQR nos diferentes polímeros condutores, e foi analisada a resposta eletroquímica de $1 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato, mediante os mesmos polímeros supracitados. Estes experimentos foram desenvolvidos de acordo com as seguintes especificações de entrada:

- potencial inicial = $(-0,150 \text{ ou } -0,050) \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$;
- potencial final = $(+0,300, 0,350 \text{ ou } 0,450) \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$; e
- velocidade de varredura = $0,010 \text{ V s}^{-1}$.

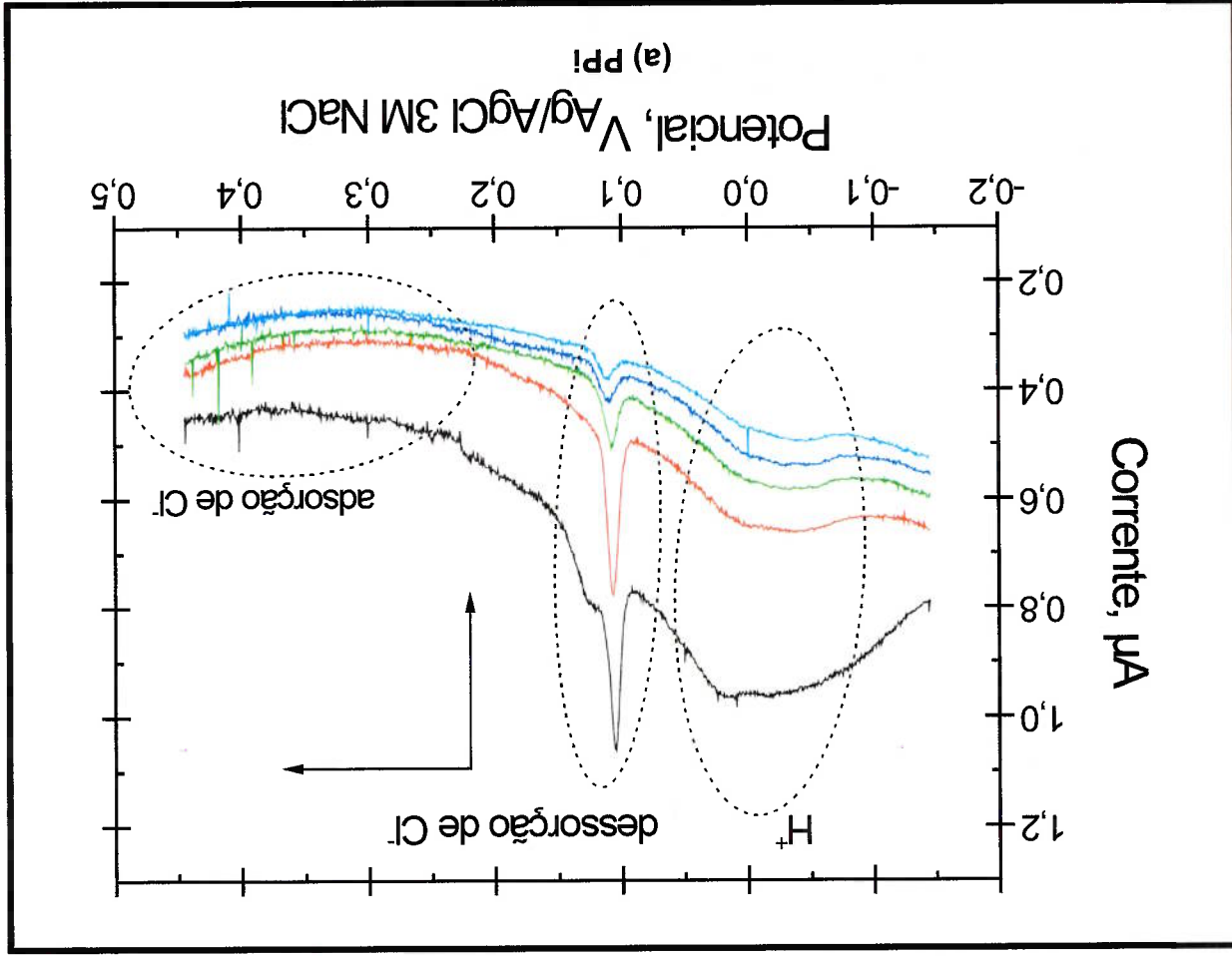
A célula, por sua vez, foi desligada automaticamente via *software*.

Antes de seguir com os estudos DPV, um breve parêntese. É importante destacar que outros experimentos foram realizados com potenciais acima de $+0,600 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$ (gráficos não mostrados). Nesses casos, o sinal de medição do nitrato usando microeletrodos modificados com PIm, poli(1,3-DAB) e PPI apresentaram incrementos consideráveis no sinal de corrente de resposta, porém os efeitos das espécies interferentes como cloratos, oxigênio e hidroxilas ficaram expressivamente somados. Além disso, como comentado no início desse tópico, os polímeros rapidamente se degradaram, ficando insensível ao nitrato (ALMEIDA, 2009, p. 118).

Por meio do estudo dos gráficos DPV - a partir de macroeletrodos de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$ de área) - podemos observar o comportamento eletroquímico dos polímeros condutores em SQR. Nesse caso, sem sulfato de cobre(II) e com concentração conhecida e estável de cloratos, sódio, potássio, fosfato e ácido EDTA dissódico a um pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ \text{C}$ (discutido no APÊNDICE B.3.3). Os íons de hidrogênio podem se absorver na estrutura do polímero, portanto, tendo como

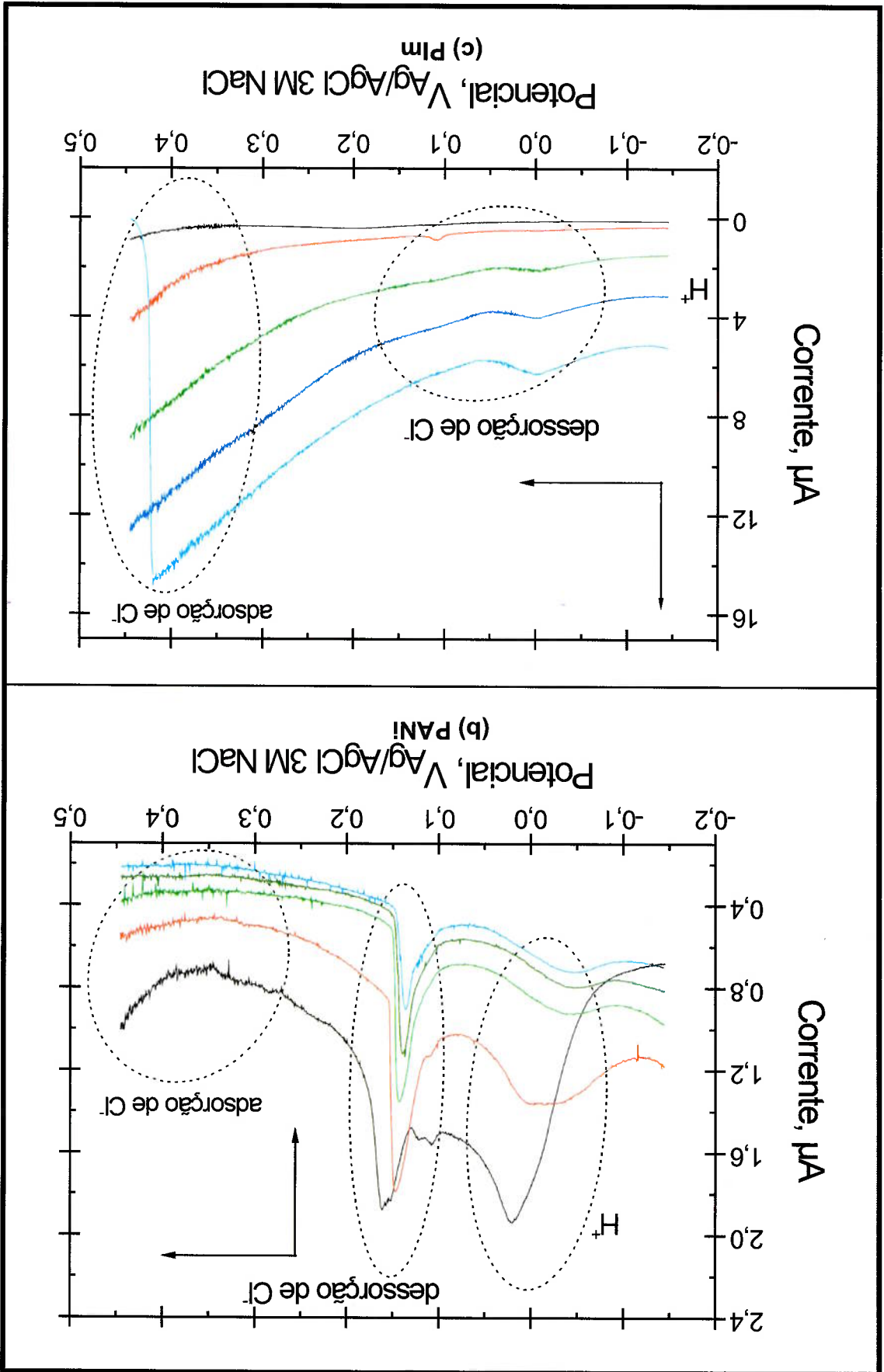
resultado a alteração no valor de corrente medida. Também pode ocorrer adsorção sobre a superfície do eletrodo, possibilitando a aproximação de cloretos no filme e a modificação de corrente de medição. Os cloretos têm sua adsorção favorecida por aplicação de potencial positivo e a dessorção ocorre a partir dos íons cloretos que se despegam do filme (ALMEIDA, 2009, p.123-125; GAO et al., 2010), aproximadamente em +0,150 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Os voltamogramas DPV apresentados na Figura 55 foram obtidos com 10 min de intervalo um do outro em SQR, permitindo desse modo uma análise a respeito dos efeitos de adsorção e adsorção de íons de hidrogênio e cloretos nos filmes poliméricos: PPI, poli(1,2-DAB), poli(1,3-DAB), PANI e PIm.

Figura 55 – A técnica eletroquímica DPV foi utilizada por analisar os efeitos de adsorção/absorção de íons hidrogênio e oxigênio ou a evolução de gás hidrogênio e os efeitos de adsorção e dessorção de cloretos usando uma SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C, sem sulfato de cobre(II) e concentrações constantes de espécies químicas. Os polímeros condutores estudados foram: (a) polipirrol, (b) polianilina, (c) poli(imidazol), (d) poli(1,2-DAB) e (e) poli(1,3-DAB). As setas nos voltamogramas indicam o comportamento da corrente na dessorção dos cloretos.



Continua...

Figura 55 - Continuação...



Continua...

Conclusão.

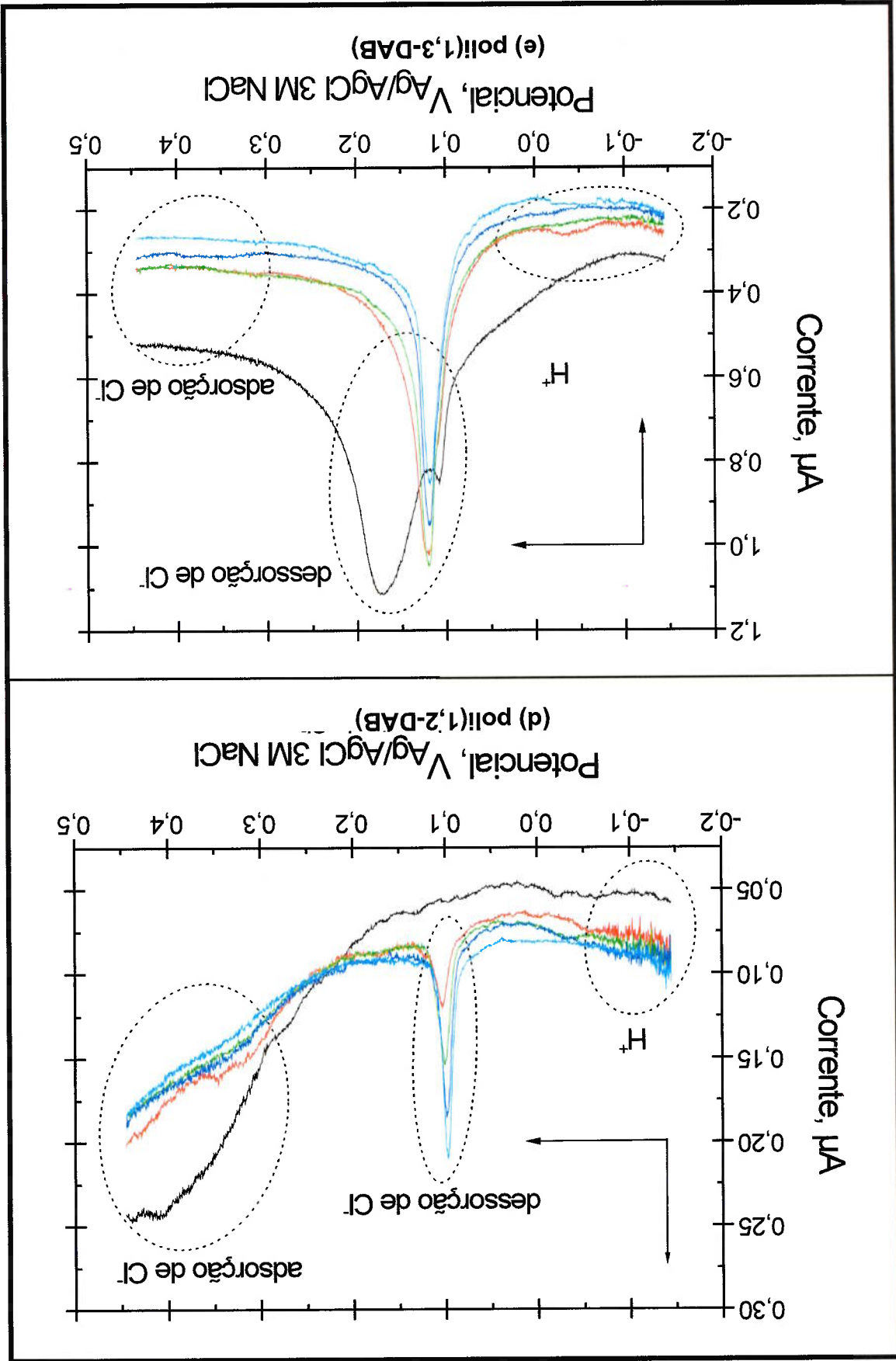
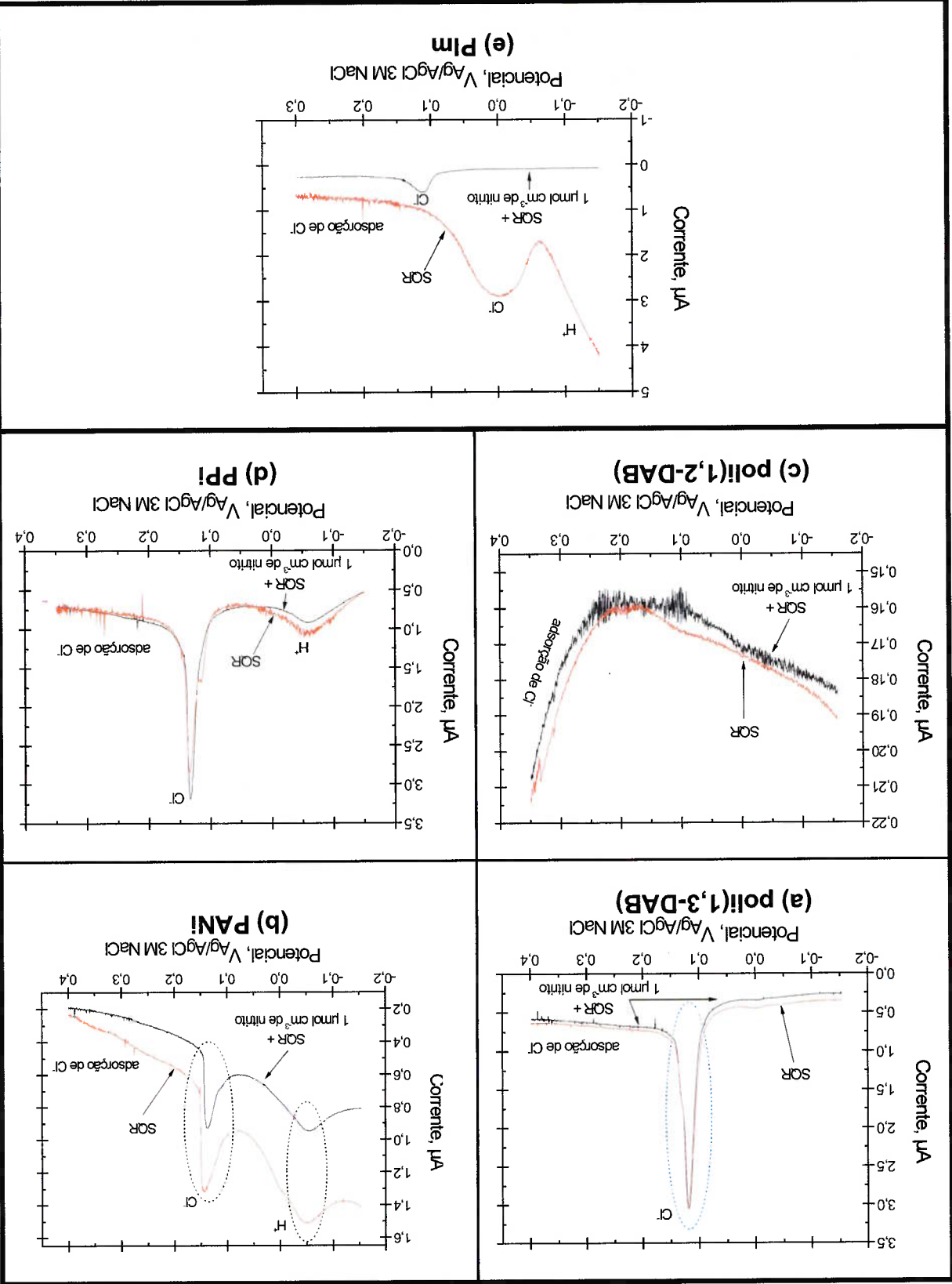


Figura 55 – Continuação...

Todos os polímeros condutores apresentaram variações de corrente a potenciais abaixo de 0 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, correspondem aos efeitos dos íons de hidrogênio e oxigênio (KUCERNAK; OFFER, 2008; JU et al., 2012). Polipirrol e, principalmente, polianilina são mais sensíveis à adsorção dos íons de hidrogênio, o poli(imidazol) não tem uma variação significativa e os DAB sofrem uma influência expressa em ruído eletroquímico (presença de íons de hidrogênio e oxigênio se adsorvendo no polímero). Na adsorção de cloretos, polianilina e polipirrol foi observado ruído eletroquímico na região dos potenciais mais positivos (efeito da adsorção dos cloretos), não observado de maneira expressiva nos outros polímeros, com exceção do imidazol, que apresenta saturação a potenciais acima de +0,400 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} (o filme fica mais condutivo com a adsorção de cloretos, efeito de dopagem do filme polimérico). Com relação à desorção de cloretos, o potencial de medição na desorção dos íons de cloro foi ao redor de +0,100 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Neste potencial, o sinal de corrente se reduz usando polianilina e polipirrol e aumenta para o poli(1,2-DAB) e poli(imidazol). Por fim, fica relativamente estável com o poli(1,3-DAB). Portanto, chega-se à conclusão de que o filme de polianilina pode ser empregado com relativa eficiência em sensores para medir íons de hidrogênio e o poli(1,3-DAB) para íons cloretos (informações em detalhes na Tabela 27).

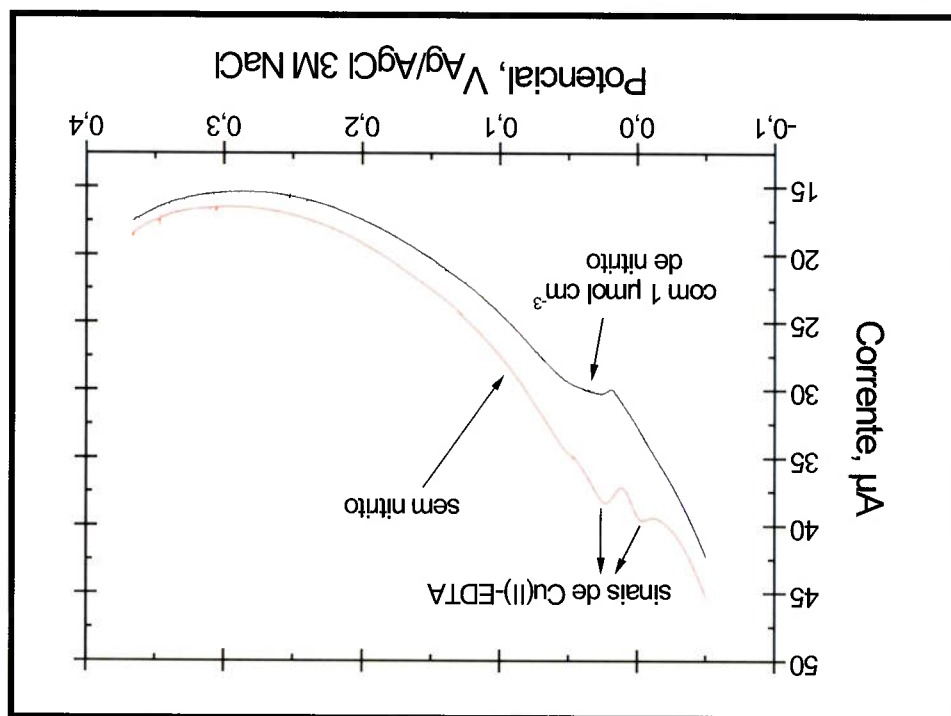
Usando macroeletrodos de ouro ($\approx 9 \text{ mm}^2$), a Figura 56 indica os comportamentos eletroquímicos dos polímeros condutores com a adição de $1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato (analisa-se as respostas em corrente a partir da varredura de potenciais por meio da técnica eletroquímica DPV. Nos voltamogramas DPV, houve um deslocamento no sinal de corrente somente para os eletrodos recobertos com polianilina ou poli(imidazol). Nos demais polímeros não ocorreu variação significativa da corrente com a adição do nitrato (Figura 56a,c,d). Esse efeito de deslocamento da corrente pode ser explicado considerando a adsorção e adsorção do nitrato sobre os polímeros, tornando-os menos condutivos com a adição de nitrato. O poli(1,2-DAB), poli(1,3-DAB) e polipirrol não apresentaram alteração significativa da corrente, portanto, nada se pode concluir. Além disso, o PANI sem ou com nitrato apresentou considerada influência dos íons hidrogênio próximo a -0,050 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} (Figura 56b), este efeito é amenizado usando o polímero imidazol, praticamente sem influência dos íons hidrogênio (Figura 56e).

Figura 56 – Considerando a faixa de potencial entre (-0,150 e +0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, os DPV indicam a resposta eletroquímica de 1 μmol cm⁻³ de nitrato em SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C, sem sulfato de cobre(II) e concentrações constantes das espécies químicas. Os polímeros condutores analisados foram: (a) poli(1,3-DAB), (b) PANI, (c) poli(1,2-DAB), (d) PPI e (e) PIm.



Avançando nos estudos com o PIm, a sensibilidade na medição de nitrato foi aumentada adicionando 20 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II) a SQR. Este se complexa em 100% com o EDTA presente na solução química (veja o APÊNDICE E). A Figura 57 indica o resultado de medição de nitrato usando um macroeletrodo de ouro modificado com polí(imidazol) e funcionalizado com cobre(II), adicionando o último a SQR. A curva em vermelho (sem nitrato) aparece dois picos próximos a (-0,010 e +0,040) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, representando os sinais do Cu(II)-EDTA similar ao trabalho reportado por Chen, Baohong et al. (2010). Na curva em preto (com nitrato), o resultado foi um sinal expressivo de nitrato próximo a +0,050 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} e este potencial de pico é similar ao potencial descrito por Lin, Hong Yan et al. (2009) e Shishobore et al. (2010). No nosso caso, o pico DPV não está completo devido à sobreposição de correntes advindas dos sinais do Cu(II)-EDTA e da redução dos ions de hidrogênio (Figura 57). Neste ponto, usar microeletrodos e adsorver de cobre(II) no polímero imidazol possibilitou distinguir com mais eficiência as correntes relativas ao nitrato em baixas concentrações, incrementando sensibilidade (este tópico será discutido em detalhes a seguir).

Figura 57 – Macroeletrodo de ouro modificado com PIm foi analisado - por meio da técnica DPV - em SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C contendo 20 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II), com e sem 1 μmol cm⁻³ de NO₂⁻.



Na medição do nitrato na faixa de potencial entre (+0,150 e +0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, o mesmo conhecendo os resultados que foram reportados por Biagiotti et al. (2007).

A Tabela 27 apresenta a síntese dos experimentos por DPV, considerando os polímeros condutores estudados e as espécies de nitrato, íons de hidrogênio, cloratos, hidroxilas, fosfatos, íons de sódio e de potássio, gás oxigênio e Cu(II)-EDTA.

Tabela 27 – A partir dos experimentos DPV, sistematizamos as respostas relacionadas às espécies químicas estudadas para cada membrana polimérica; observam-se os comportamentos eletroquímicos dos polímeros condutores que foram definidos como: medição possível, não indicado para sensorização ou com interferência eletroquímica.

Espécies Químicas	Polímeros			
	polianilina	polipirrol	poli(imidazol)	poli(1,2-DAB) poli(1-3 DAB)
nitrato	✓	x	✓	x
íons cloratos	✓	x	•	✓
íons de hidrogênio	✓	✓	x	•
hidroxilas	NA	NA	NA	NA
fosfatos	x	x	x	x
íons de sódio	x	x	x	x
íons de potássio	x	x	x	x
gás oxigênio	•	•	•	•
gás nitrogênio	•	•	•	•
gás carbônico	•	•	•	•
Cu(II)-EDTA	NA	NA	•	NA
✓ medição possível ⁴³				
• ruído eletroquímico ⁴⁴				
x não indicado ⁴⁵				
NA: não analisado				

Fonte: Almeida (2014).

⁴³ Medição possível foi um termo utilizado para referir-se aos polímeros que (a partir dos resultados desta tese) que podem ser empregados para medir determinada espécie química, porém, para tal, devem ser realizados testes adicionais.

⁴⁴ Ruído eletroquímico refere-se ao efeito provocado pelas espécies químicas que agem sobre a superfície do polímero, seja por absorção ou adsorção, alterando as características físico-químicas do polímero (deslocamento de correntes eletroquímicas decorrente de processos de dopagem).

⁴⁵ Não indicado é um termo genérico atribuído ao filme polimérico que não apresentou resposta eletroquímica a uma determinada espécie química.

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 55, 56 e 57, poli(1,2-DAB), poli(1,3-DAB) e PPI não apresentaram sensibilidade ao nitrato (usando a faixa de potencial de análise entre $-0,150$ e $+0,350$) $V_{Ag/AgCl}$ 3M NaCl. O PIm e PANI mostraram um deslocamento de corrente com a adição de $1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de nitrato (Figuras 56b,e e 57), sendo a medição possível e os demais polímeros (poli(1,2-DAB), poli(1,3-DAB) e PPI) não é indicada a medição do nitrato. As outras espécies químicas apresentadas na Tabela 27 advêm dos resultados mostrados pelas Figuras 55 e 56. Portanto, foram somente descritas, sem comentários adicionais.

Acrescentando, os experimentos com macroeletrodos (resultados referentes à Figura 55 em diante até a Tabela 27), os experimentos de medição do nitrato foram mais promissores com o polímero imidazol. Este polímero apresentou menor influência das espécies interferentes intrínsecas à SQR (resumo dos resultados na Tabela 27), foi sensível ao nitrato e é facilmente funcionalizado com cobre(II). Outro fator que corrobora para a utilização do imidazol está na sua própria estrutura química, ou seja, a capacidade de alteração do estado de oxidação, tornando-se um polímero reversível (comentado no item 4.3). Portanto, os experimentos seguintes foram realizados prioritariamente com o polímero imidazol.

Alguns testes (não mostrados) com polianilina, polipirrol e poli(1,3-DAB) foram realizados, mas não apresentaram resultados significativos para a adição de 20 nmol cm^{-3} de nitrato. Portanto, estes polímeros foram descartados para medição do nitrato a baixos níveis de concentração.

Os próximos experimentos eletroquímicos foram centrados em microeletrodos de ouro modificados com imidazol e funcionalizados com cobre(II) (Au-PIm-Cu(II)). Os microeletrodos foram analisados, usando o SME com três eletrodos, a saber:

- i. eletrodo de medição: microeletrodo de ouro ($176,6 \mu\text{m}^2$ de área geométrica média), limpo quimicamente de acordo com o procedimento descrito em 4.2.1 e 5.2 e modificado com polímeros como especificado no item 5.3.2;
- ii. eletrodo de referência: Ag/AgCl 3M NaCl (RE-5B) da BASI[®]; e
- iii. eletrodo auxiliar: platina ($1,75 \pm 0,25 \text{ mm}^2$).

Todos os experimentos com microeletrodos foram realizados utilizando uma gaiola de Faraday conectada a um aterramento adequado, o que permitiu resultados não afetados por ruídos eletromagnéticos.

A técnica eletroquímica de voltametria cíclica (descrita na revisão bibliográfica, item 2) controlado por meio do analisador eletroquímico Autolab (ANEXO B) foi utilizada para analisar os efeitos redox de adsorção das espécies químicas sobre os microeletrodos Au-Ptm-Cu(II) em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$. As especificações de entrada foram:

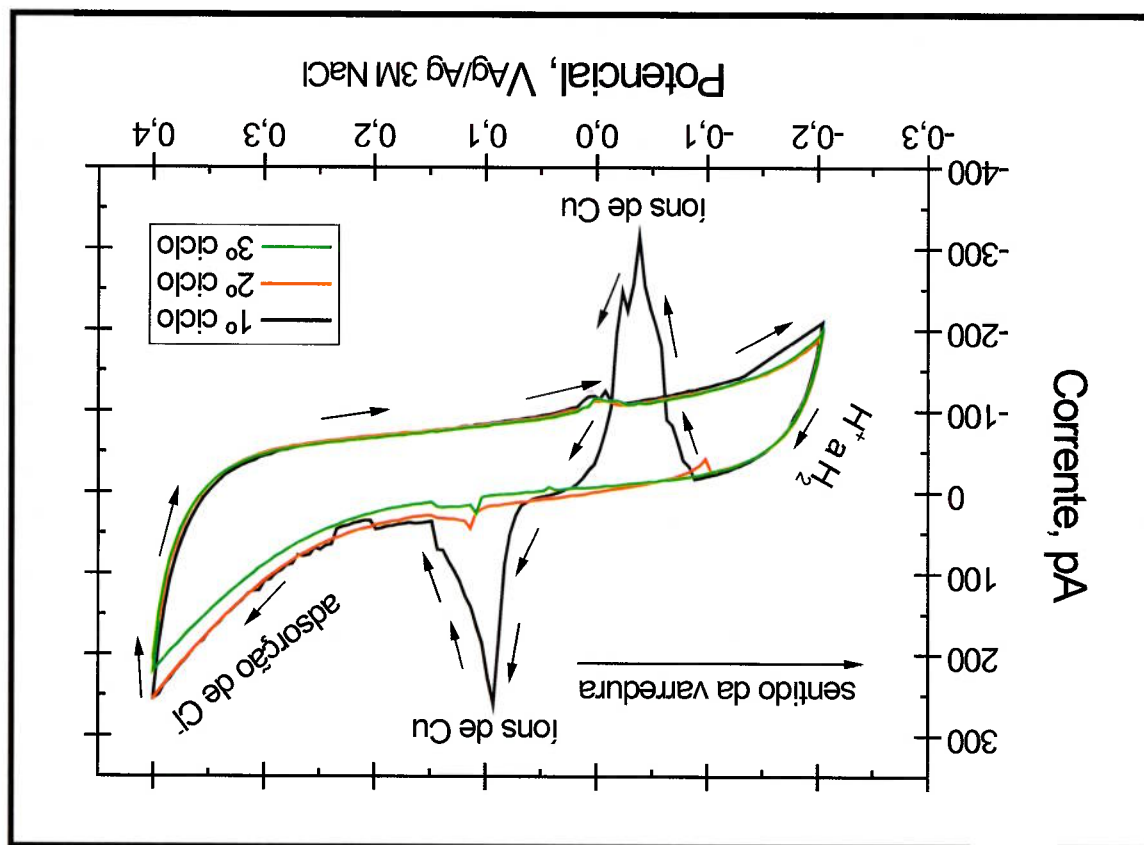
- potencial inicial = $(+0,400$ ou $+0,300) \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M KCl}}$
- potencial final = $(-0,200$ ou $-0,050$ ou $+0,050) \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M KCl}}$
- velocidade de varredura = $0,010 \text{ V s}^{-1}$; e
- números de ciclos = 10.

Todos os testes com CV foram realizados começando o voltamograma do potencial mais positivo para o potencial menos positivo. Deste modo, no início do voltamograma, o número de espécies químicas de cobre estão em maior parte na forma de Cu(II) (veja as reações eletroquímicas do cobre e os potenciais redox padrão no ANEXO C). Pelos experimentos realizados, este procedimento favorece a medição do nitrato.

Na Figura 58, os picos dos íons de cobre [próximo a $(-0,050$ e $+0,100) \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$ aparecem somente na primeira varredura dos voltamogramas. Com o EDTA, os dois picos de cobre também podem ser observados no trabalho desenvolvido por Chen, Baohong et al. (2010) e outros picos de Cu(II) em voltamogramas CV corroboram para compreensão dos potenciais obtidos nesta tese (BUFFLE; TERCIER-WAEBER, 2005; MARTÍNEZ-HUITLE et al., 2010a e 2010b). No nosso experimento, após a primeira varredura, os picos relacionados aos íons de cobre são substancialmente minimizados em decorrência das reações redox correspondentes a esse metal ou da corrente resposta do transporte de carga (íons de cobre no filme polimérico). Este fato indica que o cobre(II) absorvido dentro da estrutura do polímero pode se desorver ou o cobre(II) pode formar complexo com o EDTA presente na SQR, apresentando variações nos sinais de corrente. A partir da ligação do NO_2^- ao cobre(II) tem-se o sinal de medição de resposta, com a redução do cobre(II) ou a

desorção do mesmo, o nitrato fica livre em solução; mas se o cobre(II) em excesso sair da superfície do polímero ele será capturado pelo agente quelante EDTA (veja o APÊNDICE E). O contrário pode ocorrer, ou seja, o cobre(II) presente na SQR pode adsorver no polímero, permitindo o equilíbrio entre Cu(II)-EDTA (comentado no item 4.4). Neste caso, o nitrato está livre em solução (veja o APÊNDICE F), pois a constante de estabilidade $\log k$ do EDTA (18,80) é bem superior à do nitrato (2,02 ou 3,03); nestas condições, o cobre(II) contribui para a medição do nitrato.

Figura 58 – Voltamogramas cíclicos após o microeletrodo Au-PIm ficar guardado em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 20 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) durante 40 min (3 ciclos a uma velocidade de varredura de $0,050 \text{ V s}^{-1}$). A seta indica o sentido da varredura do voltamograma.

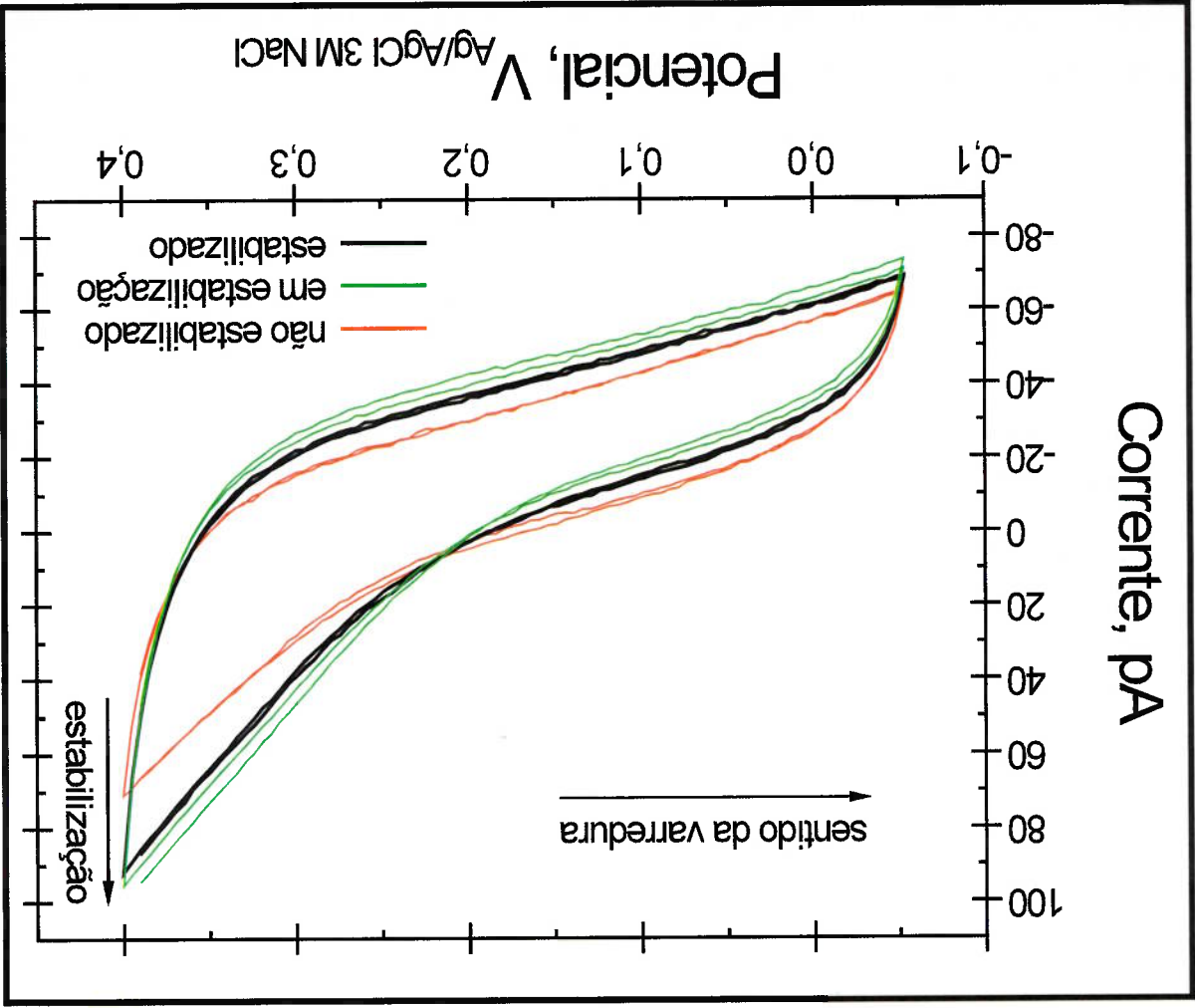


Fonte: Almeida (2014).

A SQR permite adsorver, de maneira controlada, o cobre(II) sobre o filme poli(imidazol), pois a presença de EDTA em solução garante um equilíbrio químico entre as constantes de estabilidade na complexação do cobre(II)-EDTA e do filme imidazol-cobre(II). Este procedimento difere de outros trabalhos (DENG, Yue-Yi; LIU; JIN, 2012; KUMAR; LO; CHEN, Shen-Ming, 2009) que usaram polarização elétrica para imobilizar cobre na superfície do polímero.

É importante destacar que estabilizar o sinal da corrente de medição na SQR a pH fisiológico $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ garante uma medição controlada do nitrato (similar aos processos bioquímicos de seres humanos). Os efeitos de adsorção nas superfícies dos microeletrodos de Au ($176,6 \mu\text{m}^2$) dos íons de hidrogênio; nesse caso, acabam se tornando previsíveis. Na Figura 59, observando-se o formato do voltamograma cíclico estabilizado (após 60 ciclos) percebe-se que a corrente medida foi de no máximo 90 pA correspondente ao potencial $+0,400 \text{ V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$, ponto em que houve saturação das espécies químicas presentes na SQR; consequentemente, há estabilização do filme polimérico de imidazol.

Figura 59 – Voltamogramas cíclicos representativos de 60 ciclos da estabilização do poli(imidazol) eletropolimerizado sobre o microeletrodo de ouro tendo uma SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ (faixa de potencial entre $+0,400$ e $+0,050$) $\text{V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$ a uma velocidade de varredura de $0,050 \text{ V s}^{-1}$). As setas indicam o sentido das varreduras dos voltamogramas.



A Tabela 28 mostra um quadro-resumo das faixas de potencial em que ocorre a influência dos íons de hidrogênio, das hidroxilas, dos cloratos e do oxigênio no perfil do voltamograma cíclico (KUCERNAK; OFFER, 2008; GAO et al., 2010; JU et al., 2012). Também se observa a faixa de potencial com menor sinal de corrente correspondente à linha base (somente devido à mínima resposta eletroquímica das espécies químicas presentes na SCR), seria a região mais adequada para a medição do nitrato. De acordo com os experimentos, o PIm tem a faixa de potencial com menor sinal de corrente de linha base entre (-0,150 e 0,0) $V_{Ag/AgCl}$ 3M NaCl; os demais polímeros apresentam uma faixa mais ampla, mas todos têm considerada influência dos íons hidrogênios (ver gráficos das Figuras 55 e 56).

Tabela 28 – Quadro resumo das faixas de potencial em que ocorre a influência dos íons de hidrogênio, cloratos, hidroxilas e oxigênio. Também apresenta-se as faixas de potencial eletroquímico de acordo com a menor corrente de linha base. NA: não analisado.

Polímeros	Influência do H^+ a H_2	Influência redox de H_2O , OH^- , O_2 ou Cl^-	Faixa de potencial com menor sinal de linha base
			$V_{Ag/AgCl}$ 3M NaCl

poli(1,2-DAB)	$\leq -0,10$	$\leq +0,20$	-0,10 a +0,20
poli(1,3-DAB)	$\leq +0,10$	$\leq +0,20$	+0,10 a +0,20
PANI	$\leq -0,10$	$\leq +0,10$	-0,15 a +0,20
PII	$\leq -0,10$	$\leq 0,00$	-0,10 a 0,00
PIm	NA	$\leq 0,00$	-0,15 a 0,00

Fonte: Almeida (2014).

Considerando as informações da Tabela 28, a estabilização ou pré-condicionamento do filme polimérico permitirá obter o sinal de medição do nitrato de forma mais confiável, a partir do voltamograma de referência estabilizado mostrado na Figura 59. Em outras palavras, o valor de corrente medida, na faixa de potencial mostrada na Figura 59, garante uma sensibilidade confiável e mais seletividade na medição do nitrato, fora da influência significativa dos íons de hidrogênio, hidroxilas, sulfatos e cloratos e do gás oxigênio sobre a superfície dos polímeros condutores. Para o

polímero sem estabilização, o sinal de nitrato medido acaba concorrendo com os efeitos de adsorção das espécies interferentes intrínsecas a SQR (provavelmente por trocas de cargas no polímero), principalmente os íons de hidrogênio. Nesta situação, com a adição de nitrato, inicialmente a corrente decresce, e depois de alguns voltogramas cíclicos, começa a aumentar em valor. Aumentando a concentração de nitrato, há um incremento do sinal de corrente com relação ao primeiro voltograma, mas depois ocorre um decréscimo contínuo (gráficos não mostrados).

Com o objetivo de resolver o problema de decréscimo contínuo, a partir dos resultados empíricos e da funcionalização do poli(imidazol) com cobre(II), alguns cuidados são necessários para manter o microeletrodo sensível ao nitrato, a saber:

i. a concentração da solução de deposição com o monômero imidazol deve ser da ordem de $0,50 \mu\text{mol cm}^{-3}$, pois soluções concentradas proporcionam excesso de sítios ativos de nitrato e mais diluídas acabam não eletropolimerizando;

ii. não des aerar a solução de deposição com gás nitrato, pois a eletropolimerização do filme com espécies de nitrato ligadas ao monômero imidazol acaba aumentando o número de sítios ativos para absorção de cobre(II), que satura o microeletrodo para medições de nitrato (gráfico não mostrado);

iii. também não agitar a solução de deposição, pois o oxigênio dissolvido em solução pode contribuir para efeitos similares ao do item ii;

iv. a faixa de potencial de eletropolimerização do imidazol deve ser de $+0,200$ a $+0,850$ V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Abaixo de $+0,200$ V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, ocorre influência de íons hidrogênio e muito acima de $+0,850$ V_{Ag/AgCl 3M NaCl} há saturação de hidroxilas, o que reduz a sensibilidade;

v. números de ciclos, durante a eletropolimerização, devem ser iguais a 70, pois a espessura do polímero influencia na medição eletroquímica do nitrato (Li, Jing; LIN, Xiangqin, 2007). Este número de ciclos garante máxima repetitividade nas medições e reprodutibilidade dos sensores fabricados, diante da dificuldade de medir ou calcular as espessuras dos polímeros sobre os microeletrodos;

- vi. após a eletropolimerização do poli(imidazol), o polímero foi funcionalizado com cobre(II) de acordo com o procedimento: 10 min em solução aquecida a 65 °C contendo 0,10 mmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II) com pH 5,45; e depois da funcionalização do poli(imidazol) com Cu(II), os microeletrodos Au-PIm-Cu(II) foram confinados durante 10 min na SQR contendo sulfato de cobre(II), para garantir a estabilização ou pré-condicionamento dos microeletrodos com menos ciclos voltamétricos: 10 ciclos.

Segundo os itens anteriores na ordem em que são descritos, o sinal de medição torna-se mais estável e crescente com a adição de nitrato em baixas concentrações (detalhes no próximo tópico).

5.7 Medição do Nitrato e Avaliação de Algumas Espécies Químicas Interferentes Presentes no Meio Biológico.

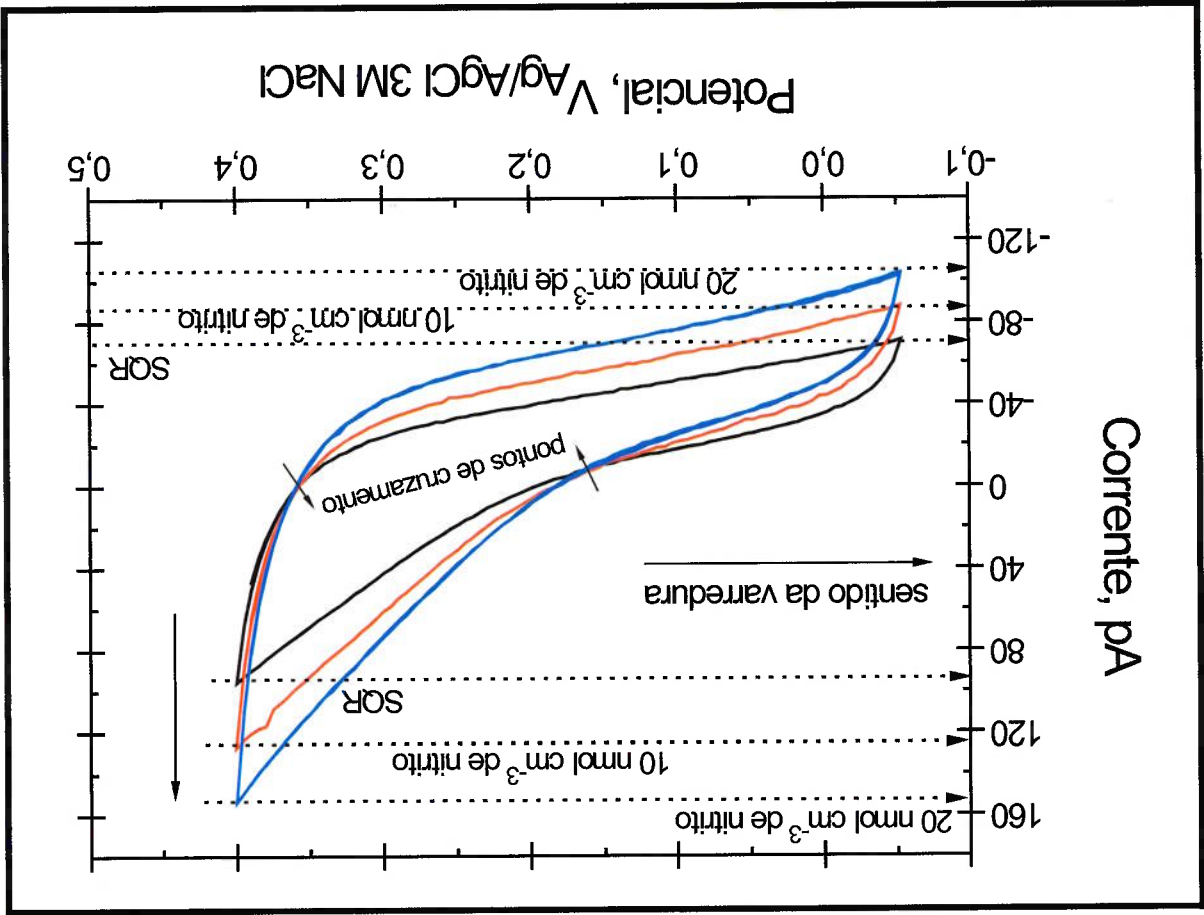
A seguir mostraremos os resultados das medições das concentrações de nitrato (30 mmol cm⁻³ para menos), usando uma SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C contendo espécies interferentes intrínsecas (cloratos, íons de hidrogênio, hidroxilas, gás oxigênio dissolvidos em solução, incluindo a oxidação da água) e a avaliação das influências das espécies interferentes presentes em meio biológico (ácido úrico, ácido ascórbico e paracetamol).

- As medições de nitrato foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento:
- i. adiciona-se nitrato a SQR, deixa-se o SME em repouso por 10 min antes de iniciar os voltamogramas cíclicos de medição; o tempo foi definido a partir dos estudos com (5, 10 e 30) min para adsorção de íons NO₂⁻; e
 - ii. o item i é repetido a cada nova adição de nitrato.

Após os testes com os polímeros condutores, o poli(imidazol) foi selecionado para a medição do nitrato por apresentar menor influência intrínseca das espécies interferentes no sinal corrente de linha base advindo da SQR (Figuras 55 e 56 e Tabelas 27 e 28) e ser sensível ao nitrato em baixas concentrações, usando solução fisiológica (experimentos mostrados a seguir). Para potenciais acima de +0,150 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}, foi observado um incremento pronunciado na resposta ao

nitrito (Figura 60), possível devido à funcionalização superficial do poli(imidazol) com cobre(II) que combina quimicamente com o nitrito (DENG, Yue-Yi; LIU; JIN, 2012).

Figura 60 – Medição eletroquímica do nitrito em uma SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 20 nmol cm^{-3} de cobre(II), usando microeletrodo de ouro ($r = 7,5 \text{ }\mu\text{m}$) modificado com poli(imidazol) e a técnica eletroquímica de voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$ e 10 ciclos a cada concentração do nitrito. A seta na vertical indica o sentido dos voltamogramas, corrente crescente com a adição de NO_2^- .



Fonte: Almeida (2014).

Na faixa de potencial observada entre $(-0,050 \text{ e } +0,400) \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$, ocorre influência moderada das espécies interferentes intrínsecas à SQR. A partir dos pontos de cruzamento (gráfico em preto), a medição do nitrito pode ser realizada no sentido anódico (potencial $> +0,150 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$) e no sentido catódico (potencial $> +0,350 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$). Importante destacar que nos potenciais abaixo de $+0,150 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$, tem-se significativa influência dos ions de hidrogênio e redução do oxigênio (KUCERNAK; OFFER, 2008). E para os potenciais acima de $+0,150 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$, os ions cloratos, hidroxilas e gás oxigênio podem atuar como espécies interferentes de acordo com o potencial aplicado (KUCERNAK; OFFER,

2008; GAO et al., 2010; JU et al., 2012). Sob este ponto de interações, justifica o estreitamento da faixa de potencial (+0,050 a +0,300 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}) utilizado nos experimentos seguintes.

A escolha da SQR não ácida com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C teve como objetivo menor influência dos íons de hidrogênio quando comparada a soluções com pHs ácidos, pois a saturação destes íons na superfície do polímero poderia mascarar o sinal de resposta do analito de interesse, o nitrato.

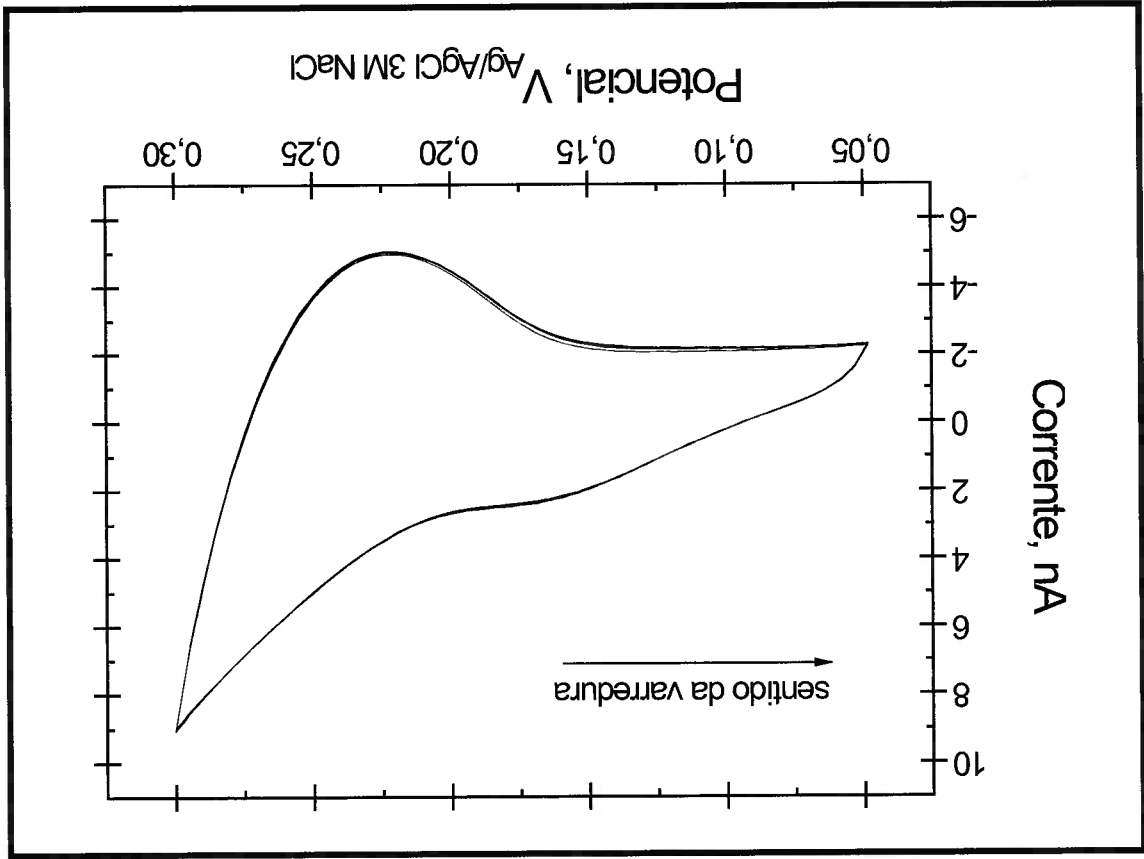
Diante do descrito, para incrementar máxima sensibilidade na medição do nitrato, é fundamental conhecer a resposta em corrente do microeletrodo de Au-poli(imidazol) quanto às espécies interferentes intrínsecas à SQR (método de estabilização do microeletrodo modificado) e quanto às espécies interferentes presentes em meio bioquímico (por exemplo: AU, AA e PA).

Além do estudo dos interferentes, observa-se que a faixa de potencial quando estreitada [(+0,050 a +0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}] corrobora para minimizar as influências das espécies interferentes intrínsecas à SQR e, principalmente, das espécies químicas que estão presentes em meio bioquímico no sinal de corrente de medição do nitrato. Além da faixa de potencial estreitada, verificamos que o aumento da concentração de cobre(II) de (20, 100, 200 até 400) nmol cm⁻³ permite um ganho de estabilização no sinal medido do nitrato, observando maior sensibilidade (provavelmente devido à iteração de complexação do cobre(II) e EDTA). Porém, para concentrações superiores a 400 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II), não houveram alterações significativas na resposta ao nitrato.

Na sequência, vamos avaliar a influência das espécies interferentes presentes em meio bioquímico. Um microeletrodo de ouro modificado com poli(imidazol) foi guardado por uma hora em solução com as espécies interferentes em concentrações dez vezes as encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos: 5,2 μmol cm⁻³ de ácido úrico, 1,1 μmol cm⁻³ de ácido ascórbico e 1,5 μmol cm⁻³ de paracetamol em SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C e 400 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II). Os efeitos de adsorção das espécies químicas são notáveis ao se comparar o voltamograma desse microeletrodo (Figura 61) com um microeletrodo

similar de Au-PIm-Cu(II) estabilizado e não guardado em SQR contendo interferentes (Figura 59).

Figura 61 – Microeletrodo de ouro ($r = 7,5 \mu\text{m}$) modificado com poli(imidazol) guardado por uma hora em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes em concentração de $5,2 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, $1,1 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico e $1,5 \mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol. O gráfico foi obtido por voltametria cíclica de $(+0,300$ a $+0,050) \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ a uma velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$ e 6 ciclos.



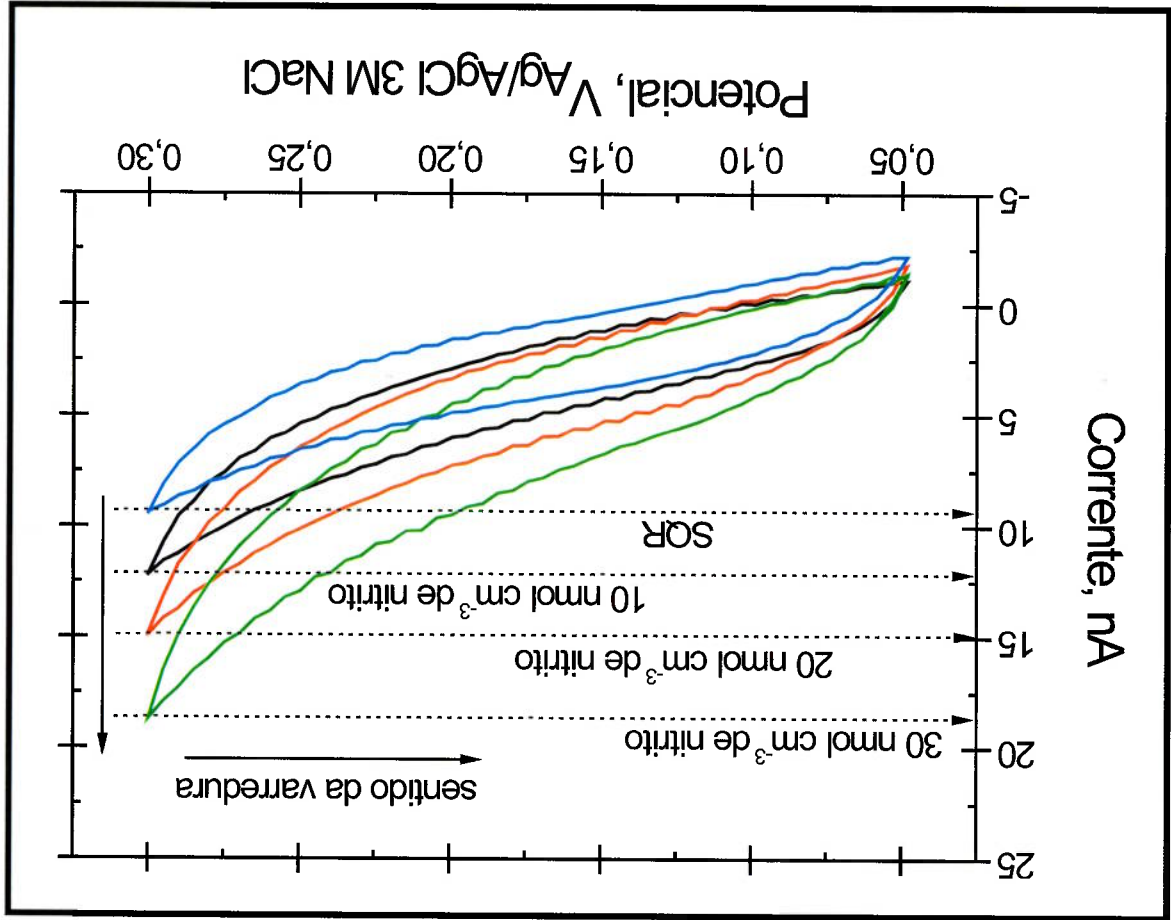
Fonte: Almeida (2014).

Analisando os gráficos apresentados nas Figuras 59 e 61, a corrente de resposta no potencial de $+0,300 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ é aproximadamente 9 nA (com os interferentes intrínsecos à SQR e os que estão presentes em meio bioquímico) e 90 pA (somente com interferentes intrínsecos à SQR). No potencial abaixo de $+0,150 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$, também ocorre influência dos ions de hidrogênio na presença das espécies interferentes (AA, AU e PA), além de um pico de redução em torno do potencial $+0,225 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$.

Após um estudo exaustivo para minimizar os efeitos de interferência e incrementar mais sensibilidade na medição ao nitrato, a interligação de microeletrodos permitiu

resultados mais confiáveis. Usando três microeletrodos interligados, além de mais sensibilidade, a saturação na medição do nitrato ocorre somente para concentrações acima de 30 nmol cm^{-3} (Figura 62) e as influências das espécies interferentes intrínsecas à SQR e presentes em meio bioquímico foram amenizadas (Figura 63) quando comparadas à Figura 61.

Figura 62 – Medição do nitrato em SQR pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ \text{C}$ com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) usando três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) ($r = 2,5 \text{ }\mu\text{m}$ cada) e a técnica eletroquímica voltametria cíclica a uma velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$ e 10 ciclos a cada concentração de nitrato. A seta na vertical indica o sentido dos voltamogramas, incremento em corrente com a adição de nitrato.



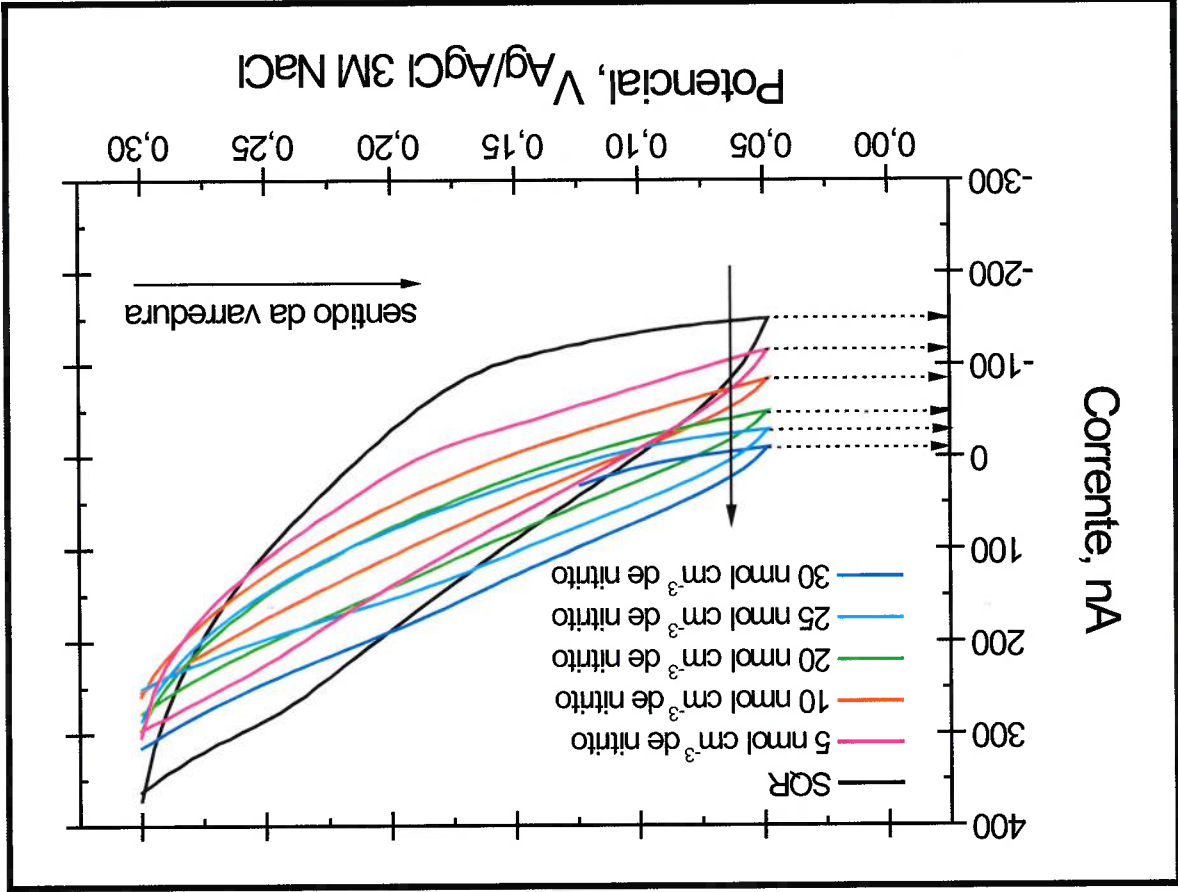
Fonte: Almeida (2014).

Comparando o formato dos voltamogramas, na Figura 62 (linha azul), a partir de $+0,200 \text{ V}_{\text{Ag/AgCl } 3\text{M NaCl}}$ há uma moderada influência das espécies interferentes intrínsecas à SQR com três microeletrodos interligados, mas usando somente um microeletrodo ocorre significativa influência (Figura 60 – linha preta). Portanto, com a interligação de microeletrodos, o estreitamento da faixa de potencial de medição, a adsorção de cobre(II) no poli(imidazol) e o aumento da concentração de cobre(II) na

SQR proporcionaram a viabilização da medição das concentrações (5, 10, 20, 25 e 30) nmol cm^{-3} de nitrato, juntamente com as espécies interferentes adicionadas à SQR (1,10 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, 0,22 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico e 0,34 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol; concentrações ao dobro (2x) das encontradas em sangue, plasma ou soro de humanos).

Na Figura 63, estão apresentados os voltamogramas cíclicos - para as medições de nitrato conforme as condições descritas.

Figura 63 - Interligação de três microeletrodos ($r = 2,5 \mu\text{m}$) Au-Ptm-Cu(II) para a medição do nitrato a concentração de (5, 10, 20, 25 e 30) nmol cm^{-3} em SQR com pH $7,4 \pm 0,02$ a $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ e 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes concentradas de 1,10 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AAe, 0,22 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AAe, 0,34 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA. Os voltamogramas cíclicos (10 ciclos a cada concentração do nitrato) foram obtidos de (+0,300 a +0,050) $\text{V}_{\text{Ag}/\text{AgCl } 3\text{M NaCl}}$ a uma velocidade de varredura de $0,010 \text{ V s}^{-1}$. A seta na vertical que transpassa os voltamogramas indica o incremento de corrente com a adição de nitrato.



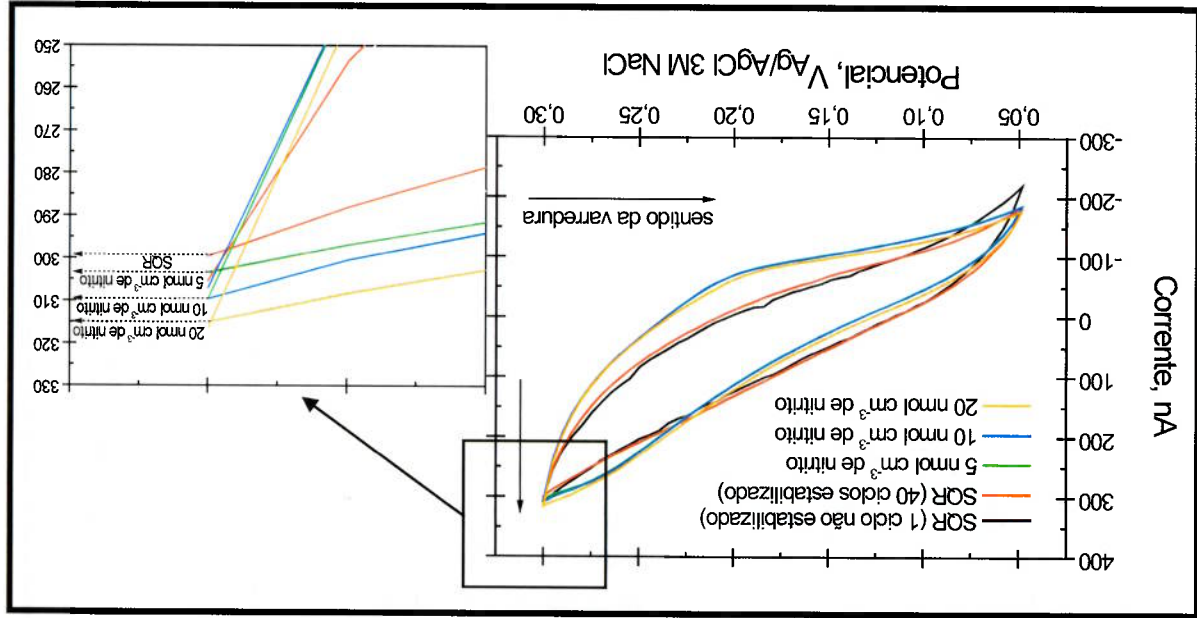
Fonte: Almeida (2014).

Na presença das espécies interferentes (AA, AU e PA), a variação de corrente medida para o nitrato ocorre no sentido crescente, para os potenciais abaixo de

+0,100 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} e no sentido decrescente, (consideravelmente difusa) no potencial +0,300 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Portanto, comparando a Figura 63 (nitrito e interferentes) à Figura 62 (somente nitrito) quanto aos potenciais descritos, há uma inversão dos sinais de corrente. Na Figura 62, há mínima corrente de resposta ao nitrito no potencial de +0,050 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} e máxima no +0,300 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}.

A seguir, extrapolamos em dez vezes as concentrações das espécies interferentes encontradas no sangue, plasma e soro de humanos: 5,2 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AU, 1,1 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e 1,5 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA foram adicionados à SQR com pH 7,4 \pm 0,02 a (24 \pm 2) °C e com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II). As concentrações (5, 10 e 20) nmol cm^{-3} de nitrito foram analisadas (Figura 64).

Figura 64 – Três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados ($r = 2,5 \mu\text{m}$ cada) para a medição do nitrito a concentração de (5, 10 e 20) nmol cm^{-3} em SQR com pH 7,4 \pm 0,02 a (24 \pm 2) °C e com 400 nmol cm^{-3} de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes em concentração dez vezes (10x) as encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos (5,2 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AU, 1,1 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e 1,5 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos de (+0,300 a +0,050) V_{Ag/AgCl 3M NaCl} a uma velocidade de varredura de 0,010 V s⁻¹ e 10 ciclos a cada concentração do nitrito. A seta na vertical indica incremento de corrente com a adição de nitrito.



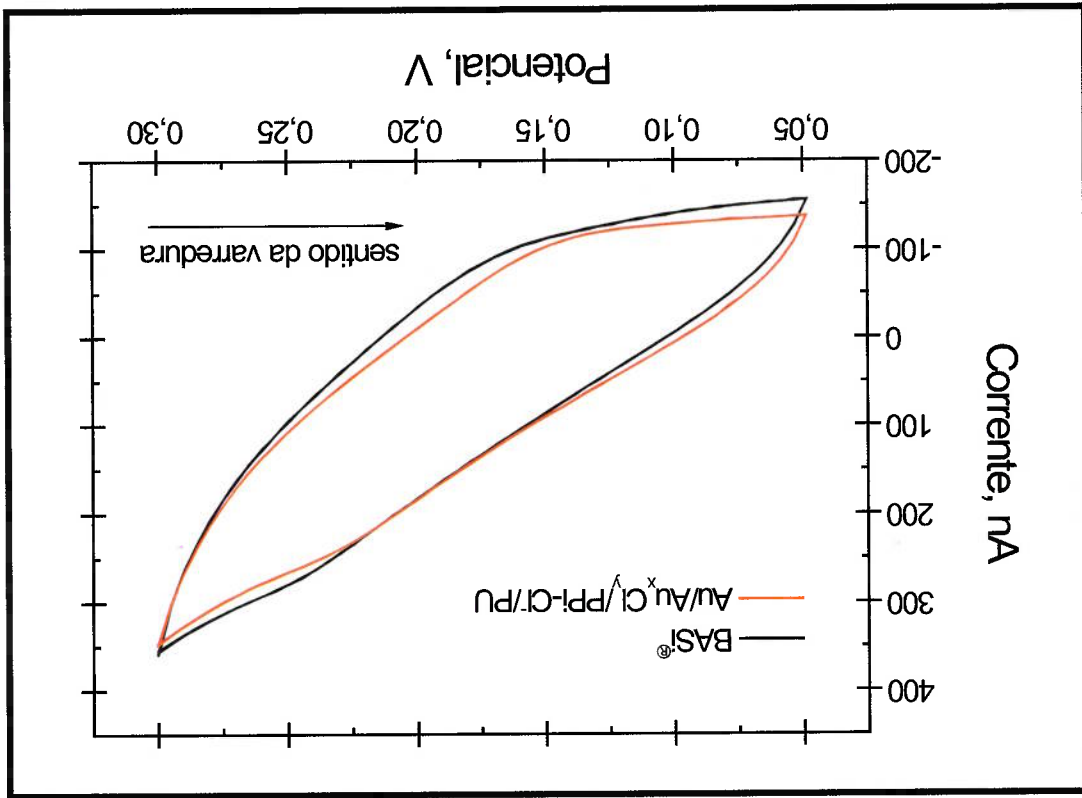
Fonte: Almeida (2014).

A partir das Figuras 63 e 64, observa-se que as correntes máximas obtidas nas medições são similares quando ao dobro e a dez vezes as concentrações das espécies interferentes (próximo a 300 nA) encontradas no sangue de humanos. Isto

indica que há saturação das espécies químicas na superfície do microeletrodo de Au-PIm-Cu(II) para as concentrações administradas das espécies interferentes.

O próximo experimento encerra a sequência de resultados deste doutorado. A Figura 65 apresenta uma análise comparativa, usando a técnica eletroquímica CV para verificar a funcionalidade do SME e o comportamento eletroquímico do EPRES Au/Au^xCl_y/PPi-Cl/PU miniaturizado (voltamograma em vermelho) com relação ao eletrodo de referência comercial BASI[®] (voltamograma em preto).

Figura 65 – Os voltamogramas cíclicos de (+0,300 a +0,050) V (0,010 V s⁻¹ e 10 ciclos por voltamograma) para verificação da funcionalidade do SME e do comportamento eletroquímico do EPRES Au/Au^xCl_y/PPi-Cl/PU miniaturizado comparado ao eletrodo comercial BASI[®] (Ag/AgCl 3M NaCl). Um SME com três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados (r = 2,5 µm cada) em SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C e com 400 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II) contendo espécies interferentes em concentração ao dobro das encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos (1,1 µmol cm⁻³ de ácido úrico, 0,22 µmol cm⁻³ de ácido ascórbico e 0,34 µmol cm⁻³ de paracetamol) e 30 nmol cm⁻³ de nitrato.



Fonte: Almeida (2014).

O resultado mostrado na Figura 65 não indica diferenças significativas entre os voltamogramas. O voltamograma em vermelho apresenta o comportamento eletroquímico de um EPRES Au/Au^xCl_y/PPi-Cl/PU miniaturizado mediante a

medição de 30 nmol cm^{-3} de nitrato. Esta similaridade na medição usando o eletrodo comercial BASI[®] (voltamograma em preto) em mesma concentração de nitrato permite validar a integração dos EPRES $\text{Au/Au}_x\text{Cl}_y/\text{PPi-Cl}/\text{PU}$ miniaturizados (sensores integrados), incluindo as aferições dos potenciais (item 5.4.4.2) dos eletrodos de referência (estáveis, pouca dependência dos íons cloretos e do pH da solução de análise e mínima influência da temperatura).

5.8 Discussão Comparativa dos Resultados.

A medição de nitrato e a avaliação de algumas espécies interferentes exigem um estudo rigoroso mediante uma determinada condição experimental. Neste doutorado, primeiramente, foi delimitado o problema a partir do desenvolvimento da SQR que permitiu uma situação experimental repetitiva. O próximo passo seria medir nitrato "totalmente livre" das espécies interferentes, mas isso não é possível devido às iterações de adsorção e absorção entre as espécies químicas e os polímeros utilizados; portanto, a estratégia foi estabelecer um procedimento de medição do nitrato junto com os interferentes e, assim aproximando-se da análise em amostras complexas, como o sangue de seres humanos, por exemplo.

Portanto, iremos discutir os resultados advindos do procedimento de medição do nitrato com base nas variáveis apresentadas na Tabela 29, comparando-os com outros trabalhos reportados na literatura (APÊNDICE A).

Tabela 29 – Sumário das variáveis catalogadas de acordo com o tipo: entrada e saída.

Variaáveis de entrada	Variaáveis de saída
X ₁ : Potencial aplicado (E)	Y ₁ : Amplitude de corrente medida (I)
X ₂ : Concentração (C)	Y ₂ : Inclinação de sensibilidade (α)
X ₃ : Espécies Interferentes (int)	Y ₃ : Sensibilidade Normalizada (S)
	Y ₄ : Seletividade (Se)
	Y ₅ : Repetitividade (Re)
	Y ₆ : Linha base (B)
	Y ₇ : Estabilidade (St)
	Y ₈ : Linearidade (L)
	Y ₉ : Ruído eletroquímico (Rq)

A seguir, as variáveis citadas na Tabela 29 serão especificadas:

- i. **X₁: potencial aplicado (E)**. O valor de potencial aplicado ao SME. Nesta tese, foram analisados três potenciais aplicados [(+0,050, +0,200 e +0,300) V_{Ag/AgCl} 3M NaCl], obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos apresentados;
- ii. **X₂: concentração (C)**. Quantidade de espécies eletroativas presentes na solução química do SME. Os valores de corrente na medição do nitrato e de algumas espécies interferentes foram analisadas a partir das concentrações de AU, (1,1 ou 0,22) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e (1,5 ou 0,34) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA; de AU, (5, 10, 15, 20, 25 e 30) nmol cm^{-3} de nitrato; e das concentrações dez vezes (10x) e ao dobro (2x) das espécies interferentes: (5,2 ou 1,1) $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e (0,15 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA (MATTOS; GORTON, 2001; LASCHI; MASCINI, 2006);
- iii. **X₃: espécies interferentes (int)**. Tipo da espécie eletroativa presente na solução química do SME, foi analisado as espécies químicas citadas no item anterior. Observa-se que aos níveis máximos encontrados em sangue, plasma ou soro de humanos 0,52 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AU, 0,11 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de AA e 0,15 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de PA (MATTOS; GORTON, 2001; LASCHI; MASCINI, 2006);
- iv. **Y₁: amplitude da corrente medida (I)**. É o sinal de resposta em corrente a partir da SQR (linha base) ou de uma espécie eletroativa (nitrato, AA, AU, PA) para um determinado potencial aplicado;
- v. **Y₂: inclinação de sensibilidade (α)**. Expressa pela razão entre um delta de corrente medida (ΔI) e um delta correspondente de concentração (ΔC);
- vi. **Y₃: sensibilidade normalizada pela área efetiva (S)**. A inclinação de sensibilidade dividida pelo valor de área efetiva do eletrodo. Nesta tese, a sensibilidade normalizada é usada como parâmetro de comparação entre diferentes trabalhos científicos apresentados no (APÊNDICE A);
- vii. **Y₄: seletividade (Se)**. É a capacidade do SME de ser mais sensível a uma determinada espécie química (por exemplo: nitrato) e ser praticamente

insensível às espécies interferentes. Neste doutorado, a seletividade foi calculada por meio da razão entre a corrente medida para as espécies interferentes (I_{int}) e para o nitrato (I_{nit}), ou seja, I_{int} / I_{nit} . A interpretação dos valores de seletividade é que quanto mais distante em módulo do zero, mais influência das espécies interferentes ocorre na medição;

viii. **Y₅: repetitividade (Re)**. Para uma mesma condição experimental, é a capacidade de o SME repetir o valor da medição dentro do intervalo de incerteza (ou grau de confiabilidade). Neste trabalho, a repetitividade foi extraída a partir dos três potenciais e das concentrações administradas nos experimentos. Dez ciclos voltamétricos para cada medição foram utilizados nos cálculos;

ix. **Y₆: linha base (B)**. É o valor médio entre o máximo e o mínimo de corrente medida para a SQR, a ser utilizada como linha base dos potenciais estudados;

x. **Y₇: estabilidade (St)**. Indica quanto o SME está estável durante o tempo total de medição, ou seja, indica o grau de robustez do sistema sem quaisquer adversidade durante a medição;

xi. **Y₈: linearidade da medição (L)**. Expressada pelo coeficiente de regressão linear e obtida por meio dos pontos sob os valores de corrente extraídos das medições; e

xii. **Y₉: ruído eletroquímico (Rq)**. Considerando o SME, é a variação do sinal de corrente no vale e no pico, relacionada a um determinado potencial.

Síntese das informações relevantes que compuseram o SME do nitrato e os procedimentos de avaliação de algumas espécies interferentes e que agora serão empregadas na discussão comparativa dos resultados, a saber:

i. Em cada potencial aplicado à medição do nitrato, as correntes foram registradas sem e com a presença das espécies interferentes, considerando um ou três microeletrodos de

Au-PIm-Cu(II) interligados e dez ciclos voltamétricos por medição;

Os resultados analisados referem-se aos microeletrodos recobertos com o polímero imidazol, cuja espessura está entre 60 nm e 100 nm, a rugosidade RMS extraída por Microscopia Confocal é da ordem de 10 nm, e a rugosidade obtida por perfilometria é aproximadamente igual a 6,8 nm;

!!!. O SME foi analisado a partir do sinal de corrente (linha base) advindo da SQR com pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C e 400 nmol cm⁻³ de sulfato de cobre(II); e

IV. Área efetiva (A_e) média de (229,4 ± 20) μm² para um microeletrodo e (618,8 ± 70) μm² para três microeletrodos interligados, cujas áreas geométricas individuais são iguais a 262,67 μm².

A Tabela 30 apresenta os valores de correntes (Y₁) na medição do nitrato, obtidas de acordo com potencial aplicado (X₁), com a concentração (X₂) e com o tipo das espécies químicas (X₃). Os valores foram extraídos para um ou três microeletrodos Au-PIm-Cu(II), e a medição do nitrato foi realizada sem ou com espécies interferentes, conforme as concentrações administradas e os potenciais aplicados.

A partir dos valores de correntes e das concentrações (Tabela 30), foram plotadas as curvas de calibração (Figura 66) com as respectivas equações, desvios padrões (DP) e regressão linear (RL) para a resposta ao nitrato (somente um microeletrodo e três microeletrodos interligados) com e sem a presença das espécies interferentes a potenciais de (+0,050, +0,200 e +0,300) V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. Em cada caso, foi extraída a inclinação de sensibilidade (Y₂) e, em seguida, esta foi normalizada pela área efetiva descrita anteriormente. Esse estudo foi sistematizado na Tabela 31 (além dos valores de seletividade e repetitividade nas medições).

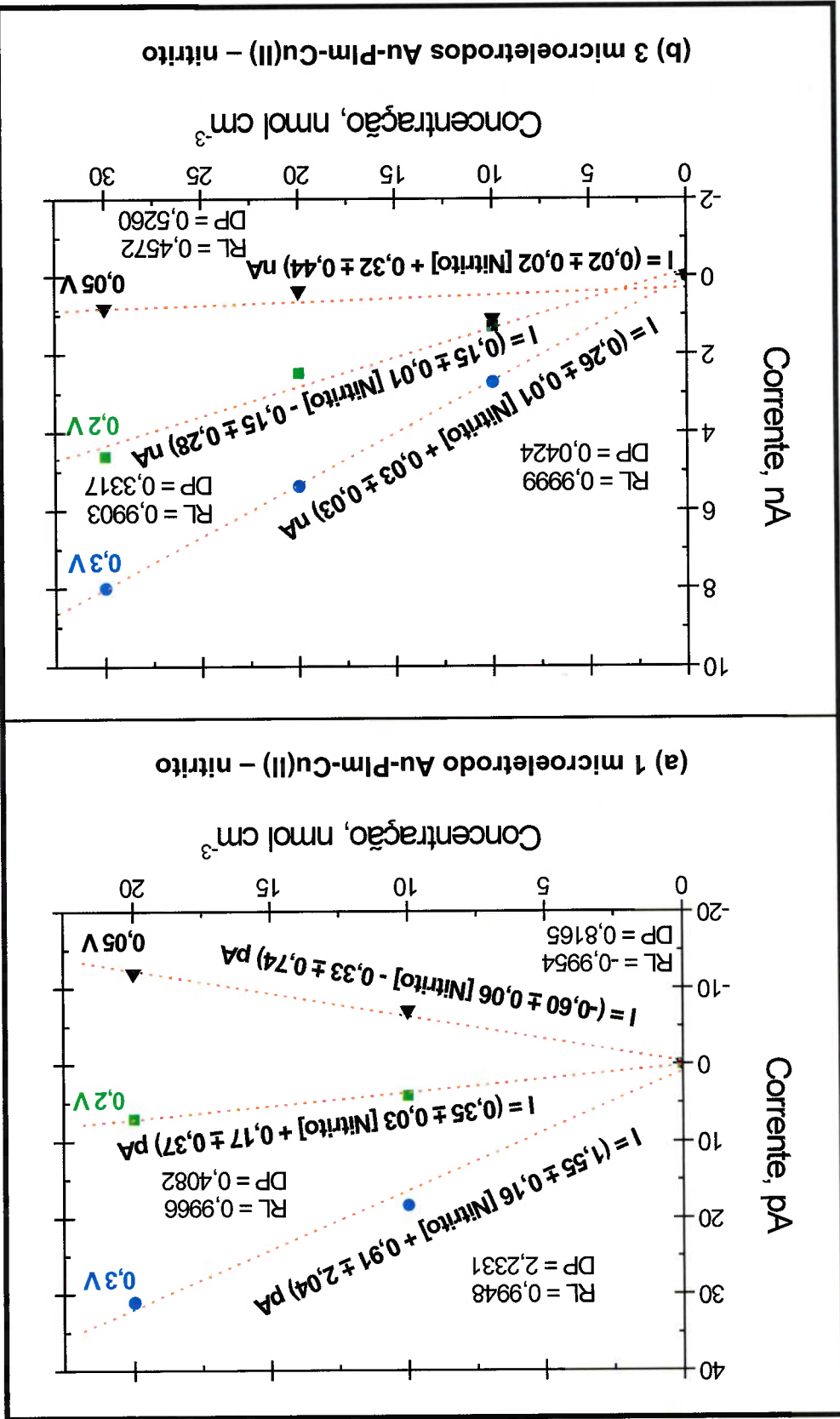
Nos coeficientes angulares negativos das curvas de calibração indicados na Figura 66, os potenciais correspondentes não apresentam resultados confiáveis para a medição do nitrato.

Tabela 30 – Valores mais prováveis de corrente para microeletrodos Au-Film-Cu(II), conforme as concentrações químicas administradas e os potenciais específicos. Foram extraídos dos experimentos de medição do nitrato sem e com espécies interferentes subtraindo o sinal de linha base correspondente à resposta em corrente da SQR.

Concentração	X ₁ : Potencial aplicado, V _{Ag/AgCl 3M NaCl}		
	0,050	0,200	0,300
Nitrato sem Interferentes	SQR	-0,026 ± 0,0005	+0,001 ± 0,0005
	10	-0,007 ± 0,0005	+0,004 ± 0,0005
	20	-0,012 ± 0,0005	+0,007 ± 0,0005
3 µEletrodos Nitrato sem Interferentes	SQR	-2,17 ± 0,05	+4,92 ± 0,05
	10	+1,10 ± 0,05	+1,29 ± 0,05
	20	+0,38 ± 0,05	+2,48 ± 0,05
	30	+0,81 ± 0,05	+4,59 ± 0,05
3 µEletrodos Nitrato e 2x Interferentes	SQR	-150,35 ± 0,05	+188,47 ± 0,05
	5	+35,30 ± 0,05	-47,69 ± 0,05
	10	+65,08 ± 0,05	-79,04 ± 0,05
	20	+99,03 ± 0,05	-44,79 ± 0,05
	25	+120,67 ± 0,05	-33,46 ± 0,05
	30	+140,69 ± 0,05	+0,79 ± 0,05
	SQR	-216,39 ± 0,05	+130,12 ± 0,05
	5	+6,76 ± 0,05	-15,98 ± 0,05
3 µEletrodos Nitrato e 10x Interferentes	SQR	-18,24 ± 0,05	-7,99 ± 0,05
	10	+11,68 ± 0,05	-15,98 ± 0,05
	5	+6,76 ± 0,05	-15,98 ± 0,05
	20	+18,24 ± 0,05	-7,99 ± 0,05

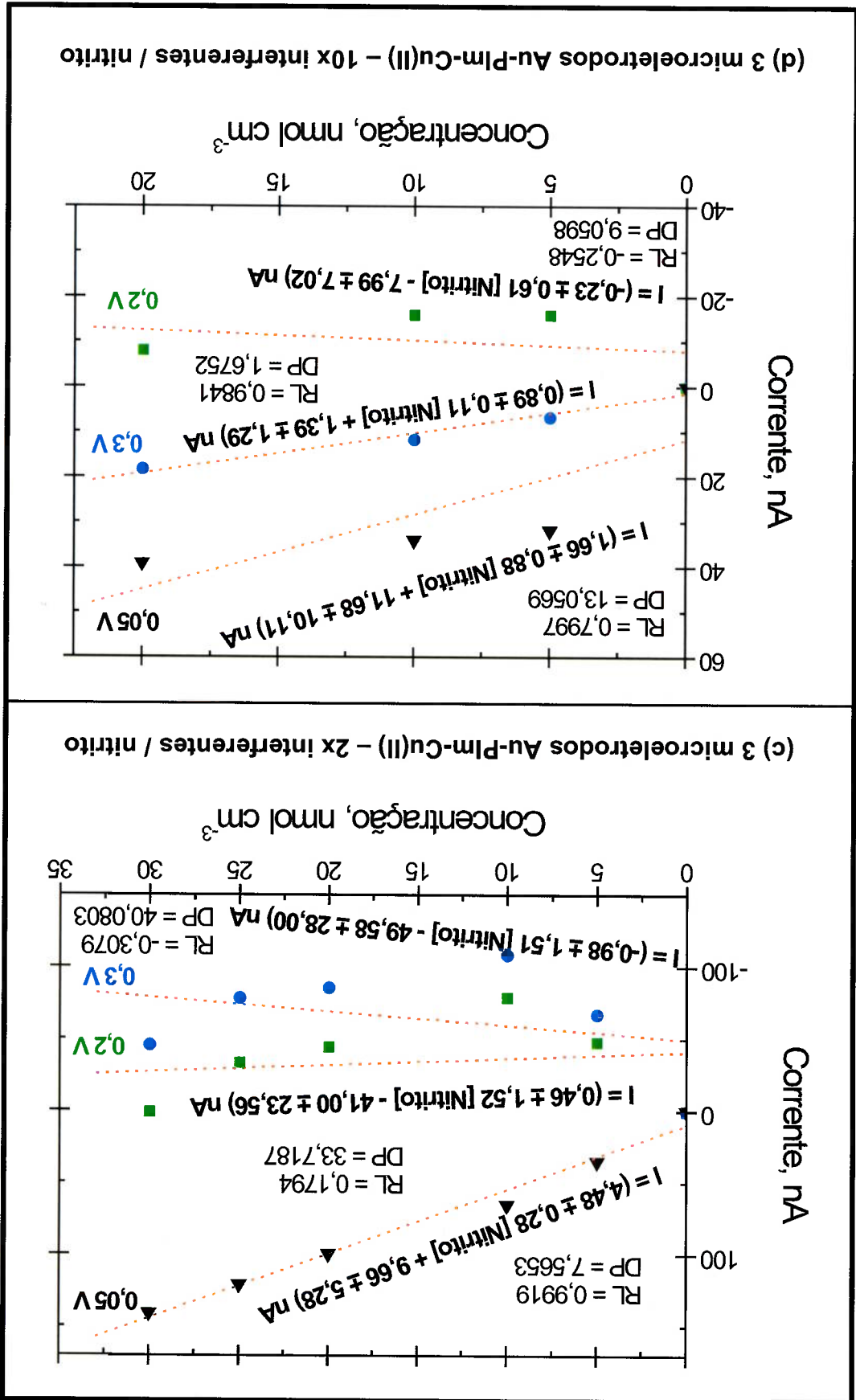
Fonte: Almeida (2014).

Figura 66 – Curvas de calibração; respectivas inclinações de sensibilidade, desvios padrões (DP) e regressões lineares (RL), considerando a corrente de linha base correspondente à SQR foi considerada nula para ausência do nitrato. (a) 1 microeletrodo - nitrato, (b) 3 microeletrodos - nitrato, (c) 3 microeletrodos - 2x interferentes e nitrato, e (d) 3 microeletrodos - 10x interferentes e nitrato.



Continua...

Figura 66 – Continuação...



A Figura 66a mostra as curvas de calibração (corrente versus concentração) extraídas a partir do experimento de medição de nitrito usando um microeletrodo Au-PIm-Cu(II) sem espécies interferentes. As três curvas de calibração correspondentes aos potenciais de (+0,050, +0,200 e +0,300) $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ apresentaram regressão linear (RL) com 0,99. O desvio padrão (DP) associado à curva de calibração no potencial +0,300 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ foi maior em relação às outras duas curvas, indicando discrepâncias na medição, mas há maior inclinação de sensibilidade [(1,55 $\cdot 10^3 \pm 0,16$) $A\ mol\ cm^{-3}$] entre os potenciais estudados.

Na Figura 66b, as curvas de calibração foram plotadas considerando os resultados para a medição de nitrito sem interferentes usando três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados. Neste caso, a curva de calibração associada ao potencial +0,300 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ apresentou RL com 0,9999 e baixo DP, indicando uma situação experimental adequada. Com relação aos potenciais (+0,050 e +0,200) $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$, as curvas de calibração mostram discrepâncias na medição, sendo o pior caso para o potencial de +0,050 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$, baixa RL e alto DP. Isso indica que nesses potenciais a medição de nitrito ocorre em uma situação fora da região linear.

A medição de nitrito foi repetida usando o SME com três microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados e com as espécies interferentes (AU, AA, PA) ao dobro das concentrações máximas encontradas no sangue, plasma ou soro de seres humanos. As curvas de calibração correspondentes aos potenciais (+0,300 e +0,200) $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ seguem um padrão semelhante à variação da corrente com o aumento de concentração de nitrito (Figura 66c), ambas com pobre RL e DP altíssimos (portanto, não apresentaram confiabilidade experimental adequada na região linear de medição). No potencial +0,050 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$, há RL com 0,99, DP de 7,56 e a maior inclinação de sensibilidade calculada ($4,48 \pm 0,29$) $A\ mol\ cm^{-3}$.

O último gráfico (Figura 66d) idem para a situação experimental anterior, exceto que as concentrações máximas dos interferentes foram multiplicadas por dez. Nesta caso, o potencial de +0,300 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ indica o valor de inclinação de sensibilidade igual a ($0,89 \pm 0,12$) $A\ mol\ cm^{-3}$ com RL de 0,98 e DP de 1,67. No potencial +0,050 $V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ há maior de inclinação de sensibilidade, porém com pobre RL e alto DP (novamente fora da região linear de medição de nitrito).

A Tabela 31 apresenta os valores de inclinação de sensibilidade para todos os casos comentados e os valores de sensibilidade normalizada pela área efetiva (comentada antes da Tabela 30), de seletividade e de repetitividade.

Tabela 31 – Valores calculados (nos potenciais específicos) da inclinação de sensibilidade, da sensibilidade normalizada pela área efetiva, da seletividade e da repetitividade.

X_1	Potencial	$V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$	$A\ mol\ cm^{-3}$	Y_2	Inclinação de sensibilidade	Y_3	Sensibilidade normalizada	$A\ mol^{-1}\ cm$	Y_4	Seletividade	l_{int} / l_{int}	Y_5	Repetitividade
+0,050	-0,60 $10^{-3} \pm 0,06$			-2,7 $10^2 \pm 0,06$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+0,200	0,35 $10^{-3} \pm 0,03$			1,5 $10^2 \pm 0,03$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+0,300	1,55 $10^{-3} \pm 0,16$			6,7 $10^2 \pm 0,16$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+0,050	0,02 $\pm 0,02$			3,23 10^3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+0,200	0,15 $\pm 0,01$			2,42 10^4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+0,300	0,26 $\pm 0,01$			4,36 10^4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+0,050	4,48 $\pm 0,28$			7,25 10^5	-3,90	80							
+0,200	0,46 $\pm 1,52$			7,59 10^4	0,74	38							
+0,300	-0,98 $\pm 1,51$			-1,6 10^5	0,65	40							
+0,050	1,66 $\pm 0,88$			2,7 10^5	-5,64	75							
+0,200	-0,23 $\pm 0,61$			-3,72 10^4	0,51	75							
+0,300	0,89 $\pm 0,11$			1,4 10^5	0,53	70							

Fonte: Almeida (2014).

Tabela 32 – Valores extraídos (nos potenciais eletroquímicos especificados) de linha base relativa à corrente eletroquímica em SQR (linha base), de estabilidade e de linearidade na medição eletroquímica do nitrato e de ruído eletroquímico presente nos voltamogramas cíclicos.

Potencial X_1	Linha base Y_0	Estabilidade Y_7	Linearidade da medição Y_8	Ruído eletroquímico Y_9	V _{Ag/AgCl 3M NaCl}	
					nA	nA
+0,050	-(-0,024 ± 0,0005)	99,00	-0,9954	0,002	1 µEletrodo	
+0,200	-(-0,027 ± 0,0005)	99,00	0,9966	0,002	Nitrato sem Interferentes	
+0,300	+(0,057 ± 0,0005)	99,00	0,9948	0,002	Nitrato sem Interferentes	
+0,050	-(-2,09 ± 0,05)	66,67	0,4572	0,34	3 µEletrodos	
+0,200	+(1,69 ± 0,05)	66,67	0,9903	0,60	Nitrato sem Interferentes	
+0,300	+(9,77 ± 0,05)	66,67	0,9999	0,36	Nitrato sem Interferentes	
+0,050	-(-216,39 ± 0,05)	99,00	0,7997	0,20	3 µEletrodos	
+0,200	+(130 ± 0,05)	99,00	-0,2548	0,20	Nitrato e 10x Interferentes	
+0,300	+(297,13 ± 0,05)	99,00	0,9841	0,20	Nitrato e 10x Interferentes	

Fonte: Almeida (2014).

No APÊNDICE A, uma revisão extensa pela literatura foi realizada para sistematizar procedimentos para medição do nitrato usando polímeros condutores modificados

com metal de transição 3d ou somente com o polímero condutor. Silva, Sonia et al. (1996), Santos, Wilney et al. (2009), Zheng et al. (2009) e Biagiotti et al. (2007) reportaram as maiores sensibilidades publicadas quando normalizada pela área efetiva dos eletrodos para a medição de nitrato, ($6,93 \cdot 10^4$, $1,0 \cdot 10^5$, $1,90 \cdot 10^6$ e $5,82 \cdot 10^8$) A cm mol⁻¹, respectivamente. Porém, os potenciais foram aplicados entre (+0,71 e +0,90) V_{SCE}, portanto, muito superior ao potencial máximo de +0,300 V_{Ag/AgCl 3M NaCl} empregado nesta tese para a medição de nitrato. No nosso caso, somente para o nitrato sem as espécies interferentes, obtivemos a sensibilidade normalizada igual a $4,36 \cdot 10^4$ cm mol⁻¹ (Tabela 31). Os demais trabalhos científicos (22 artigos) sistematizados no APÊNDICE A têm sensibilidade normalizada da ordem de 10^3 A cm mol⁻¹ para menos.

Na literatura, os trabalhos reportados pouco discutem a seletividade, repetitividade, estabilidade, linearidade nas medições de nitrato com relação às espécies interferentes. Neste doutorado, a seletividade para com o nitrato também exige mais estudos. Por outro lado, nosso trabalho exhibe resultados de acordo com a melhor situação experimental (tarjas cinzas nas Tabelas 31 e 32) que corroboram com o estudo da repetitividade, estabilidade, linearidade, linha base e ruído eletroquímico nas medições de nitrato; seguem os valores: 80%, 99%, 0,9919, -(150,35 ± 0,05) nA e 1 nA, respectivamente.

Nesta tese, empregando a SQR e as espécies interferentes (AA, AU e PA) ao dobro das concentrações encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos, a sensibilidade normalizada obtida foi igual a $7,25 \cdot 10^5$ A cm mol⁻¹ (Tabela 31) para o potencial de +0,050 V_{Ag/AgCl 3M NaCl}. A principal contribuição de nosso trabalho está justamente em medir concentrações de nitrato entre (5 e 30) nmol cm⁻³, considerando o estreitamento da faixa de potencial de medição e a presença de algumas espécies interferentes. Permitindo alta sensibilidade normalizada pela área efetiva dos microeletrodos Au-PIm-Cu(II) quando comparada à maioria dos trabalhos similares reportados na literatura (APÊNDICE A).

6 CONCLUSÕES

Como parte da fabricação dos sensores integrados para medição do nitrato, foram estudados eletrodos de pseudo-referência (EPER) Ag/AgCl. Os EPER foram fabricados a partir de um filme de prata (1 µm de espessura) eletrodepositado (27,7 µA por 938,74 s) sobre ouro com área geométrica de (2,77 ± 0,01) mm² e cloritado (11,1 µA por 2104,5 s) para obter a junção redox de Ag/AgCl (espessura total de 2,5 µm e rugosidade RMS entre 50 nm e 200 nm). Também, foram desenvolvidos EPERs Au/Au_xCl_y/PPi-CI/PU miniaturizados [área geométrica de (0,135 ± 0,001) mm²] a partir de um filme de ouro cloritado (+0,850 V_{Ag/AgCl} 3M NaCl por 10 min para 78,1 nm) onde foi eletropolimerizado pirrol com cloretos (+0,650 V_{Ag/AgCl} 3M NaCl por 30 min com 603,5 nm) e; por fim, o filme de poliuretano foi eletrodepositado sobre o filme PPi-CI (+0,650 V_{Ag/AgCl} 3M NaCl durante 1 h, 14,9 nm). Os eletrodos - após acondicionados por três dias em solução de 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl com pH 6,36 - apresentaram potencial, coeficiente de degradação, histerese em potencial e em corrente: +(60 ± 0,01) mV_{Ag/AgCl} Orion; 6,67 µV h⁻¹; +(62,1 ± 0,01) mV_{Ag/AgCl} Orion e -(81,4 ± 0,02) µA (para os EPER Ag/AgCl) e +(200 ± 0,2) mV_{Ag/AgCl} 3M NaCl; -13,6 µV h⁻¹; +(43 ± 0,01) mV_{Ag/AgCl} 3M NaCl e -(3,4 ± 0,02) µA (para os Au/Au_xCl_y/PPi-CI/PU miniaturizados). Os EPERs Au/Au_xCl_y/PPi-CI/PU miniaturizados apresentaram vantagem em relação aos EPER Ag/AgCl, pois mostraram ser menos sensíveis ao cloro, sofreram menos alteração do potencial com a variação de temperatura e podem ser obtidos a partir do ouro depositado por *e-beam*, sem a necessidade de depositar outro metal (no caso dos EPER Ag/AgCl, a prata é eletrodepositada sobre o ouro).

Com este trabalho de doutorado, também concluímos que o condicionamento eletroquímico - em solução química e em fluxo adequado (pressurizada por gás nitrogênio) resulta em incremento expressivo da área efetiva exposta em solução química em até 300%. O procedimento é trivial para macroeletrodos e pouco reportado para microeletrodos. A respeito destes últimos, os procedimentos de condicionamento eletroquímico foram realizados empregando um microeletrodo MF-2006 de ouro (10 µm de diâmetro) da BASI[®] e uma solução de HNO₃ (0,05 mmol cm⁻³) + H₂O₂ (0,20 mmol cm⁻³) em fluxo ≥ 5 ml min⁻¹ sendo combinada a voltamogramas cíclicos [(-0,700 a +0,580) V_{Ag/AgCl} 3M NaCl em velocidade de varredura

de $0,050 \text{ V s}^{-1}$ até a estabilização da corrente eletroquímica (50 a 70 ciclos). Resultados similares foram observados usando uma limpeza química (100 s em 3 mmol cm^{-3} de ácido sulfúrico e enxágue em IPA e água DI) em microeletrodos fotografados em SU-8 sobre uma lâmina de silício (sensor integrado). Estima-se um incremento de área efetiva exposta em solução química entre 100% e 250%.

Concluímos também nesta tese que três microeletrodos de ouro interligados e modificados com poli(imidazol)-cobre(II) (Au-PIm-Cu(II)) são sensíveis às concentrações de (5 a 30) nmol cm^{-3} de nitrato. A principal contribuição para o avanço científico foi medidas em potenciais entre (+0,050 e +0,300) $V_{\text{Ag/AgCl}} 3\text{M NaCl}$, considerando a influência cruzada das espécies interferentes intrínsecas à SQR (Cl⁻, SO_4^{2-} , O_2 , H^+ e OH⁻). No mesmo sentido, avaliamos a influência das espécies interferentes, presentes em meio bioquímico, de acordo com o dobro e dez vezes ao limite máximo das concentrações encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos: $0,52 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido úrico, $0,11 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido ascórbico e $0,15 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ de paracetamol.

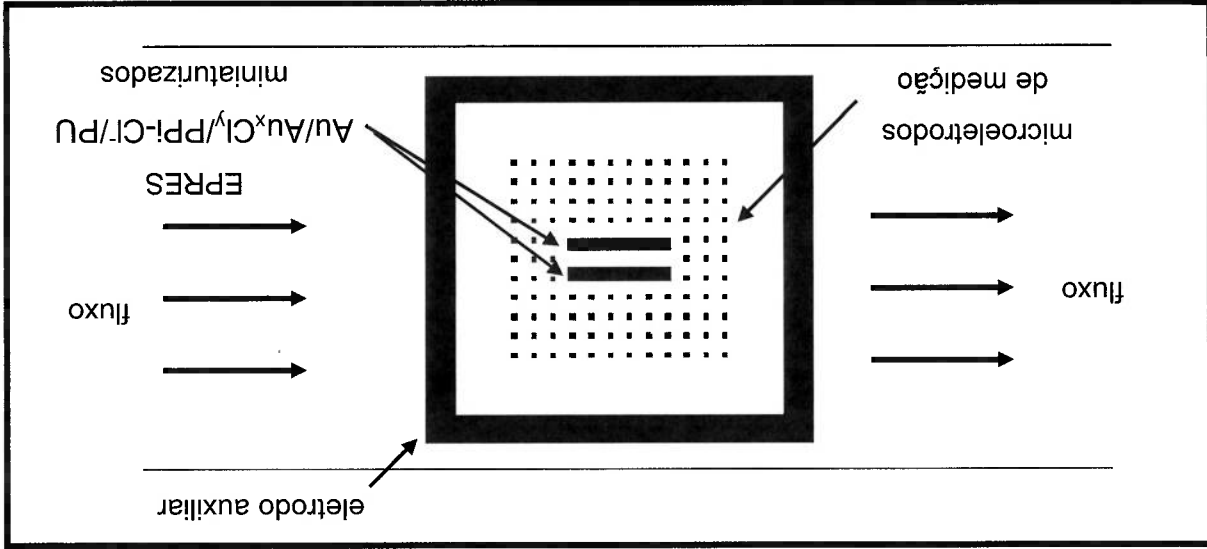
Por fim, até o ano de 2013, nenhum procedimento reportado na literatura, mediu o nitrato juntamente com as espécies interferentes que mascaram o sinal de medição do nitrato, usando um potencial tão baixo quanto +0,050 $V_{\text{Ag/AgCl}} 3\text{M NaCl}$ e microeletrodos Au-PIm-Cu(II) interligados. Este procedimento possibilitou resultados adequados na medição do nitrato. Destacamos aqui os melhores valores de linha base, linearidade, repetitividade, estabilidade e sensibilidade, que foram $(-150,35 \pm 0,05) \text{ nA}$, 0,9919, 80%, 99% e $7,25 \cdot 10^5 \text{ A cm mol}^{-1}$, respectivamente.

7 TRABALHOS FUTUROS

A. Sensor Integrado com Três Eletrodos

Um possível trabalho futuro será a configuração de três eletrodos integrados em mesmo plano, ou seja, microeletrodos de medição de ouro, eletrodo auxiliar de ouro e dois eletrodos de referência Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU em estado sólido confeccionados sobre um substrato planar (Figura 67). O sensor integrado pode ser acoplado a um Sistema de Medição Eletroquímica em Fluxo (SMEF) configurando uma célula eletroquímica fechada e em fluxo (Figura 67).

Figura 67 – Esquema ilustrativo da vista frontal do sensor integrado com três eletrodos.



A partir do sensor acoplado ao SMEF, poder-se-á obter resultados de monitoração do nitrato e de avaliação de interferentes em meio fluido. Nesta proposta, os estudos de iteração da força iônica no sinal de resposta eletroquímica, de caracterização dos microeletrodos e dos eletrodos de referência e de confiabilidade no funcionamento do SMEF são outros temas possíveis de serem analisados.

B. Incremento de Espécies Interferentes

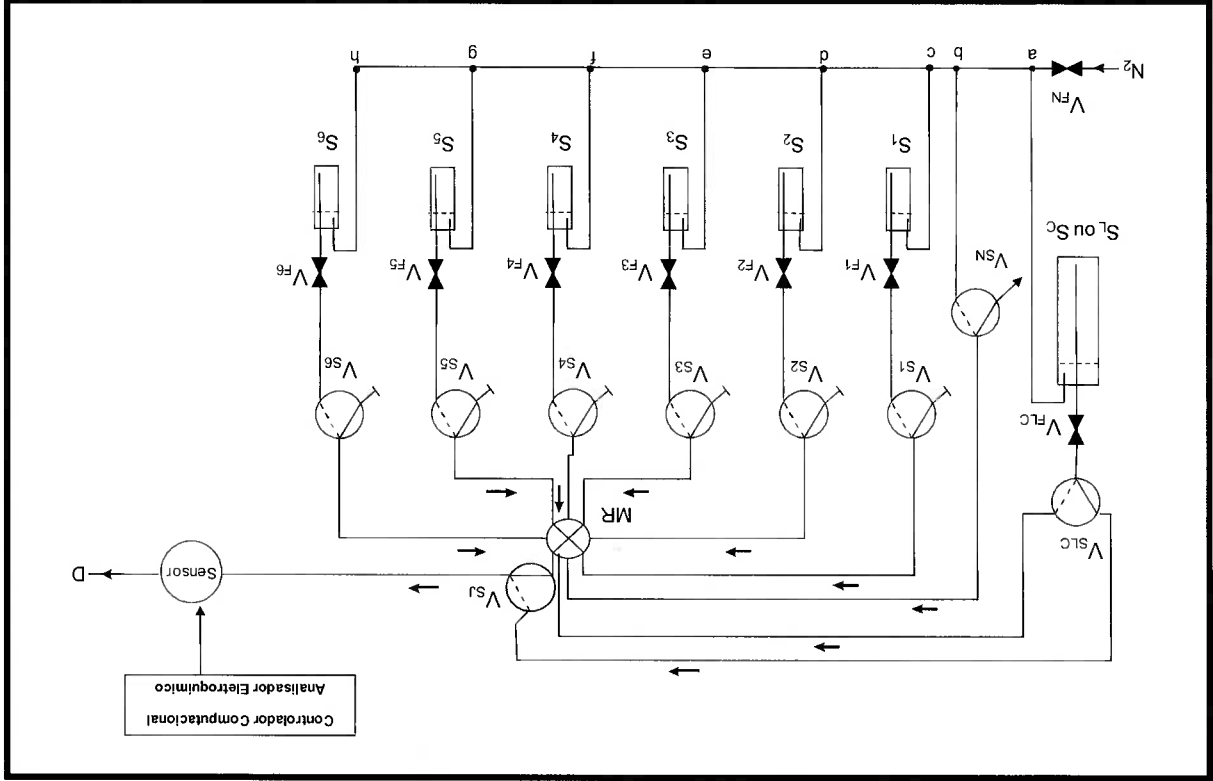
Mediante esta tese de doutorado, além das espécies interferentes estudadas, a medição do nitrato - usando um microeletrodo Au-PIIm-Cu(II) - pode ser aplicada em

amostras reais fisiológicas, mas requer um incremento de espécies interferentes como: dopamina, nitratos, glicose, magnésio, molibdênio, flúoreto, acetona, ácido fólico, ácido pirúvico, ureia, ácido cítrico, ácido málico, etanol, ácido fórmico, ácido fumárico e ácido adípico. A seleção dessas espécies interferentes é embasada nos estudos apresentados pelas Tabelas 3 e 4 e pelo APÊNDICE D.

C. Sistema de Medição Eletroquímica em Fluxo (SMEF).

Propõe-se expandir o estudo deste doutorado, desenvolvendo um procedimento de microfabricação do sensor integrado que permita acoplá-lo a um SMEF com FIA-automatizada.

Figura 68 – Por FIA-automatizada, o esquema do SMEF: configuração das válvulas solenoides (V_{S1} , V_{S2} , V_{S3} , V_{S4} , V_{S5} , V_{S6} , V_{SN} , V_{SJ} e V_{SLC}) e das válvulas de controle de fluxo (V_{FLC} , V_{FN} , V_{F1} , V_{F2} , V_{F3} , V_{F4} , V_{F5} e V_{F6}) para injeção das soluções químicas (S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 e S_6) no misturador (MR) ou da solução de limpeza (S_L) ou de carregamento (S_C) no Sensor.



Fonte: Almeida (2014).

Na Figura 68, foi observado o esquema das válvulas solenoides e de fluxo, da solução de limpeza e de carregamento, do descarte, da célula de medição eletroquímica (Sensor), do bombeamento de nitrogênio e das soluções químicas

(análitos). Pretendíamos utilizar o esquema de configuração de válvulas indicado na Figura 68 para comutar soluções químicas e controlar/selecionar uma determinada quantidade de solução a ser analisada, ou seja, definir variação de concentração química. Isso será proposto na forma de trabalhos futuros.

Segue a descrição do esquema operacional proposto para FIA-automatizada:

N_2 : fluxo de nitrogênio para bombeamento (transporte por pressurização) das soluções químicas;

a, b, c, d, e, f, g, h: pontos de confluência de gás nitrogênio;

S_C ou S_L : solução química de carregamento ou de limpeza;

S_1 : solução de química 1;

S_2 : solução de química 2;

S_3 : solução de química 3;

S_4 : solução de química 4;

S_5 : solução de química 5;

S_6 : solução de química 6;

MR: misturador de soluções químicas;

V^{FN} : válvula para regular fluxo de N_2 ;

V^{FLC} : válvula para regular fluxo de S_L ou de S_C ;

V^{F1} , V^{F2} , V^{F3} , V^{F4} , V^{F5} , V^{F6} : válvulas para regular fluxo das soluções

químicas S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 e S_6 , respectivamente;

V^{S1} : válvula solenóide acionada injeta S_1 no MR;

V^{S2} : válvula solenóide acionada injeta S_2 no MR;

V^{S3} : válvula solenóide acionada injeta S_3 no MR;

V^{S4} : válvula solenóide acionada injeta S_4 no MR;

V^{S5} : válvula solenóide acionada injeta S_5 no MR;

V^{S6} : válvula solenóide acionada injeta S_6 no MR;

V^{SLC} : válvula solenóide desligada flui como solução química de limpeza

(S_L), quando acionada flui como solução química de carregamento (S_C) para o

misturador;

V^{SJ} e V^{SN} : válvulas solenóides de injeção e de entrada do fluxo de

nitrogênio no MR, respectivamente. Quando acionadas flui a solução misturada para

o Sensor;

Sensor: representa o SMEF que compõe a célula de medição eletroquímica, o qual é controlado por um sistema computacional a partir de um analisador voltamétrico; e

D: representa o descarte de soluções químicas.

Observação: V_{SA} quando desligada funciona como um respiro, saindo o ar em excesso de dentro do misturador com a entrada de solução.

No esquema, há um misturador (MR) que recolhe as soluções químicas (análitos) e - por vibração - mistura-as; na sequência, a amostra misturada flui até a célula de medição eletroquímica (Sensor). Por fim, o descarte (D) encerra o processo.

D. Medição Amperométrica do Nitrato

A partir dos resultados apresentados neste doutorado para a medição voltamétrica do nitrato juntamente com as espécies interferentes (ao dobro das concentrações máximas encontradas em fluidos sanguíneos de humanos), podemos selecionar um potencial para medir amperometricamente o nitrato. Portanto, realizar experimentos fixando o potencial em $+0,050 V_{Ag/AgCl\ 3M\ NaCl}$ ao longo do tempo e variando as concentrações de nitrato podem incrementar sensibilidade nas medições de nitrato, a verificar.

4WORK. Aprenda como prevenir o aparecimento de doenças cardiovasculares. **4work Group**, 2011. Disponível em: <<http://www.4work.pt/cms>>. Acesso em: 13 out. 2013.

ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 7, p. 699-766, jul. 2004. doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.03.002.

ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Chemkeys**, p. 1-21, mar. 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-tecnicas>>. Acesso em: 02 abr. 2014.

ALLEN, J. D. et al. Plasma nitrite response and arterial reactivity differentiate vascular health and performance. **Nitric Oxide**, v. 20, n. 4, p. 231-237, 2009. doi:10.1016/j.niox.2009.01.002.

ALMEIDA, F. L. Desenvolvimento de um sensor eletroquímico planar modificado com 1,2-diaminobenzeno (DAB) para monitoração de nitrito por FIA-automatizada. 2009. 176 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALMEIDA, F. L. et al. TEOS and TEOS-HFE plasma thin films used in electrochemical measurements. In: INTERNATIONAL MEETING OF MATERIALS, 7th, 2013, Coimbra, Portugal. **Anais...** Coimbra: MRS, 2013.

ALMEIDA, F. L. **Montagem e caracterização de sensores eletroquímicos em cateteres**. São Paulo: Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC-SP), 2006.

ALMEIDA, F. L.; FONTES, M. B. A. Influence of the Interferers in the nitrite detection by using planar electrochemical sensors. **ECS Transactions**, v. 9, n. 1, p. 545-551, sep. 2007. doi:10.1149/1.2766928.

ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Surface activation of gold electrodes using electrochemical conditioning. In: SYMPOSIUM ON MICROELECTRONICS TECHNOLOGY AND DEVICES, 28., 2013, Curitiba. **Proceedings...** Curitiba: SBMicro - Chip in Curitiba, 2013. doi:10.1109/SBMicro.2013.6676168.

ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. Flow-injection analysis technique used to electrochemically measure nitrite through a gold working electrode modified with 1,2-diaminobenzene (DAB). **ECS Transactions**, v. 23, n. 1, p. 263-269, sep. 2009. doi:10.1149/1.3183728.

ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. FIA-automated system used to electrochemically measure nitrite and its interfering chemicals through a 1,2-DAB / Au electrode: gain of sensitivity at upper potentials. **Journal of Physics: Conference Series (Online)**, v. 421, n. 1, p. 012009, mar. 2013. doi:10.1088/1742-6596/421/1/012009.

REFERÊNCIAS

- AMER, I.; YOUNG, D. A.; VOSLOO, H. C. M. Chemical oxidative polymerization of m-phenylenediamine and its derivatives using aluminum triflate as a co-catalyst. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 10, p. 3251-3260, oct. 2013. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.06.031.
- ANNAMALAI, S. K.; PALANI, B.; PILLAI, K. C. Highly stable and redox active nano copper species stabilized functionalized-mutlwallled carbon nanotube/chitosan modified electrode for efficient hydrogen peroxide detection. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, v. 395, p. 207-216, feb. 2012. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.12.032.
- ASHOK KUMAR, S.; LO P.-H.; CHEN, Shen-Ming. Electrochemical analysis of H₂O₂ and nitrite using copper nanoparticles/poly(o-phenylenediamine) film modified glassy carbon electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 156, n. 7, p. E118-E123, may 2009. doi:10.1149/1.3129604.
- ASTORGA, P. et al. Glassy carbon electrode modified with nickel (II) tetrasulfotphalocyanine films and its behavior as amperometric sensor for nitrite. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 9, n. 1, p. 109-119, jan. 2014. Disponible em: <<http://www.electrochemsci.org/papers/vol9/100109.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- BADIA, M. et al. New electrochemical sensors for detection of nitrites and nitrates. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 509, n. 1, p. 66-72, aug. 2001. doi:10.1016/S0022-0728(01)00358-8.
- BARNES, H.; FOLKARD, A. R. The determination of nitrites. *Analyst*, v. 76, n. 907, p. 599-603, oct. 1951. doi:10.1039/AN9517600599.
- BARRY, R. H.; HARTUNG, W. H. α -Oximino acid intermediates for the synthesis of α -amino acids. *Journal of Organic Chemistry*, v. 12, p. 460-468, may 1947. doi:10.1021/jo01167a015.
- BAUMAN Jr., J. E.; WANG, J. C. Imidazole complexes of nickel(II), copper(II), zinc(II), and silver(I). *Inorganic Chemistry*, v. 3, n. 3, p. 368-373, mar. 1964. doi:10.1021/ic50013a014.
- BEUTLER, E.; BALUDA, M. C. Methemoglobin reduction studies of the interaction between cell populations and of the role of methylene blue. *Blood*, v. 22, n. 3, p. 323-333, sep. 1963. Disponible em: <<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/22/3/323>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- BIAGIOTTI, V. et al. Synthesis and characterization of polymeric films and nanotubule nets used to assemble selective sensors for nitrite detection in drinking water. *Sensors and Actuators B*, v. 122, n. 1, p. 236-242, jun. 2007. doi:10.1016/j.snb.2006.05.024.
- BOHNKE, C. et al. All-solid-state sensors used in drilling muds to prevent H₂S gas evolution on oil wells. *Solid State Ionics*, available online, nov. 2013. doi:10.1016/j.ssi.2013.10.045.

- BOON, B.; LAUDELOUT, H. Kinetics of nitrite oxidation by nitrobenzene winogradsky. *Biochemical Journal*, v. 85, n. 3, p. 440-447, dec. 1962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1243762/>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- BOSSI, A. et al. An assay for ascorbic acid based on polyaniline-coated microplates. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 18, p. 4296-4300, sep. 2000. doi:10.1021/ac00185s.
- BOTT, A. W. Practical problems in voltammetry 3: reference electrodes for voltammetry. *Current Separations*, v. 14, n. 2, p. 64-68, 1995. Disponível em: <<http://www.currentseparations.com/issues/14-2/cs14-2d.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS n. 518/2004**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental, Editora MS, 2005a. 34 p. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA n. 357/2005**: dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, DF: CONAMA, 2005b. 27 p. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sia/download.pdf?idNorma=2747>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- BREHIER, P. C.; BELFORD, R. E. Thick-film reference electrodes for solid state pH measurement. *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, v. 32, n. 8, p. 323-326, 1995. doi:10.1039/A19953200323.
- BROLO, A. G.; JIANG, Z.; IRISH, D. E. The orientation of 2,2'-bipyridine adsorbed at a SERS-active Au (111) electrode surface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 547, n. 2, p. 163-172, may 2003. doi:10.1016/S0022-0728(03)00215-8.
- BRUNS, D. E.; ASHWOOD, E. R.; BURRIS, C. A. **Fundamentals of Molecular Diagnostics**. Philadelphia: Elsevier, 2007.
- BRUNTON, T. L. Use of nitrite of amylin in angina pectoris. *The Lancet*, London, v. 90, n. 2291, p. 97-98, jul. 1867. doi:10.1016/S0140-6736(02)51392-1.
- BRUTSAERT, D. L. et al. Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovascular Research*, v. 38, n. 2, p. 281-290, p. 1998. doi:10.1016/S0008-6363(98)00044-3.
- BUFFLE, J.; TERCIER-WAEBER, M.-L. Voltammetric environmental trace metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 172-191, 2005. doi:10.1016/j.trac.2004.11.013.
- CAO, Fei et al. ITO Electrode modified by α -K₆[P₂W₁₈O₆₂] hybrid nanofibers for nitrite determination. *Electroanalysis*, v. 24, n. 2, p. 418-424, feb. 2012. doi:10.1002/elan.201100613.

- CAO, Xiaomei et al. Simultaneous determination of dopamine and uric acid on natrium/sodium dodecylbenzenesulfonate composite film modified glassy carbon electrode. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 39, n. 9, p. 1603-1608, set. 2009. doi:10.1007/s10800-009-9851-0.
- CARDOSO, J. L. **Obtenção de ligas Au^xSn_y utilizando deposição eletroquímica: influência dos aditivos, análise de morfologia e crescimento de multicamadas.** ed. rev. 2011. 272 p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- CARDOSO, J. L.; SANTOS FILHO, S. G. Electrodeposition of gold from formaldehyde-sulfite baths: bath stability and deposits characterization. *Química Nova (Impresso)*, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 641-645, 2011. doi:10.1590/S0100-40422011000400017.
- CHANDLER, D. L. New material could lead to faster chips: graphene may solve communications speed limit. **MIT News Office**, 19 mar. 2009. Disponível em: <<http://newsoffice.mit.edu/2009/graphene-palacios-0319>>. Acesso em: 30 mar. 2014.
- CHAUBE, A.; BAVEJA, A. K.; GUPTA, V. K. Extractive spectrophotometric determination of nitrite in polluted waters. *Analytica Chimica Acta*, v. 143, n. C, p. 273-276, nov. 1982. doi:10.1016/S0003-2670(01)95511-4.
- CHEAQS Pro. A computer program for calculating Chemical Equilibria in Aquatic Systems – Professional, current version: CHEAQS Pro 2013.2. **CHEAQS Pro**, 2013. Disponível em: <<http://home.tiscali.nl/cheaqs/download.html>>. Acesso em: 23 oct. 2013.
- CHEN, Baohong et al. Glassy carbon electrode modified with organic-inorganic pillared montmorillonites for voltammetric detection of mercury. *Microchemical Acta*, v. 172, n. 3-4, p. 335-341, mar. 2011. doi:10.1007/s00604-010-0457-3.
- CHEN, Shen-Ming; LIU, J-W.; THANGAMUTHU, R. Electrodeposition of poly(benzophenone-4) film modified electrode and its electrocatalytic behavior towards dopamine, ascorbic acid and nitrite. *Electroanalysis*, v. 18, n. 23, p. 2361-2368, nov. 2006. doi:10.1002/elan.200603672.
- CHO, S. J. et al. H₂ sorption in HCl-treated polyaniline and polypyrrole. *Catalysis Today*, v. 120, n. 3-4, p. 336-340, feb. 2007. doi:10.1016/j.cattod.2006.09.007.
- CHOW, D. T.-W.; ROBINSON, R.J. Polarographic determination of nitrite. *Analytical Chemistry*, v. 25, n. 10, p. 1493-1496, oct. 1953. doi:10.1021/ac60082a022.
- CLAY, W. F. **The decomposition of the fixed alkalies and alkaline earths by Humphry Davy 1807-1808.** London: S., M., H., K. & Co. Ltd., 1894.
- COBBOLD, R. S. C. **Transducers for Biomedical Measurements: Principles and Applications.** New York: John Wiley & Sons, 1974.

COE, C. S.; DOUMANI, T. F. Photochemical decomposition of t-butyl nitrite. *Journal of the American Chemical Society*, v. 70, n. 4, p. 1516-1519, apr. 1948. doi:10.1021/1a01184a065.

COFFEY, G. W. et al. Fabrication and characterization of a novel Luggin capillary reference electrode for use in solid state electrolytes. *Solid State Ionics*, v. 178, n. 11-12, p. 827-832, may 2007. doi:10.1016/j.ssi.2007.01.008.

COMTE, P. A.; JANATA, J. A field effect transistor as a solidstate reference electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 101, n. 2, p. 247-252, nov. 1978. doi:10.1016/S0003-2670(01)93361-6.

COTELL, C.M.; SPRAGUE, J. A.; SMIDT Jr., F. A. *Surface Engineering - Glossary of terms*. ASM International Handbook v. 5: ASM Handbook, 10 ed. ASM International: The Materials Information Society, 1993-1994.

COURT, M. N.; STEPHEN, R.C.; WAID, J. S. Toxic effect of urea on plants: nitrite toxicity arising from the use of urea as a fertilizer. *Nature*, v.194, p. 1263-1265, jun. 1962. doi:10.1038/1941263a0.

COX, J. A.; KULKARNI, K. R. Flow injection determination of nitrite by amperometric detection at a modified electrode. *Analyst*, v. 111, n. 10, p. 1219-1220, oct. 1986. doi:10.1039/AN9861101219.

CURULLI, A. et al. Assembling and evaluation of new dehydrogenase enzyme electrode probes obtained by electropolymerization of aminobenzene isomers and PdQ on gold, platinum and carbon electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 12, n. 9-10, p. 1043-1055, nov. 1997. doi:10.1016/S0956-5663(97)00060-2.

DAI, Z. A novel nitrite biosensor based on the direct electron transfer of hemoglobin immobilized on CdS hollow nanospheres. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 12, p. 1869-1873, jul. 2008. doi:10.1016/j.bios.2008.03.002.

DAMIANI, P.; BURINI, G. Fluorometric determination of nitrite. *Talanta*, Perugia, v. 33, n. 8, p. 649-652, aug. 1986. doi:10.1016/0039-9140(86)80151-5.

DANIELL, J. F., Abstracts of the papers printed in the philosophical transactions of the Royal Society. *The Royal Society*, London, v. 3, p. 469-471, 1800-1814.

DAS, A. K.; RAJ, C. R. Rapid room temperature synthesis of electrocatalytically active Au nanostructures. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 353, n. 2, p. 506-511, jan. 2011. doi:10.1016/j.jcis.2010.09.080.

DAVIS, J. et al. Electrochemical detection of nitrate and nitrite at a copper modified electrode. *Analyst*, v. 125, p. 737-742, mar. 2000. doi:10.1039/A909762G.

DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Sonoelectrochemically enhanced nitrite detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 404, n. 2, p. 241-247, jan. 2000. doi:10.1016/S0003-2670(99)00724-2.

- DEJAM, A. et al. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 734-739, jul. 2005. doi:10.1182/blood-2005-02-0567.
- DENG, Chunyan et al. Electrochemical detection of nitrite based on the polythionine/carbon nanotube modified electrode. **Thin Solid Films**, v. 520, p. 7026-7029, sep. 2012. doi:10.1016/j.tsf.2012.07.010.
- DENG, Yue-Yi; LIU, F.-Q.; JIN, Y.-L. Synthesis, crystal structure, and electrocatalytic properties of a copper(II) complex of 1,2-bis(2-benzimidazolyl)benzene. **Transition Metal Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 309-314, may 2012. doi:10.1007/s11243-012-9577-4.
- DESMOND, D. et al. Evaluation of miniaturised solid state reference electrodes on a silicon based component. **Sensors and Actuators B**, v. 44, n. 1-3, p. 389-396, oct. 1997. doi:10.1016/S0925-4005(97)00231-1.
- DHAOUI, W. et al. Electrochemical sensor for nitrite determination based on thin films of sulfamic acid doped polyaniline deposited on Si/SiO₂ structures in electrolyte/insulator/semiconductor (E.I.S.) configuration. **Synthetic Metals**, v. 158, n. 17-18, p. 722-726, oct. 2008. doi:10.1016/j.synthmet.2008.04.020.
- DOBLANDER, C.; LACKNER, R. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1289, n. 2, p. 270-274, mar. 1996. doi:10.1016/0304-4165(95)00166-2.
- DREYSE, P. A. et al. Electrochemical reduction of nitrite at poly-[Ru(5-NO₂-phen)₂Cl] tetrapyrrolylporphyrin glassy carbon modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 5230-5237, mar. 2011. doi:10.1016/j.electacta.2011.03.028.
- EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química** v. 1. São Paulo: EDUSP, 1977. cap. 11-13, p. 196-263.
- FAGO, A.; JENSEN, F. B. The role of blood nitrite in the control of hypoxic vasodilation. **Advances in Experimental Biology**, v. 1, p. 199-212, 2007. doi:10.1016/S1872-2423(07)01009-5.
- FERNANDES, J. C. B.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T. Eletrodos íons-seletivos: Histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão de conceitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 120-130, fev. 2001. doi:10.1590/S0100-40422001000100020.
- FIORUCCI, A. R.; BENEDETTI FILHO, E. A Importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, n. 22, p. 10-16, nov. 2005. Disponível em: <<http://qnesc.sbg.org.br/online/qnesc22/a02.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- FISCHER, L. M. et al. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MICRO- AND NANO-ENGINEERING, 34th, 2008, Athens. **Proceedings...** Athens: Microelectronic Engineering, v. 86, n. 4-6, p. 1282-1285, 2009. doi:10.1016/j.mee.2008.11.045.

FONTES, M. B. A.; MAZZETTO, M.; CESTARI, I. A. Microeletrodos aplicados ao estudo in vitro de propagação de sinais eletrofisiológicos fabricados em mídia CD. In: IBEROAMERICANA SENSOR CONFERENCE, 4th, 2004, Puebla. **Resumos...** Puebla: INAOE, 2004. 1 CD-ROM.

FURIA, T. E. Stability Constants ($\log K_1$) of various metal chelates from chapter 6 - sequestrants in foods. **CRC Handbook of Food Additives v. 1: FURIA, T. E.** 2nd ed. Cleveland, Ohio: CRC Press, 1972 revised 2006.

FYE, W. B. [Thomas] Lauder Brunton, 1844-1916. **Clinical Cardiology**, v. 12, n. 11, p. 675-676, nov. 1989. doi:10.1002/cic.4960121112.

GAMBOA, J. C. M. et al. Activated copper cathodes as sensors for nitrite analysis. **Electroanalysis**, v. 22, n. 22, p. 2627-2632, nov. 2010. doi:10.1002/elan.201000318.

GAMBOA, J. C. M. et al. Morphology, microstructure and electrocatalytic properties of activated copper surfaces. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 120-123, 2012. doi:10.1590/S0103-50532012000100017.

GANJALI, M. R. et al. Development of fast fourier transformations with continuous cyclic voltammetry at an Au microelectrode and its application for the subnano-molar monitoring of methyl morphine trace amounts. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1311-1318, dec. 2008. doi:10.1016/j.msec.2008.01.004.

GAO X. et al. Fabrication and performance of all-solid-state chloride sensors in synthetic concrete pore solutions. **Sensors**, v. 10, n. 11, p. 10226-10239, nov. 2010. doi:10.3390/s101110226.

GEETHA, S. et al. Biosensing and drug delivery by polypyrrole. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 2-4, p. 119-125, may 2006. doi:10.1016/j.aca.2005.10.011.

GESTIS Substance Database. **Institute for Occupational Safety and Health of the German Social Accident Insurance (IFA)**, sem data. Disponível em: <<http://gestis-en.trust.de>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, oct. 1982. doi:10.1016/0003-2697(82)90118-X.

GREENBERG, L. A.; LESTER, D.; HAGGARD, H. W. The reaction of hemoglobin with nitrite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 15, p. 665-673, sep. 1943. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/151/2/665.full.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2014.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 876-921, jun.-aug.-sep. 2007. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012.

GUISEPP-ELIE, A. Cleaning and surface activation of microfabricated Interdigitated Microsensor Electrodes (IMES), Planar Metal Electrodes (PMEs), Independently

- Addressable Microband Electrodes (iAMES), and E'Chem "Cell-On-A-Chip. **Application Note (2000) - ABTECH, Scientific, Inc.**, 2000. Disponível em: <<http://www.abtechsci.com>>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica e.9.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- HA, J. et al. A polymeric junction membrane for solid-state reference electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 549, n. 1-2, p. 59-66, sep. 2005. doi:10.1016/j.aca.2005.06.011.
- HALLINAN Jr., D. T.; BALSARA, N. P. **Polymer Electrolytes. Annual Review of Materials Research**, v. 43, p. 503-525, jul. 2013. doi:10.1146/annurev-matsci-071312-121705.
- HAMELIN, A. Comments on the paper of A.T. D'agostino and P.N. Ross: on the importance of surface structure in electrochemistry: the well-defined Au (111) single crystal electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 195, n. 1, p. 175-176, nov. 1985. doi:10.1016/0022-0728(85)80015-2.
- HASNAT, M. A. et al. Influence of Rh on electrocatalytic reduction of NO₃⁻ and NO₂⁻ over Pt and Pd films. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 317, n. 1-2, p. 61-67, oct. 2010. doi:10.1016/j.mocata.2009.10.022.
- HASNAT, M. A. et al. Silver modified platinum surface/H⁺ conducting nafion membrane for cathodic reduction of nitrate ions. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 7, p. 3309-3314, nov. 2012. doi:10.1016/j.apsusc.2011.11.088.
- HAYNES, W.M. Chemical constituents of human blood. **CRC Handbook of Chemistry and Physics: HAYNES, W. M. 93 ed.** Washington, D.C.: CRC Press, 2012-2013.
- HERAS, A. et al. Electrochemical purification of carbon nanotube electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 7, p. 1535-1538, jul. 2009. doi:10.1016/j.elecom.2009.05.052.
- HERNANDEZ, L. F. **Produção de Filmes Compositos a partir de Treatamentossilicato para Aplicação em Estruturas miniaturizadas e em Detecção de VOCs/Umidade.** 2012. 215p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- HERNANDEZ, L. F. et al. Advantages of using clustered TEOS plasma polymerized thin films in humidity/VOCs measurement. In: **INTERNATIONAL MEETING OF MATERIALS**, 7th, 2013, Coimbra. **Anais...** Coimbra: MRS, 2013. 1 CD-ROM.
- HORWOOD, P. E. **Instrumental methods in Electrochemistry.** Southampton: Woodhead Publishing, 2001.
- HUANG, I-Yu; HUANG; Ruey-Shing. Fabrication and characterization of a new planar

- solid-state reference electrode for ISFET sensors. **Thin Solid Films**, v. 406, n. 1-2, p. 255-261, mar. 2002. doi:10.1016/S0040-6090(01)01783-7.
- HUANG, I-Yu; HUANG; Ruy-Shing; LO, L.-H. Improvement of integrated Ag/AgCl thin-film electrodes by KCl-gel coating for ISFET applications. **Sensors and Actuators B**, v. 94, n. 1, p. 53-64, aug. 2003. doi:10.1016/S0925-4005(03)00326-5.
- HUANG, X. et al. Electrochemical determination of nitrite and iodate by use of gold nanoparticles/poly(3-methylthiophene) composites coated glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 134, n. 2, p. 780-786, jun. 2008. doi:10.1016/j.snb.2008.06.028.
- HUNT, L. B. The early history of gold plating. **Gold Bulletin**, London, v. 6, n. 1, p. 16-27, jan. 1973. 10.1007%2F03215178.
- IQ-USP. Manual de segurança para proteção química microbiológica e radiológica. **CIPA do Instituto de Química da USP**, 2004. Disponível em: <<http://www2.iq.usp.br/cipa/manual/manualinteiro.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2012.
- ISKANDARANI, Z.; PIETRZYK, D. J. Determination of nitrite and nitrate in water and food samples by ion interaction chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 2601-2603, dec. 1982. doi:10.1021/ac00251a046.
- IZUMI, K.; CASSENS, R. G.; GREASER, M. L. Reaction of nitrite with ascorbic acid and its significant role in nitrite-cured food. **Meat Science**, v. 26, n. 2, p. 141-153, 1989. doi:10.1016/0309-1740(89)90037-5.
- JAHNO, V. D. **Avaliação da citotoxicidade in vitro e da biocompatibilidade in vivo de biomateriais poliméricos**. 2009. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- JANÁKY, C.; VISY, C. Conducting polymer-based hybrid assemblies for electrochemical sensing: a materials science perspective. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3489-3511, apr. 2013. doi:10.1007/s00216-013-6702-y.
- JANZ, G. J.; IVES, D. J. G. **Reference electrodes: theory and practice**. New York-London: Academic Press, 1961.
- JIANG, J.; WANG, X. Fabrication of high-surface nanoporous gold microelectrode. **Electrochemistry Communications**, v. 20, p. 157-159, jul. 2012a. doi:10.1016/j.elecom.2012.04.028.
- JIANG, J.; WANG, X. Nanostructuring a gold microelectrode through electrochemical alloying-dealloying for nitrite detection. **ECS Electrochemistry Letters**, v. 1, n. 5, p. H21-H23, aug. 2012b. doi:10.1149/2.009205eel.
- JU, Jian et al. Poly-o-tolidine cobalt supported on ordered mesoporous carbon as an efficient electrocatalyst for oxygen reduction. **Electrochemistry Communications**, v. 25, p. 35-38, nov. 2012. doi:10.1016/j.elecom.2012.09.023.

- KALIMUTHU, P.; JOHN, S. A. Highly sensitive and selective amperometric determination of nitrite using electropolymerized film of functionalized modified glassy carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 5, p. 1065-1068, may 2009. doi:10.1016/j.elecom.2009.03.015.
- KAUR, H.; SINGLA, A. Comparative study of stability constants and thermodynamic properties of complexation of aspirin and paracetamol with divalent metal ions by potentiometry. **International Journal of Theoretical & Applied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 14-17, feb. 2010. Disponível em: <<http://researchtrend.net/tas21/3%20H%20KAUR.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- KAZIMIERSKA, E.; SMYTH, M. R.; KILLARD, A. J. Size-dependent electrocatalytic reduction of nitrite at nanostructured films of hollow polyaniline spheres and polyaniline-polystyrene core-shells. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 28, p. 7260-7267, dec. 2009. doi:10.1016/j.electacta.2009.07.039.
- KEELE, G. P. et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and paracetamol based on thin pyrolytic carbon films. **Analytical Methods**, v. 4, n. 7, p. 2048-2053, may 2012. doi:10.1039/c2ay25156f.
- KERSHAW, N. F.; CHAMBERLIN, N. S. Determination of nitrites: discussion of the shinn method as applied to examination of water. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 312-313, apr. 1942. doi:10.1021/i560104a012.
- KIANG, C.-H.; KUAN, S. S.; GUBAULT, G. G. A novel enzyme electrode method for the determination of nitrite based on nitrite reductase. **Analytica Chimica Acta**, v. 80, n. 2, p. 209-214, dec. 1975. doi:10.1016/S0003-2670(01)85074-1.
- KISIEL, A. et al. All-solid-state reference electrodes based on conducting polymers **Analyst**, v. 130, n. 12, p. 1655-1662, dec. 2005. doi:10.1039/b510868c.
- KISIEL, A. et al. All-solid-state reference electrodes with poly(n-butyl acrylate) based membranes. **Electroanalysis**, v. 20, n. 3, p. 318-323, 2008. doi:10.1002/elan.200704065.
- KISIEL, A. et al. Polyacrylate microspheres composite for all-solid-state reference electrodes. **Analyst**, v. 135, n. 9, p. 2420-2425, sep. 2010. doi:10.1039/c0an00196a.
- KISIEL, A. et al. Polypyrrole microcapsules in all-solid-state reference electrodes. **Electroanalysis**, v. 24, n. 1, p. 165-172, jan. 2012. doi:10.1002/elan.201100551.
- KLESZCZEWSKA, E.; The spectrophotometry determination of chelate complex: L-ascorbic acid with cuprum(II) and mercury(II) in alkaline solution. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 8, n. 5, p. 313-318, jun. 1999. Disponível em: <<http://www.pjoes.com/pdf/8.5/313-318.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- KO, W.-Y. et al. Highly electrocatalytic reduction of nitrite ions on a copper nanoparticles thin film. **Sensors and Actuators B**, v. 137, n. 2, p. 437-441, apr. 2009. doi:10.1016/j.snb.2009.01.014.

- KOUPPARIS, M. A.; WALCZAK, K. M.; MALMSTADT, H. V. Automated determination of nitrate in waters with a reduction column in a microcomputer-based stopped-flow sample processing system. *Analytica Chimica Acta*, v. 142, n. C, p. 119-1271, oct. 1982. doi:10.1016/S0003-2670(01)95273-0.
- KOZUB, B. R.; REES, N. V.; COMPTON, R. G. Electrochemical determination of nitrite at a bare glassy carbon electrode; why chemically modify electrodes? *Sensors and Actuators, B: chemical*, v. 143, n. 2, p. 539-546, jan. 2010. doi:10.1016/j.snb.2009.09.065.
- KUCERNAK, A. R.; OFFER, G. J. The role of adsorbed hydroxyl species in the electrocatalytic carbon monoxide oxidation reaction on platinum. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 10, n. 25, p. 3699-3711, mai. 2008. doi:10.1039/b802816h.
- KUHN, T. S. *A estrutura das revoluções científicas*. Trad. de Beatriz Vianna Boeira e Nelson Boeira. 3.ed. São Paulo: Perspectiva, 1992. 257p.
- KULESZA, P. J.; COX, J. A. Solid-state voltammetry – analytical prospects. *Electroanalysis*, v. 10, n. 2, p. 73-80, feb. 1998. doi:10.1002/(SICI)1521-4109(199802)10:2<73::AID-ELAN73>3.0.CO;2-K.
- LAMBERT, J. L.; ZITOMER, F. Differential colorimetric determination of nitrite and nitrate ions. *Analytical Chemistry*, v. 32, n. 12, p. 1684-1686, nov. 1960. doi:10.1021/ac60168a041.
- LASCHI, S.; MASCINI, M. Planar electrochemical sensors for biomedical applications. *Medical Engineering & Physics*, Sesto Fiorentino, v. 28, n. 10, p. 934-943, dec. 2006. doi:10.1016/j.medengphy.2006.05.006.
- LI, JING; LIN, XIANGQIN. Electrocatalytic reduction of nitrite at polypyrrole nanowire-platinum nanocluster modified glassy carbon electrode. *Microchemical Journal*, v. 87, n. 1, p. 41-46, oct. 2007. doi:10.1016/j.microc.2007.05.005.
- LI, XIAO-RONG et al. Synthesis of potassium-modified graphene and its application in nitrite-selective. *Sensing Advanced Functional Materials*, Nanjing, v. 22, n. 9, p. 1981-1988, may 2012. doi:10.1002/adfm.201103025.
- LI, YANCAI et al. Amperometric nitrite sensor based on PVP-OS entrapped in titania sol-gel matrix. *Electroanalysis*, v. 16, n. 19, p. 1637-164, 2004. doi:10.1002/elan.200402997.
- LIMA, R. R. *Desenho técnico sem nome*. Não publicado, 2013.
- LIN, AI-JING et al. Layer-by-layer construction of multi-walled carbon nanotubes, zinc oxide, and gold nanoparticles integrated composite electrode for nitrite detection. *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 3, p. 1030-1036, jan. 2011. doi:10.1016/j.electacta.2010.10.058.
- LIN, Chia-Yu et al. A novel poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/iron

- phthalocyanine/multi-wall carbon nanotubes nanocomposite with high electrocatalytic activity for nitrite oxidation. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1905-1911, oct. 2010. doi:10.1016/j.talanta.2010.08.010.
- LIN, Hongyan et al. A novel copper(II) complex constructed with mixed ligands of biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid (H₂bpdac) and dipyrrodo [3,2-d:2',3'-f]quinoxaline (Dpq): Synthesis, structure, electrochemistry and electrocatalysis. **Solid State Sciences**, v. 11, n. 3, p. 643-650, mar. 2009. doi:10.1016/j.solidstatesciences.2008.10.007.
- LONG, J. W. et al., Ultrathin, protective coatings of poly(o-phenylenediamine) as electrochemical proton gates: making mesoporous MnO₂ nanoarchitectures stable in acid electrolytes. **Nano Letters**, v. 3, n. 8, p. 1155-1161, may 2003. doi:10.1021/nl0343598.
- LORANT, S. All-solid-state pH sensor used in oil drilling mud. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 223-229, 2013. doi:10.1002/elan.201200367.
- LOVRIĆ, M. Differential pulse voltammetry on spherical microelectrodes. **Electroanalysis**, v. 11, n. 15, p. 1089-1093, nov. 1999. doi:10.1002/(SICI)1521-4109(199911)11:15<1089::AID-ELAN1089>3.0.CO;2-J.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. doi:10.1038/nrd2466.
- MABBOTT, G. A. An introduction to cyclic voltammetry. **Journal of Chemicals Education**, v. 60, n. 9, p. 697-701, sep. 1983. doi:10.1021/ed060p697.
- MALJUSCH, A. et al. A quick method for the preparation of Pt(111)-like thin films. **Electrochemistry Communications**, v. 16, p. 88-91, mar. 2012. doi:10.1016/j.elecom.2011.12.004.
- MALLICK, K.; WITCOMB, M. J.; SCURRELL, M. S. Gold in polyaniline: recent trends. **Gold Bulletin**, London, v. 39, n. 4, p. 166-174, dec. 2006. doi:10.1007/BF03215550.
- MANGIATORDI, G. F. et al. Charge transport in poly-imidazole membranes: a fresh appraisal of the growth mechanism. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 31, p. 10910-10918, aug. 2012. doi:10.1039/c2cp23727j.
- MARSHALL, P. A.; TRENNERY, V. C. The determination of nitrite and nitrate in foods by capillary ion electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 339-345, oct. 1996. doi:10.1016/0308-8146(96)00002-7.
- MARTINEZ-HUITL, C. A. et al. Cu-doped polymeric-modified electrode for determination of cysteine. **Latin American Applied Research**, Bahía Blanca, v. 40, n. 1, p. 47-51, 2010b. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/pdf/laar/v40n1/v40n1a08.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- MARTINEZ-HUITL, C. A. et al. Determination of trace metals by differential pulse voltammetry at chitosan modified electrodes. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 28, n. 1, p. 39-49, 2010a. doi:10.4152/pea.201001039.

- MARY, N. et al. Finite-element and XRD methods for the determination of the residual surface stress field and the elastic-plastic behaviour of duplex steels. **Philosophical Magazine**, v. 85, n. 12, p. 1227-1242, feb. 2007. doi:10.1080/14786430412331333329.
- MATTOS, I. L.; GORTON, L. Filmes de metal Hexacianoferrato: uma ferramenta em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 200-205, mar./abr. 2001. doi:10.1590/S0100-40422001000200010.
- MAZEIKIENĖ, R.; NIAURA, G.; MALINAUSKAS, A. Voltammetric study of the redox processes of self-doped sulfonated polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 139, n. 1, p. 89-94, aug. 2003. doi:10.1016/S0379-6779(03)00037-7.
- MCDONALD, D.; HUNT, L. B. **A History of Platinum and its Allied Metals**. London: Johnson Matthey, p. 147-177, 1982.
- MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B. Níveis de nitrato e nitrato em saisichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 390-392, jul.-set. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n3/21931.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- MENEZES, E. W. et al. Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 12, p. 3703-3713, dec. 2012. doi:10.1007/s10008-012-1782-8.
- MENG, Z. et al. Electrodeposition of cobalt oxide nanoparticles on carbon nanotubes, and their electrocatalytic properties for nitrite electrooxidation. **Microchimica Acta**, v. 175, p. 251-257, sep. 2011. doi:10.1007/s00604-011-0688-y.
- MODIN et al. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, n. 1, p. 9-16, jan. 2001. doi:10.1046/j.1365-201X.2001.00771.x.
- MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, n. 5, p. 785-803, jan. 2001. doi:10.1016/S0039-9140(01)00323-X.
- MORCOS, E.; WIKLUND, N. P. Nitrite and nitrate measurement in human urine by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 13, p. 2763-2768, aug. 2001. doi:10.1385/1-59259-807-2:021.
- MOTOMIZU, S.; MIKASA, H.; TÔEI, K. Fluorometric determination of nitrite in natural waters with 3-aminonaphthalene-1,5-disulphonic acid by flow-injection analysis. **Talanta**, v. 33, n. 9, p. 729-732, sep. 1986. doi:10.1016/0039-9140(86)80174-6.
- MOTTA, V. T. **Biogímica Básica**. Caxias do Sul: Laboratório Autolab Ltda, 2006.
- MOURA, M. Oliver Smithies. **Pesquisa FAPESP**, n. 146, abr. 2008.

- MOUSAVI, Z. et al. An analytical quality solid-state composite reference electrode. *Analyst*, v. 138, n. 18, p. 5216-5220, 2013. doi:10.1039/c3an00852e.
- MUCHINDU, M. et al. Electrochemical nitrite nanosensor developed with amine- and sulphate-functionalised polystyrene latex beads self-assembled on polyaniline. *Electrochimica Acta*, v. 55, n. 14, p. 4274-4280, may 2010. doi:10.1016/j.electacta.2009.06.047.
- MULLIN, J. B.; RILEY, J. P. The spectrophotometric determination of nitrate in natural waters, with particular reference to sea-water. *Analytica Chimica Acta*, v. 12, p. 464-480, 1955. doi:10.1016/S0003-2670(00)87865-4.
- MURAD, F.; FURCHGOTT, R. F.; IGNARRO, L. Prêmio nobel em fisiologia e medicina pela descoberta das propriedades sinalizadoras do NO, 1998.
- MUSCARA, M. N.; DE NUCCI, G. Simultaneous determination of nitrite and nitrate anions in plasma, urine and cell culture supernatants by high-performance liquid chromatography with post-column reactions. *Journal of Chromatography B: biomedical sciences and applications*, v. 686, n. 2, p. 157-164, nov. 1996. doi:10.1016/S0378-4347(96)00229-0.
- NEELAKANTAN, M. A. et al. Solution equilibria of Ni(II), Cu(II), and Zn(II) complexes involving pyridoxine and imidazole containing ligands: pH metric, spectral, electrochemical, and biological studies. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 56, n. 5, p. 2527-2535, apr. 2011. doi:10.1021/e200054w.
- NICHOLAS, D. A.; NASON, D. J. Determination of nitrate and nitrite. *Methods in Enzymology*, v. 3, p. 981-984, 1957. doi:10.1016/S0076-6879(57)03489-8.
- NICKELS, J. D.; SCHMIDT, C. E. Surface modification of polypyrrole via affinity peptide: quantification and mechanism. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, n. 7, p. 1060-1066, p. 2013. doi:10.1039/c2tb00269h.
- NOGUEIRA, W. A. SANTOS FILHO, S. G. Influência das impurezas químicas úmidas H₂O/H₂O₂/NH₄OH e H₂O/HF/HNO₃ na micro-rugosidade de lâminas de silício. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, v. 22, n. 4, p. 53-58, 2002. Disponível em: <http://www.sbvacu.org.br/rbav/index.php/rbav/artic/e/viewFile/194/189>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- NOROUZI, P. et al. Nano-level detection of naltrexone hydrochloride in its pharmaceutical preparation at Au microelectrode in flowing disdissolutions by fast fourier transforms continuous cyclic voltammetry as a novel detector. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, n. 8, p. 2009-2017, aug. 2007.
- NYGAARD, D. D. Electrochemical determination of nitrite and nitrate by pneumatoamperometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 130, n. 1, p. 391-394, oct. 1981. doi:10.1016/S0003-2670(01)93018-1.
- O'CONNELL, P. J. et al. Development of an amperometric l-ascorbic acid (Vitamin C) sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis.

Analytica Chimica Acta, v. 431, n. 2, p. 239-247, mar. 2001. doi:10.1016/S0003-2670(00)01330-1.

OHTA, T.; ARAI, Y.; TAKITANI, S. Fluorometric determination of nitrite with 4-hydroxycoumarin. *Analytical Chemistry*, v. 58, n. 14, p. 3132-3135, dec. 1986. doi:10.1021/ac00127a047.

OJANI, R.; RAOOF, J.-B.; ZAMANI, S. A novel and simple electrochemical sensor for electrocatalytic reduction of nitrite and oxidation of phenylhydrazine based on poly (o-anisidine) film using ionic liquid carbon paste electrode. *Applied Surface Science*, v. 271, n. 15, p. 98-104, apr. 2013. doi:10.1016/j.apsusc.2013.01.132.

OJANI, R.; RAOOF, J.-B.; ZAREI, E. Electrocatalytic reduction of nitrite using ferricyanide; application for its simple and selective determination. *Electrochimica Acta*, v. 52, n. 3, p. 753-759, nov. 2006. doi:10.1016/j.electacta.2006.06.005.

OKOCHI, H.; BRIMBLECOMBE, P. Potential trace metal-organic complexation in the atmosphere. *The Scientific World Journal*, v. 2, p. 767-786, mar. 2002. doi:10.1100/tsw.2002.132.

OLIVEIRA, L. M.; FONTES, M. B. A. Caracterização de microssensores eletroquímicos. *Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo*, 10ª edição, 2001. Disponível em: <http://bt.fatecsp.br/buletins/show_article/120>. Acesso em: 26 out. 2013.

OLIVER, Sonia P. *Microceldas para análisis voltamétrico de microlíquidos de soluciones líquidas*. Ciudad de la Habana: Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Facultad de Ingeniería Eléctrica, Centro de Investigaciones en Microelectrónica, 2006.

OROZCO, J.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C.; JIMÉNEZ-JORQUERA, C. Ultramicroelectrode array based sensors: a promising analytical tool for environmental monitoring. *Sensors*, v. 10, n. 1, p. 475-490, jan. 2010. doi:10.3390/s100100475.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: uma breve revisão sobre os conceitos. *Revista Virtual Química*, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. Disponível em: <<http://www.uftf.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/380/345>>. Acesso em: 02 abr. 2014.

PAIXÃO, T.R.L.C. BERTOTTI, M. Métodos para fabricação de microeletrodos visando a detecção em microambientes. *Química Nova (On line)*, v. 32, n. 5, p. 1306-1314, may 2009. doi:10.1590/S0100-40422009000500037.

PATERNÓ, L. G. *Aula 3 – Preparação e estrutura de polímeros conjugados*. Aula apresentada à disciplina do curso de pós-graduação: PSI 5100 – Dispositivos Eletrônicos Poliméricos (2010). Universidade de São Paulo Escola Politécnica Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, 2010. Não Publicado.

PATNAIK, P. *Electroanalytical Methods*. Dean's Analytical Chemistry Handbook: McGraw-Hill. 2nd ed. sec. 14. New York, Chicago, San Francisco, London,

- Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney and Toronto: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2004.
- PENG, C. et al. Carbon nanotube and conducting polymer composites for supercapacitors. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 7, p. 777-788, jul. 2008. doi:10.1016/j.pnsc.2008.03.002.
- PEREIRA, Antonio C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 1012-1021, ago. 2002. doi:10.1590/S0100-40422002000600019.
- POLLARD, T. D.; EARNSHAW, W.C. **Biologia celular (1942)**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. (Ilustrado por JOHNSON, G. T. e trad. de MATHILES, A. L. A. et al.).
- PRICE, D. S. On the tests for nitrates, and a new one for nitrites. **Quarterly Journal of the Chemical Society**, London, v. 2, p. 151-155, 1852. doi:10.1039/QJ8520400151.
- RAJESHWAR, K.; IBANEZ, J. G. **Environmental Electrochemistry**. California: Academic press, p. 29, 1997.
- RAMANAVÍCIUS, A.; RAMANAVÍCIENE, A.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical sensors based on conducting polymer-porphyrrole. **Electrochimica Acta 51**, v. 51, n. 27, p. 6025-6037, aug. 2006. doi:10.1016/j.electacta.2005.11.052.
- RASSAF, T. et al. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 2, p. 295-301, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814110>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- RASSAF, T. Modulation of human mitochondrial function: the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. University Hospital Düsseldorf, Department of Medicine, Division of Cardiology, Pulmonary Diseases and Vascular Medicine from Heinrich Heine Universität Düsseldorf. **European Society of Cardiology**, sem data. Disponível em: <<http://spo.escardio.org/eslides/view.aspx?eevtid=48&f=3107>>. Acesso em: 05 jan. 2013.
- RASSAF, T.; FEELISCH, M.; KELM, M. Circulating no pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 4, p. 413-422, 2004. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.011.
- RAYMUNDO, M. S. **Avaliação da quantificação de nitritos e antioxi-dantes em alimentos por técnicas voltamétricas**. 2007. 215 p. Tese (Doutorado): Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- REHM, D.; MCENROE, E.; DIAMOND, D. An all solid-state reference electrode based on a potassium chloride doped vinyl ester resin. **Analytical Proceedings Including Analytical Communications**, v. 32, n. 8, p. 319-322, 1995. doi:10.1039/A19953200319.

RIDER, B. F.; MELLON, M. G. Colorimetric determination of nitrites. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 96-99, feb. 1946. doi:10.1021/i560150a003.

RINGER, S.; MURRELL, W. On nitrite of sodium as a toxic agent. **The Lancet**, London, v. 122, n. 3140, p. 766-767, nov. 1883. doi:10.1016/S0140-6736(02)23900-8.

RIUS-RUIZ, F. X. et al. Solid-state reference electrodes based on carbon nanotubes and polyacrylate membranes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 10, p. 3613-362, apr. 2011. doi:10.1007/s00216-011-4689-9.

ROCHA, J. R. C. et al. Amperometric detection of nitrite and nitrate at tetraethenated porphyrin-modified electrodes in a continuous-flow assembly. **Analytica Chimica Acta** v. 452, n. 1, p. 23-28, jan. 2002. doi:10.1016/S0003-2670(01)01440-4.

ROCHA, J. R. C. et al. Anodic oxidation of nitrite at a molybdenum oxide layer. **Electroanalysis**, v. 13, n. 2, p. 155-160, feb. 2001. doi:10.1002/1521-4109(200102)13:2<155::AID-ELAN155>3.0.CO;2-F.

RODRIGUEZ, J. M. D.; MELIÁN, J. A. H.; PENA, J. P. Determination of the real surface area of Pt electrodes by hydrogen adsorption using cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 9, p. 1195-1197, sep. 2000. doi:10.1021/ed077p1195.

SABER-TEHRANI, M. et al. A simple and efficient electrochemical sensor for nitrite determination in food samples based on Pt nanoparticles distributed poly(2-aminothiophenol) modified electrode. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1300-1307, nov. 2012. doi:10.1007/s12161-012-9543-y.

SACHAN, S. et al. Electrophoretic studies of biologically important mixed metal-ascorbic acid-nitritotriacetate complexes. **Croatica Chimica Acta**, v. 84, n. 4, p. 461-464, dec. 2011. doi:10.5562/cca1778.

SALIMI, A.; NOORBAKHSH, A.; GHADERMARZI, M. Amperometric detection of nitrite, iodate and periodate at glassy carbon electrode modified with catalase and multi-wall carbon nanotubes. **Sensors and Actuators B**, v. 123, n. 1, p. 530-537, apr. 2007. doi:10.1016/j.snb.2006.09.054.

SANTOS, Wilney J. R. et al. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1206-1211, apr. 2009. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.009.

SANTOS, Wilney J. R. et al. Amperometric sensor for nitrite using a glassy carbon electrode modified with alternating layers of iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin and cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 588-594, oct. 2006. doi:10.1016/j.talanta.2006.01.023.

SAWICKI, E. et al. Comparison of fifty-two spectrophotometric methods for the determination of nitrite. **Talanta**, Northern Ireland, v. 10, n. 6, p. 641-655, jun. 1963. doi:10.1016/0039-9140(63)80081-8.

- SCHOENFISCH, M. H.; ROSS, A. M.; PEMBERTON, J. E. Electrochemical cleaning of surface-confined carbon contamination in self-assembled monolayers on polycrystalline Ag and Au. **Langmuir**, v. 16, n. 6, p. 2907-2914, oct. 2000. doi:10.1021/la9900627.
- SEYAMA, T. **Chemical Sensor Technology** v. 1. Tokio: Kodansha Ltd., 1988.
- SHIDDIKY, M. J. A.; WON, M.-S.; SHIM, Y.-B. Simultaneous analysis of nitrate and nitrite in a microfluidic device with a Cu-complex-modified electrode. **Electrophoresis**, v. 27, n. 22, p. 4545-4554, nov. 2006. doi:10.1002/elps.200600240.
- SHINN, M. B., Colorimetric method for determination of nitrate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 13, n. 1, p. 33-35, jan. 1941. doi:10.1021/i560089a010.
- SHISHHEBBORE, M. R. et al. Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of hydroxylamine using a 4-hydroxy-2-(triphenylphosphonio)phenolate carbon nanotubes modified electrode. **Analytical Methods**, v. 3, n. 2, p. 306-313, 2011. doi:10.1039/c0ay00451k.
- SHUKLA, A. K.; KUMAR, T. P. Pillars of modern electrochemistry. **The Electrochemical Society Interface**, Arlington, v. 17, n. 3, p. 31-39, 2008. Disponível em: <http://www.electrochem.org/dl/interface/fall/fal08/fal08_p31-39.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- SILVA, Serge et al. An efficient poly(pyrrrole-viologen)-nitrite reductase biosensor for the mediated detection of nitrite. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 4, p. 404-408, apr. 2004. doi:10.1016/j.elecom.2004.02.007.
- SILVA, Sonia M. et al. Electrochemical determination of nitrites in natural waters with ultramicroelectrodes. **Electroanalysis**, v. 8, n. 11, p. 1055-1059, nov. 1996. doi:10.1002/elan.1140081114.
- SINHA, S. S.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Myocardial protection by nitrite: evidence that this reperfusion therapeutic will not be lost in translation. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 163, jul. 2008. doi:10.1016/j.ticm.2008.05.001.
- SOUSA, A. L. et al. Amperometric sensor for nitrite based on copper tetrasulphonated phthalocyanine immobilized with poly-L-lysine film. **Talanta**, v. 75, n. 2, p. 333-338, apr. 2008. doi:10.1016/j.talanta.2007.10.016.
- SPIES, J. R.; CHAMBERS, D. C. Chemical determination of tryptophan: study of color-forming reactions of tryptophan, p-dimethylaminobenzaldehyde, and sodium nitrite in sulfuric acid solution. **Analytical Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 30-39, jan. 1948. doi:10.1021/ac60013a006.

SPIES, J. R.; CHAMBERS, D. C. Chemical determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, v. 21, n. 10, p. 1249-1266, oct. 1949. doi:10.1021/ac60034a033.

STEFAN, R.-L.; VAN STADEN, J. F.; ABUL-ENEIN, H. Y. Electrochemical sensor arrays. *Analytical Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 133-153, jun. 1999. doi:10.1080/10408349891199293.

STEJSKAL, J.; PROKEŠ, J.; TRCHOVÁ, M. Reprotonation of polyaniline: A route to various conducting polymer materials. *Reactive & Functional Polymers*, v. 68, n. 9, p. 1355-1361, sep. 2008. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2008.06.012.

STETTER, J. R.; PENROSE, W. R.; YAO, S. J. Sensors, chemical sensors, electrochemical sensors, and ECS. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 150, n. 2, p. S11-S16, 2003. doi:10.1149/1.1539051.

STRIEGLER, S.; DITTEL, M. A sugar discriminating binuclear Copper(II) complex. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 38, p. 11518-11524, aug. 2003. doi:10.1021/a035561f.

ŠTULÍK, K. et al. Microelectrodes, definitions, characterization, and applications (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 72, n. 8, p. 1483-1492, 2000. doi:10.1351/pac200072081483.

SUZUKI, H. Advances in the microfabrication of sensors electrochemical and systems. *Electroanalysis*, v. 12, n. 9, p. 703-715, may 2000. doi:10.1002/1521-4109.

SUZUKI, H.; TAURA, T. Thin-film Ag/AgCl structure and operational modes to realize long-term storage. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 148, n. 12, p. E468-E474, 2001. doi:10.1149/1.1416504.

SWOFFORD JR., H. S.; MCCORMICK, P. G. An electrochemical study of nitrite and oxide in sodium nitrate-potassium nitrate eutectic melts. *Analytical Chemistry*, v. 37, p. 970-974, 1965. doi:10.1021/ac60227a005.

SZUNERITS, S.; THOUIN, L. Microelectrode arrays. *Handbook of Electrochemistry*: C.G. Zoski, 1st ed. United Kingdom: Elsevier B. V., 2007. chap. 10, p. 391.

TAN, F.; METTERS, J. P.; BANKS, C. E. Electroanalytical applications of screen printed microelectrode arrays. *Sensors and Actuators B*, v. 181, p. 454-462, may 2013. doi:10.1016/j.snb.2013.02.034.

TARAFDER, P. K.; RATHORE, D. P. S. Spectrophotometric determination of nitrite in water. *Analyst*, v. 113, p. 1073-1076, jul. 1988. doi:10.1039/AN9881301073.

TARTE, P. Rotational isomerism as a general property of alkyl nitrites. *The Journal of Chemical Physics*, v. 20, p. 1570-1575, mar. 1952. doi:10.1063/1.1700218.

- TESKE, A. et al. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 21, p. 6623-6630, nov. 1994. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/176/21/6623>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- TIAN, Y. et al. Electroreduction of nitrite at an electrode modified with polypyrrole nanowires. **Synthetic Metals**, v. 143, n. 3, p. 309-313, jun. 2004. doi:10.1016/j.synthmet.2003.12.014.
- TIAN, Y. et al. Solid-phase extraction and amperometric determination of nitrite with polypyrrole nanowire modified electrodes. **Sensors and Actuators B**, v. 104, n. 1, p. 23-28, jan. 2005. doi:10.1016/j.snb.2004.04.094.
- TOMODA, A.; TSUJIT, A.; YONEYAMA, Y. Involvement of superoxide anion in the reaction mechanism of hemoglobin oxidation by nitrite. **Biochemical Journal**, v. 193, n. 1, p. 169-179, jan. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1162587/>>. Acesso em: 14 fev. 2014.
- TUNULLI, M. S. Gold chloride electrodes as electrochemical sensors for liquid chromatography. **Talanta**, v. 35, n. 9, p. 697-700, apr. 1988. doi:10.1016/0039-9140(88)80163-2.
- UEDA, T. et al. The determination of nitrite and nitrate in human blood plasma by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 16, n. 6, p. 1002-1004, jun. 1995. doi:10.1002/elps.11501601167.
- UHLIG, H. H. Developments in corrosion during the past fifty years, a brief review. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 99, n. 10, p. 275C-276C, oct. 1952. doi:10.1149/1.2779604.
- UNNIKRISHNAN, B. et al. Nitrite determination at electrochemically synthesized polydiphenylamine-Pt composite modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 177, p. 887-892, feb. 2013. doi:10.1016/j.snb.2012.11.102.
- VALENTINI, F. et al. Glassy carbon electrodes modified with hemin-carbon nanomaterial films for amperometric H₂O₂ and NO₂⁻ detection. **Electrochimica Acta**, v. 63, p. 37-46, feb. 2012. doi:10.1016/j.electacta.2011.12.027.
- VAN'YERK, P. **Electrochemical Series**. CRC Handbook of Chemistry and Physics: HAYNES, W. M. 93rd ed. Northwest, Washington, D.C.: CRC Press, 2012-2013.
- VOLTA, A., On the electricity excited by the mere contact of conducting substances of different kinds. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 90, p. 403-431, jan. 1800. doi:10.1098/rstl.1800.0018.
- WANG, Hui et al. Constructions of polyaniline nanofiber-based electrochemical sensor for specific detection of nitrite and sensitive monitoring of ascorbic acid scavenging nitrite. **Synthetic Metals**, v. 162, n. 3-4, p. 326-331, mar. 2012. doi:10.1016/j.synthmet.2011.12.013.
- WANG, Li et al. Process Integration for production of propylene oxide and hydrogen

- peroxide. **Petrochemical Technology**, v. 32, n. 6, p. 525-529, 2003. doi:10.1007/s00604-012-0794-5.
- WANG, Q.; YUN, Y. A nanomaterial composed of cobalt nanoparticles, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and graphene with high electrocatalytic activity for nitrite oxidation. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3-4, p. 411-418, jun. 2012.
- WANG, Yi et al. A microchip-based flow injection-amperometry system with mercaptopropionic acid modified electrode for the selective determination of dopamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, n. 2, p. 180-187, sep. 2008. doi:10.1016/j.aca.2008.07.030.
- WAY, P. M.; LINDER, P. W.; WILLIAMS, D. R. Computer simulation of metal-ion equilibria in biofluids: models for the low-molecular-weight complex distribution of calcium(II), magnesium(II), manganese(II), iron(III), copper(II), zinc(II), and lead(II) ions in human blood plasma. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 6, p. 588-595, 1977. doi:10.1039/D19770000588.
- WELLER, R. et al. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, n. 3, p. 327-331, sep. 1996. doi:10.1111/1523-1747.ep12363167.
- WETTERS, J. H., UGLUM, K. L. Direct spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate in the ultraviolet. **Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 335-340, mar. 1970. doi:10.1021/ac60285a016.
- WOLLASTON, W. H. Abstracts of the papers printed. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 3, p. 207-208, 1830-1837.
- WOLYNEC, S. **Técnicas Eletroquímicas em Corrosão**. São Paulo: EDUSP, 2003.
- WYGLADACZ, K. et al. Design of miniaturized nitrite sensors based on silicon structure with back-side contacts. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 83, n. 1-3, p. 109-114, mar. 2002. doi:10.1016/S0925-4005(01)01052-8.
- XUE, Y.; TRAINA, S. J. Stability of metal organic complexes in acetone and methanol water mixtures. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 11, p. 3177-3183, oct. 1996. doi:10.1021/es950740l.
- YAMANAKA, T.; OTA, A.; OKUNUKI, K. A nitrite reducing system reconstructed with purified cytochrome components of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 53, n. 2, p. 294-308, 1961. doi:10.1016/0006-3002(61)90442-5.
- YANG, Chunhai; LU, Q.; HU, S. A novel Nitrite amperometric sensor and its application in food analysis. **Electroanalysis**, v. 18, n. 22, p. 2188-2193, nov. 2006. doi:10.1002/elan.200603646.
- YANG, Ming; LI, Hu L. Determination of trace nitrite by differential pulse voltammetry using magnetic microspheres. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 67, p. 1173-1180, 2002. doi:10.1135/cccc20021173.

- YANG, Shanli et al. Fabrication of nano-copper/carbon nanotubes/chitosan film by one-step electrodeposition and its sensitive determination of nitrite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 2, p. 762-768, mar. 2010. doi:10.1016/j.snb.2010.01.032.
- ZHANG, Ou et al. One-step synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-Au composites and their application for the detection of nitrite. **Synthetic Metals**, v. 164, p. 47-51, jan. 2013. doi:10.1016/j.synthmet.2012.11.013.
- ZHANG, Ya et al. Electroanalysis and detection of nitrite on a polyaniline-Cu nanocomposite-modified glassy carbon electrode. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 5, p. 2971-2976, jun. 2013. doi:10.1002/AP.38466.
- ZHENG, D. et al. A carbon nanotube/polyvanillin composite film as an electrocatalyst for the electrochemical oxidation of nitrite and its application as a nitrite sensor. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 21, p. 4910-4915, aug. 2009. doi:10.1016/j.electacta.2009.04.004.
- ZHU, W. et al. Electrochemical characterization of the underpotential deposition of tellurium on Au electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 11, p. 3660-3666, mar. 2007. doi:10.1016/j.electacta.2006.10.028.
- ZIEGLER, G. E. The crystal structure of sodium nitrite, NaNO_2 . **Physical Review**, v. 38, n. 5, p. 1040-1047, set. 1931. doi:10.1103/PhysRev.38.1040.

APÉNDICE A

APÊNDICE A – A partir da base de dados científicos Scopus, sistematizam-se os procedimentos reportados para medição eletroquímica do nitrato (limite inferior de concentração $\leq 50 \text{ nmol cm}^{-3}$), empregando polímeros condutores com ou sem metais de transição 3d e soluções químicas de neutras e levemente básicas a ácidas. A partir de cada referência, os eletrodos (material sensível), as soluções (incluindo o pH) e os potenciais de medição, as áreas geométricas do eletrodo de medição, as sensibilidades e as faixas de concentração em resposta linear de corrente eletroquímica foram descritos.

<i>Eletrodos / soluções de medição eletroquímica</i>	<i>pH</i>	<i>Potenciais de medição</i>	<i>Área geométrica do eletrodo de medição</i>	<i>Sensibilidade normalizada pela área efetiva</i>	<i>Faixa linear de medição eletroquímica</i>	<i>Referências</i>
<i>(mmol cm⁻³)</i>			<i>cm²</i>	<i>(A cm mol⁻¹)</i>	<i>(mmol cm⁻³)</i>	
CF ^a e Na ₂ SO ₄ (0,05)	6,8	+0,90 V _{SCE}	3,85 10 ⁻⁷	6,93 10 ⁴	0,03 – 1	SILVA, Sonia et al., 1996
Pt/Poly(1-3-DAB) ^b e AB ^c (0,10)	4,0	+0,90 V _{Ag/AgCl}	1,96 10 ⁻⁵	5,82 10 ⁸	10 – 100	BIAGIOTTI et al., 2007
GC ^h /PBCB ^d e PBS ^e (0,10)	3,0	+1,10 V _{SCE}	0,07	1,73 10 ²	0,9 – 14,9	YANG, Chunhai; LU; HU, 2006
GC/FeTAMPyP ^f e CuTSPc ^g (1 10 ⁻⁴)	7,0	+0,71 V _{SCE}	0,20	1,0 10 ⁵	0,5 – 7,5	SANTOS, Wilney et al., 2009
Cu eletrodepositado o e Na ₂ SO ₄ (0,10), pH ajustado com HCl (0,10)	3,0	-0,30 V _{SCE}	0,07	3,43 10 ²	12 – 200	DAVIS; COMPTON, 2000
CuNPs/thiol/Au ⁱ e PBS (ND) ^e	2,0	-0,33 V _{Ag/AgCl}	0,80	7,13 10 ²	0,1 – 3 10 ²	KO et al., 2009
Pt/Poli(1,8 DAN) ^j e AB ^e (0,10)	4,0	+0,90 V _{Ag/AgCl}	6,40 10 ⁻³	2,19 10 ¹	1 – 100	BADEA et al., 2001
GC h / poly(benzophenone-4) e NaCl (0,10)	1,5	+0,50 V _{Ag/AgCl}	0,07	1,43 10 ³	3 – 120	CHEN, Shen-Ming et al., 2006
GE/PANI-SFA ^k e PBS ^e (0,10)	2,0	+0,39 V _{SCE}	1	ND	1 – 10 ⁵	DHAOUI et al., 2008
nano-Au/P3MT/GCE ^l e PBS ^e (0,20)	4,0	+0,81 V _{SCE}	0,13	4,62 10 ²	10 – 1000	HUANG et al., 2008

Continua...

Continuação...

Eletrodos / soluções de medição eletroquímica	pH	Potenciais de medição	Área geométrica do eletrodo de medição	Sensibilidade normalizada pela área efetiva	Faixa linear de medição eletroquímica	Referências
(mmol cm ⁻³)			cm ²	(A cm mol ⁻¹)	(mmol cm ⁻³)	
MWNT/ PVN/CFE ^m e PBS ^e (0,10)	4,0	+0,80 V _{sce}	4,78 10 ⁻⁷	1,90 10 ⁶	0,2 – 3 10 ³	ZHENG et al., 2009
GC/MWCNTs ⁿ e PBS ^e (0,10)	2,0	+0,30 V _{Ag/AgCl}	0,12	5,83 10 ¹	5 – 85	SALIMI; NOORBAKSHI; GHADERMARZI, 2007
PP1-PV/GCE ^e e H ₂ SO ₄ (0,50)	0 a 4,0	-0,12 V _{sce}	0,13	4,35 10 ³	0,5 – 10 ³	LI, Jing; LIN, Xiangqin, 2007
GCE/p-ATT ⁴ e PBS ^e (0,20)	7,2	+0,84 V _{Ag/AgCl}	0,07	4,57 10 ³	0,05 – 16	KALIMUTHU; JHON, 2009
Cu-NPs/PoPD/GCE ¹ e HCl (0,50)	1	-0,30 V _{Ag/AgCl}	0,20	1,0 10 ²	5 – 2,2 10 ⁴	ASHOK KUMAR; LO; CHEN, Shen-Ming et al., 2009
GC [Co-TRP] ₅ (TFMS) ₅ Na ₂ [Zn-TPPS] ^s e NaAc (0,10) + NaClO ₄ (0,20)	8	+0,75 V _{Ag/AgCl}	0,07	2,67 10 ²	100 – 900	ROCHA et al., 2002
Au-Py/AISI ¹ e BRB ^u (0,10)	7,3	+0,70 V _{sce}	1,64	4,38 10 ¹	79 – 740	MENEZES et al., 2012
PTH/CNT/GC ^v e H ₂ SO ₄ (0,50)	0	+0,31 V _{sce}	ND	5,81 10 ³	5 – 45	DENG, Chunyan et al., 2012
Cu-CPE ^w e PBS ^e (0,10)	2	ND	0,07	ND	ND	DENG, Yue-Yi; LIU; JIN, 2012
GC/ Poly-NITRP e NaClO ₄ (0,10)	5,9	-0,80 V _{Ag/AgCl}	0,07	9,92 10 ¹	14,9 – 124	DREYSE et al., 2011
Cu e Na ₂ SO ₄ (0,10)	2	-0,20 V _{Ag/AgCl}	0,07	7,65 10 ²	50 – 1,44 10 ³	GAMBOA et al., 2010
NPG e H ₂ SO ₄ (0,50)	ND	+0,30 V _{Ag/AgCl}	1,96 10 ⁻⁵	0,8 10 ³	2 – 0,1 10 ⁶	JIANG, Junhua; WANG, Xinying, 2012b
GC-FeT4MPyP/CotSPc ^x e PBS (0,10)	7,0	+0,85 V _{sce}	0,07	5,29 10 ³	0,2 – 8,6	SANTOS, Wilney et al., 2006
CPE / Cu-MPS ^v e AB (0,02)	5,0	-0,150 V _{Ag/AgCl}	0,39	1,77 10 ⁻¹	0,25 – 120	SHIDDIKY; WON; SHIM, 2006

Continua...

Continuação...

Eletrodos / soluções de medição eletroquímica	pH	Potenciais de medição	Área geométrica do eletrodo de medição	Sensibilidade normalizada pela área efetiva	Faixa linear de medição eletroquímica	Referências
			cm ²	(A cm mol ⁻¹)	(mmol cm ⁻³)	
GC / CuTSPc PLL ^z e PBS (0,10)	7,0	+0,84 V _{SCE}	0,13	6,38 10 ³	0,12 – 12,20	SOUSA et al., 2008
PVP-Os/TTiO ₂ /GCE ^{aa} e Na ₂ SO ₄ (0,20)	1,0	+0,15 V _{SCE}	0,07	-2,86 10 ²	5 – 950	LI, Yancai et al., 2004
GCE / PANI-Cu e H ₂ SO ₄ (0,10)	4,0	-0,20 V _{SCE}	0,07	3,12 10 ²	0,049 – 70,0	ZHANG, Ya et al., 2013
PEDOT-AuNPs e PBS (0,10)	5,0	+0,78 V _{SCE}	ND	ND	3 – 300	ZHANG, Ou et al. 2013

Conclusão.

- ^a. carbon fiber; ^b. platinum electrode / 1,3-diaminobenzene; ^c. acetate buffer; ^d. glassy carbon / poly(brilliant cresyl blue); ^e. phosphate buffer solution; ^f. glassy carbon / iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin; ^g. copper (II) tetrasulfophthalocyanine; ^h. glassy carbon; ⁱ. copper nanoparticles on Au electrodes pre-coated 1-decanethiol layers; ^j. platinum electrode / poly(1,8-diaminonaphthalene); ^k. gold electrode / PANI protonated with sulfamic acid; ^l. gold nanoparticles on poly(3-methylthiophene) (P3MT)-modified glassy carbon electrode (GCE); ^m. multi-walled carbon nanotubes / polyvanillin / carbon fiber microelectrodes; ⁿ. glassy carbon / multi-wall carbon nanotubes; ^o. copper electrodepositado a um potencial de -1 V_{SCE} em 0,05 M de CuSO₄ + 0,1 M de Na₂SO₄ ajustado pH 3 com 0,1 M de HCl; ^p. polypyrrole-platinum nanocomposite / glassy carbon electrode; ^q. glassy carbon electrode / 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol; ^r. Cu-NPs-polymer film-coated GCE; ^s. tetrauthenated cobalt porphyrin/(meso-tetra(4-sulphonatophenyl)porphyrinate zinc(II)); ^t. gold-polypyrrol/aluminum silicate; ^u. Britton-Robinson buffer; ^v. carbon nanotube (CNT)-modified glassy carbon (GC) to fabricate the polythionine (PTH)/CNT/GC electrode; ^w. carbon paste electrode modified with copper(II) complex based on OBimB (OBimB = 1,2-bis(2-benzimidazolyl)benzene); ^x. iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin / cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine; ^y. complex-modified carbon paste electrode / copper-(3-mercaptopropyl) trimethoxysilane; ^z. glassy carbon electrode modified with copper tetrasulfonated phthalocyanine immobilized by polycationic poly-L-lysine film nanoporous gold; ^{aa}. poly(4-vinylpyridine) complexed with [Os(bpy)₂Cl]^{+/2+} (PVP-Os) titania sol-gel matrix.

APÉNDICE B

APÊNDICE B – Descrições gerais do trabalho de doutorado.

A seguir, são descritos os equipamentos, sensores e eletrodos, as soluções químicas e a lista de produtos químicos e ferramentas.

1 Equipamentos

Os experimentos voltamétricos e amperométricos foram realizados com o analisador eletroquímico Autolab PGSTAT302N controlado pelo computador portátil Dell Inspiron e operado por meio do sistema Nova 1.9 da Metrohm Autolab B.V. O analisador eletroquímico *PalmSens* da Ivium foi utilizado para depositar cloretos sobre prata para obtenção dos eletrodos de referência e membranas poliméricas.

A configuração experimental - para caracterizar e aferir os potenciais dos eletrodos de referência em função do tempo e com relação a um eletrodo de referência comercial da Digimed ou, do inglês, da *Bioanalytical Systems, Inc.* (BAS[®]) - foi desenvolvida usando o equipamento USB-6259 da *National Instruments* (NI) e o componente *nonreferenced single-ended* (NRSE) como terminal de entrada, programado em *LabView* 8.0 e controlado por computador de mesa *desktop*.

Os equipamentos de microfabricação utilizados foram: forno de oxidação, *spinner*, *hotplates* da IKA[®] e da Velp Scientifica, alinhadora para fotografação, capela de fluxo laminar, evaporadora *e-beam*, *sputtering* e deposição por plasma *Direct-Current* (DC).

Na caracterização física foi usado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Perfilômetro, Elipsômetro e Microscópio Ótico e Confocal. Na caracterização elétrica, foram empregados o medidor de quatro pontas e o multímetro MS8220R da MASTECH[®].

A célula eletroquímica (*Cell Stand*) da BAS[®] (com agitação magnética e gaiola de Faraday), a balança analítica de precisão AUV220D da Schimadzu e o ferro soldador WESD51 da Weller[®] também foram usados ao longo desta tese de doutorado.

O pHmetro de bancada modelo PHBANC II versão 1.8 da CAAL e pH-100 da PHTek foram empregados para medir a temperatura e o valor de pH das soluções químicas. O equipamento de produção de água desionizada (DI) MilliQ da Millipore permitiu controlar a qualidade da água quanto à remoção de metais e partículas para ter resistividade de 18 M Ω cm.

2 Eletrodos e sensores integrados

A partir dos resultados com os eletrodos fabricados mediante os eletrodos comerciais, fabricamos o sensor integrado sobre um substrato planar de silício. O polímero termorrígido SU-8 foi fotografado para definir uma estrutura de 64 microeletrodos de ouro integrados conjuntamente a dois eletrodos de referência.

Os eletrodos usados neste trabalho podem ser divididos em dois grupos:

- i. os eletrodos comerciais, que foram empregados nos experimentos de caracterização e na eletrodeposição de membranas poliméricas; e
- ii. os eletrodos fabricados, que serviram de eletrodos de prova.

2.1 Eletrodos comerciais

Microeletrodo de ouro MF-2006 (10 μ m de diâmetro), eletrodo auxiliar de platina (Pt) MF-2013 (1,6 mm de diâmetro) e eletrodo de referência (RE-5B) de junção redox prata/cloro em solução 3 mmol cm⁻³ de cloreto de sódio (Ag/AgCl 3M NaCl) foram adquiridos da empresa BASI[®]. Também foram utilizados os eletrodos de referência prata/cloro de prata (Ag/AgCl) de dupla junção da *Thermo Scientific* (Orion 900200) e da Digimed.

2.2 Eletrodos e sensores fabricados

Neste trabalho de doutorado, foram fabricados macroeletrodos cilíndricos de referência Ag/AgCl 3M NaCl ou cloreto de potássio (KCl), eletrodos de pseudo-referência (EPER) de junção redox Ag/AgCl, macroeletrodos planares de referência

em estado sólido (macroEPRES)⁴⁶ e EPRES miniaturizados. Prata/cloro de prata/polipirrol-cloretos/ tretaetilortossilicato (Ag/AgCl/PPi-Cl/TEOS) ou tretaetilortossilicato/metil-nonafiuoro(ISO)butil-éter (TEOS-HFE) ou poliuretano (PU) e ouro/cloro de ouro/polipirrol-cloretos/tretaetilortossilicato (Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/TEOS) ou TEOS-HFE ou PU. Também foram fabricados macroeletrodos auxiliares de platina (não mostrados).

2.2.1 Eletrodos de referência e auxiliares

Os eletrodos de referência e auxiliares fabricados foram:

- i. eletrodo de referência cilíndrico Ag/AgCl 3M NaCl ou KCl;
- ii. EPER Ag/AgCl ((2,77 ± 0,01) mm²);
- iii. macroEPRES Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU ((4,51 ± 0,01) mm²);
- iv. EPRES Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU miniaturizados ((0,135 ± 0,001) mm²); e
- v. auxiliar de platina ((1,75 ± 0,25) mm², (8,04 ± 0,25) mm² ou (1 ± 0,025) cm²).

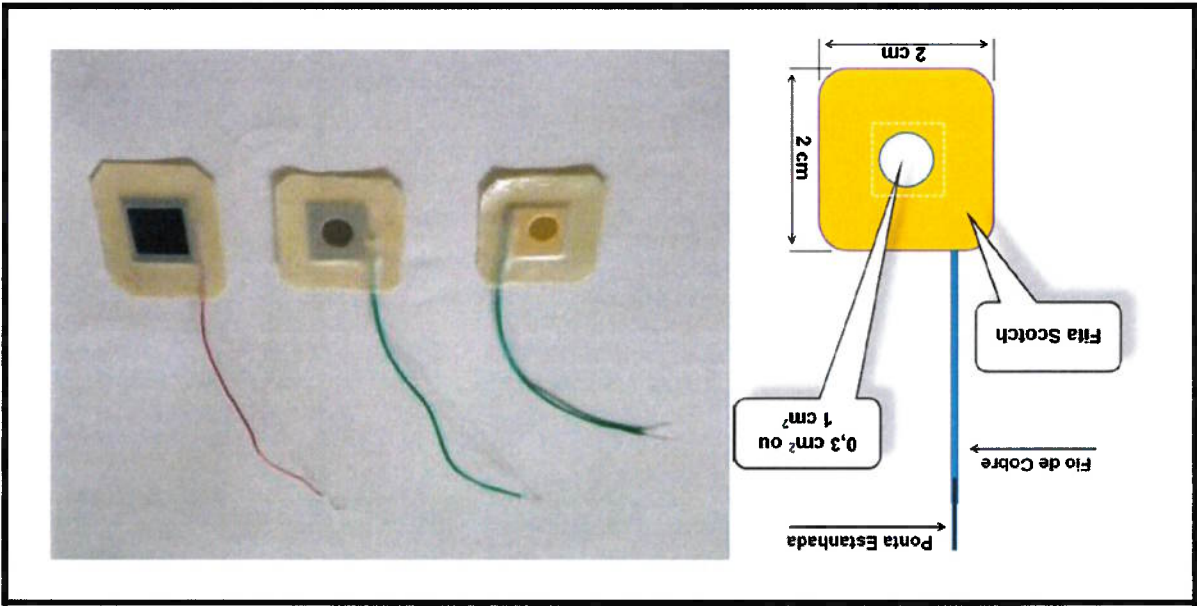
A seguir serão detalhados os macroEPRES Au/Au_xCl_y/PPi-Cl/PU e os EPER Ag/AgCl. Os demais eletrodos serão somente descritos ao longo dos procedimentos experimentais.

2.2.2 Macroeletrodos empregados na caracterização de membranas

Partindo de uma lâmina de silício oxidada, foi depositado ouro (Au) ou níquel (Ni) ou óxido de silício (SiO₂). A área ativa dos macroeletrodos quadrados com área de (1 ± 0,25) cm² ou circulares com diâmetro de (0,6 ± 0,05) cm (Figura 1). A área também dos eletrodos foi delimitada pela colagem de uma fita Scotch^{MR} da 3M, que também serviu de suporte para segurar o fio de cobre (Cu) soldado com pasta polimérica de cloro de prata (AgCl) para promover o contato elétrico. Na outra extremidade, o fio de cobre foi estanhado para evitar efeitos de mau contato elétrico.

⁴⁶ Dois tipos de macroeletrodos de referência completos em estado sólido foram desenvolvidos: o eletrodo prata / cloro de prata (Ag/AgCl) ou ouro / cloro de ouro (Au/Au_xCl_y). Sobre ambos, foi eletropolimerizado um filme de pirrol com cloretos (PPi-Cl) assumindo a função de eletrodo em estado sólido, por fim, o TEOS e o poliuretano foram depositados para atuarem como membrana de proteção/contenção e contato iônico.

Figura 69 – Macroelétrodos de ouro ou níquel, com geometria circular de área igual a $(0,3 \pm 0,05) \text{ cm}^2$ ou quadrada de área igual a $(1 \pm 0,25) \text{ cm}^2$, foram usados na deposição de polímeros condutores, cuja finalidade foi realizar testes de caracterização e de deposição dos filmes poliméricos.



Fonte: Almeida (2014).

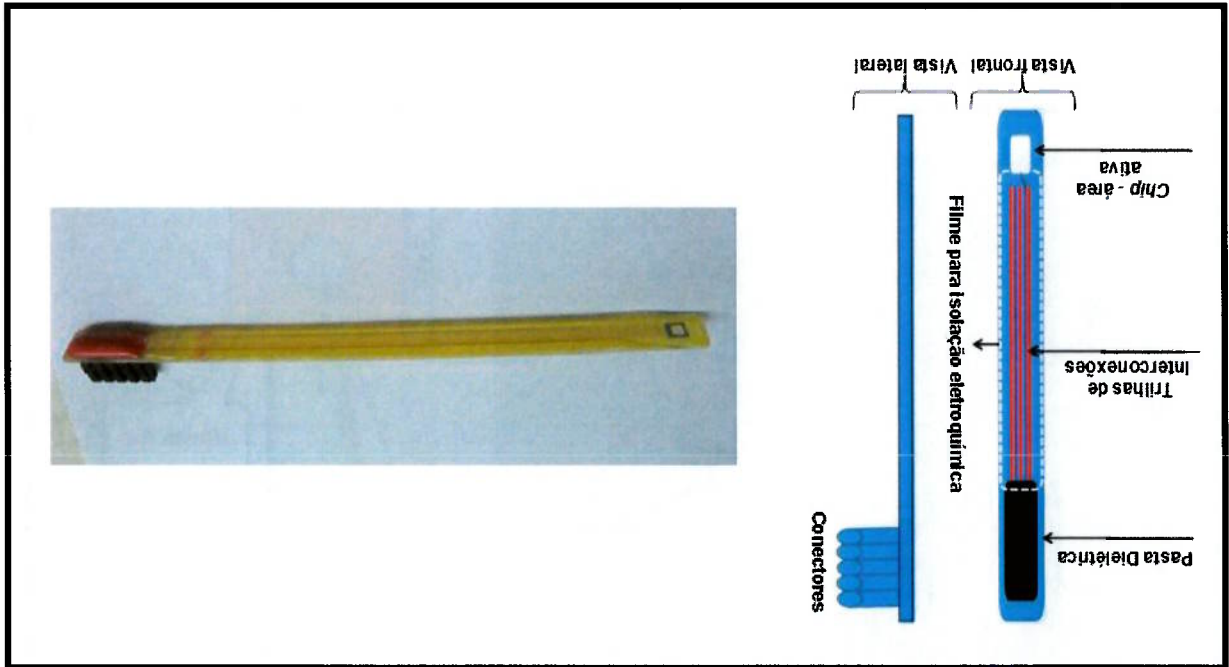
2.2.3 Macroelétrodos de ouro com suporte PCI⁴⁷

Ao longo dos experimentos, 60 macroelétrodos de ouro ($4,51 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ou $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$) foram utilizados, os quais foram fabricados pelo *Instituto de Microelectrónica de Barcelona - Centro Nacional de Microelectrónica (IMB-CNM)*. Os elétrodos foram confeccionados empregando-se técnicas padrão de fotografação sobre lâminas de silício previamente limpas e com uma camada de $1 \mu\text{m}$ de SiO_2 depositado. Em seguida, 20 nm de titânio (Ti) e 100 nm de ouro foram depositados - por da técnica de evaporação por feixe de elétrons (*e-beam*) - sobre o óxido de silício. A região ativa ($4,51 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ou $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$) e os contatos dos elétrodos foram definidos mediante a técnica *lift-off*. Posteriormente, os elétrodos de ouro definidos sobre silício foram colados sobre um suporte desenvolvido a partir de uma placa de circuito impresso (PCI), como pode ser visto na Figura 2.

Também, processamos 40 macroelétrodos de ouro sobre PCI no Laboratório de Sistema Integráveis da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LSI-EPUSP).

⁴⁷ Placa de circuito impresso (PCI), do inglês: *print circuit board* (PCB).

Figura 70 – Macroelétrodos de ouro empregados na verificação da faixa de potencial adequada para a deposição de polímeros condutores pelo processo de eletropolimerização, cuja finalidade foi realizar testes de medição com nitrato e avaliar os efeitos de algumas espécies interferentes no sinal de medição do nitrato. Área ativa de $(4,51 \pm 0,01) \text{ mm}^2$, de $\approx 9 \text{ mm}^2$ e de $(2,77 \pm 0,01) \text{ mm}^2$.



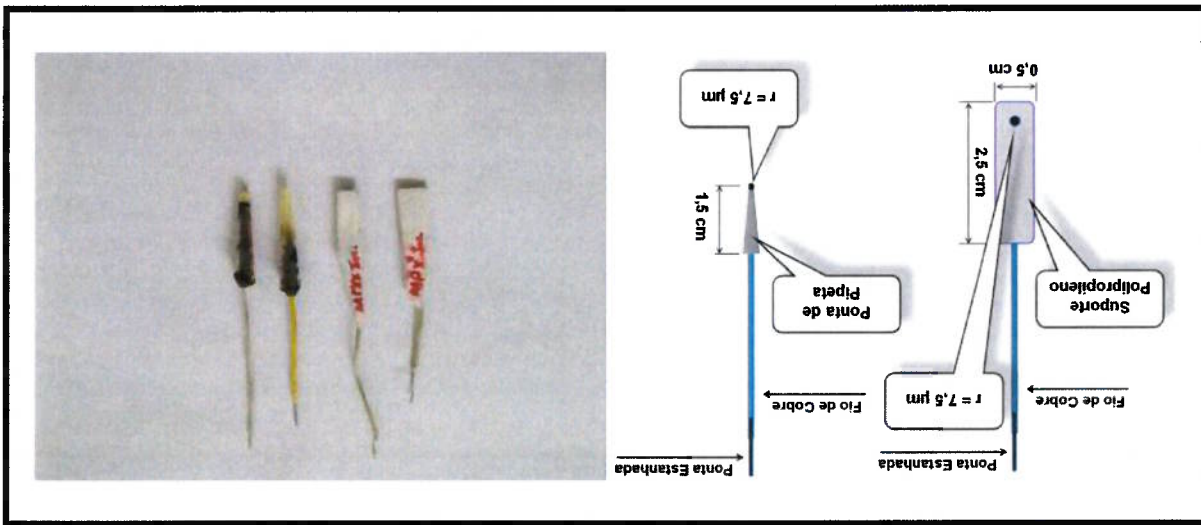
Fonte: Almeida (2014).

Primeiramente, uma camada de óxido de silício de 180 nm de espessura foi crescida por oxidação térmica sobre uma lâmina de silício previamente limpa em procedimento padrão *Radio Corporation of America* (RCA). Na sequência, uma camada de 20 nm de titânio e, em seguida, outra de ouro de 100 nm de espessura foram depositadas por técnica *e-beam* ou *sputtering*. A área ativa ($\approx 9 \text{ mm}^2$) foi delimitada, nos *chips* de silício, por fotografação do fotoresistente termorrígido SU-8 da NanoTM (Figura 2), e com cola epóxi da 3M foram fixados à PCI.

2.2.4 Microelétrodos de ouro fixados em suporte na forma de cone e planar

Os microelétrodos de ouro seja em suporte no formato de cone ou planar (Figura 3) foram empregados nos experimentais iniciais, verificando a funcionalidade dos microelétrodos quanto ao sistema eletroquímico de medição (SME), aos procedimentos para deposição e ativação das membranas poliméricas e aos processos de caracterização eletroquímica.

Figura 71 – Esquema e foto dos microeletrodos de ouro ($r = 7,5 \mu\text{m}$) desenvolvidos para testes iniciais de deposição de polímeros condutores, de medição do nitrato e de avaliação das espécies interferentes no sinal do nitrato.



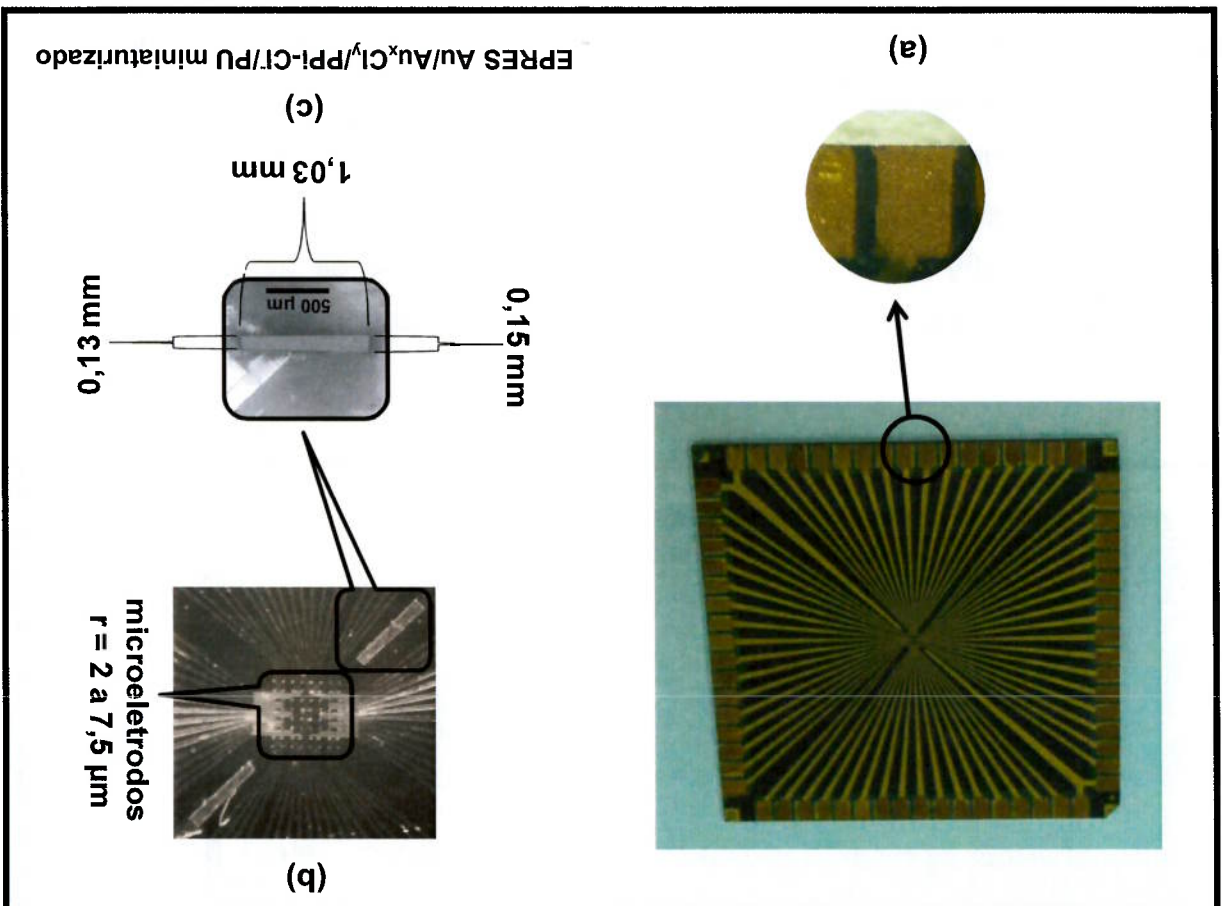
Fonte: Almeida (2014).

Estes microeletrodos foram fabricados a partir de microfios de ouro ($15 \mu\text{m}$ de diâmetro) e de um fio de cobre que foi soldado com pasta AgCl em uma das extremidades do microfio de ouro para realizar o contato elétrico (a outra extremidade do fio de cobre foi estanhada para garantir eficiência do contato elétrico). Na sequência, o microfio foi inserido no suporte cone ou no furo de 1 mm^2 em placa de polipropileno ($1 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$) e, depois, fixo com cola superbonder de precisão e isolado eletricamente com fita isolante líquida. O polímero termorrígido epóxi SU-8 foi empregado para delimitar a área ativa dos microeletrodos, atuando também como dielétrico e como filme de proteção contra adsorção química.

2.3 Sensor eletroquímico com microeletrodos de Ouro e EPRES integrados sobre um substrato de silício

A partir da fotografação do fotorresistivo positivo SU-8, foram definidos os microeletrodos de medição com área geométrica média de $(12,56 \pm 0,25) \mu\text{m}^2$ e os eletrodos de referência com $(0,135 \pm 0,001) \text{ mm}^2$, e também foram expostos os contatos de conexão elétrica que posteriormente foram pintados com pasta polimérica de ouro e seca em temperatura ambiente para minimizar mau contato elétrico (ver a Figura 4a no detalhe).

Figura 72 – Sensor fotografado em substrato planar de silício e deposição de pasta polimérica de ouro para propiciar efetivo contato elétrico (a) e matriz de microeletrodos de ouro a serem modificados com polímeros condutores e respectivos eletrodos de referências integrados (b) e imagem por MEV com os detalhes de dimensões do eletrodo de referência miniaturizado (c).



Fonte: Almeida (2014).

O polímero SU-8 foi empregado como isolante dielétrico entre os eletrodos, cuja resistência elétrica entre microeletrodos foi superior a 36 M Ω e como filme resistente a absorção química (verificando com o resistímetro de folha, não se observou alteração significativa de resistência após a imersão do sensor com SU-8 na SQR por uma hora).

3 Soluções químicas

Todas as soluções químicas foram preparadas com água DI, Milli-Q 18 M Ω cm. A seguir descrevemos as soluções empregadas na preparação e limpeza química de sensores e eletrodos, no condicionamento eletroquímico, na caracterização de eletrodos e no procedimento de medição.

3.1 Na limpeza e na preparação de sensores / eletrodos

As soluções químicas usadas com eficiência na limpeza química foram: álcool isopropílico, do inglês, *isopropyl alcohol* (IPA) e 3 mmol cm⁻³ de H₂SO₄, ambas especificadas com grau eletrônico.

Todas as soluções químicas para deposição - sobre eletrodos de medição - dos monômeros 1,2-DAB, 1,3-diaminobenzeno (1,3-DAB), pirrol (PI), anilina (ANI) e imidazol (Im) foram preparadas com concentração de 0,50 μmol cm⁻³ em solução tampão fosfato de potássio monobásico (STF) a 0,10 mmol cm⁻³ com pH 7,2 ± 0,05 a (24 ± 2) °C (ajustado com hidróxido de sódio). Os monômeros foram eletropolimerizados nas superfícies dos eletrodos de ouro imediatamente após a preparação das soluções, sem agitação e desaeração.

Na fabricação dos eletrodos de referências integrados, a solução química 0,15 mmol cm⁻³ de cloreto de sódio (NaCl) foi utilizada para cloretar o ouro. Depois, 0,5 mmol cm⁻³ de pirrol em 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl foi usado para depositar um filme polimérico de pirrol cloretado (PPI-Cl) que cumpre a função de eletrólito em estado sólido, fornecendo cloretos a reação redox de Ag/AgCl ou de Au/AuCl_y. Por fim, a solução 5 μmol cm⁻³ de uretano (U) em STF 0,01 mmol cm⁻³ (pH 7,4 ± 0,05 a (24 ± 2) °C) foi usada para eletrodepositar poliuretano sobre PPI-Cl atuando como uma membrana de proteção/contenção e de contato iônico.

3.2 Na caracterização e no condicionamento eletroquímico de eletrodos

As soluções para testes de caracterização dos eletrodos estão listadas a seguir:

- i. medição: 1 μmol cm⁻³ de K₃[Fe(CN)₆] em 0,10 mmol cm⁻³ de KNO₃ usadas na quantificação de área efetiva exposta em solução química (OROZCO; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ-JORQUERA, 2010);
- ii. referência: 0,15 mmol cm⁻³ de NaCl a um pH de 7,2 (soro fisiológico) que foi empregada na estabilização e na verificação de reversibilidade;
- iii. auxiliar: em SQR a um pH 7,4 ± 0,02 a (24 ± 2) °C com 400 mmol cm⁻³ de CuSO₄ e 30 mmol cm⁻³ de nitrato, observamos a funcionalidade do SME com três eletrodos.

O condicionamento eletroquímico de superfícies de macro e microeletrodos de ouro para estabilização de área efetiva foi realizado em solução química de 0,05 mmol cm^{-3} de ácido nítrico (HNO_3) com 0,20 mmol cm^{-3} de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este procedimento foi usado tanto para eletrodos de medição como para os de referência e auxiliar.

3.3 No procedimento de medição

A solução química de referência (SQR) empregada como solução de linha base nas medições de nítrito foi preparada com 0,10 mmol cm^{-3} de fosfato de potássio monobásico, 0,15 mmol cm^{-3} de NaCl, 7 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) dissódico dihidratado e pH 7,4 \pm 0,02 (24 \pm 1 °C) ajustado com 0,10 mmol cm^{-3} de NaOH e com 0,30 $\mu\text{mol cm}^{-3}$ de HCl. Antes dos procedimentos de medição, (20, 200 ou 400) mmol cm^{-3} de CuSO_4 foi adicionado a SQR; para investigar o comportamento eletroquímico dos metais em solução⁴⁸ durante a medição do nítrito.

As soluções das espécies interferentes - estudadas na medição do nítrito - foram preparadas a partir de 50 $\mu\text{mol cm}^{-3}$: paracetamol, ácido ascórbico e ácido úrico (diluído em 0,1 mmol cm^{-3} de hidróxido de sódio (NaOH)), todos em 0,1 mmol cm^{-3} de STF (pH = 7,4).

O nítrito, principal analito de interesse, foi utilizado em cinco diferentes concentrações: (5, 10, 20, 25 e 30) mmol cm^{-3} em SQR.

4 Lista de produtos

A seguir, listamos os principais produtos empregados ao longo deste trabalho de doutorado, a saber:

- ácido nítrico (HNO_3), 70% (J. T. Baker[®]),
- ácido clorídrico (HCl), 38% (J. T. Baker[®]),

⁴⁸ O comportamento eletroquímico de metais complexados ou não em SQR simula os efeitos dos metais presentes em fluidos sanguíneos, que a maior parte está complexado por alguma molécula orgânica (WAY; LINDER; WILLIAMS, 1977).

- peróxido de hidrogênio (H₂O₂) estabilizado a 30% (J. T. Baker[®]),
- ácido sulfúrico (H₂SO₄), 97,99% (J. T. Baker[®]),
- álcool isopropílico (do inglês, *isopropyl alcohol* - IPA) grau eletrônico (J. T. Baker[®]),
- T. Baker[®]),
- 1,2-cis/trans-diaminobenzeno (Sigma-Aldrich[®]),
- 1,3-diaminobenzeno (Sigma-Aldrich[®]),
- pirrol (Sigma-Aldrich[®]),
- anilina (Sigma-Aldrich[®]),
- imidazol (Sigma-Aldrich[®]),
- paracetamol (Sigma-Aldrich[®]),
- ácido úrico (Sigma-Aldrich[®]),
- ácido ascórbico (Sigma-Aldrich[®]),
- hidróxido de sódio (Labsynth Synth[®]),
- cloreto de sódio (Labsynth Synth[®]),
- uretano (Sigma-Aldrich[®]),
- ácido etilenodiamino-tetra-acético (ácido EDTA) dissódico diidratado (CAAL[®]),
- fosfato de potássio monobásico (Labsynth Synth[®]),
- nitrato de potássio (Merck Millipore),
- hexacianoferrato(III) de potássio ou ferricianeto de potássio (Merck Millipore),
- Plasti Film[®] - emborrachamento a frio (Quimatic[®]),
- fita isolante líquida (Quimatic[®]),
- pasta polimérica de ouro C2041206P2 (Gwent Electronic Materials Ltd.),
- pasta polimérica de AgCl 5876 (DuPont[®]),
- pasta carbono C2000511D1 (Gwent Electronic Materials Ltd.),
- microfio de ouro 15 µm de diâmetro,
- microfio de platina 200 µm de diâmetro,
- caixa de lâmina de silício Tipo P,
- sulfato de cobre pentahidratado (Labsynth Synth[®]),
- cloreto de potássio (Labsynth Synth[®]),
- nitrato de sódio (Labsynth Synth[®]),
- trietoxiosilicato – TEOS (Merck Millipore),
- metil-nonafluoro(iso)butil-éter – HFE 7100[™] (3M),

- 2 vidros de relógio.
- 2 baquetas de náilon,
- 3 baquetas de vidro,
- 3 barras magnéticas de 1 cm,
- 2 provetas graduadas,
- 3 béqueres de 100 ml,
- 5 béqueres de 80 ml,
- 3 béqueres de 50 ml,
- 2 béqueres de 25 ml,
- 4 balões volumétricos de 100 ml,
- 2 balões volumétricos de 25 ml,
- 6 balões volumétricos de 10 ml,
- 8 balões volumétricos de 5 ml,
- pipetas de 20, 200 e 1000 µl (Eppendorf Research),
- aterrada adequadamente (função de gaiola de Faraday),
- Caixa de alumínio (30 cm x 30 cm x 30 cm) revestida com malha de ferro e


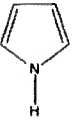
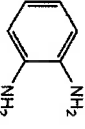
5 Lista de ferramentas e vidrarias

- NANO™ SU-8 2000 (MICROCHEM).
- pasta Ag/AgCl ED430-128 (Dupont),
- fita Scotch^{MR} dupla face (3M),
- fita Scotch^{MR} (3M),
- adesivo epóxi de alta resistência Scotch^{MR} Mix (3M),
- adesivo de contato Brasscoplast[®] (Brascola Ltda),
- super bonde precisão (Loctite[®]),
- graxa silicone (Implastec),
- polivinilpirrolidona 1290D (Plasdone[®]),
- SILVREX™ S (ENTHONE),
- glicerol (Sigma-Aldrich[®]),
- poliuretano Diol (Sigma-Aldrich[®]),
- acrilamida (Sigma-Aldrich[®]),

APÉNDICE C

APÊNDICE C – Lista dos monômeros a serem eletropolimerizados para obtenção de polímeros condutores, estudados a partir da literatura, objetivando a medição do nitrato. As informações químicas e físicas (estrutura química, massa molar, pH em solução aquosa, densidade, cor e odor, solubilidade, temperaturas de fusão e de ebulição do monômero e a toxicidade por via oral em ratos) estão sistematizadas a partir da base de produtos químicos GESTIS (sem data).
 ND: não definido.

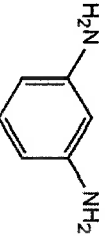
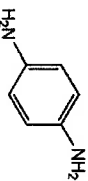
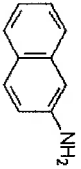
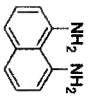
Monômeros:

estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹) / estado físico	pH em solução aquosa	Densidade a (20 °C) g cm ⁻³	Cor / odor	Solubilidade em água (20 °C) mg cm ⁻³	Fusão / Ebulição °C	Toxicidade mg kg ⁻¹
anilina (ANI)  93,13 / líquido	8,8	1,02	Marron claro amrina	36	-6 184	250
pirrol (PI)  67,09 / líquido	6	0,97	Verde escuro amrina	60	-24 131	3
1,2-dianilino benzeno (1,2-DAB)  108,14 / cristais	7 – 8	1,03	Sem cor a vermelho fraco Característico de amino	54	103 257	510

Continua...

Continuação...

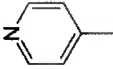
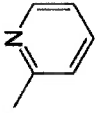
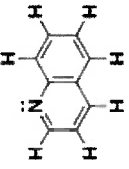
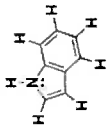
Monômeros:

estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹) / estado físico	pH em solução aquosa	Densidade a (20 °C) g cm ⁻³	Cor / odor	Solubilidade em água (20 °C) mg cm ⁻³	Fusão / Ebulição °C	Toxicidade mg kg ⁻¹
 1,3-diaminobenzeno (1,3-DAB) 108,14 / cristais	8,4	1,14	Sem cor a amarelado	350	63-64 283-284	280
 1,4-diaminobenzeno (1,4-DAB) 108,14 / cristais	9	1,13	Sem cor a vermelho pálido	47	139,7 267	80
2-aminonaftaleno (2-ANA)  143,19 / laminado	6	1,51	Sem cor a avermelhado	Pouco solúvel em água	111 – 113 306	727
1,8-diaminonaftaleno (1,8-DAN)  158,20 / cristais	ND	ND	Castanho-claro a Preto-marron sem cheiro	solúvel	60 – 65 205	4

Continua...

Continuação...

Monômeros:

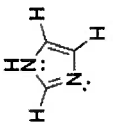
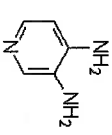
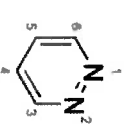
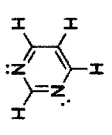
estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹) / estado físico	pH em solução aquosa	Densidade a (20 °C) g cm ⁻³	Cor / odor	Solubilidade em água (20 °C) mg cm ⁻³	Fusão / Ebulição °C	Toxicidade mg kg ⁻¹
4-vinilpiridina (4-VPI) 	6	ND	Amarelo-marrom desagradável	29	ND 58	100
2-vinilpiridina (2-VPI) 	8	1,00	Sem cor a vermelho-marrom forte	27	-50 159-160	100
quinolina (Qui) 	7,3	1,09	Marron claro desagradável	6	-15 238	331
indol (Ind) 	6	1,22	Sem cor a castanho-claro característico forte	3,56	52 254	1000

117,15 / lascas

Continua...

Continuação...

Monômeros:

estrutura química e	pH em solução aquosa	Densidade a (20 °C)	Cor / odor	Solubilidade em água (20 °C)	Fusão / Ebulição °C	Toxicidade mg kg ⁻¹
massa molar (g mol ⁻¹) / estado físico	temperatura e quantidade	g cm ³		mg cm ⁻³		
imidazol (Im)						
	10,5		Sem cor a amarelado		89-90	
	20 °C a 67 g l ⁻¹	1,03	amínia	633	256	220
3,4-diaminopiridina (3,4-DAP)						
68,08 / cristais						
	ND	ND	Castanho-claro a bege	30	217-220	ND
			desagradável		480	
109,13 / cristais						
piridazina (Ptd)						
	2,10		Líquido sem cor	miscível	-8	
80,09 / ND	ND	ND	ND		208	ND
pirimidina (Pim)						
	ND		ND	miscível	19	
80,09 / ND	ND	1,02	ND		123-124	ND

Conclusão.

APÉNDICE D

APÊNDICE D – A partir da literatura, um ensaio foi desenvolvido analisando algumas espécies químicas encontradas no sangue, plasma ou soro de humanos; indicam-se os nomes, a estrutura química e a massa molar. (a) A faixa de concentração encontrada em Sa = sangue, So = soro sanguíneo e/ou Pa = plasma sanguíneo. (b) O potencial de redução padrão (E^{red}) ou de meia-onda ($E_{1/2}$) em relação ao eletrodo de referência primário de hidrogênio e de acordo com as referências: a. (GUYTON; HALL, 1997); b. (HAYNES, 2012-2013); c. Pt platinizada em água DI (VANÝEK, 2012-2013); d. (MOTTA, 2006); e. 1,2-DAB, NaCl a 0,9% (ALMEIDA, 2009); f. (PATNAIK, 2004); g. (CHEAQS Pro, 2013); h. (FIORUCCI; BENEDETTI FILHO, 2005); i. (MATTOS; GORTON, 2001) (c) O potencial de equilíbrio redox foi calculado para cada situação de concentração e de potencial de redução ou de meia-onda descrito, usando a temperatura fisiológica de 37 °C (temperatura média do corpo humano sadio) e somado o potencial de eletrodo de medição polí(imidazol), na ordem de +0,650 V_H. Por fim, sugerem-se as prováveis interferências na medição do nitrito usando polímero condutor. ND: não definido e NA: não analisado.

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b)		(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição polí(imidazol) a 37 °C (V _H /Ag/AgCl 3M NaCl)	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrito
		Potencial de redução padrão (E^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda ($E_{1/2}$) a 25 °C (V _H)	Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição polí(imidazol) a 37 °C (V _H)		
Ion de hidrogênio (Sa) H ⁺	^a pH 7,38 – 7,44 (faixa normal) 1,01 ^b pH 6,90 – 8,00 (límites não letais)	^c 0,000	+0,158 – +0,161 +0,128 – +0,196	Resposta em Potencial Ponte de hidrogênio Dopagem do Polímero Concentração Química	
ion de potássio (So) K ⁺	^a 1,5 10 ³ – 9 10 ³ ^b 3,5 10 ³ – 5 10 ³ 39,10	^c -2,931	-3,238 – -3,286 -3,261 – -3,270	ND	
cloreto (So) Cl ⁻	^a 7,0 10 ⁴ – 1,3 10 ⁵ ^b 9,8 10 ⁴ – 1,06 10 ⁵ 35,45	^c +1,358	+0,991 – +1,007 +0,999 – +1,002	Dopagem do Polímero Concentração Química Ligante	

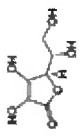
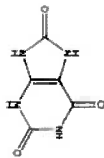
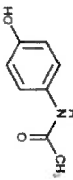
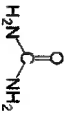
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)		(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})		Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
sulfato (Pa) (SO ₄) ²⁻		^f 1,20 10 ²	^c -1,817 ^c +0,146	-1,848 +0,115	Resposta em Potencial Dopagem do Polímero Concentração Química Ligante	
ion de sódio (So) Na ⁺		^a 1,1 10 ⁵ – 1,8 10 ⁵ ^b 1,2 10 ⁵ – 1,6 10 ⁵	^c -2,710	-3,132 – -3,145 -3,134 – -3,142		NID
ion cobre (II) (So) Cu ²⁺		^b 11 – 22	^c +0,153 ^c +0,345	+0,041 +0,017 – +0,007	Resposta em Potencial Dopagem do Polímero	
gás oxigênio (aquoso) O ₂		^h 1,29 10 ³ (1 atm e 25 °C)	^c +0,401	-0,374 – -0,394	Resposta em Potencial Dopagem do Polímero	
gás nitrogênio (aquoso) N ₂		^h 6,21 10 ² (1 atm e 25 °C)	^c +0,092	+0,160	Dopagem do Polímero	
hidroxila OH ⁻		17,01	ND	NA	Dopagem do Polímero Ligante	
fosfato (PO ₄) ³⁻		94,97	ND	NA	Dopagem do Polímero Ligante	

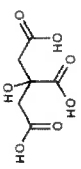
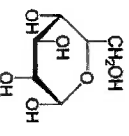
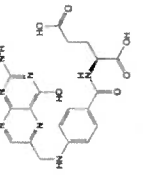

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nítrito
nitrato (Pa) (NO ₃) ⁻	ND - 200	^c 0,010	-0,908	Dopagem do Polímero Ligante
ácido L-ascórbico (L-ascorbato) (Pa) 	62,01	ND - 1,110 (1,2-DAB, NaCl a 0,9%) ^f -0,071 pH 3,4 ^f -0,301 pH 7,0	NA	Resposta em Potencial Ligante
ácido úrico (So, Pa) 	176,12	^b 77 - 476 / 520 ^e +0,274 (1,2-DAB, NaCl a 0,9%)	NA	Resposta em Potencial Ligante
paracetamol (Pa) 	168,11	ND - 1,150 ^e +0,404 (1,2-DAB, NaCl a 0,9%)	NA	Resposta em Potencial Ligante
ureia (So) 	151,17	^b 3,5 10 ³ - 7 10 ³	NA	Ligante
	60,06	ND	NA	Ligante

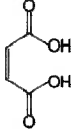
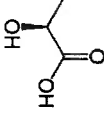
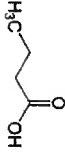

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b)		(c) Potencial de equilíbrio do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{a, c, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	Potencial calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})		
amônia (Pa) NH ₃		^b 11,16 – 35,23	ND	NA	Ligante
ácido cítrico (citrato) 		ND	ND	NA	Ligante
glicose (So) 		^a 0,02 – 1,5 10 ⁶ ^b 3,3 10 ³ – 5,5 10 ³	^f -1,764	NA	Ligante
ácido fólico (folato) 		ND	^f -0,971 pH 4,6	NA	Ligante
etanol 		ND	^d -0,220	NA	Resposta em Potencial
		441,40			
		180,16			
		192,13			
		17,03			
		46,07			

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
ácido maleico (malato)  116,01	ND	^d -0,250 ^f -0,941 pH 2 ^f -1,211 pH 4 ^f -0,351, -1,541 pH 6 ^f -0,751 pH 10	NA	Resposta em Potencial Ligante
ácido L-láctico (L-lactato)  90,08	ND	^d -0,230	NA	Resposta em Potencial Ligante
ácido butírico  88,11	ND	ND	NA	Ligante
acetona (So, Pa)  58,08	^b 51,6 – 344,3	^f -1,761	NA	Ligante
brometo (So, Pa) Br ⁻ 79,90	^b 25 – 137,5	ND	NA	Dopagem Polimérica Ligante

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
fluorite (So, Pa) F ⁻ 18,99	^b 1,74 – 12,42	ND	NA	Dopagem Polimérica Ligante
iodeto (So, Pa) I ⁻ 126,90	^b 0,5 – 0,6	ND	NA	Dopagem Polimérica Ligante
ion bicarbonato (HCO ₃) ⁻ 61,01	^a 8000 – 45 000	NA	NA	Ligante
sulfito (SO ₃) ²⁻ 103,04	NA	^c -1,120 ^e -0,571	NA	Dopagem Polimérica Ligante
ferro (II) (So) Fe ²⁺ 55,84	^b 9,0 – 30,4	^c -0,447 ^e -0,037 ^c +0,771	-0,773 – -0,789 -0,414 – -0,425 +0,659	Resposta em Potencial
calcio (II) (Sa) Ca ²⁺ 40,08	^a 500 – 2000 ^b 750 – 1125	^c -2,868	-3,247 – -3,266 -3,253 – -3,258	ND
manganês (II) (So) Mn ²⁺ 54,94	^b 5,5 10 ⁻³ – 18,2 10 ⁻³	^c +0,150	-1,412 – -1,428	^g Complexa com nitrato

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio biológico (nmol cm ⁻³)	(b)		Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	Potencial de equilíbrio do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})		
magnésio (II) (So) Mg ²⁺	24,30	^b 7,5 10 ² – 1,25 10 ³	^c -2,372	-2,757 – -2,764	NID
arsênico (So) As	74,92	^b 6,7 10 ⁻³ – 6,67 10 ²	^c -0,608	-0,466 – -0,486	NID
zinco (II) (So, Pa) Zn ²⁺	65,41	^b 7,6 – 18,3	^c -0,762	-1,085 – -1,097	NID
molibdênio (III) (So, Pa) Mo ³⁺	95,94	^b 3,1 10 ⁻³ – 13,5 10 ⁻³	^c -0,200	-0,506 – -0,520	NID
níquel (II) (So) Ni ²⁺	58,69	^b 1,7 10 ⁻³ – 2,22 10 ²	^c -0,257	-0,468 – -0,525	NID
chumbo (II) (So) Pb ²⁺	207,21	^b 2,41 10 ⁻² – 4,826 10 ⁻¹	^c -0,1262	-0,373 – -0,413	NID
silício Si	28,09	ND	ND	NA	NID
mercúrio (II) (So) Hg ²⁺	200,59	^b 2,5 10 ⁻³ – 1,59 10 ⁻²	^c +0,851 ^c +0,920	+0,635 – +0,601 +0,704 – +0,679	NID

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
fósforo (So) P	^b 0,97 – 1,45	^c -0,870	-1,634 – -1,637	ND
lítio (So, Pa) Li ⁺	^b ND – 1,14	^c -3,040	-3,155	ND
cobalto (III) (So) Co ²⁺	^b 8,5 10 ⁻⁷ – 5,9 10 ⁻³	^c -0,280	-0,390 – -0,508	ND
cádmio (So) Cd ²⁺	^b 8,9 10 ⁻⁴ – 8,9 10 ⁻³	^c -0,403	-0,605 – -0,636	ND
crômio (II) (So) Cr ²⁺	^b 1,9 10 ⁻³ – 7,7 10 ⁻³	^c -0,913	-1,126 – -1,144	ND
alumínio (So) Al	^b 3,7 10 ² – 3,7 10 ⁻¹	^c -2,328 a -1,662	-1,991 – -2,011	ND
antimônio (So, Pa) Sb	^b ND – 8,2 10 ³	^c -0,510	-0,370	ND
bário (So, Pa) Ba	^b ND – 5,8 10 ⁻¹	^c -2,912	-3,201	ND
	137,33			

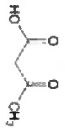
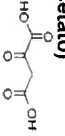
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b)		(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl} em NaCl)	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _N)			
berílio (So, Pa) Be		^b < 0,4	^c -1,847	-2,131	ND
césio (So, Pa) Cs		^b 3,8 10 ⁻³ – 1,5 10 ⁻²	^c -3,026	-2,990	ND
rubídio (So, Pa) Rb		^b 1,17 – 3,51	^c -2,980	-3,096 – -3,125	ND
estrôncio (So, Pa) Sr		^b ND – 0,65	^c -4,100 a -2,899	-3,190	ND
titânio (So, Pa) Ti		^b ND – 0,63	^c -1,630 a -0,900	-1,920	ND
telúrio (So, Pa) Te		^b ND – 0,24	^c +0,568	+0,190	ND
vanádio (So, Pa) V		^b 3,93 10 ⁻³ – 1,96 10 ⁻²	^c -1,175 a -0,255	-1,397 – -1,418	ND
prata (So, Pa) Ag		^b ND – 9,3 10 ⁻³	^c -0,691 a +1,980	+0,813	ND
		107,87			

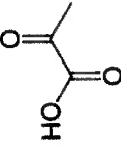
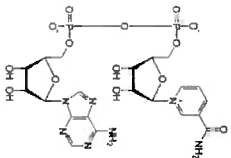
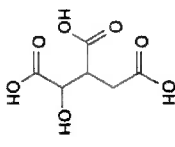
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
selênio (So, Pa) Se 78,96	^b 0,51 – 2,03	^c -0,924 a -0,399	-1,211 – -1,230	ND
estanho (So, Pa) Sn 118,71	^b ND – 8,4 10 ⁻³	^c -0,137 a +0,151	-0,370	ND
dióxido de carbono CO ₂ 44,01	^f 2,1 10 ⁴ – 3,0 10 ⁴	^e -0,199	+0,173	Ligante
óxido nítrico NO 30,01	ND	^c +0,100	NA	Resposta em Potencial Ligante
ácido (acetato) (Pa) acetacético  102,09	^b < 97,2	^d +0,070	NA	Resposta em Potencial Ligante
tiocianato SCN ⁻ 58,11	ND	ND	NA	Ligante
ácido (oxaloacetato) oxaloacético  132,07	ND	^d +0,250	NA	Resposta em Potencial


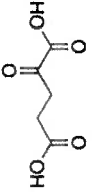
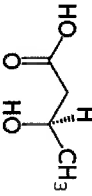
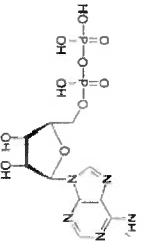
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b)		(c)	
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou E _{1/2} ^{d, e, f} de meia-onda (V _H) a 25 °C	Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato	
ácido pirúvico (piruvato) 	ND	^d +0,230	NA	Resposta em Potencial Ligante	
NAD ⁺ 	ND	^d +0,100	NA	ND	
ácido isocítrico (isocitrato) 	ND	^d -0,034	NA	Resposta em Potencial Ligante	
		192,09			

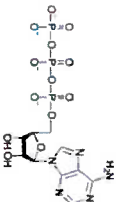
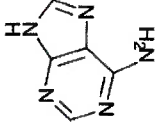
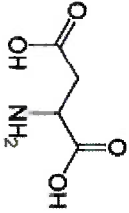
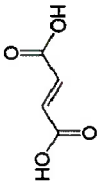
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b)		(c) Potencial de equilíbrio do eletrodo de medição poli(imidazo) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	Potencial calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazo) a 37 °C		
ácido succínico (succinato)  118,09	ND	^d -0,670	NA	Ligante	
ácido α-cetoglutarico (α-cetoglutarato)  146,11	ND	^d -0,040 a +0,670	NA	Resposta em Potencial Ligante	
ácido β-hidroxi-bútrico (β-hidroxi-burato)  118,12	ND	^d -0,070	NA	Resposta em Potencial Ligante	
ADP  427,20	ND	ND	NA	ND	




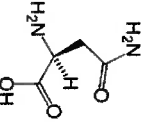
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b)		(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)			
ATP 	ND	ND	NA	ND	
adenina 507,11 	ND	ND	NA	ND	
ácido aspártico 135,13 	ND	ND	NA	Ligação Peptídica Carga negativa Ligante	
ácido fumárico (fumarato) 133,11 	ND	^f -1,071 pH 2,6 ^f -1,171 pH 4,0 ^f -1,271 pH 5,9	NA	Ligante	
116,07					

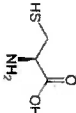
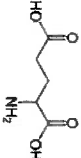
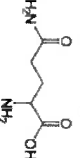
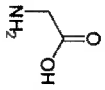
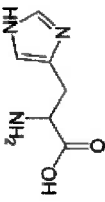
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c)	
			Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
<p>purina</p>  <p>120,11</p>	ND	ND	NA	Ligante
<p>pirimidina</p>  <p>80,09</p>	ND	^f -1,161, -1,500 pH 3,6 ^f -0,781 pH 9,2	NA	Ligante
<p>piridina</p>  <p>79,10</p>	ND	^f -1,991 pH 7,0	NA	Ligante
<p>asparagina (So, P)</p>  <p>132,1</p>	^b 40,9 – 49,2	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante

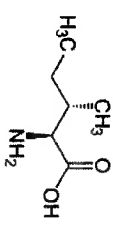
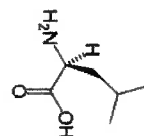
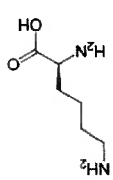
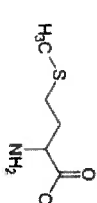
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b)		(c)	
		Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato	
cisteína 	ND	ND	NA		Ligação Peptídica Ligante
ácido glutâmico (So, Pa) 121,15 	^b 29,2 – 78,2	ND	NA		Ligação Peptídica Carga negativa Ligante
glutamina (So, Pa) 147,11 	^b 417,4 – 698,0	ND	NA		Ligação Peptídica Ligante
glicina (So, Pa) 146,13 	^b 178,5 – 230,4	ND	NA		Ligação Peptídica
histina (So, Pa) 75,06 	^b 50,9 – 95,4	ND	NA		Ligação Peptídica Ligante
	155,14				

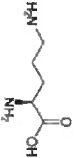
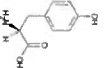
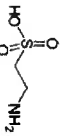
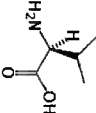
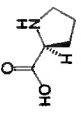
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou E _{1/2} ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
isoleucina (So, Pa) 	^b 52,6 – 97,6	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
leucina (So, Pa) 	^b 106,7 – 175,3	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
lisina (So, Pa) 	^b 171,0 – 205,2	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
metionina (So, Pa) 	^b 22,1 – 28,8	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
	149,2			

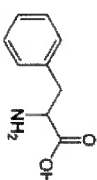
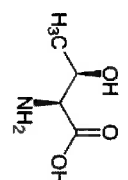
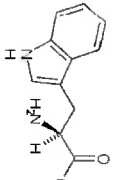
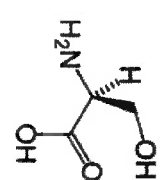
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (mmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
ornitina (So, Pa) 	^b 46,9 – 60,5	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
tirosina (So, Pa) 	^b 44,7 – 80,0	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
taurina (So,P) 	^b 32,8 – 65,5	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
valina (So, Pa) 	^b 204,9 – 315,8	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
prolina (So, Pa) 	^b 173,7 – 286,6	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
	115,12			

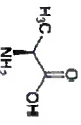


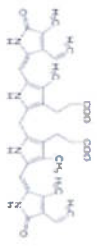
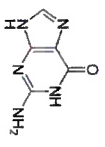
Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar (g mol ⁻¹)	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c) Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
fenilalanina (So, Pa) 	^b 35,1 – 84,7	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
treonina (So, Pa) 	^b 100,7 – 142,7	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
triptofano 	ND	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
serina (So, Pa) 	^b 96,1 – 118,9	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
105,08				

Continua...

Continuação...

Nome, estrutura química e massa molar	(a) Concentração em meio bioquímico (nmol cm ⁻³)	(b) Potencial de redução padrão (E ^{red}) ou ^{d, e, f} de meia-onda (E _{1/2}) a 25 °C (V _H)	(c)	
			Potencial de equilíbrio redox calculado a partir do eletrodo de medição poli(imidazol) a 37 °C (V _{Ag/AgCl 3M NaCl})	Provável interferência na medição eletroquímica do nitrato
alanina 	ND	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
L-arginina 	ND	ND	NA	Ligação Peptídica Ligante
acetilcolina 	ND	ND	NA	ND
bilirrubina 	ND	ND	NA	Ligante
guanina 	ND	ND	NA	Ligante
151,13				

Conclusão.

Fonte: Almeida (2014).

APÉNDICE E

APÊNDICE E – Arquivo de saída da simulação CHEAQS Pro (Release P2013.1) da solução química de referência (SQR). O pH com valor fixo de 7,4, a força iônica calculada de $2,786 \cdot 10^{-1} \text{ mmol cm}^{-3}$ e o critério de convergência: $0,01\% (1,0 \cdot 10^{-4})$.

Componentes		Concentração em mmol cm^{-3} e (tipo da entrada)	
H	$3,981 \cdot 10^5$ (atividade livre)		
Na	$2,500 \cdot 10^1$ (total concentração)		
K	$1,000 \cdot 10^1$ (total concentração)		
Cu(II)	$4,000 \cdot 10^4$ (total concentração)		
(OH)	$2,512 \cdot 10^4$ (total concentração)		
(PO ₄)	$1,000 \cdot 10^1$ (total concentração)		
(SO ₄)	$4,000 \cdot 10^4$ (total concentração)		
Cl	$1,500 \cdot 10^1$ (total concentração)		
(EDTA)	$7,000 \cdot 10^3$ (total concentração)		

LIGANTES

Espécies	Concentração	Dissolvido	Atividade	Constante de Equilíbrio
(OH) 100% dissolvido	$3,436 \cdot 10^{-1}$		$2,529 \cdot 10^{-10}$	13,731
(PO ₄) 100% dissolvido	$1,448 \cdot 10^{-11}$	0,00	$9,194 \cdot 10^{-13}$	11,577
H(PO ₄) ⁻²	$2,955 \cdot 10^{-4}$	0,30	$8,680 \cdot 10^{-5}$	18,243
H ₂ (PO ₄) ⁻	$7,405 \cdot 10^{-2}$	74,05	$5,451 \cdot 10^{-2}$	20,125
H ₃ (PO ₄) ^(aq)	$3,051 \cdot 10^{-4}$	0,31	$3,051 \cdot 10^{-4}$	20,125
H ₄ (PO ₄) ⁺	$1,650 \cdot 10^{-8}$	0,00	$1,215 \cdot 10^{-8}$	0,632
Na(PO ₄) ⁻²	$1,385 \cdot 10^{-11}$	0,00	$4,069 \cdot 10^{-12}$	12,115
NaH(PO ₄) ⁻	$2,278 \cdot 10^{-4}$	0,23	$1,677 \cdot 10^{-4}$	18,277
NaH ₂ (PO ₄) ^(aq)	$1,788 \cdot 10^{-2}$	17,88	$1,788 \cdot 10^{-2}$	-0,170
Na ₂ (PO ₄) ⁻	$4,880 \cdot 10^{-13}$	0,00	$3,593 \cdot 10^{-13}$	18,277
Na ₂ H(PO ₄) ^(aq)	$2,067 \cdot 10^{-5}$	0,02	$2,067 \cdot 10^{-5}$	11,724
K(PO ₄) ⁻²	$5,543 \cdot 10^{-12}$	0,00	$1,628 \cdot 10^{-12}$	0,632
KH(PO ₄) ⁻	$5,885 \cdot 10^{-5}$	0,06	$4,332 \cdot 10^{-5}$	11,925
KH ₂ (PO ₄) ^(aq)	$7,156 \cdot 10^{-3}$	7,16	$7,156 \cdot 10^{-3}$	18,277
K ₂ (PO ₄) ⁻	$3,655 \cdot 10^{-14}$	0,00	$2,691 \cdot 10^{-14}$	-0,500
K ₂ H(PO ₄) ⁻	$4,364 \cdot 10^{-6}$	0,00	$4,364 \cdot 10^{-6}$	11,844
Cu(II)H(PO ₄) ⁻	$6,181 \cdot 10^{-14}$	0,00	$6,181 \cdot 10^{-14}$	14,637
Cu(II)H ₂ (PO ₄) ⁺	$4,981 \cdot 10^{-15}$	0,00	$3,667 \cdot 10^{-15}$	17,810
Cu(II)H ₂ (PO ₄) ⁻²	$9,189 \cdot 10^{-15}$	0,00	$2,699 \cdot 10^{-15}$	28,916
Cu(II)H ₃ (PO ₄) ⁻²	$2,653 \cdot 10^{-15}$	0,00	$1,953 \cdot 10^{-15}$	32,643
Cu(II)H ₄ (PO ₄) ^{2(aq)}	$2,634 \cdot 10^{-6}$	0,00	$2,634 \cdot 10^{-6}$	35,907
(SO ₄) 100% dissolvido	$2,584 \cdot 10^{-4}$	64,60	$7,590 \cdot 10^{-5}$	

Continua...

Continuação...				
Espécies	Concentração	Dissolvido	Atividade	Constante de Equilíbrio
CÂTIONS				
Espécies	Concentração	Dissolvido	Atividade	Constante de Equilíbrio
H ⁺	5,408 10 ⁻⁵		3,981 10 ⁻⁵	13,731
Na ⁺	2,233 10 ⁻¹	89,34	1,644 10 ⁻¹	
Na(OH) ^(aq)	5,236 10 ⁻¹¹	0,00	5,236 10 ⁻¹¹	-0,166
Na(PO ₄) ²⁻	1,385 10 ⁻¹¹	0,00	4,069 10 ⁻¹²	0,632
NaH(PO ₄) ⁻	2,278 10 ⁻⁴	0,09	1,677 10 ⁻⁴	12,115
NaH ₂ (PO ₄) ^(aq)	1,788 10 ⁻²	7,15	1,788 10 ⁻²	18,277
Na ₂ (PO ₄) ⁻	4,880 10 ⁻¹³	0,00	3,593 10 ⁻¹³	-0,170
Na ₂ H(PO ₄) ^(aq)	2,067 10 ⁻⁵	0,02	2,067 10 ⁻⁵	11,724
H ₂ (SO ₄) ⁻	4,011 10 ⁻⁷	0,10	2,953 10 ⁻⁷	1,458
Na(SO ₄) ⁻	9,316 10 ⁻⁵	23,29	6,858 10 ⁻⁵	0,208
K(SO ₄) ⁻	4,802 10 ⁻⁵	12,01	3,535 10 ⁻⁵	0,318
Cu(II)(SO ₄) ^(aq)	9,300 10 ⁻¹⁶	0,00	9,300 10 ⁻¹⁶	1,296
Cu(II) ₂ (SO ₄) ^(s)	0,00	0,00	0,00	65,302
Cl ⁻	1,383 10 ⁻¹	92,17	1,018 10 ⁻¹	
NaCl ^(aq)	8,387 10 ⁻³	5,59	8,387 10 ⁻³	-0,566
KCl ^(aq)	3,356 10 ⁻³	2,24	3,356 10 ⁻³	-0,566
Cl ^(s)	0,00	0,00	0,00	-1,816
KCl ^(s)	0,00	0,00	0,00	-1,166
Cu(II)Cl ⁻	1,475 10 ⁻¹⁴	0,00	1,086 10 ⁻¹⁴	-0,232
(EDTA) 100% dissolvido				
(EDTA) ⁴⁻	9,093 10 ⁻¹⁰	0,00	6,768 10 ⁻¹²	
H(EDTA) ⁻³	3,764 10 ⁻⁴	5,38	2,390 10 ⁻⁵	9,884
H ₂ (EDTA) ⁻²	6,075 10 ⁻³	86,78	1,784 10 ⁻³	15,359
H ₃ (EDTA) ⁻	1,264 10 ⁻⁴	1,81	9,303 10 ⁻⁵	17,944
H ₄ (EDTA) ^(aq)	6,056 10 ⁻⁷	0,01	6,056 10 ⁻⁷	19,891
H ₅ (EDTA) ⁺	1,036 10 ⁻⁹	0,00	7,624 10 ⁻¹⁰	21,391
H ₆ (EDTA) ²⁺	8,031 10 ⁻¹⁴	0,00	2,359 10 ⁻¹⁴	21,548
Na(EDTA) ⁻³	9,075 10 ⁻⁹	0,00	5,764 10 ⁻¹⁰	1,650
NaH(EDTA) ⁻²	2,221 10 ⁻⁵	0,32	6,523 10 ⁻⁶	9,306
K(EDTA) ⁻³	3,163 10 ⁻¹⁰	0,00	2,009 10 ⁻¹¹	0,590
Cu(II)(EDTA) ⁻²	3,796 10 ⁻⁴	5,42	1,115 10 ⁻⁴	18,360
Cu(II)H(EDTA) ⁻	2,030 10 ⁻⁵	0,29	1,494 10 ⁻⁵	21,355
Cu(II)H ₂ (EDTA) ^(aq)	9,728 10 ⁻⁸	0,00	9,728 10 ⁻⁸	23,303
Cu(II)(EDTA)(OH) ⁻²	4,015 10 ⁻¹¹	0,00	2,550 10 ⁻¹²	20,849

Continuação...

Espécies	Concentração	Dissolvido	Atividade	Constante de equilíbrio
		%	mmol cm ⁻³	
Na(SO ₄) ⁻	8,316 10 ⁻⁵	0,04	6,858 10 ⁻⁵	0,208
NaCl ^(aq)	8,387 10 ⁻³	3,35	8,387 10 ⁻³	-0,566
Na(EDTA) ⁻³	9,075 10 ⁻⁹	0,00	5,764 10 ⁻¹⁰	1,650
NaH(EDTA) ⁻²	2,221 10 ⁻⁵	0,01	6,523 10 ⁻⁶	9,306
NaCl ^(s)	0,00	0,00	0,00	-1,816
K 100% dissolvido				
K ⁺	8,937 10 ⁻²	89,37	6,579 10 ⁻²	
K(OH) ^(aq)	2,878 10 ⁻¹¹	0,00	2,878 10 ⁻¹¹	-0,028
K(PO ₄) ⁻²	5,543 10 ⁻¹²	0,00	1,628 10 ⁻¹²	0,632
KH(PO ₄) ⁻	5,885 10 ⁻⁵	0,06	4,332 10 ⁻⁵	11,925
KH ₂ (PO ₄) ^(aq)	7,156 10 ⁻³	7,16	7,156 10 ⁻³	18,277
K ₂ (PO ₄) ⁻	3,655 10 ⁻¹⁴	0,00	2,691 10 ⁻¹⁴	-0,500
K ₂ H(PO ₄) ^(aq)	4,364 10 ⁻⁶	0,01	4,364 10 ⁻⁶	11,844
K(SO ₄) ⁻	4,802 10 ⁻⁵	0,05	3,535 10 ⁻⁵	0,318
KCl ^(aq)	3,356 10 ⁻³	3,36	3,356 10 ⁻³	-0,566
K(EDTA) ⁻³	3,163 10 ⁻¹⁰	0,00	2,009 10 ⁻¹¹	0,590
KCl ^(s)	0,00	0,00	0,00	-1,166
Cu(II) 100% dissolvido				
Cu(II) ²⁺	1,821 10 ⁻¹³	0,00	5,348 10 ⁻¹⁴	5,968
Cu(II)(OH) ⁺	5,811 10 ⁻¹⁷	0,00	4,278 10 ⁻¹⁷	9,902
Cu(II)(OH) ^{2(aq)}	1,715 10 ⁻²²	0,00	1,715 10 ⁻²²	13,402
Cu(II)(OH) ³⁻	1,863 10 ⁻²⁸	0,00	1,372 10 ⁻²⁸	15,868
Cu(II)(OH) ⁴⁻²⁻	1,872 10 ⁻³⁶	0,00	5,498 10 ⁻³⁶	8,050
Cu(II) ₂ (OH) ³⁺	1,278 10 ⁻²⁷	0,00	8,118 10 ⁻²⁹	16,702
Cu(II) ₂ (OH) ²⁺	1,970 10 ⁻²⁸	0,00	5,787 10 ⁻²⁸	33,604
Cu(II) ₃ (OH) ⁴⁺	3,379 10 ⁻⁴³	0,00	9,924 10 ⁻⁴⁴	14,637
Cu(II)H(PO ₄) ^(aq)	6,181 10 ⁻¹⁴	0,00	6,181 10 ⁻¹⁴	17,810
Cu(II)H ₂ (PO ₄) ⁺	4,981 10 ⁻¹⁵	0,00	3,667 10 ⁻¹⁵	28,916
Cu(II)H ₂ (PO ₄) ⁻²⁻	9,189 10 ⁻¹⁵	0,00	2,699 10 ⁻¹⁵	32,643
Cu(II)H ₃ (PO ₄) ⁻²⁻	2,653 10 ⁻¹⁵	0,00	1,953 10 ⁻¹⁵	35,907
Cu(II)H ₄ (PO ₄) ^{2(aq)}	2,634 10 ⁻¹⁶	0,00	2,634 10 ⁻¹⁶	1,296
Cu(II)(SO ₄) ^(aq)	9,300 10 ⁻¹⁶	0,00	9,300 10 ⁻¹⁶	-0,232
Cu(II)Cl ⁺	1,475 10 ⁻¹⁴	0,00	1,086 10 ⁻¹⁴	18,360
Cu(II)(EDTA) ⁻²⁻	3,796 10 ⁻⁴	94,90	1,115 10 ⁻⁴	21,355
Cu(II)H(EDTA) ⁻	2,030 10 ⁻⁵	5,07	1,494 10 ⁻⁵	23,303
Cu(II)H ₂ (EDTA) ^(aq)	9,728 10 ⁻⁸	0,02	9,728 10 ⁻⁸	20,849
Cu(II)(EDTA)(OH) ⁻³⁻	4,015 10 ⁻¹¹	0,00	2,550 10 ⁻¹²	18,702
Cu(II)O ^(s)	0,00	0,00	0,00	65,302
Cu(II) ₄ (SO ₄)(OH) ^{6(s)}	0,00	0,00	0,00	

Conclusão.

Fonte: Almeida (2014).

APÉNDICE F

APÊNDICE F – Arquivo de saída da simulação CHEAQS Pro (Release P2013.1) da SQR com concentrações de nitrato. O pH com valor fixo de 7,4, a força iônica calculada de $2,786 \cdot 10^{-1} \text{ mmol cm}^{-3}$ e o critério de convergência: 0,01% ($1,0 \cdot 10^{-4}$).

Componentes	Concentração em mmol cm^{-3} e (tipo da entrada)
H	$3,98 \cdot 10^{-5}$ (atividade livre)
Na	$2,50 \cdot 10^{-1}$ (total concentração)
K	$1,00 \cdot 10^{-1}$ (total concentração)
Cu(II)	$4,00 \cdot 10^{-4}$ (total concentração)
(OH)	$2,51 \cdot 10^{-4}$ (total concentração)
(PO ₄)	$1,00 \cdot 10^{-1}$ (total concentração)
(SO ₄)	$4,00 \cdot 10^{-4}$ (total concentração)
Cl	$1,50 \cdot 10^{-1}$ (total concentração)
(EDTA)	$7,00 \cdot 10^{-3}$ (total concentração)
NO ₂	$5 \cdot 10^{-6}, 10 \cdot 10^{-6}, 20 \cdot 10^{-6}, 30 \cdot 10^{-6}$ e $40 \cdot 10^{-6}$ (total concentração)

Usando as concentrações de nitrato de acordo com a tabela acima, não houve quaisquer variações com relação ao resultado apresentado no APÊNDICE E (simulação de complexação de cátions por ligantes).

CÁTIONS e LIGANTES idem ao APÊNDICE E, exceto para o nitrato.

Para todas as situações de concentração de nitrato, o resultado de complexação foi:

LIGANTE NITRATO

Espécies	Concentração	Dissolvido	Atividade	Constante de Equilíbrio
(NO ₂) 100% dissolvido	$4,9 \cdot 10^{-6}$	96,02	$3,5 \cdot 10^{-6}$	
(NO ₂)	$9,6 \cdot 10^{-6}$	96,02	$7,1 \cdot 10^{-6}$	
	$1,9 \cdot 10^{-5}$	96,02	$1,4 \cdot 10^{-5}$	
	$2,9 \cdot 10^{-5}$	96,02	$2,1 \cdot 10^{-5}$	
	$3,8 \cdot 10^{-5}$	96,02	$2,8 \cdot 10^{-5}$	
H(NO ₂) ^(aq)	$2 \cdot 10^{-7}$ a $1,6 \cdot 10^{-6}$	3,98	$2 \cdot 10^{-7}$ a $1,6 \cdot 10^{-6}$	2,884
Cu(II)(NO ₂) ⁺	$2,6 \cdot 10^{-17}$ a $2,2 \cdot 10^{-16}$	0,00	$1,9 \cdot 10^{-17}$ a $1,6 \cdot 10^{-16}$	1,488
Cu(II)(NO ₂) ₂ ^(aq)	$7,2 \cdot 10^{-22}$ a $4,6 \cdot 10^{-20}$	0,00	$7,2 \cdot 10^{-22}$ a $4,6 \cdot 10^{-20}$	2,232

Fonte: Almeida (2014).

APÉNDICE G

APÊNDICE G – Lista de publicações científicas produzidas durante a realização deste trabalho de doutorado.

- ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Differential pulse voltammetry (DPV) used to electrochemically measure nitrite and interfering chemicals by means Au electrodes recovered with 1,2-cis-diaminobenzene. In: INTERNATIONAL MEETING ON CHEMICAL SENSOR, 15th, 2014, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: IMCS15, 2014. In process.
- HERNANDEZ, L. F.; ALMEIDA, F. L.; LIMA, R. R.; SANTOS FILHO, S. G.; SILVA, M. L. P. Use of TEOS plasma films on the development of gaseous and liquid sensors. In: INTERNATIONAL MEETING ON CHEMICAL SENSOR, 15th, 2014, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires: IMCS15, 2014. In process.
- ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Surface activation of gold electrodes using electrochemical conditioning. In: SYMPOSIUM ON MICROELECTRONICS TECHNOLOGY AND DEVICES, 28th 2013, Curitiba. **Proceedings...** Curitiba: SBMicro - Chip in Curitiba, 2013. doi:10.1109/SBMicro.2013.6676168.
- ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Copper(II)-poly(imidazole)-gold microelectrode to measure nitrite and evaluate its interfering chemicals. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN CIRCUITS, ELECTRONICS AND MICRO-ELECTRONICS, 6th, 2013, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: IARIA, 2013. 1 CD-ROM. Disponível em: < www.iaria.org/conferences >. Acesso em: 10 dez. 2013.
- ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. FIA-automated system used to electrochemically measure nitrite and its interfering chemicals through a 1,2-DAB / Au electrode: gain of sensitivity at upper potentials. **Journal of Physics. Conference Series (Online)**, v. 421, n. 1, p. 012009, mar. 2013. doi:10.1088/1742-6596/421/1/012009.
- ALMEIDA, F. L. et al. TEOS and TEOS-HFE plasma thin films used in electrochemical measurements. In: INTERNATIONAL MEETING OF MATERIALS, 7th, 2013, Coimbra. **Anais...** Coimbra: MRS, 2013. 1 CD-ROM.
- ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. FIA-automated system used to electrochemically measure nitrite and its interfering chemicals through a 1-2 DAB / Au electrode: gain of sensitivity at upper potentials. In: IBERO-AMERICAN CONGRESS ON SENSORS, 8th, 2012, Isla Verde. **Proceedings...** Isla Verde: IBERSENSOR, 2012. 1 CD-ROM.
- ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Evaluation of the average current density to make up electrochemical sensors with robust Ag/AgCl reference. In: ENCONTRO DA SBPMAT, 11., 2012, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: SBPMat, 2012. 1 CD-ROM.
- ALMEIDA, F. L.; FONTES, M. B. A.; SANTOS FILHO, S. G. Flow-injection analysis technique used to electrochemically measure nitrite through a gold working electrode

modified with 1,2-diaminobenzene (DAB). *Journal of Integrated Circuits and Systems (ed. Português)*, v. 5, p. 134-139, 2010.

ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G. Chloride adsorption over gold surface: an amperometric sensor of Cl⁻. In: *IBERO-AMERICAN CONGRESS ON SENSORS*, 7th, 2010, Lisboa, Portugal. *Proceedings...* Lisboa: IBERSENSOR 2010, 2010. 1 CD-ROM.

ALMEIDA, F. L. et al. Nitrite Electrochemical sensors modified with 1,2-diaminobenzene (DAB) and controlled by a home-made amperostat. In: *IBERO-AMERICAN CONGRESS ON SENSORS*, 7th, 2010, Lisboa, Portugal. *Proceedings...* Lisboa: IBERSENSOR 2010, 2010. 1 CD-ROM.

IGARASHI, M. O. et al. Galvanostat circuit developed to achieve of an Ag/AgCl pseudo-reference microelectrode on LTCC substrate. In: *IBERO-AMERICAN CONGRESS ON SENSORS*, 7th, 2010, Lisboa. *Proceedings...* Lisboa: IBERSENSOR, 2010. 1 CD-ROM.

ALMEIDA, F. L. et al. Nitrite electrochemical sensors controlled by home-made amperostat: high sensibility and reproducibility. In: *IEEE CIRCUITS AND SYSTEMS FOR MEDICAL & ENVIRONMENTAL APPLICATIONS WORKSHOP*, Merida, 2009. *Proceedings...* Merida: IEEE CASME, 2009.

IGARASHI, M. O. et al. Ag/AgCl reference pseudo-microelectrode obtained by galvanic deposition for integrated bio-electrochemical sensors. In: *IEEE CIRCUITS AND SYSTEMS FOR MEDICAL & ENVIRONMENTAL APPLICATIONS WORKSHOP*, Merida, 2009. *Proceedings...* Merida: IEEE CASME, 2009.

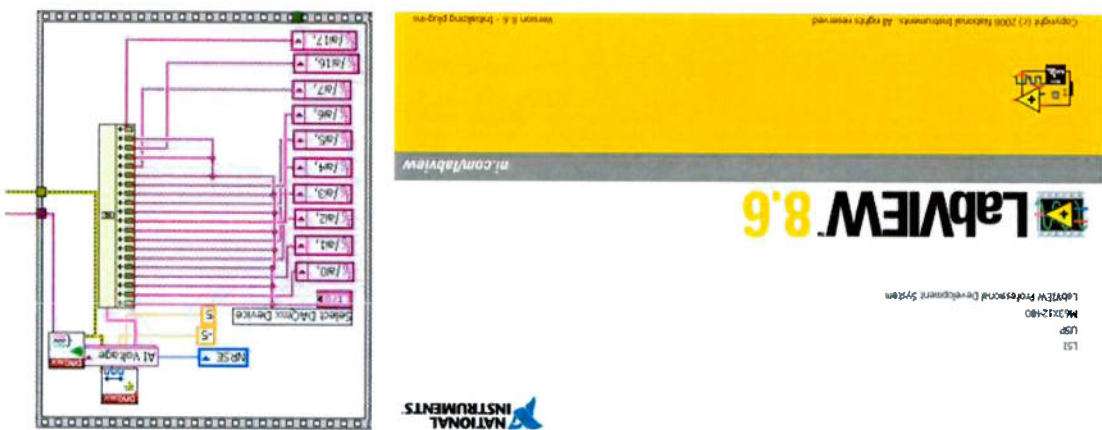
ALMEIDA, F. L.; SANTOS FILHO, S. G.; FONTES, M. B. A. Flow-injection analysis technique used to electrochemically measure nitrite through a gold working electrode modified with 1-2 Diaminobenzene (DAB). *ECS Transactions*, v. 23, n. 1, p. 263-269, sep. 2009. doi:10.1149/1.3183728.

ALMEIDA, F. L. et al. Fabrication process of Ag/AgCl reference pseudo-electrode based on electrodeposition of Au on Pt Surfaces from formaldehyde baths: chemical stability and adherence. *ECS Transactions*, v. 23, n. 1, p. 255-262, sep. 2009. doi:10.1149/1.3183727.

ANEXO A

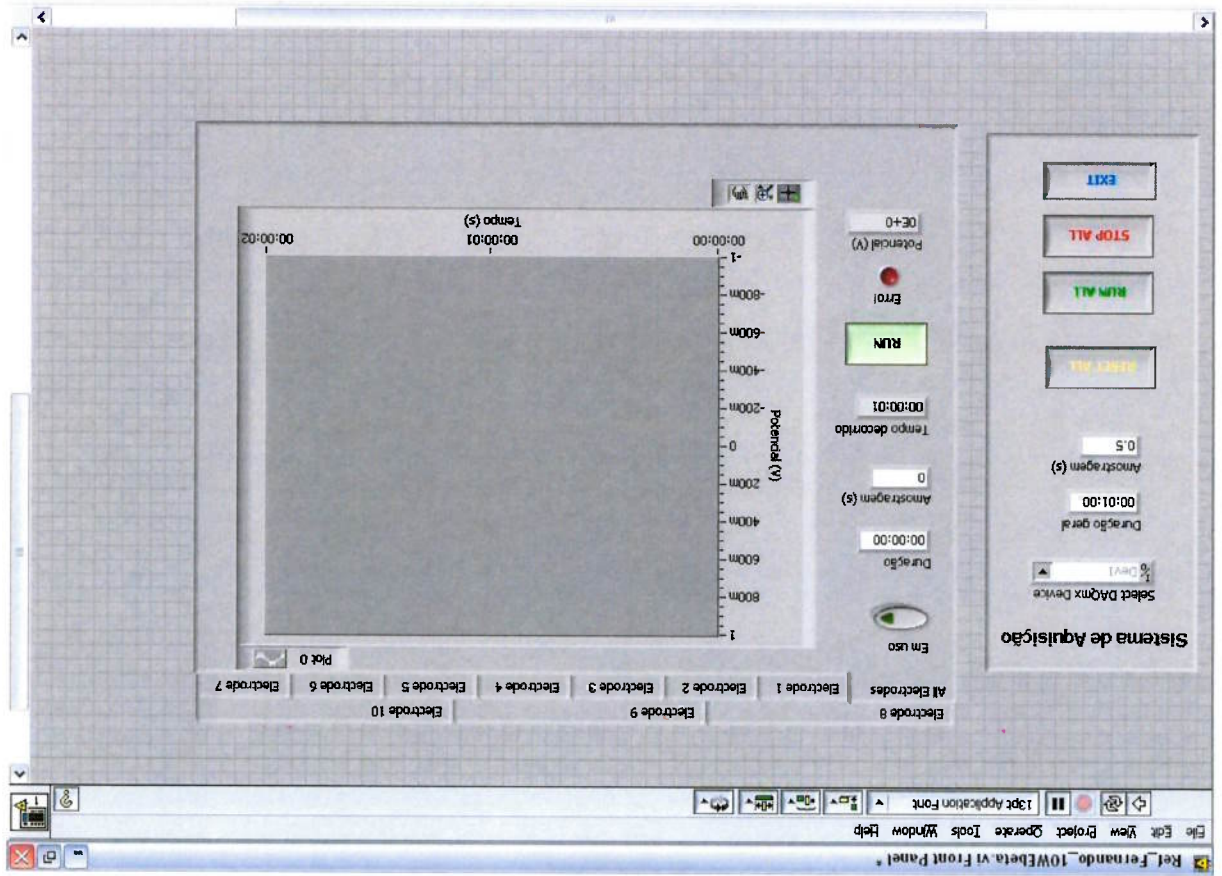
ANEXO A – Software LabView® 8.6, componente central NRSE e Layout do programa desenvolvido, por Cardoso, J. L. em 2009, para aferição do potencial em função do tempo de até 10 eletrodos de referência.

Figura 73 – Software LabView® 8.6.



Fonte: Almeida (2014).

Figura 74 – Layout do programa desenvolvido por Cardoso, J. L. em 2009.



Fonte: Almeida (2014).

ANEXO B

ANEXO B – Imagens dos analisadores eletroquímicos usados durante esse trabalho de doutorado.

Figura 75 – Autolab PGSTAT302N da Metrohm Autolab B.V.



Fonte: Almeida (2014).

Figura 76 – PalmSens da Ivium.



Fonte: Almeida (2014).

ANEXO C

ANEXO C – Série eletroquímica parcial de (VANÝEK, 2012-2013), com as principais reações redox utilizadas por este trabalho de doutorado e os respectivos potenciais redox apresentados no sentido da redução (E^0).

Potencial de redução E^0 a 25 °C (V _H)	Reação redox
--	--------------

-3,040	Li ⁺ + e ⁻	Li	↔
-3,026	Cs ⁺ + e ⁻	Cs	↔
-2,980	Rb ⁺ + e ⁻	Rb	↔
-2,931	K ⁺ + e ⁻	K	↔
-2,912	Ba ²⁺ + 2e ⁻	Ba	↔
-2,899	Sr ²⁺ + 2e ⁻	Sr	↔
-2,868	Ca ²⁺ + 2e ⁻	Ca	↔
-2,710	Na ⁺ + e ⁻	Na	↔
-2,372	Mg ²⁺ + 2e ⁻	Mg	↔
-1,847	Be ²⁺ + 2e ⁻	Be	↔
-1,662	Al ³⁺ + 3e ⁻	Al	↔
-1,630	Tl ²⁺ + 2e ⁻	Tl	↔
-1,185	Mn ²⁺ + 2e ⁻	Mn	↔
-1,175	V ²⁺ + 2e ⁻	V	↔
-1,143	Te + 2e ⁻	Te ⁻	↔
-1,120	2SO ₃ ²⁻ + 2H ₂ O + 2e ⁻	S ₂ O ₄ ²⁻ + 4OH ⁻	↔
-1,099	Nb ³⁺ + 3e ⁻	Nb	↔
-1,050	PO ₃ ⁴⁻ + 2H ₂ O + 2e ⁻	HPO ₃ ²⁻ + 3OH ⁻	↔
-0,930	SO ₄ ²⁻ + H ₂ O + 2e ⁻	SO ₃ ²⁻ + 2OH ⁻	↔
-0,924	Se + 2e ⁻	Se ²⁻	↔
-0,913	Cr ²⁺ + 2e ⁻	Cr	↔
-0,762	Zn ²⁺ + 2e ⁻	Zn	↔
-0,608	As + 3H ⁺ + 3e ⁻	AsH ₃	↔
-0,571	2SO ₃ ²⁻ + 3H ₂ O + 4e ⁻	S ₂ O ₃ ²⁻ + 6OH ⁻	↔
-0,510	Sb + 3H ⁺ + 3e ⁻	SbH ₃	↔
-0,460	NO ₂ ⁻ + H ₂ O + e ⁻	NO + 2OH ⁻	↔
-0,403	Cd ²⁺ + 2e ⁻	Cd	↔
-0,280	Co ²⁺ + 2e ⁻	Co	↔

Continua...

