UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

WANDERSON SIRLEY REIS TEIXEIRA

Metodologia eletrossintética para a construção de sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com ERGO/Au/MIP de poli(*m*-fenilenodiamina)

Versão Corrigida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

17/08/2020

WANDERSON SIRLEY REIS TEIXEIRA

Metodologia eletrossintética para a construção de sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com ERGO/Au/MIP de poli(*m*-fenilenodiamina)

> Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências: Química Orientador: Prof. Dr. Jonas Gruber

> > Coorientadora: Profa. Dra. Ivana Cesarino

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

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

T266m	Teixeira, Wanderson Sirley Reis Metodologia eletrossintética para a construção de sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com ERGO/Au/MIP de poli(m- fenilenodiamina) / Wanderson Sirley Reis Teixeira São Paulo, 2020. 166 p.
	Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Gruber, Jonas Coorientador: Cesarino, Ivana
	 Polímero molecularmente impresso (MIP). 2. Sensores. 3. Eletropolímerização. 4. Eletroanalítica. Grafeno. I. T. II. Gruber, Jonas, orientador. III. Cesarino, Ivana, coorientador.



"Metodologia eletrossintética para a construção de sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com ERGO/Au/MIP de poli(*m*-fenilenodiamina)"

WANDERSON SIRLEY REIS TEIXEIRA

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

Origintador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Dr. Lucio Angnes IQ - USP

Tadeu Gomes Cavalheiro IQSC - USP

Peeters NCL UNIV

SÃO PAULO 02 de outubro de 2020

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jonas Gruber pela orientação, amizade, ensinamentos e confiança ao longo de todo o período que temos trabalhado juntos.

À Profa. Ivana Cesarino pela coorientação, introdução na área de materiais para modificação de eletrodos, pela disponibilização do laboratório, equipamentos e reagentes para a execução deste trabalho.

Aos professores da FMVZ-UNESP-Botucatu, Jane Megid e Juliano Pereira Gonçalves, pelo apoio, compreensão e por acreditarem em minhas ideias.

Aos professores Marloes Peeters (Universidade de Newcastle, UK) e Craig E. Banks (Universidade Metropolitana de Manchester, UK) pela confecção e doação dos eletrodos de SPE.

A todos os meus colegas de laboratório, seja do trabalho ou da pesquisa, Wellington Gonçalves, Mateus Mioni, Vanessa Pelícia, Bruna Devidé, Clovis Fonseca, Martin Leme, pela companhia, contribuições e favores ao longo desses anos. Ao meu amigo Robson Guimarães, pelas imagens de SEM.

Ao meu pai, Paulo Barreto Teixeira, pela motivação e por ter me ensinado a enfrentar os problemas com bom humor. À minha irmã, Singrid Reis Teixeira, pela amizade e companheirismo de toda a vida.

À minha mãe, Léia Reis Pinto, pelo amor e educação, por me ensinar a correr atrás dos meus objetivos, por ser, de longe, a minha maior apoiadora e por toda confiança que ela sempre depositou em mim. Agradeço também ao meu padrasto Marco van den Akker por toda a ajuda e motivação.

À minha noiva, futura esposa e melhor amiga Daniele Camalionte, pela constante presença, cumplicidade e confiança, pelo apoio e amor, por compartilhar o dia a dia, as alegrias e tristezas comigo, e por sempre me dar esperança que algo melhor está por vir.

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho e esta etapa de minha vida.

Por fim, agradeço às instituições IQ-USP e FMVZ-UNESP-Botucatu pela formação e às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP pelas bolsas e projetos financiados.

Resumo

W.S.R.Teixeira. Metodologia eletrossintética para a construção de sensores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com ERGO/Au/MIP de poli(*m*-fenilenodiamina). 2020. 166 páginas. Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Fundamental. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho diz respeito ao desenvolvimento de metodologia exclusivamente eletroquímica para a síntese e operação de um sistema compósito baseado em óxido de grafeno reduzido/ouro/poli(*m*-fenilenodiamina) molecularmente impresso (ERGO/Au/P*m*-PD-MIP) e a possível aplicação desse material em sensores eletroquímicos.

Inicialmente, cada etapa da modificação foi considerada isoladamente, utilizando carbono vítreo (GC) como material de eletrodo. Posteriormente, o compósito foi depositado sobre GC e *screen printed electrode* (SPE) e analisado como um todo. Dessa forma, é possível estruturar o trabalho em três partes principais:

1) Desenvolvimento do substrato de ERGO/Au: A) obtenção e caracterização do filme de ERGO: análise da concentração de óxido de grafeno na suspensão de partida e ciclos de eletrorredução; B) obtenção e caracterização do filme de Au: primeiramente foi feita a comparação do desempenho eletroquímico de eletrodos modificados com diferentes filmes metálicos: Ag, Au, Cu, Pd e Pt, sendo que o ouro foi o material que apresentou os melhores resultados. Posteriormente, a concentração de HAuCl₄ na solução de partida e a quantidade de ciclos de eletrodeposição foram analisadas; C) síntese e caracterização do compósito de ERGO/Au. Nessa etapa os eletrodos modificados foram caracterizados por voltametria de pulso diferencial em solução de dopamina e por diferentes técnicas eletroquímicas com a sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$.

2) Filme polimérico: A) eletropolimerização: avaliação de variáveis sintéticas: monômeros eletroativos, pirrol, tiofeno, *m*-fenilenodiamina e *o*-fenilenodiamina, sendo que o último foi utilizado como modelo para estudos adicionais sobre a influência do pH, concentração do monômero e material de eletrodo de trabalho na reação de eletropolimerização; B) síntese de MIPs e NIPs (polímero não impresso, sem o molde) utilizando poli(*o*-fenilenodiamina), P*m*-PD e polipirrol como matrizes polimérica e dopamina como molécula molde e comparação do *imprinting factor*, sendo que, dentre os materiais avaliados, o que apresentou melhores resultados foi o P*m*-PD.

3) Aplicação: A) para espécies eletroativas: modificação de GC com ERGO/Au/P*m*-PD-MIP para dopamina e avaliação da especificidade do sistema frente ao ácido úrico; B) para espécies não eletroativas: modificação de SPE com ERGO/Au/P*m*-PD-MIP para desoxiadenosina trifosfato e avaliação da especificidade do sistema frente a outros desoxinucleotídeos trifosfato utilizando a sonda de K_3 [Fe(CN)₆]. Para ambas aplicações os MIPs apresentaram alguma interação preferencial com a molécula molde.

Além disso, o trabalho apresenta, discute e sugere algumas estratégias operacionais para o desenvolvimento e aplicação dos MIPs em sensores eletroquímicos, especificamente: i) o uso do pico de redução do óxido metálico como indicativo da eficiência do processo extrativo, assim como, ferramenta de leitura indireta e ii) uso de diversas técnicas eletroquímicas, voltametrias cíclica, pulso diferencial, varredura linear e espectroscopia de impedância eletroquímica, juntamente com ferramentas de análise multivariada, mais precisamente, a análise por componentes principais, como procedimento prático, simples, robusto e intuitivo para a caracterização de eletrodos modificados com a sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Palavras chaves: polímero molecularmente impresso (MIP), sensores, eletropolimerização, eletroanalítica, eletroquímica, grafeno.

Abstract

W.S.R.Teixeira. Electrosynthetic methodology for the construction of electrochemical sensors based on electrodes modified with ERGO/Au/MIP of poly (*m*-phenylenediamine). 2020. 166 pages. PhD Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work concerns to the development of an exclusively electrochemical methodology for the synthesis and operation of a composite system based on reduced graphene oxide/gold/poly(*m*-phenylenediamine) molecularly imprinted (ERGO/Au/P*m*-PD-MIP) and the potential application of this material for electrochemical sensors.

Initially, each modification step was considered on its own using glassy carbon (GC) as electrode material. Then, the composite was set up on GC and screen printed electrode (SPE) and evaluated as a whole. In this way, it is possible to divide the work in three main parts:

1) Development of the ERGO/Au substrate: A) synthesis and characterization of the ERGO film: analysis of the graphene oxide concentration in the starting suspension and electroreduction cycles; B) synthesis and characterization of the Au film: first, electrochemical performances of modified electrodes with different metallic films: Ag, Au, Cu, Pd and Pt were evaluated, with gold being the material which presented the best results, than later, the concentration of HAuCl₄ in the starting solution and the number of electrodeposition cycles were analyzed; C) synthesis and characterization of the ERGO/Au composite. In this stage, the modified electrodes were characterized by differential pulse voltammetry in dopamine solution and by different electrochemical techniques with the $K_3[Fe(CN)_6]$ probe.

2) Polymeric film: A) electropolymerization: evaluation of synthetic variables: electroactive monomers, pyrrole, thiophene, *m*-phenylenediamine and *o*-phenylenediamine, the latter being used as a model for further studies on the influence of pH, monomer concentration and working electrode material in the electropolymerization reaction; B) synthesis of MIPs and NIPs (non-imprinted polymer, without the template) of poly(*o*-phenylenediamine), Pm-PD and polypyrrole as polymeric matrices and dopamine as a template molecule and comparison of the imprinting factor, among the evaluated materials, the polymer which presented best results was Pm-PD.

3) Application: A) for electroactive species: modification of GC with ERGO/Au/P*m*-PD-MIP for dopamine and evaluation of the specificity of the system against uric acid; B) for non-electroactive species: modification of SPE with ERGO/Au/P*m*-PD-MIP for deoxyadenosine triphosphate and assessment of system specificity compared to other triphosphate deoxynucleotides using K_3 [Fe(CN)₆] as probe. For both applications, MIPs showed some preferential interaction with the template molecules.

In addition, the work presents, discusses and suggests some operational strategies for the development and application of MIPs in electrochemical sensors, specifically: i) the use of the metal oxide reduction peak as an indicator of the efficiency of the extractive process, as well as a strategy for indirect read out and ii) use of several electrochemical techniques, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, linear scanning voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy together with multivariate analysis tools, more precisely the principal component analysis as a practical, simple, robust and intuitive procedure for the characterization of modified electrodes with the $K_3[Fe(CN)_6]$ probe.

Keywords: molecularly imprinted polymer (MIP), sensors, electropolymerization, electroanalysis, electrochemistry, graphene.

Lista de abreviações e anagramas

CA: cronoamperometria CV: voltametria cíclica DA: dopamina dATP: desoxiadenosina trifosfato dCTP: desoxicitidina trifosfato dGTP: desoxiguanidina trifosfato dNTP: desoxinucleotídeo trifosfatado DPV: voltametria de pulso diferencial (DPV) dTTP: desoxitimidina trifosfato EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica ELISA: (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ERGO: óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente GC: carbono vítreo (glassy carbon) GO: óxido de grafeno **IF:** imprinting Factor LOD: limite de detecção LSV: voltametria de varredura linear (LSV) MIP: polímero molecularmente impresso NIP: polímero não impresso OCP: potencial de circuito aberto PBS: solução de tampão fosfato PCA: análise de componente principal *m*-PD: *m*-fenilenodiamina o-PD: o-fenilenodiamina Pm-PD: poli(*m*-fenilenodiamina) Po-PD: poli(o-fenilenodiamina) PPy: polipirrol PThi: politiofeno Py: pirrol QCM: microbalança a cristal de quartzo RGO: óxido de grafeno reduzido SEM: microscopia eletrônica de varredura

SPE: eletrodo impresso, *screen printed electrode* Thi: tiofeno UA: ácido úrico

Lista de símbolos

A_{elet}: área eletroativa do eletrodo (cm²)

 $A_{geo} =$ área geométrica do eletrodo (cm²)

A_{pico}: área de pico (u.a.)

E_{eq}: potencial de equilíbrio (V)

Eonset: potencial de início de processo eletroquímico (V)

E_{pico}: potencial de pico (V)

io: corrente de troca (A)

i_{pico}: corrente de pico (A)

 R_{ct} : resistência de transferência de carga (Ω)

 R_{pol} : resistência de polarização (Ω)

Q = carga(C)

v = velocidade de varredura (mV/s)

Lista de Figuras

Figura 1: Esquemas representativos das estratégias de leitura (*read out*) mais utilizadas em sensores eletroquímicos aplicadas à tecnologia dos MIPs. A) Leitura direta; B) Leitura indireta.

Figura 2: Esquema representativo do desenvolvimento de sensores eletroquímicos à base do compósito de ERGO/Au/MIP, objetivo principal deste trabalho.

Figura 3: A) Célula eletroquímica convencional; B) Célula eletroquímica adaptada em placa de ELISA; C) Apoio para fixação dos eletrodos na célula eletroquímica adaptada.

Figura 4: A) CVs referentes ao 1° e 10° ciclos da ativação eletroquímica nos eletrólitos de H_2SO_4 , PBS e NaOH, todos na concentração de 0,2 mol.L⁻¹; B) Ativação eletroquímica de quatro diferentes eletrodos utilizando H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ como eletrólito de suporte.

Figura 5: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho após o processo de ativação eletroquímica em H₂SO₄, PBS e NaOH, todos eletrólitos a 0,20 mol.L⁻¹ e na ausência de tratamento.

Figura 6: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem ativação eletroquímica e ativado em H₂SO₄ 0,2 mol.L⁻¹; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LSV; E) EIS para os eletrodos de GC sem ativação eletroquímica e aqueles ativados em H₂SO₄, PBS e NaOH, todos eletrólitos com concentração de 0,2 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Figura 7: CVs obtidos na ausência e na presença de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito de suporte.

Figura 8: Cronoamperogramas na ausência e na presença de GO $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ como eletrólito de suporte, 10 ciclos.

Figura 9: A) CVs; B) DPVs obtidos para os eletrodos de GC e GC/ERGO em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Figura 10: A) Fotografia de eletrodos de GC modificados com ERGO; B) Imagem de SEM de SPE de carbono sem modificação (ampliação: 50000 x); C) SEM de SPE de carbono recoberto com ERGO (ampliação: 50000 x).

Figura 11: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrorredução de GO 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, 10 ciclos.

Figura 12: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/ERGO obtido a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em N₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, 10 ciclos; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LPV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/ERGO obtidos a partir de suspensão de GO 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ em N₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Figura 13: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10, 15 e 20 ciclos de eletrorredução.

Figura 14: A) Curva de $i_{pico} \ge v^{1/2}$; B) DPV; C) LSV; D) EIS para os eletrodos de trabalho sem modificação e GC/ERGO obtidos a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10, 15 e 20 ciclos de eletrorredução. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. E) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Figura 15: A) CVs referentes à eletrodeposição de Ag, Au, Cu, Pd e Pt 0,50 mmol.L⁻¹ em $H_2SO_4 0,5 mol.L^{-1}$, 1° ciclo; B) Carga acumulada para o processo de eletrodeposição de cada um dos metais durante 15 ciclos.

Figura 16: CVs referentes à eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol. L^{-1} em H₂SO₄ 0,5 mol. L^{-1} sobre quatro diferentes eletrodos de GC.

Figura 17: CVs obtidos para os eletrodos de GC e GC modificado com Ag, Au, Cu, Pd e Pt em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Figura 18: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com Ag, Au, Cu, Pd e Pt.

Figura 19: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Pt; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LSV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/metal obtidos a partir de AgNO₃, HAuCl₄, CuCl₂, C₄H₆O₄Pd e H₂PtCl₆ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Figura 20: A) CVs; B) DPVs obtidas para os eletrodos de GC e GC/Au em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Figura 21: Fotografia de eletrodos de GC modificados com Au; B) SEM de SPE de carbono sem modificação (ampliação: 50000 x); C) SEM de SPE de carbono recoberto com Au (ampliação: 50000 x).

Figura 22: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹, 10 ciclos.

Figura 23: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtido com solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LPV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtidos a partir de solução de HAuCl₄ 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, R_{ct}, i₀, E_{eq} e R_{pol} nas condições supracitadas.

Figura 24: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10 e 15 ciclos.

Figura 25: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtido com solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 15 ciclos; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LSV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtidos a partir de suspensão de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10 e 15 ciclos. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Figura 26: CVs obtidas para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/ERGO/Au em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Figura 27: A) Fotografia de eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au; SEMs (ampliação: 50000 x) para B) SPE de carbono; C) SPE/ERGO; D) SPE/Au; E) SPE/ERGO/Au. **Figura 28**: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 μmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au.

Figura 29: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC e GC/ERGO/Au; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LPV; E) EIS para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Figura 30: A) CV relativa à eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de *o*-PD.

Figura 31: A) CV relativa à eletropolimerização de *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de *m*-PD.

Figura 32: A) CV relativa à eletropolimerização de Py 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos. Imagem em detalhe corresponde às curvas do 1° e 2° ciclos de reação; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de Py.

Figura 33: A) CV relativa à eletropolimerização de Thi 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de Thi.

Figura 34: A) Valores de i_{pico} e % i_{pico} ciclo/ i_{pico} 1° ciclo; B) Carga acumulada ao longo das reações de eletropolimerização por CV para os monômeros de *o*-PD, *m*-PD, Py e Thi 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2.

Figura 35: A) CVs para 1° ciclo; B) Carga acumulada e i_{pico} para cada ciclo da reação de eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pHs 2,5; 5,0 e 7,5.

Figura 36: Imagens de diferentes soluções de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹ pHs 2,5; 5,0 e 7,5 após 2 e 24 horas da dissolução do monômero e expostas ao ar atmosférico.

Figura 37: Estruturas sugeridas para o Po-PD, ladder e open.

Figura 38: A) CVs para o 1° ciclo; B) Curva de i_{pico} x [*o*-PD] para os três primeiros da reação de eletropolimerização de *o*-PD 5,0; 7,5; 10 e 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2.

Figura 39: A) CVs; B) Carga acumulada para a eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos, utilizando GC e Pt como eletrodos de trabalho.

Figura 40: Síntese de MIPs de A) *o*-PD; B) *m*-PD e C) Py, todos com concentração de 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, utilizando DA e AA, ambos com concentração de 5,0 mmol.L⁻¹, como moléculas molde. Os NIPs foram sintetizados seguindo o mesmo procedimento, exceto o uso das moléculas molde. As Figuras também apresentam os voltamogramas referentes às moléculas moldes, 5,0 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, sem a presença dos monômeros.

Figura 41: A) DPVs; B) A_{pico} , sem e após extração, obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com NIPs obtidos a partir de *o*-PD 1) 5,0, 2) 10 e 3) 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Para os MIPs, além do monômero, foi acrescentado DA 5,0 mmol.L⁻¹.

Figura 42: A) DPVs; B) A_{pico} , sem e após extração, obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com NIPs obtidos a partir de *m*-PD 1) 5,0, 2) 10 e 3) 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Para os MIPs, além do monômero, foi acrescentado DA 5,0 mmol.L⁻¹.

Figura 43: A) DPVs; B) A_{pico} , sem e após extração, obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com NIPs obtidos a partir de Py 1) 5,0, 2) 10 e 3) 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Para os MIPs, além do monômero, foi acrescentado DA 5,0 mmol.L⁻¹.

Figura 44: A) Imagens das soluções de *o*-PD e *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, 0, 15, 30, 60 e 120 min após a dissolução do sólido, assim como, os espectros de UV-vis para ambas soluções nas mesmas condições. B) Imagens das soluções de *o*-PD e *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, 1, 5, 10 e 30 dias após a dissolução do sólido.

Figura 45: A) CVs; B) EISs obtidas para os eletrodo de GC modificado com NIP de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹, sem extração e após extração por: agitação magnética em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, por 1 hora; CV em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, -0,5 a 1,0 V, por 10 ciclos; agitação magnética em solução de H₂O/etanol (1;1, v/v), por 1 hora e ultrassom em solução aquosa NaOH 0,1 mol.L⁻¹ por 10 min.

Figura 46: CVs referentes ao 1° ciclo da eletropolimerização do MIP, *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ e DA 5,0 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2 sobre o eletrodo de GC/ERGO/Au. O NIP foi obtido seguindo o mesmo procedimento, exceto a adição da molécula molde. Imagem em detalhe: carga acumulada para o 1° ciclo da CV para os NIPs e MIPs eletropolimerizados sobre os eletrodos de GC e GC/ERGO/Au.

Figura 47: A) CVs; B) A_{pico}AuO_x referentes ao 1° e 10° ciclos da extração por CV em PBS 0,2 mol.L⁻¹ para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP.

Figura 48: A) DVs; B) A_{pico} para DA 10 μmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹ para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP sem extração e após extração.

Figura 49: A) DVs; B) Curvas analíticas de A_{pico} x [DA] obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP, após extração, em soluções de DA 5,0, 10, 15 e 20 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

Figura 50: A) DVs; B) A_{pico} (valores absoluto e normalizado pelo GC/ERGO/Au) obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP, após extração, em soluções de UA 250 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

Figura 51: A) DVs; B) A_{pico} obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP, após extração, em soluções de DA 10 µmol.L⁻¹ + UA 250 µmol.L⁻¹, em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

Figura 52: estruturas químicas dos nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

Figura 53: DPVs obtidas para o eletrodo de GC/ERGO/Au em solução individual de cada dNTP 1,0 mmol.L⁻¹, em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Figura 54: A) CVs referentes à limpeza/ativação eletroquímica em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ dos eletrodos de SPE (1° ciclo); B) CAs referentes à eletroredução de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ sobre os SPEs; C) CVs referentes à eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ sobre os eletrodos de SPE/ERGO (1° ciclo); D) CVs referentes à síntese do NIP (*m*-PD 15 mmol.L⁻¹) e MIP (*m*-PD 15 mmol.L⁻¹ + dATP 5 mmol.L⁻¹) em tampão de

acetato 0,2 mol.L⁻¹ (1° ciclo) sobre os eletrodos de SPE/ERGO/Au, as CVs obtidas apenas com o eletrólito de suporte também são apresentadas.

Figura 55: CAs referentes à incubação dos eletrodos de SPE/ERGO/Au, SPE/ERGO/Au/NIP e SPE/ERGO/Au/MIP em solução de dATP 1,0 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Figura 56: A) CV, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$; B) DPV; C) LPV; D) EIS para os eletrodos de SPE/ERGO/Au (A), SPE/ERGO/Au/NIP (B) e SPE/ERGO/Au/MIP (C) nas seguintes condições: 1) sem extração, 2) após extração, após incubação em 3) dTTP, 4) dGTP e 5) dATP. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. E) PCA considerando as variáveis de i_{pico}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho após processo de limpeza/ativação eletroquímica nos eletrólitos H₂SO₄, PBS e NaOH, todos em concentração de 0,2 mol.L⁻¹, e na ausência de tratamento. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 2: Valores calculados de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrorredução de GO 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, 10 ciclos. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 3: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , $R_{pol} e R_{ct}$ para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10, 15 e 20 ciclos de eletrorredução. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 4: Valores calculados da espessura dos filmes de Ag, Au, Cu, Pd e Pt eletrodepositados sobre GC a partir de solução de cátion metálico 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹.

Tabela 5: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e modificados com Ag, Au, Cu, Pd e Pt. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 6: Valores calculados de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹, 10 ciclos. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 7: Valores calculados de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10 e 15 ciclos. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 8: Valores calculados de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{ct} e R_{pol} para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Tabela 9: Valores calculados da espessura dos filmes de Po-PD, Pm-PD, PPy e PThi eletropolimerizados sobre GC partir de solução monomérica 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2.

Tabela 10: Valores de E_{pico} , E_{onset} , i_{pico} , A_{pico} (1° ciclo), Q e espessura junto com os valores da média, desvio padrão e desvio padrão relativo para a eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos, utilizado GC e Pt como eletrodos de trabalho.

Tabela 11: Valores calculados de i_{pico}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos GC/ERGO/Au (A), GC/ERGO/Au/NIP (B) e GC/ERGO/Au/MIP (C) para as seguintes condições 1) sem extração, 2) após extração, após incubação em 3) dTTP, 4) dGTP e 5) dATP, os três nucleotídeos em concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Sumário

1. Introdução	22
1.1. Polímeros molecularmente impressos (Molecularly imprinted polymers, MIPs)	22
1.2. MIPs em sensores e biossensores	23
1.3. Sensores eletroquímicos baseados em MIPs	24
1.4. MIPs obtidos por eletropolimerização	27
1.4.1. Poli(<i>m</i> -fenilenodiamina)(P <i>m</i> -PD): características gerais, síntese eletroquímica e aplicação em MIPs	29
1.5. Substratos	30
1.5.1. Grafeno	30
1.5.2. Metais	32
1.6) Eletrodos impressos	33
2. Objetivos	34
3. Materiais e métodos	37
3.1. Reagentes e soluções	37
3.1.1 Reagentes	37
3.1.2 Soluções	38
3.1.2.1 Soluções de eletrólitos de suporte	38
3.1.2.2 Soluções de moléculas eletroativas	39
3.2. Materiais	42
3.2.1. Equipamentos e Softwares	42
3.2.1.1. Potenciostasto	42
3.2.1.2. Microscópio eletrônico de varredura	42
3.2.1.3. pHmetro	43
3.2.1.5. Banho de ultrassom	43
3.2.1.6. Softwares	43
3.2.2. Células eletroquímicas e eletrodos	43
3.2.2.1. Célula eletroquímica convencional	43
3.2.2.2. Célula eletroquímica adaptada	43
3.2.2.3. Eletrodos convencionais de GC e Pt	44
3.2.2.4. Eletrodo de referência	44
3.2.2.5. Eletrodo de pseudo-referência	44
3.2.2.6. Eletrodo auxiliar	45
3.2.2.7. SPE	45
3.3. Procedimentos	45

3.3.1. Limpeza/ativação eletroquímica dos eletrodos de trabalho	45
3.3.2. Síntese do ERGO	46
3.3.3. Síntese de filmes metálicos	46
3.3.4. Síntese de ERGO/Au	46
3.3.5. Síntese de filmes poliméricos	47
3.3.6. Síntese de MIPs e NIPs	47
3.4. Técnicas eletroquímicas	48
3.4.1. Voltametria cíclica	48
3.4.2. Voltametria de pulso diferencial	49
3.4.3. Voltametria de varredura linear	50
3.4.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica	50
3.4.5. Cronoamperometria	51
4. Resultados e discussão	
4.1. Limpeza/ativação do eletrodo de trabalho	
4.2 Substrato	57
4.2.1. ERGO	57
4.2.1.1. ERGO- concentração de GO na suspensão de partida	62
4.2.1.2. ERGO- quantidade de ciclos de eletrorredução	65
4.2.2. Metais	68
4.2.3. Filmes de Au	76
4.2.3.1. Au- concentração de HAuCl ₄ solução de partida	78
4.2.3.2. Au- quantidade de ciclos de eletrodeposição	81
4.2.4. ERGO/Au	84
4.3. Eletropolimerização	90
4.3.1. Características gerais	90
4.3.2. Monômeros eletroativos	91
4.3.3. pH	
4.3.4. Concentração monômero	
4.3.5. Material de eletrodo de trabalho	110
4.4. MIP	112
4.4.1. Síntese MIP x NIP	112
4.4.2. Fator de impressão (Imprinting Factor, IF)	116
4.4.3. Características operacionais: Po-PD x Pm-PD	
4.4.3.1. Síntese filme: estabilidade da solução	
4.4.3.2. Extração	

4.4.4. Compósitos de ERGO/Au/Pm-PD para detecção direta de DA	128
4.4.4.1. Síntese	128
4.4.4.2. Extração	129
4.4.4.3. Desempenho GC/ERGO/Au/MIP para DA	134
4.4.5. Compósitos de SPE/ERGO/Au/Pm-PD para detecção de dNTPs	141
4.4.5.1. Desoxinucleotídeos: estrutura e eletroatividade	142
4.4.5.2. Modificação de SPE com ERGO/Au/MIP e NIP de P <i>m</i> -PD	144
4.4.5.3. Desempenho SPE/ERGO/Au/MIP para dATP	145
5. Conclusão	152
6. Referências	155

1. Introdução

1.1. Polímeros molecularmente impressos (*Molecularly imprinted polymers*, MIPs)

O conceito de impressão molecular é baseado na síntese de matrizes poliméricas na presença de uma dada molécula molde, que serve como guia para a formação de sítios de ligação complementares à espécie de interesse. Dessa forma, é desejado que, após a remoção do molde e posterior religação, o material polimérico seja capaz de interagir de forma específica com a molécula alvo, mesmo na presença de moléculas de estrutura química análoga [1].

Entre os materiais sintéticos com capacidade de reconhecimento molecular, os MIPs são os que mais recebem atenção. De maneira geral, os MIPs são estáveis, robustos e resistentes a uma larga faixa de pH, solventes e temperatura. Além disso, normalmente, a síntese do material é relativamente simples e de baixo custo [2].

No que diz respeito à síntese, as principais variáveis são: molécula molde, monômeros e solvente, além disso, as proporções entre eles, tipo de polimerização, iniciador (caso necessário), fonte energética (calor, radiação ultravioleta ou potencial/corrente elétrica), a morfologia do polímero e o procedimento extrativo também interferem de forma significativa no desempenho dos MIPs [3].

De maneira geral, os MIPs são classificados em dois tipos: i) covalentes: molécula molde e monômero formam ligações covalentes entre si; ii) não covalentes: molécula molde e monômero interagem de forma não covalente (pontes de hidrogênio, forças de dipolo e van der Waals), sendo os últimos mais utilizados devido à maior facilidade de remoção do molde do interior da rede polimérica [3, 4].

Devido a essas propriedades, os MIPs vêm ganhando atenção entre a comunidade científica e são considerados alternativas promissoras para o desenvolvimento de meios extrativos seletivos para fins analíticos e/ou preparativos, sensores, catalisadores, sistemas de entrega controlada de fármacos, entre tantas outras aplicações [1, 3].

Desde os primeiros trabalhos na área, os MIPs mais descritos na literatura são aqueles obtidos por polimerização em *bulk* de monômeros, contendo grupamentos acrílicos ou vinílicos, para o desenvolvimento de meios extrativos [2, 5]. No entanto, mais recentemente, o interesse na construção de sensores e biossensores que utilizam MIPs como elemento de reconhecimento tem crescido consideravelmente [6–9].

1.2. MIPs em sensores e biossensores

Biossensores e quimiossensores vêm sendo tratados como importantes elementos da química analítica moderna devido às satisfatórias sensibilidade, seletividade/especificidade e capacidade de customização desses sistemas [10]. Eles podem ser utilizados para a determinação qualitativa e/ou quantitativa em diversas áreas, tais como, diagnóstico clínico [11], monitoramento ambiental [12, 13], controle de qualidade em alimentos [14, 15], e outros produtos [16–18].

Tanto para os biossensores quanto para os sensores químicos, a parte central do sistema é o elemento de reconhecimento (receptor), que, idealmente, é capaz de interagir com o(s) analito(s) de interesse de forma seletiva ou mesmo específica [10].

No campo dos biossensores, os elementos de reconhecimento são, normalmente, anticorpos/antígeno [19, 20], enzimas [21–23], ácidos nucleicos [24, 25], aptâmeros [26, 27], proteínas específicas [28, 29], vírus [30], ou até mesmo células inteiras [31–33]. Os receptores estão acoplados ou relacionados de alguma forma a um transdutor, elemento que converte a interação entre o receptor e o analito em algum sinal que é possível de ser observado.

Um exemplo tradicional de biossensor são os imunossensores, que se baseiam na interação seletiva entre antígeno-anticorpo. No entanto, apesar da especificidade, a aplicação

desse tipo de sistema em ensaios rotineiros é pouco viável, visto que, muitas vezes, a extração e purificação de antígenos e/ou anticorpos demanda elevado tempo e recursos, além da baixa estabilidade química e térmica dessas biomoléculas [1, 34].

Desta forma, a fim de substituir os elementos naturais, receptores artificiais vêm sendo amplamente estudados tanto para análises químicas quanto bioquímicas, sendo que, até o momento, os MIPs e suas variações estão entre as classes de materiais mais promissoras [3, 35].

1.3. Sensores eletroquímicos baseados em MIPs

Sensores químicos são classificados em seis grandes categorias: ópticos, térmicos, elétricos, magnéticos, gravimétricos e eletroquímicos [36].

Sensores eletroquímicos são aqueles que utilizam eletrodos como transdutores e a variação de alguma propriedade eletroquímica do sistema eletrodo/solução como meio de detecção do analito de interesse. Esta classe de sensores, geralmente, apresenta baixos limites de detecção, baixo custo de construção e operação, fácil acoplamento a dispositivos eletrônicos de leitura e tratamento de sinais, miniaturização e automação [4]. No entanto, apesar de todos os esforços no desenvolvimento de materiais para construção de eletrodos, sensores eletroquímicos costumam apresentar baixa especificidade e serem muito afetados pela presença de interferentes na matriz, que podem alterar o sinal referente ao analito de interesse, levando a erros sistemáticos nas análises [37]. Dessa forma, o uso do MIP como elemento de reconhecimento pode ser uma alternativa viável para reduzir as interferências e, assim, obter sistemas eletroanalíticos mais específicos [38].

Os sensores eletroquímicos podem ser classificados em voltamétricos, impedimétricos, potenciométricos, capacitivos e condutométricos, sendo os dois primeiros os mais usados quando MIPs são empregados como receptores [4].

Para esse tipo de sistema, a resposta obtida (*read out*) pode corresponder ao: a) sinal devido à alteração das propriedades físicas do sistema como resultado da interação entre MIP e molde; b) sinal baseado na competição entre analito e interferente de estrutura similar pelos sítios de ligação do receptor, deslocamento; c) sinal devido às reações redox do analito na superfície do sistema MIP/eletrodo (leitura direta), para moléculas molde eletroativas; d) sinal devido à alteração do sinal eletroquímico de sondas eletroativas (leitura indireta) na ausência e na presença do analito, para analitos não eletroativos [39]. As duas últimas estratégias são as mais empregadas e são esquematizadas nas Figuras 1-A e B, respectivamente.



Figura 1: Esquemas representativos das estratégias de leitura (*read out*) mais utilizadas em sensores eletroquímicos aplicadas à tecnologia dos MIPs. A) Leitura direta; B) Leitura indireta.

Na Figura 1-A, duas moléculas eletroativas, a amarela e a vermelha, são representadas e os sinais referentes ao processo redox de ambas são observados. Posteriormente, é sintetizado um MIP utilizando a espécie amarela como molde. Dessa forma, cavidades específicas e complementares a esta espécie são formadas, sendo que apenas o sinal referente a esta espécie passa a ser observado.

Na Figura 1-B, o analito de interesse, molécula amarela, não é eletroativa, dessa forma, apenas o sinal referente à sonda é observado. Em seguida, é confeccionado um MIP para a espécie amarela e sítios específicos para esse molde são gerados. O filme impede a chegada da sonda à superfície do eletrodo e o processo redox é interrompido. Após a extração/religação da molécula molde, o sinal eletroquímico referente à sonda volta a ser observado, e a diferença entre os sinais na ausência e na presença do analito de interesse está relacionado à concentração dessa espécie em solução.

No que diz respeito à aplicação em sensores e/ou biossensores, apesar de diversos trabalhos tratarem sobre polímeros orgânicos convencionais [2, 40, 41] e até mesmo hidrogéis como matrizes poliméricas [42, 43], aqueles obtidos pela eletropolimerização de monômeros eletroativos têm apresentado vantagens sintéticas e operacionais [35, 44].

1.4. MIPs obtidos por eletropolimerização

Monômeros eletroativos são espécies que transferem elétrons de ou para o eletrodo de trabalho e, em condições favoráveis, podem sofrer polimerização oxidativa ou redutiva, gerando polímeros que podem ser condutores, semicondutores ou isolantes. Alguns exemplos de monômeros desta classe são: anilina, pirrol (Py), *o*-fenilenodiamina (*o*-PD), tiofeno (Thi) e fenol [44]. Independente da capacidade do transporte de carga da macromolécula sintetizada, polímeros obtidos a partir de tais monômeros têm sido amplamente estudados e aplicados em

diversas áreas, tais como, eletrônica e dispositivos optoeletrônicos, revestimentos anticorrosivos, biomedicina, sensores e biossensores [45, 46].

No que diz respeito à aplicação em sensoriamento, a eletropolimerização é uma estratégia preferível à polimerização convencional, e até mesmo frente à oxidação química. Dentre as vantagens do uso da eletropolimerização é possível citar [9, 35, 44]:

a) Síntese simples (célula eletroquímica convencional, eletrodos de trabalho, referência e auxiliar e potenciostato), rápida (alguns minutos) e em condições amenas (temperatura ambiente, meio aquoso, na maioria dos casos, neutro ou levemente ácido), pré-requisito necessário à aplicação com biomoléculas;

 b) Deposição direta do filme sobre a superfície do eletrodo, favorecendo a distribuição homogênea dos sítios de ligação e aumentando a reprodutibilidade do sistema;

c) Controle da espessura, morfologia e porosidade do filme por meio de diversos parâmetros experimentais, tais como: potencial e/ou corrente aplicados, tempo de reação, quantidade de ciclos, programa de deposição, solvente, eletrólito, pH, etc;

 d) Fácil integração do filme ao eletrodo e aplicação de diversas técnicas eletroquímicas como ferramenta de leitura;

e) Devido à menor espessura do filme, normalmente, MIPs obtidos por eletropolimerização apresentam altas taxas de transferência de massa, e, consequentemente, faixas lineares mais amplas e menores limites de detecção (*limit of detection*, LODs);

f) Metodologia ambientalmente sustentável, menor geração de resíduos e menor consumo de solventes orgânicos.

MIPs podem ser obtidos por eletropolimerização de monômeros eletroativos através de várias estratégias eletroquímicas, tais como técnicas potenciostáticas, galvanostáticas e potenciodinâmicas, sendo a última, principalmente, por meio de voltametria cíclica, a ferramenta mais empregada para obtenção dos polímeros [44].

Entre os monômeros eletroativos mais utilizados para a obtenção de MIPs estão o pirrol e a *o*-fenilenodiamina, que são monômeros comerciais, de baixo custo e polimerizáveis em meio aquoso e em diversos pHs [38]. Além disso, por portarem átomos eletronegativos e sistemas aromáticos em suas estruturas, esses monômeros permitem a interação com diversas moléculas molde de interesse biológico por pontes de hidrogênio, forças iônicas e empilhamento π - π [35]. Alguns outros monômeros comumente utilizados são anilina, tiofeno, fenol e aminofenol [38, 44].

<u>1.4.1. Poli(m-fenilenodiamina)(Pm-PD): características gerais, síntese eletroquímica e</u> <u>aplicação em MIPs</u>

A *m*-PD, assim como a *p*-fenilenodiamina, são isômeros estruturais da *o*-PD, apresentam comportamento eletroquímico similar à espécie *orto* substituída e também são passíveis de eletropolimerização em meio aquoso e vários pHs [47, 48].

O P*m*-PD é insolúvel e intrinsicamente não condutor, no entanto, como será discutido posteriormente, no geral, apresenta condutividade superior ao P*o*-PD em mesmas condições sintéticas e operacionais.

Entre as principais aplicações do P*m*-PD, como homo ou copolímeros ou na forma de compósitos, estão o desenvolvimento de catalisadores [49, 50] filmes anticorrosivos [47, 51], e, principalmente, membranas extrativas de absorção/adsorção para metais [52, 53], compostos inorgânicos [54, 55] e orgânicos [56, 57], o que sugere que o polímero tem grande capacidade de interagir química e/ou fisicamente com espécies em solução.

Diferentemente do polímero obtido a partir do isômero *orto*, que é amplamente utilizado como MIPs em sensores eletroquímicos, principalmente em sistemas de leitura indireta [58–60], o P*m*-PD tem sido pouco utilizado como elemento de reconhecimento.

Utilizando as palavras-chave: "*m-phenylenediamine*" ou "*meta-phenylenediamine*" and "*Molecular Imprinted Polymer*" como entrada nos campos de título, resumo e palavras chaves na base de dados *ScienceDirect* foram encontrados 19 resultados (consulta 30/04/2020), sendo que, desses, apenas 3 estavam de fato relacionados ao isômero *meta* e a MIPs.

Os três artigos foram publicados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Vitali Syritski da Tallinn University of Technology, Estônia, sendo o primeiro para a análise de amoxicilina com microbalança de cristal de quartzo (*Quartz Crystal Microbalance*, QCM) [48], em 2017, o segundo para eritromicina utilizando detecção eletroquímica [61], em 2019, e o mais recente, disponível online em janeiro de 2020, para análise de fator neurotrófico de dopamina cerebral através de ondas acústicas de superfície [62].

Dessa forma, é possível afirmar que o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, utilizando filmes de P*m*-PD como MIPs, além de atual, apresenta caráter inovador e promissor para área.

1.5. Substratos

Assim como a especificidade, a sensibilidade é um importante parâmetro analítico para o desenvolvimento de sensores e biossensores. No que diz respeito aos sensores eletroquímicos, a principal alternativa para aumentar a sensibilidade do sistema é através da funcionalização do eletrodo, seja pelo aumento da superfície eletroativa e/ou deposição de materiais com melhores propriedades eletrocatalíticas.

1.5.1. Grafeno

O grafeno é um dos alótropos do carbono, apresenta hibridização sp², sendo uma folha planar de átomos empacotados em uma estrutura hexagonal cristalina semelhante à de um "favo de mel". A princípio, dependendo do grau de insaturação, o material possui grande quantidade de elétrons π deslocalizados, o que o torna altamente condutor e favorece a cinética dos processos de transferência de elétrons [63]. Além disso, o grafeno e seus derivados apresentam

grande área superficial, são quimicamente inertes, de baixo custo, possuem ótimas propriedades mecânicas, térmicas, ópticas e eletrônicas [64].

Dessa forma, devido, principalmente, à notável razão área superficial/volume e alta taxa de transferência de elétrons, o grafeno vem sendo amplamente aplicado na área da eletroanalítica e no desenvolvimento de sensores, aumentando consideravelmente a sensibilidade e reduzindo os limites de detecção [65]. Dentre os vários derivados do grafeno, aqueles que merecem mais destaque como material de eletrodo na área da eletroquímica e eletroanalítica é o óxido de grafeno reduzido (reduced *graphene oxide*, RGO).

O RGO pode ser obtido pela redução química, eletroquímica ou termoquímica do óxido de grafeno (*graphene oxide*, GO) [66]. O GO é um material fácil de processar em larga escala e que apresenta estrutura molecular similar ao grafeno, porém, grande quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio, consequentemente átomos de C saturados na estrutura da rede, o que reduz a condução elétrica. O processo de redução do GO leva ao considerável aumento da conjugação no material, logo, ao aumento da condutividade do sistema em algumas ordens de grandeza [67].

Dentre as possíveis metodologias para a obtenção do RGO a partir de GO, a redução eletroquímica, gerando o óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente, é uma alternativa viável, principalmente quando a finalidade do material é a modificação de eletrodos para a aplicação em eletroanalítica e eletroquímica, devido ao fácil controle da morfologia do filme através da alteração das variáveis sintéticas (técnica eletroquímica, concentração de precursor, pH, potencial elétrico e ciclos de redução), efetiva deposição sobre o eletrodo de trabalho, síntese rápida e sem necessidade de agentes redutores [68].

Em relação à construção de sensores eletroquímicos baseados na modificação do eletrodo de trabalho com derivados de grafeno para a posterior deposição de MIPs, diversos

trabalhos demonstraram que esta combinação é possível e que os sistemas obtidos apresentaram maior sensibilidade que aqueles sem modificação [69–71].

1.5.2. Metais

A eletrodeposição de filmes metálicos ou de nanopartículas de diversos elementos, tais como, ouro, platina, paládio, níquel e cobre, individualmente ou combinados, é usada desde os primórdios da eletroanalítica para a funcionalização de eletrodos e empregada em inúmeras aplicações, por exemplo, células a combustível, baterias, eletrocatálise, eletrossíntese de compostos orgânicos, entre tantas outras [72, 73].

No que diz respeito à eletroanalítica, assim como à modificação com o grafeno, a principal finalidade de depositar um metal sobre a superfície do eletrodo é favorecer a transferência de elétrons entre o eletrodo modificado e o analito em solução, através da melhora das propriedades eletrocatalíticas do material [74]. Dessa forma, filmes ou nanopartículas metálicas demonstraram ser efetivos para construção de substrato em sensores eletroquímicos com MIPs como elemento de reconhecimento [75, 76].

Por fim, compósitos de derivados de grafeno e metais estão sendo cada vez mais utilizados para modificação de eletrodos e desenvolvimento de substratos a fim de aumentar a sensibilidade dos sistemas eletroquímicos [65, 74]. Além disso, a presença do metal reduz a agregação do grafeno, confere maior estabilidade ao compósito e ajuda a manter as propriedades de interesse para a eletroanalítica [77]. Sendo assim, sensores eletroquímicos baseados em compósitos de grafeno/metal/MIPs também vêm sendo desenvolvidos e demonstrando parâmetros analíticos satisfatórios [60, 77–79].

1.6) Eletrodos impressos

Os eletrodos impressos (*screen printed electrodes*, SPEs) são confeccionados pela deposição de um filme de algum material condutor, normalmente tinta à base de carbono, sobre um suporte inerte e vêm sendo utilizados para a construção de diferentes tipos de sensores, aplicados em diversas áreas [80]. No que diz respeito aos SPEs utilizados em eletroquímica, geralmente, o eletrodo é confeccionado na forma retangular, deixando as extremidade expostas e cobrindo a parte central com algum material isolante, dessa forma, duas regiões condutoras são obtidas, uma onde é feito o contato elétrico e na outra, a superfície do eletrodo propriamente dita [81].

Além disso, o sistema é confeccionado de forma a conter eletrodos de trabalho, referência e auxiliar em um único suporte, o que faz com que os SPEs sejam atrativos em relação aos eletrodos convencionais por uma série de motivos, tais como, rápida resposta, pequeno volume (na ordem de dezenas de microlitros), baixa potência operacional, simplicidade na modificação da superfície do eletrodo, facilidade de miniaturização e automação, baixo custo e descartabilidade, sendo, portanto, uma eficiente plataforma para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, principalmente, aqueles destinados à aplicação bioquímica e *in loco* [82].

2. Objetivos

Esta tese tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma metodologia para síntese eletroquímica de filmes de óxido de grafeno reduzido/Au/poli(*m*-fenilenodiamina)-MIP (ERGO/Au/P*m*-PD-MIP) diretamente sobre o eletrodo de trabalho, conferindo sensibilidade e especificidade ao sistema, e a aplicação do eletrodo modificado na construção de sensores eletroquímicos para a detecção direta e indireta de espécies eletro e não eletroativas, respectivamente.

Dessa forma, o esquema genérico da proposta, considerando a análise direta de espécies eletroativas, amarela (molécula molde) e vermelha (interferente), pode ser dividido em três etapas e é apresentado na Figura 2. A etapa 1 corresponde à modificação do eletrodo com o substrato de ERGO/Au, visando o aumento do sinal eletroquímico. Em seguida, na etapa 2, o MIP para a espécie amarela é sintetizado, dessa forma, sítios de ligação específicos para o molde são formados. Por fim, na etapa 3, ocorre a extração/religação e, a princípio, apenas a espécie amarela é capaz de migrar através da matriz polimérica, alcançar a superfície do eletrodo e sofrer o processo redox.



Figura 2: Esquema representativo do desenvolvimento de sensores eletroquímicos à base do compósito de ERGO/Au/MIP, objetivo principal deste trabalho.

Além disso, são objetivos específicos deste trabalho:

Avaliação de condições sintéticas experimentais relacionadas ao ERGO (concentração de GO na suspensão de partida e quantidade de ciclos de eletrorredução) no desempenho eletroquímico do eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon*, GC) modificado;

- Comparação entre o desempenho eletroquímico de filmes metálicos de Ag, Au, Cu, Pd e Pt como materiais de modificação de GC;

 Avaliação de condições sintéticas experimentais relacionadas ao filme de Au (concentração de HAuCl₄ na solução e quantidade de ciclos de eletrorredução) no desempenho eletroquímico do eletrodo de GC;

 Estudo do desempenho eletroquímico do eletrodo de GC modificado com o compósito de ERGO/Au;
- Síntese de MIPs de polipirrol (PPy), poli(*o*-fenilenodiamina) (P*o*-PD) e P*m*-PD sobre GC utilizando dopamina (DA) como molécula molde e avaliação da sensibilidade da resposta em comparação com o respectivo polímero não impresso;

- Síntese de MIPs de P*m*-PD sobre GC/ERGO/Au, utilizando DA como molécula molde e avaliação da sensibilidade e especificidade do sistema para a eletrooxidação da dopamina, analito de interesse, frente ao ácido úrico (UA), interferente, sistema de leitura direta;

- Transposição da metodologia sintética dos compósitos de ERGO/Au/P*m*-PD para SPE, utilizando desoxiadenosina trifosfato (dATP) como molécula molde e avaliação da especificidade do sistema frente os interferentes de desoxiguanidina e desoxitimidina trifosfato (dGTP e dTTP, respectivamente) com o auxílio da sonda de K₃[Fe(CN)₆], sistema de leitura indireta;

Proposta de ferramenta baseada em análise de componente principal (*principal component analysis*, PCA) e diferentes técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*, CV), voltametria de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry*, DPV), voltametria de varredura linear (*linear sweep voltammetry*, LSV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) para avaliação do desempenho eletroquímico de materiais de eletrodo com a sonda de K₃[Fe(CN)₆].

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes e soluções

3.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos dos seguintes fornecedores:

LabSynth (Brasil): etanol (CH₃CH₂OH), ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]), ácido fosfórico (H₃PO₄) (85%), ácido clorídrico (37%), ácido sulfúrico (98%), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de sódio (Na₂SO₄), nitrato de prata (AgNO₃), cloreto de cobre II (CuCl₂).

Dinâmica (Brasil): cloreto de potássio (KCl), fostato de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibássico (Na₂HPO₄), L-ácido ascórbico (C₆H₈O₆).

Sigma Aldrich (multinacional): *o*-fenilenodiamina e *m*-fenilenodiamina ($C_6H_8N_2$), pirrol (C_4H_5N), tiofeno (C_4H_4S), óxido de grafeno (suspensão aquosa, 4,0 mg.mL⁻¹), ácido cloroáurico (HAuCl₄)- 30% m/m em HCl diluído, acetato de paládio ($C_4H_6O_4Pd$)- 98%, ácido cloroplatínico (H₂PtCl₆)- 8% m/m em H₂O, cloridrato de dopamina ($C_8H_{12}NO_2.HCl$), ácido úrico ($C_5H_4N_4O_3$).

Invitrogen (multinacional): solução comercial individual de diferentes desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina e desoxitimidina trifosfato (respectivamente, dATP, dCTP, dGTP e dTTP), todos em concentração de 100 mmol.L⁻¹.

A água utilizada durante todo este trabalho foi deionizada (18 M Ω .cm⁻¹) em filtros PureLab Option Q (Veolia).

3.1.2 Soluções

3.1.2.1 Soluções de eletrólitos de suporte

A) $H_2SO_4 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$: em um balão volumétrico de 100 mL foram introduzidos 50 mL de H_2O e 5,0 g (5x10⁻² mol) de H_2SO_4 . Em seguida, o volume foi ajustado com H_2O até o menisco. A solução foi utilizada como partida para posteriores diluições, quando necessário.

B) NaOH 0,5 mol.L⁻¹: em um balão volumétrico de 100 mL foram introduzidos 50 mL de H₂O e 2,0 g ($5x10^{-2}$ mol) de NaOH. Em seguida, o volume foi ajustado com H₂O até o menisco. A solução foi utilizada como partida para posteriores diluições, quando necessário.

C) KCl 0,1 mol: em um balão volumétrico de 100 mL foram introduzidos 0,75 g ($1x10^{-2}$ mol) de KCl e H₂O até se atingir o menisco, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido.

D) Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹: em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 1,4 g $(1x10^{-2} \text{ mol})$ de Na₂SO₄ e H₂O até se atingir o menisco, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido.

E) Solução de tampão fosfato (*phosphate buffer solution*, PBS) 0,2 mol.L⁻¹, diversos pHs, preparados em balão volumétrico de 250 mL

- pH 2,5: 1,8 g (2x10⁻² mol) de H₃PO₄ (85%), 4,7 g (3x10⁻² mol) de KH₂PO₄ e H₂O até se atingir o menisco;

- pH 5,0: 6,7 g ($5x10^{-2}$ mol) de KH₂PO₄ e 4,7 $x10^{-2}$ g ($4x10^{-4}$ mol) Na₂HPO₄ e H₂O até se atingir o menisco;

- pH 7,0: 3,8 g ($3x10^{-2}$ mol) de KH₂PO₄ e 2,7 ($2x10^{-2}$ mol) g Na₂HPO₄ e H₂O até se atingir o menisco;

- pH 7,5: 1,9 g (1x10⁻² mol) de KH₂PO₄ e 4,3 g (4x10⁻² mol) Na₂HPO₄ e H₂O até se atingir o menisco.

O pH da solução foi medido com o auxílio de pHmetro, e quando necessário, o pH foi ajustado com HCl 0,5 mol.L⁻¹ ou NaOH 0,5 mol.L⁻¹.

F) Tampão de acetato de sódio, 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2: em um balão volumétrico de 100 mL foram introduzidos 50 mL de H₂O, 3,0 g ($2x10^{-2}$ mol) de ácido acético e 0,4 g ($1x10^{-2}$ mol) de NaOH, em seguida, o volume foi ajustado até o menisco. O pH da solução foi medido com o auxílio de pHmetro, e quando necessário, o pH foi ajustado com HCl 0,5 mol.L⁻¹ ou NaOH 0,5 mol.L⁻¹.

3.1.2.2 Soluções de moléculas eletroativas

A) $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol.L⁻¹: em um balão volumétrico de 100 mL foram introduzidos 0,16 g (5,0x10⁻⁴ mol) de $K_3[Fe(CN)_6]$ e solução de KCl 0,1 mol.L⁻¹ até se atingir o menisco.

B) Óxido de grafeno, 0,50 mg.mL⁻¹: em um tubo Falcon de 50 mL foram introduzidos 5,0 mL da suspensão comercial de óxido de grafeno (4,0 mg.mL⁻¹) e 35 mL de solução de Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹. No caso de suspensões com concentrações variadas, o procedimento adotado foi o mesmo, no entanto, considerando os volumes diferenciados da suspensão comercial de GO e solução de Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ a serem adicionados a fim de se atingir a concentração requerida.

C) HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 5,7 mg $(5,0x10^{-6} \text{ mol})$ de HAuCl₄ e solução de H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ até completar o volume de 10 mL. No caso de soluções com concentrações variadas, o procedimento adotado foi o mesmo, no

entanto, considerando os volumes diferenciados da solução de partida de HAuCl₄ e solução de $H_2SO_4 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ a serem adicionados a fim de se atingir a concentração requerida.

D) AgNO₃ 0,50 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 0,85 mg $(5,0x10^{-6} \text{ mol})$ de AgNO₃ e solução de H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ até completar o volume de 10 mL, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido.

E) CuCl₂ 0,50 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 0,67 mg $(5,0x10^{-6} \text{ mol})$ de CuCl₂ e solução de H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ até completar o volume de 10 mL, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido.

F) $C_4H_6O_4Pd$ 0,50 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 1,1 mg (5,0x10⁻⁶ mol) de $C_4H_6O_4Pd$ e solução de H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ até completar o volume de 10 mL, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido.

G) $H_2PtCl_6 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 25 mg (5,0x10⁻⁶ mol) de H_2PtCl_6 e solução de $H_2SO_4 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ até completar o volume de 10 mL.

H) *o*-fenilenodiamina 30 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 32 mg (3,0x10⁻⁴ mol) de *o*-PD e 10 mL de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido. Esta solução foi utilizada como partida para posteriores diluições.

I) *m*-fenilenodiamina 30 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 32 mg de *m*-PD (3,0x10⁻⁴ mol) e 10 mL de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, a solução foi agitada até a completa dissolução do sólido. Esta solução foi utilizada como partida para posteriores diluições.

J) Pirrol 30 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 20 mg (3,0x10⁻⁴ mol) de Py e 10 mL de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Esta solução foi utilizada como partida para posteriores diluições.

K) Tiofeno 30 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 25 mg $(3,0x10^{-4} \text{ mol})$ de Thi e 10 mL de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Esta solução foi utilizada como partida para posteriores diluições.

L) Dopamina:

- solução de eletrooxidação, DA 1,0 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 1,9 mg (1,0x10⁻⁵ mol) de cloridrato de dopamina e 10 mL de PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0. A solução foi agitada até a completa dissolução do sólido e utilizada como partida para posteriores diluições, quando necessário.

- solução de síntese de MIPs, DA 10 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 19 mg (1,0x10⁻⁴ mol) de cloridrato de dopamina e 10 mL de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. A solução foi agitada até a completa dissolução do sólido e utilizada como partida para posteriores diluições, quando necessário.

M) Ácido ascórbico 10 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 18 mg ($1,0x10^{-4}$ mol) de ácido ascórbico e 10 mL de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. A solução foi agitada até a completa dissolução do sólido e utilizada como partida para posteriores diluições, quando necessário.

N) Ácido úrico 0,50 mmol.L⁻¹: em um tubo Falcon de 15 mL foram introduzidos 0,80 mg ($5,0x10^{-6}$ mol) de ácido úrico e 10 mL de PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0. A solução foi agitada até a completa dissolução do sólido e utilizada como partida para posterior diluição.

O) dNTPs:

- solução de eletrooxidação e incubação, dNTPs 1,0 mmol.L⁻¹: em um tubo eppendorf foram introduzidos 10 μ L da solução comercial de cada um dos dNTPs e 990 μ L de PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

- solução de síntese de MIPs, apenas para o dATP 10 mmol.L⁻¹: em um tubo eppendorf foram introduzidos 50 μ L de solução comercial de dATP e 450 μ L de tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, e utilizada como partida para posterior diluição.

3.2. Materiais

3.2.1. Equipamentos e Softwares

3.2.1.1. Potenciostasto

Todos os experimentos eletroquímicos, voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de varredura linear, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizados utilizando um potenciostato modelo Autolab PGSTAT128N (Metrohm).

3.2.1.2. Microscópio eletrônico de varredura

Para a caracterização microscópica, os filmes foram sintetizados sobre SPE de carbono. As imagens de SEM foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura, modelo FESEM JEOL JSM-7401F (Thermo), com ampliação de 1000 a 100000x e voltagem de aceleração entre 5 e 10 kV. O modo de detecção utilizado foi o de elétrons retro-espalhados. Os eletrodos foram fixados no porta-amostra com fita condutora de carbono.

3.2.1.3. pHmetro

O pHmetro utilizado foi o modelo 827 pH lab (Metrohm), previamente calibrado.

3.2.1.5. Banho de ultrassom

As amostras foram tratadas em um banho de ultrassom modelo LS-12 DA (Limp Sonic).

3.2.1.6. Softwares

O *software* utilizado para as medidas eletroquímicas e análise de dados foi o Nova 2.1 (Metrohm). O tratamento dos dados, PCAs e construção dos gráficos foram feitos no Origin 2018 da OriginLab.

3.2.2. Células eletroquímicas e eletrodos

3.2.2.1. Célula eletroquímica convencional

Frasco de vidro, volume máximo de aproximadamente 20 mL, com tampa de teflon e orifícios apropriados para o encaixe dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, Figura 3-A. As leituras com a sonda K_3 [Fe(CN)₆] foram conduzidas nessa célula, exceto no caso do SPE, para o qual apenas cerca de 100 µL de solução foram depositados diretamente sobre o próprio eletrodo.

3.2.2.2. Célula eletroquímica adaptada

Uma placa de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de 24 poços confeccionadas em poliestireno, volume aproximado de 2,5 mL por poço, foi adaptada como célula eletroquímica, Figura 3-B. As vantagens de utilizar esta célula são: o menor volume de solução e a praticidade para a síntese dos filmes e leituras, visto que uma única placa permite o preparo de até 24 soluções diferentes ao mesmo tempo. Os eletrodos de trabalho, *pseudo*-referência e auxiliar foram fixados por meio de uma seringa adaptada, Figura 3-C. Os

procedimentos de ativação eletroquímica, deposição de filmes e todas leituras eletroquímicas, exceto as com a sonda K_3 [Fe(CN)₆] e as realizadas com SPE, foram conduzidas nessa célula.



Figura 3: A) Célula eletroquímica convencional; B) Célula eletroquímica adaptada em placa de ELISA; C) Apoio para fixação dos eletrodos na célula eletroquímica adaptada.

3.2.2.3. Eletrodos convencionais de GC e Pt

Eletrodos de GC e Pt convencionais, diâmetro de 3,0 mm e área geométrica aproximada de 7,1 $\times 10^{-2}$ cm² foram utilizados neste trabalho.

3.2.2.4. Eletrodo de referência

O eletrodo comercial de Ag/AgCl/KCl 3,0 mol.L⁻¹ (Metrohm) foi utilizado como eletrodo de referência. Antes do uso, o eletrodo foi lavado com água deionizada para a remoção da solução salina na qual ele é armazenado.

3.2.2.5. Eletrodo de pseudo-referência

A fim de utilizar a célula eletroquímica adaptada e um menor volume de solução, foi confeccionado um eletrodo de *pseudo*-referência baseado em um fio de Ag recoberto com AgCl.

3.2.2.6. Eletrodo auxiliar

Um bastão de grafite, diâmetro de 2 mm, foi utilizado como eletrodo auxiliar, antes do uso, o eletrodo foi lavado e tratado em banho de ultrassom em água deionizada por 10 min para a remoção de qualquer material adsorvido na superfície.

3.2.2.7. SPE

Os SPEs de carbono utilizados neste trabalho foram confeccionados e caracterizados no laboratório do Prof. Craig E. Banks (Universidade Metropolitana de Manchester, Reino Unido) [83]. A região circular referente ao eletrodo de trabalho possui diâmetro de 3,0 mm e área geométrica de aproximadamente $7,1x10^{-2}$ cm².

3.3. Procedimentos

3.3.1. Limpeza/ativação eletroquímica dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos de GC e Pt foram polidos em uma mesa de polimento com auxílio de suspensão de alumina 0,05 μ m até a obtenção de uma superfície lisa e refletiva. Em seguida, os eletrodos foram tratados em banho de ultrassom em etanol e água deionizada, 10 min cada um. Exceto quando mencionado, antes do uso, os eletrodos de trabalho foram ativados eletroquimicamente por voltametria cíclica em solução de H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹, 10 ciclos ou até se obter um sinal estável.

No caso do SPE, não foi realizado polimento, apenas a limpeza por ultrassom e ativação eletroquímica, seguindo procedimento idêntico àquele utilizado para os eletrodos convencionais de GC e Pt.

3.3.2. Síntese do ERGO

O ERGO foi obtido por CA a partir de suspensões de diferentes concentrações de GO (0,10 a 2,0 mg.mL⁻¹) em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹. Antes da deposição, a suspensão de GO foi mantida em ultrassom por pelo menos 30 min. O programa de potencial utilizado para a deposição foi: 0,0 V por 15 s, seguido de -1,5 V (potencial de trabalho) por 20 s, com intervalo de tempo de aquisição de 0,01 s. A quantidade de ciclos foi variada entre 1 e 20 ciclos. Para a modificação do SPE com o ERGO, o procedimento adotado foi o mesmo, GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, por 5 ciclos.

3.3.3. Síntese de filmes metálicos

Os filmes metálicos foram obtidos por CV a partir de soluções contendo os cátions metálicos na concentração de 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹. O potencial foi variado entre -1,0 e 1,0 V, v = 100 mV.s⁻¹, por 15 ciclos. As cargas acumuladas foram calculadas pela integração da curva de i x t.

No caso do Au, o mesmo procedimento eletroquímico foi adotado para a síntese de filmes a partir de diferentes concentrações de HAuCl₄ (0,10 a 1,0 mmol.L⁻¹) em H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹. A quantidade de ciclos também foi variada, entre 1 e 15 ciclos. Para a modificação do SPE com o Au, o procedimento adotado foi o mesmo, HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹, por 5 ciclos.

3.3.4. Síntese de ERGO/Au

Os filmes de ERGO/Au foram obtidos, seguindo os procedimentos eletroquímicos supracitados para cada um individualmente. O filme de ERGO foi depositado sobre o eletrodo de trabalho a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 5 ciclos. Após a secagem do ERGO, foi depositado o Au a partir de solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹

em H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ por 5 ciclos. Para a modificação do SPE com o ERGO/Au, o procedimento adotado foi o mesmo.

3.3.5. Síntese de filmes poliméricos

Em todos os experimentos, os polímeros foram obtidos por eletropolimerização utilizando CV, as outras condições sintéticas foram variadas e descritas abaixo.

Síntese de P*o*-PD, P*m*-PD, PPy e politiofeno (PThi): monômero eletroativo 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, CV por 15 ciclos, entre -0,5 e 1,0 V, v = 50 mV.s⁻¹.

pH: *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em soluções de PBS, 0,2 mol.L⁻¹, com pHs de 2,5; 5,0 e 7,5, CV por 15 ciclos, entre 0,0 e 1,0 V, v = 50 mV.s⁻¹.

Concentração monômero eletroativo: soluções de *o*-PD 5,0; 7,5; 10 e 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, CV por 15 ciclos, entre 0,0 e 1,0 V, v = 50 mV.s⁻¹.

Material de eletrodo de trabalho: GC e Pt foram utilizados como eletrodo de trabalho, *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, CV por 15 ciclos, entre 0,0 e 1,0 V, v = 50 mV.s⁻¹.

3.3.6. Síntese de MIPs e NIPs

Os MIPs de Po-PD, Pm-PD e PPy foram sintetizados sobre GC por CV entre -0,5 e 1,0 V, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, por 15 ciclos, a partir de soluções 5,0; 10 e 15 mmol.L⁻¹ de monômero eletroativo em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. DA 5,0 mmol.L⁻¹ e AA 5,0 mmol.L⁻¹ foram utilizados como moléculas molde para os respectivos MIPs. No caso do filme do MIP de P*m*-PD sobre GC/ERGO/Au para DA, o procedimento foi idêntico, exceto a quantidade de ciclos de eletropolimerização, que foram 10.

Para a eletropolimerização do MIP de P*m*-PD sobre o SPE modificado com ERGO/Au, o procedimento adotado foi CV em solução de *m*-PD 15 mmol. L^{-1} e dATP 5 mmol. L^{-1} como

molécula molde em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, por 5 ciclos, entre -0,5 e 1,0 V, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

Não houve controle do tempo que monômero e molde estiveram em contato na solução antes da eletropolimerização. Os NIPs foram obtidos, seguindo o mesmo procedimento dos MIPs, exceto a adição do molde. Após a síntese MIPs e NIPs foram lavados com água e mantidos secos.

3.4. Técnicas eletroquímicas

Todas as técnicas eletroquímicas usadas nesta tese estão consolidadas e amplamente utilizadas na área, portanto, os aspectos gerais não serão abordados, apenas aqueles pertinentes ao desenvolvimento do trabalho. Extensa referência teórica é encontrada em diversos livros sobre o assunto. [84, 85].

Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em células eletroquímicas convencionais ou adaptadas, conforme descrito na Seção 3.2.2., contendo eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.

A fim de facilitar a comparação, para todos os experimentos conduzidos durante o trabalho foram utilizados eletrodos modificados e sem modificação. Além disso, ao longo dos experimentos, foram utilizados eletrodos de trabalho diversos, por isso os valores dos parâmetros eletroquímicos calculados podem variar significativamente entre os experimentos.

3.4.1. Voltametria cíclica

As CVs foram utilizadas para ativação eletroquímica do eletrodo de trabalho, caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados em diversas soluções tampão e, também, com as soluções/suspensões eletroativas de GO e K₃[Fe(CN)₆], assim como para a eletrodeposição dos filmes metálicos e eletropolimerização.

Os parâmetros básicos para a técnica, potenciais de partida, mínimo e máximo, assim como, a velocidade de varredura (v) são informados caso a caso para cada experimento.

Utilizando a sonda K_3 [Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ como espécie eletroativa e variando a *v* entre 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ foi possível obter a relação linear entre corrente de pico (i_{pico}) x $v^{1/2}$, conhecida como equação de Randles-Sevcik.

$$i_{pico} = (2,69x10^5)n^{3/2}A_{elet}CD^{1/2}v^{1/2}$$
 Equação 1

Onde, i_{pico} = corrente de pico; n = n° de elétrons transferidos, 1, no caso da sonda de K₃[Fe(CN)₆]; A_{elet} = área eletroativa, em cm²; C = concentração da espécie eletroativa, no caso, 5,0 mmol.L⁻¹; D = coeficiente de difusão, 7,6x10⁻⁶ cm².s⁻¹ e 6,5x10⁻⁶ cm².s⁻¹ para a oxidação e redução, respectivamente [84], e *v* = velocidade de varredura.

A partir do coeficiente angular da reta, determinado graficamente, foi possível calcular o valor da área eletroativa do eletrodo (A_{elet}).

Além disso, em alguns casos, os processos de transferência de carga observados nas CVs foram considerados, para isso, a área do pico (A_{pico}) foi calculada por integração.

3.4.2. Voltametria de pulso diferencial

A DPV é uma técnica mais sensível que a CV e comumente utilizada para a determinação da concentração de espécies eletroativas em solução. Dessa forma, a DPV foi utilizada para a caracterização dos eletrodos e análise das espécies eletroativas nas diversas condições avaliadas nesse trabalho, sendo que, a informação relevante obtida a partir da DPV foi a A_{pico}.

Os parâmetros utilizados para todas as DPVs foram: $E_{step} = 0,005$ V, modulação de amplitude = 0,025 V, modulação de tempo = 0,05 s e tempo de aquisição de 0,5 s. Os potenciais limites não foram os mesmos para todos os experimentos e são mostrados caso a caso.

3.4.3. Voltametria de varredura linear

A LSV foi utilizada exclusivamente para a caracterização do eletrodo com a sonda de $K_3[Fe(CN)_6] 5,0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ em KCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}.$

O experimento consiste na varredura linear de potencial próximo ao potencial de circuito aberto (*open circuit potential*, OCP) do sistema em análise, -0,15 < OCP < 0,05 V, onde é possível considerar que a polarização ocorre apenas por ativação e existe a relação linear entre E x ln |i|, curva de Tafel. A partir da curva de Tafel, dois importantes parâmetros da cinética eletroquímica do sistema em análise podem ser determinados facilmente, a corrente de troca (i₀) e potencial de equilíbrio (E_{eq}), além da resistência de polarização (R_{pol}). Os valores foram calculados com a função "*corrosion rate analysis*" do Nova 2.1.

3.4.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A EIS foi utilizada exclusivamente para a caracterização do eletrodo com a sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

O experimento consiste na aplicação de um pequeno sinal de tensão alternada, com ampla variação da frequência, ao sistema eletroquímico. A EIS é capaz de fornecer diversas informações sobre as propriedades eletroquímicas da interface eletrodo/solução, sendo que, nesta tese, o parâmetro de interesse foi a resistência de transferência de carga (R_{ct}), facilmente obtida a partir das curvas de Nyquist. Dessa forma, durante toda a tese, quando mencionado EIS, entenda-se que será apresentado as curvas de Nyquist referentes àquele dado experimento de EIS.

As medidas foram feitas em OCP, variando a frequência entre 10^5 e 10^{-1} Hz. Os valores de R_{ct} foram calculados com a função "*electrochemical circle fit*" do Nova 2.1.

3.4.5. Cronoamperometria

Como já mencionado, a CA foi a técnica empregada para a eletrorredução de GO, utilizando como ciclo de potencial 0,0 V por 15 s, seguido de -1,5 V por 20 s. Sendo um processo controlado por difusão, a alternância entre os potenciais na CA é fundamental para a renovação da interface eletrodo/solução, tornando o processo de eletrorredução de GO mais eficiente.

Além disso, no caso dos experimentos conduzidos com SPE/ERGO/Au MIP e NIP para a análise indireta dos dNTPs, a CA foi empregada durante o processo de incubação na tentativa de facilitar o processo de absorção do analito pela matriz polimérica.

4. Resultados e discussão

4.1. Limpeza/ativação do eletrodo de trabalho

A primeira etapa para a construção de um sensor com maior área superficial e melhores propriedades eletrocatalíticas é a efetiva limpeza/ativação dos eletrodos de trabalho. A fim de avaliar como o procedimento de limpeza/ativação eletroquímica dos eletrodos interfere na resposta do sistema, comparamos os sinais obtidos com GC nos seguintes casos: a) sem ativação eletroquímica e com ativação eletroquímica por CV em diferentes eletrólitos de suporte b) H₂SO₄ 0,2 mol.L⁻¹; c) PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0; d) NaOH 0,2 mol.L⁻¹, conforme descrito na Seção 3.3.1. Para os casos em que houve ativação eletroquímica, as curvas referentes ao primeiro e décimo ciclos dos voltamogramas são mostradas na Figura 4-A.

As curvas da Figura 4-A evidenciam a complexa formação de óxidos na superfície dos eletrodos de GC em cada um dos meios e estão de acordo com o descrito na literatura [86, 87]. Menores correntes de redução e oxidação são observadas entre -1,0 V e 1,0 V para H₂SO₄ e PBS e para esses eletrólitos, o comportamento eletroquímico se mantém aproximadamente constante ao longo dos ciclos avaliados. No entanto, em meio básico é observado uma significativa corrente anódica, que aumenta do primeiro para o último ciclo da CV, e, que além dos óxidos, está relacionada à eletrólise da água e evolução de oxigênio [87].



Figura 4: A) CVs referentes ao 1° e 10° ciclos da ativação eletroquímica nos eletrólitos de H₂SO₄, PBS e NaOH, todos na concentração de 0,2 mol.L⁻¹; B) Ativação eletroquímica de quatro diferentes eletrodos utilizando H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ como eletrólito de suporte.

Além disso, o uso da CV como etapa de pré-tratamento permite avaliar o eletrodo sobre a presença de qualquer material adsorvido e não removido durante a limpeza mecânica, possíveis falhas estruturais, auxiliar na estabilização do sinal e escolha de eletrodos que possuam comportamento eletroquímico similar e reprodutível [84]. A Figura 4-B mostra os voltamogramas característicos (1º ciclo) de quatro diferentes eletrodos de GC em solução de H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹, sendo que os voltamogramas obtidos foram similares e indicam a reprodutibilidade do tratamento eletroquímico.

A comparação entre as diferentes estratégias de limpeza/ativação foi realizada por DPV em solução de dopamina 50 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, Figura 5-A. A partir dos voltamogramas apresentados na Figura 5-A, foi calculada a área do pico referente à oxidação da dopamina para cada um dos casos, Figura 5-B. Assim como previsto e descrito na literatura [88], a partir da Figura 5-B é evidente que, independente do eletrólito utilizado, a ativação eletroquímica resultou em aumento do sinal, sendo a ordem crescente dos picos aqueles obtidos em H₂SO₄ < PBS < NaOH.



Figura 5: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho após o processo de ativação eletroquímica em H₂SO₄, PBS e NaOH, todos eletrólitos a 0,20 mol.L⁻¹ e na ausência de tratamento.

A influência da etapa de ativação eletroquímica também foi avaliada para a sonda inorgânica K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹ por meio das seguintes técnicas eletroquímicas, CV, DPV, LSV e EIS.

Na Figura 6-A é possível observar os voltamogramas obtidos com diferentes v para os casos sem ativação (menor i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$) e após a ativação eletroquímica com H₂SO₄ (maior i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$). A fim de evitar o excesso de curvas e erros na atribuição dos voltamogramas, apenas esses dois sistemas foram ilustrados. De acordo com o procedimento descrito na Seção 3.4.1., os valores de A_{elet} de GC para cada caso foram estimados através do coeficiente linear obtido da curva de i_{pico} x $v^{1/2}$, Figura 6-B, em conjunto com a bem descrida equação de Randles-Sevcik.

As curvas de DPV, LSV e EIS para a solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ são mostradas nas Figuras 6-C, D e E, respectivamente. Os valores de A_{pico} da DPV foram calculados por integração. Os valores i₀, E_{eq} e R_{pol} , foram calculados, seguindo o procedimento descrito na Seção 3.4.3., enquanto os valores R_{ct} foram determinados de acordo com a Seção a 3.4.4. Os valores de A_{elet} , A_{pico} , i₀, E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores calculados de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho após processo de limpeza/ativação eletroquímica nos eletrólitos H₂SO₄, PBS e NaOH, todos em concentração de 0,2 mol.L⁻¹, e na ausência de tratamento. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,10 mol.L⁻¹.

	A _{elet} -CV	A _{pico} -DPV	i ₀ -LSV	E _{eq} -LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	$(k\Omega)$	$(k\Omega)$
Sem ativação	3,6	1,6x10 ⁻⁵	24	0,22	4,1	1,70
H_2SO_4	6,3	2,5x10 ⁻⁵	30	0,21	3,7	0,14
PBS	3,1	1,8x10 ⁻⁵	29	0,22	3,8	0,80
NaOH	4,9	1,6x10 ⁻⁵	26	0,21	4,0	0,45

Da Tabela 1, analisando individualmente, é fácil observar quais casos apresentam os maiores valores para cada uma das variáveis, por exemplo, a ativação eletroquímica com H₂SO₄ foi a que resultou em maiores valores de A_{elet}, A_{pico}, e i₀, enquanto os menores valores foram obtidos para o eletrodo sem a ativação. No entanto, quando o objetivo é avaliar os dados da Tabela 1 de forma simultânea, a tarefa se torna mais complexa, e, para fazê-la, é indicado o uso de ferramentas de análise multivariada, por exemplo, a análise por PCA, que é uma transformação vetorial ortogonal baseada em critérios de variância e muito utilizada para redução de dimensionalidade e análise discriminatória [89, 90].

Dessa forma, foi realizado o cálculo do PCA a partir dos dados contidos na Tabela 1 e a construção do gráfico *biplot*, que é a representação gráfica do PCA obtido, Figura 6-F. Na Figura 6-F é possível notar seis vetores, cada um deles correspondendo a uma das variáveis da Tabela 1, e quatro pontos, cada um correspondendo a um dos casos avaliados.

De forma simplificada, o *biplot* pode ser interpretado como, quanto mais próximo o ponto estiver do vetor, mais significativo ele é para aquela variável (maior *loading*). Por exemplo, o H_2SO_4 é ponto mais próximo aos vetores referentes à A_{elet} , A_{pico} e i₀, portanto, dentre os quatro casos avaliados seria este o que apresentaria os maiores valores para essas variáveis, o que concorda com o observado para análise dos dados da Tabela 1 de forma isolada.



Figura 6: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem ativação eletroquímica e ativado em H₂SO₄ 0,2 mol.L⁻¹; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LSV; E) EIS para os eletrodos de GC sem ativação eletroquímica e aqueles ativados em H₂SO₄, PBS e NaOH, todos eletrólitos com concentração de 0,20 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,10 mol.L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Portanto, para ambas as espécies eletroativas, é evidente que, no geral, a ativação eletroquímica por CV resultou em aumento dos sinais obtidos por DPV para a dopamina e melhoras nos parâmetros eletroquímicos observados para K_3 [Fe(CN)₆], maiores A_{elet}, A_{pico} e i₀, e menores R_{ct}, R_{pol} e E_{eq}, sendo uma etapa fundamental para as posteriores modificações de eletrodo.

Comparando os eletrólitos, apesar de para a dopamina, maiores sinais terem sido obtidos em meios neutro e, principalmente, básico, a ativação com H₂SO₄ se mostrou mais eficaz para a sonda inorgânica, além disso, o procedimento em meio ácido é reprodutível e mais utilizado na literatura para esta finalidade, assim, o H₂SO₄ foi escolhido como eletrólito para ativação eletroquímica durante todo o trabalho.

4.2 Substrato

4.2.1. ERGO

Nos últimos anos, grafeno e derivados vêm sendo amplamente utilizados para modificação de eletrodos, tanto para a aplicação em eletroanalítica quanto eletrocatálise, devido às suas propriedades eletrônicas bem conhecidas [64].

O comportamento eletroquímico de GO 0,50 mg.L⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ pode ser observado na Figura 7. Para o voltamograma correspondente à solução contendo GO, é possível observar três regiões distintas e ausentes naquele obtido apenas com o eletrólito de suporte. A intensa corrente catódica da região 1 está relacionada à redução dos grupos funcionais presentes no GO, principalmente, hidroxilas, epóxidos e carboxilas [64, 91] e, consequentemente, é a faixa de potencial de interesse para a obtenção do ERGO [68, 92]. As outras duas regiões correspondem a um processo redox, sendo a 2, referente à sobreoxidação do GO, ou seja, os grupos funcionais do GO são oxidados a espécies ainda mais ricas em oxigênio, e a 3 é relacionada à redução dos óxidos obtidos na 2 [68].



Figura 7: CVs obtidos na ausência e na presença de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito de suporte.

De acordo com a literatura, o ERGO pode ser obtido de diversas formas, por meio de técnicas potenciodinâmicas ou potenciostáticas, variando potenciais, ciclos de potencial e quantidade de ciclos de deposição, a fim de obtê-lo com estruturas e propriedades eletroquímicas diferentes e que atendam melhor a uma determinada aplicação [93].

Assim como descrito na Seção 3.3.2., neste trabalho, o ERGO foi obtido por CA com programa de potencial, sendo 1 ciclo de deposição: 0,0 V por 15 s, seguido de -1,5 V (potencial de trabalho) por 20 s. As curvas referentes ao programa de potencial utilizado, com 10 ciclos de repetição, na ausência e na presença de GO 0,50 mg.L⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito de suporte, são mostradas na Figura 8.



Figura 8: Cronoamperogramas na ausência e na presença de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ como eletrólito de suporte, 10 ciclos.

A partir da Figura 8, já no primeiro ciclo, é evidente o aumento de ambas as correntes quando o GO está presente na célula eletroquímica. As correntes negativa e positiva estão, respectivamente, relacionadas à redução do GO para a formação de ERGO e à oxidação GO a outros óxidos superiores. É importante salientar que os processos nos potenciais utilizados, a princípio, não são reversíveis, ou seja, não necessariamente o ERGO obtido em -1,5 V será novamente oxidado em 0,0 V. Além disso, outro fator que corrobora o acentuado acréscimo dos valores das correntes na presença do GO é devido ao aumento da capacitância da dupla camada e que está relacionada à deposição do próprio ERGO sobre o eletrodo de trabalho, consequentemente, também é o aumento da capacitância que justifica a diferença das correntes ao longo dos ciclos de deposição.

O método proposto para a deposição do ERGO foi avaliado por CV e DPV em PBS, pH 7,0, Figuras 9-A e B, respectivamente. O aumento do sinal em ambos os casos está relacionado ao aumento da corrente capacitiva e serve de evidência da efetiva deposição de ERGO sobre o eletrodo de trabalho.



Figura 9: A) CVs; B) DPVs obtidos para os eletrodos de GC e GC/ERGO em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

A modificação do eletrodo também pode ser confirmada macroscopicamente através da presença de depósitos de material granular e não uniforme na superfície do eletrodo de trabalho, Figura 10-A. Além disso, por comparação com o SPE, o eletrodo de SPE modificado com ERGO foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), Figura 10-B e C, respectivamente. Das imagens de SEM, é possível observar que o eletrodo não modificado apresenta uma estrutura granular de tamanhos uniformes, enquanto o ERGO apresenta uma estrutura aparentemente mais lamelar, o que é condizente com a literatura a respeito da estrutura do RGO [68, 94].



Figura 10: A) Fotografia de eletrodos de GC modificados com ERGO; B) Imagem de SEM de SPE de carbono sem modificação (ampliação: 50000 x); C) SEM de SPE de carbono recoberto com ERGO (ampliação: 50000 x).

Desta maneira, o ERGO foi avaliado como material de substrato para oxidação da dopamina e caracterização eletroquímica do material obtido com a sonda K₃[Fe(CN)₆]. Na tentativa de obter um material com maior capacidade de promover o processo de transferência de carga, o procedimento para a obtenção de ERGO foi otimizado por meio da análise das seguintes variáreis: a) concentração de GO na suspensão de partida; b) quantidade de ciclos de eletrorredução. A seguir cada um dos casos é avaliado separadamente.

4.2.1.1. ERGO- concentração de GO na suspensão de partida

Eletrodos de GC modificados com ERGO obtidos a partir de diferentes concentrações de GO na suspensão de partida: 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ e 10 ciclos de eletrorredução foram avaliados para a eletrooxidação de DA 50 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, Figura 11-A.



Figura 11: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrorredução de GO 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, 10 ciclos.

A partir da Figura 11-A é evidente que, independente da concentração de GO utilizada, a modificação do eletrodo com ERGO resultou em um significativo aumento do sinal referente à oxidação da espécie eletroativa. Além disso, como previsto, também é notável que quanto maior a concentração do GO, maior a corrente capacitiva no sistema. Integrando os picos para cada um dos casos, Figura 11-B, é possível observar que a maior área foi obtida quando a concentração de GO 0,50 mg.mL⁻¹ foi utilizada.

As curvas relacionadas à CV, $i_{pico} \ge v^{1/2}$, DPV, LSV e EIS para os eletrodos modificados a partir de suspensões com diferentes concentrações de GO são apresentadas nas Figuras 12-A, B, C, D e E, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹. A fim de evitar o excesso de curvas e erros na atribuição das curvas, a Figura 12-A apresenta apenas os voltamogramas obtidos com GO 0,50 mg.L⁻¹ (maior i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$) e GC sem modificação (menor i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$).

Os dados relevantes, A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} foram calculados, sumarizados na Tabela 2 e utilizados para a construção do PCA, Figura 12-F.

Tabela 2: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrorredução de GO 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, 10 ciclos. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

	A _{elet} -CV	A _{pico} -DPV	i ₀ -LSV	E _{eq} -LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	$(k\Omega)$	$(k\Omega)$
GC	0,84	8,4x10 ⁻⁶	24	0,22	6,1	3,2
GC-GO						
0,10 mg.mL ⁻¹	2,2	2,3x10 ⁻⁵	35	0,21	4,1	2,3
GC-GO						
0,25 mg.mL ⁻¹	3,9	1,9x10 ⁻⁵	34	0,21	3,8	2,1
GC-GO						
0,50 mg.mL ⁻¹	5,6	$4,3x10^{-5}$	33	0,21	3,2	1,5
GC-GO						
1,0 mg.mL ⁻¹	3,9	$1,2x10^{-5}$	37	0,21	2,9	5,3
GC-GO						
2,0 mg.mL ⁻¹	2,9	1,8x10 ⁻⁵	57	0,22	2,7	11

Da Figura 12-F, é possível observar que o eletrodo que mais se diferencia dos demais, na região das maiores $A_{elet} e A_{pico} e$ menores $R_{ct} e R_{pol}$, foi aquele obtido com GO 0,50 mg.mL⁻¹. Dessa forma, sendo a modificação com GO 0,50 mg.mL⁻¹ aquela que apresentou maior sinal para a eletrooxidação da dopamina e melhores propriedades eletroquímicas com o K₃[Fe(CN)₆], esta foi a condição escolhida para as próximas etapas desse estudo.



Figura 12: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/ERGO obtido a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em N₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, 10 ciclos; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LPV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/ERGO obtidos a partir de suspensão de GO 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ em N₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

4.2.1.2. ERGO- quantidade de ciclos de eletrorredução

A otimização da quantidade de ciclos de eletrorredução de GO foi avaliada entre 1 e 20 ciclos (1 ciclo = 0,0 V por 15 s, seguido de -1,5 V por 20 s) com suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ e comparadas com o GC sem modificação. As curvas de DPV obtidas para a DA 50 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹ são apresentadas na Figura 13-A.



Figura 13: A) DPVs; B) A_{pico} obtidas em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10, 15 e 20 ciclos de eletrorredução.

Assim como no caso da concentração de GO na suspensão de partida, é possível observar que quanto mais ciclos, maior a corrente capacitiva, ou seja, maior a quantidade de material depositado sobre o eletrodo, evidenciando que o procedimento utilizado é eficiente para a eletrorredução do GO. Além disso, para todos os eletrodos modificados com o ERGO, houve o aumento significativo do sinal de oxidação da dopamina. Integrando os picos da Figura 13-A, foi possível construir o gráfico da Figura 13-B, onde é possível notar que a maior área de pico foi aquela obtida para o eletrodo modificado através da eletrorredução de GO por 10 ciclos.

Os eletrodos modificados com filmes de ERGO obtidos a partir de diferentes quantidades de ciclos também foram caracterizados com K_3 [Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ por meio de CV (ver Figura 12-A), curva de i_{pico} x v^{1/2}, DPV, EIS e LPV, Figuras 14-A, B, C e D, respectivamente. Para este experimento as curvas de CV não foram apresentadas, visto que o eletrodo com maior i_{pico} com v =25 mV.s⁻¹ foi aquele obtido com GO 0,50 mg.mL⁻¹ e 10 ciclos. Esse eletrodo foi utilizado tanto no experimento sobre a concentração de GO na suspensão de partida quanto naquele sobre a quantidade de ciclos, portanto, as curvas são as mesmas da Figura 12-A. Os dados relevantes, A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct}, foram calculados para cada eletrodo, sumarizados na Tabela 3 e utilizados para a construção do PCA, Figura 14-E.

Tabela 3: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10, 15 e 20 ciclos de eletrorredução. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

	A _{elet} -CV	A _{pico} -DPV	i ₀ -LSV	E _{eq} -LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	(kΩ)	$(k\Omega)$
GC	0,84	8,4x10 ⁻⁶	24	0,22	6,1	3,3
GC-GO						
1 ciclo	2,2	9,8x10 ⁻⁶	29	0,21	3,8	3,2
GC-GO						
5 ciclos	3,9	1,9x10 ⁻⁵	40	0,22	4,9	2,0
GC-GO						
10 ciclos	5,6	4,3x10 ⁻⁵	33	0,21	3,2	1,5
GC-GO						
15 ciclos	3,9	1,1x10 ⁻⁵	32	0,21	4,7	2,8
GC-GO						
20 ciclos	2,9	7,2x10 ⁻⁶	33	0,22	4,2	3,1



Figura 14: A) Curva de $i_{pico} \ge v^{1/2}$; B) DPV; C) LSV; D) EIS para os eletrodos de trabalho sem modificação e GC/ERGO obtidos a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10, 15 e 20 ciclos de eletrorredução. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹. E) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

A partir da Figura 14-E, é possível notar que o eletrodo com melhores propriedades eletroquímicas, mais próximo dos vetores de A_{elet} , A_{pico} e i_0 e distante dos R_{ct} e R_{pol} , foi aquele obtido por modificação com o ERGO 10 ciclos, além de ter sido o eletrodo que apresentou maior sinal para a oxidação eletroquímica da dopamina.

Dessa forma, quando avaliado apenas o ERGO como material de substrato, a combinação que resultou no eletrodo modificado com maior capacidade de eletrooxidar a DA e melhores propriedades eletroquímicas com o K_3 [Fe(CN)₆], foi GO 0,50 mg.mL⁻¹ na suspensão de partida e 10 ciclos de eletrorredução.

4.2.2. Metais

Nas áreas da eletrocatálise e eletroanalítica, a eletrodeposição de filmes metálicos é uma das estratégias mais antigas e consolidadas para modificação de eletrodos de trabalho.

Os filmes metálicos foram obtidos por eletrodeposição, utilizando CV, 15 ciclos, 100 mV.s⁻¹, a partir soluções de AgNO₃, HAuCl₄, CuCl₂, Pd(OAc)₂ e H₂PtCl₆, todas com a concentração de 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹. Para cada sistema avaliado, as curvas correspondentes ao primeiro ciclo da CV e a carga acumulada durante todos os ciclos da voltametria são apresentadas na Figura 15-A e B, respectivamente.



Figura 15: A) CVs referentes à eletrodeposição de Ag, Au, Cu, Pd e Pt 0,50 mmol. L^{-1} em H₂SO₄ 0,5 mol. L^{-1} , 1° ciclo; B) Carga acumulada para o processo de eletrodeposição de cada um dos metais durante 15 ciclos.

A partir da Figura 15-A é possível observar uma intensa corrente de redução, iniciando por volta de -0,75 V para Au, Pd e, principalmente, Pt. Este fato é esperado e está relacionado à grande capacidade desses metais em reduzirem a água em meio ácido, liberando gás hidrogênio [95, 96]. Considerando os valores de carga acumulada da Figura 15-B foi possível estimar a espessura dos filmes metálicos, Tabela 4, através da Equação 2.

espessura =
$$QM/nF\rho A_{geo}$$
 Equação 2

Onde, Q = carga acumulada, Coulomb; M = massa atômica do cátion metálico ou massa molecular do monômero, g.mol⁻¹; n = n^o de elétrons transferidos no processo eletroquímico; F = constante de Faraday, 96500 C.mol⁻¹; ρ = densidade do filme depositado, em g.cm⁻³; A_{geo} = área geométrica do eletrodo, cm².

		MM		ρ^*	F	A_{geo}	espessura
Eletrodo	Q (C)	(g/mol)	Elétrons	(g/cm^3)	$(x10^3 \text{ C/mol})$	(cm^2)	(µm)
Ag	$4,2x10^{-2}$	108	1	10	96,5	7,1x10 ⁻²	0,64
Au	2,9x10 ⁻¹	198	3	19	96,5	7,1x10 ⁻²	1,5
Cu	$4,4x10^{-2}$	63,5	2	9,0	96,5	7,1x10 ⁻²	0,23
Pd	$4,4x10^{-1}$	106	2	12	96,5	7,1x10 ⁻²	2,9
Pt	1,7	195	2	21	96,5	$7,1x10^{-2}$	12

Tabela 4: Valores calculados da espessura dos filmes de Ag, Au, Cu, Pd e Pt eletrodepositados sobre GC a partir de solução de cátion metálico $0,50 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ em H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

* Foi considerada a densidade *bulk* do metal.

Comparando os dados contidos na Tabela 4, é evidente a discrepância entre os valores de carga e espessura dos filmes de Pd e Pt para os demais, sendo essa, outra evidência de que, no caso desses metais, a corrente observada está principalmente relacionada à redução do solvente e não ao processo de formação do filme metálico, o que torna a eletrodeposição desses metais pouco reprodutível. No caso da Ag e do Cu, eles são metais que não apresentam boas propriedades eletrocatalíticas (i₀) para a reação de evolução de hidrogênio [96], isto explica os menores valores de carga e espessura estimada, sendo provável que a maior parte da carga seja, de fato, consumida para a deposição dos metais. O Au apresenta um comportamento intermediário entre os dois grupos, o que torna sua eletrodeposição por CV viável e de certa forma reprodutível, o que pode ser confirmado pela similaridade entre as curvas correspondentes aos primeiros ciclos da eletrorredução de Au sobre quatro diferentes eletrodos de GC, Figura 16.



Figura 16: CVs referentes à eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ sobre quatro diferentes eletrodos de GC.

A fim de avaliar se a deposição dos filmes metálicos se deu de forma efetiva, os eletrodos modificados foram analisados por meio de CV em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, Figura 17. Para os eletrodos recobertos com Ag, Au, Pd e Pt, é possível observar picos de redução em aproximadamente -0,05 V, 0,25 V, -0,30 V e -1,0 V, respectivamente, sendo que os picos referentes aos dois últimos metais foram os de maior intensidade. Esses picos são característicos de cada um dos metais e estão relacionados à redução de óxidos metálicos formados na superfície do eletrodo modificado. Nenhum pico é observado para o GC, além disso, em meio neutro, o pico de redução referente ao Cu é bem menos intenso, sendo mais relevante em pHs maiores [97].


Figura 17: CVs obtidos para os eletrodos de GC e GC modificado com Ag, Au, Cu, Pd e Pt em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Dessa forma, foi feita a avaliação do uso de eletrodos de GC modificados com filmes metálicos de Ag, Au, Cu, Pd e Pt para a eletrooxidação da dopamina, assim como, a avaliação do comportamento eletroquímico dos eletrodos obtidos na presença de K₃[Fe(CN)₆].

As curvas de DPV obtidas para os eletrodos modificados com diferentes filmes metálicos em solução de dopamina 50 μ mol.L⁻¹ e PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0 são apresentadas na Figura 18-A. A partir dos voltamogramas da Figura 18-A, foi calculada A_{pico} referente à oxidação da espécie eletroativa para cada um dos casos, Figura 18-B. Independente do metal utilizado, é evidente que a modificação do eletrodo resultou em um aumento do sinal referente à eletrooxidação da dopamina, sendo que, os metais que apresentaram melhores desempenho foram, em ordem crescente, Pd< Pt< Ag< Cu< Au.



Figura 18: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com Ag, Au, Cu, Pd e Pt.

O comportamento eletroquímico dos eletrodos de GC sem modificação e GC modificado com os diferentes metais em relação à sonda de K₃[Fe(CN)₆] foi avaliado por CV, curva de $i_{pico} \ge v^{1/2}$, DPV, LSV e EIS, Figuras 19-A, B, C, D e E, respectivamente. A fim de evitar o excesso de curvas e erros na atribuição das curvas, a Figura 19-A apresenta apenas os voltamogramas obtidos para o GC/Pt (maior i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$) e GC sem modificação (menor i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$). Os dados relevantes, A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct}, foram calculados, sumarizados na Tabela 5 e utilizados para a construção do PCA, Figura 19-F.

Tabela 5: Valores calculados de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e modificados com Ag, Au, Cu, Pd e Pt. Todos os dados foram obtidos em solução de K_3 [Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

	A _{elet} -CV	A _{pico} -DPV	i ₀ -LSV	E _{eq} -LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	$(k\Omega)$	$(k\Omega)$
GC	2,1	4,9x10 ⁻⁶	35	0,22	8,3	2,6
GC/Ag	2,9	1,4x10 ⁻⁵	36	0,22	4,1	0,62
GC/Au	5,7	1,6x10 ⁻⁵	40	0,20	5,8	0,46
GC/Cu	2,2	7,2x10 ⁻⁶	25	0,22	5,1	1,5
GC/Pd	4,5	1,6x10 ⁻⁵	30	0,22	3,8	0,68
GC/Pt	5,7	1,7x10 ⁻⁵	37	0,20	4,6	1,1

Assim como previsto, os pontos referentes a GC/Au e GC/Pt estão próximos no PCA, evidenciando que os dois metais apresentam desempenho semelhante e superior aos demais. A principal justificativa para os eletrodos modificados com Au e Pt apresentarem propriedades tão diferentes do GC está relacionada à cinética do processo de transferência de carga, que, para esses metais apresenta maior constante de velocidade, assim como sugerem os maiores valores de i₀ [85].

Visto que o Au foi o metal que apresentou maior capacidade para a eletrooxidação da dopamina, melhores propriedades eletroquímicas em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$, junto com a Pt, além de ser um metal de eletrodeposição reprodutível quando comparado à Pt, o Au foi escolhido como material de modificação nos estudos posteriores.



Figura 19: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Pt; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LSV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/metal obtidos a partir de AgNO₃, HAuCl₄, CuCl₂, C₄H₆O₄Pd e H₂PtCl₆ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

4.2.3. Filmes de Au

Como já mencionado, metais apresentam picos de redução e oxidação característicos e facilmente observados em técnicas eletroquímicas potenciodinâmicas. No caso do Au, por CV, Figura 20-A, dois picos são observados, um no sentido positivo da varredura, em aproximadamente 0,60 V, pico 1, referente à formação de óxidos do metal, e o outro, no sentido reverso, pico 2, 0,22 V, referente à redução dos óxidos formados anteriormente. Assim como o previsto, para a DPV, Figura 20-B, efetuando a varredura entre -1,0 e 1,0 V, observou-se apenas o pico referente à oxidação do metal, pico 1.

Em ambos os casos, nenhum pico foi observado para o eletrodo de GC sem modificação, portanto, o uso de técnicas voltamétricas é uma estratégia simples e útil para caracterizar o eletrodo modificado e confirmar a formação do filme de Au sobre o eletrodo de trabalho.



Figura 20: A) CVs; B) DPVs obtidas para os eletrodos de GC e GC/Au em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

A modificação do eletrodo de trabalho com Au também pode ser confirmada macroscopicamente, pois o metal se apresenta na forma de um filme contínuo, sem rugosidades e de coloração dourada, característica do Au, Figura 21-A. Além disso, por comparação com o SPE sem modificação, o eletrodo modificado com Au foi caracterizado por SEM,

Figuras 21-B e C, respectivamente. Das imagens de SEM, é possível observar que o eletrodo de SPE apresenta uma estrutura granular de tamanhos uniformes, enquanto o eletrodo modificado com Au apresenta uma estrutura de camadas contínuas e sobrepostas. É importante ressaltar que, diferentemente do descrito na literatura, onde estruturas nanométricas de Au foram obtidas variando as condições da eletrodeposição [98–100], neste trabalho, as imagens de SEM não dão indícios da obtenção de nanopartículas de Au e sim de filmes metálicos.



Figura 21: Fotografia de eletrodos de GC modificado com Au; B) SEM de SPE de carbono sem modificação (ampliação: 50000 x); C) SEM de SPE de carbono recoberto com Au (ampliação: 50000 x).

Desta maneira, o Au foi avaliado como material de substrato para oxidação da dopamina e caracterização eletroquímica do material obtido com K_3 [Fe(CN)₆]. Na tentativa de obter um material com melhores propriedades eletrocatalíticas, o procedimento para a obtenção de filmes metálicos de Au foi otimizado através da análise das seguintes variáreis: a) concentração de HAuCl₄ na solução de partida; b) quantidade de ciclos de eletrodeposição do metal. A seguir cada um dos casos é avaliado separadamente.

4.2.3.1. Au- concentração de HAuCl₄ solução de partida

Eletrodos de GC modificados com filmes de Au obtidos a partir de diferentes concentrações de HAuCl₄ na solução de partida: 0,10; 0,25; 0,50, 1,0 mmol.L⁻¹ em H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ e 10 ciclos de eletrodeposição foram avaliados para a eletrooxidação de dopamina 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, Figura 22-A.

A partir da Figura 22-A é possível observar que a deposição de Au resultou em um aumento do sinal referente à oxidação da espécie eletroativa, independente da concentração de HAuCl₄ utilizada. Integrando os picos para cada um dos casos, Figura 22-B, é possível observar que a maior área foi obtida quando a concentração de cátion metálico em solução foi de 0,50 mmol.L⁻¹.



Figura 22: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹, 10 ciclos.

As curvas relacionadas à CV, $i_{pico} x v^{1/2}$, DPV, LSV e EIS para os eletrodos modificados a partir de soluções contendo diferentes concentrações de HAuCl₄ são apresentadas nas Figuras 23-A, B, C, D e E, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. A fim de evitar o excesso de curvas e erros na atribuição das curvas, a Figura 23-A apresenta apenas os voltamogramas obtidos com HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ (maior i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$) e GC sem modificação (menor i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$).

Os dados relevantes, A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{ct} e R_{pol} foram calculados, sumarizados na Tabela 6 e utilizados para a construção do PCA, Figura 23-F.

Tabela 6: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹, 10 ciclos. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

	A _{elet} -CV	A _{pico} -DPV	i ₀ -LSV	E _{eq} -LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	$(k\Omega)$	$(k\Omega)$
GC	2,2	4,8x10 ⁻⁶	22	0,25	9,6	10
GC-HAuCl ₄						
0,10 mmol.L ⁻¹	5,4	1,1x10 ⁻⁵	35	0,23	4,8	5,7
GC-HAuCl ₄						
0,25 mmol.L ⁻¹	5,1	1,5x10 ⁻⁵	35	0,24	4,5	2,3
GC-HAuCl ₄						
0,50 mmol.L ⁻¹	5,7	2,1x10 ⁻⁵	41	0,22	3,5	0,46
GC-HAuCl ₄						
1,00 mmol.L ⁻¹	6,2	1,8x10 ⁻⁵	46	0,21	3,8	0,56

Da Figura 23-F, é possível observar que os eletrodos que mais se diferenciam dos demais, na região das maiores A_{elet}, A_{pico} e i₀, além de menores R_{ct}, R_{pol} e E_{eq} foram aqueles obtidos com HAuCl₄ 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹. Dessa forma, sendo a modificação com HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ aquela que também apresentou maior sinal para a eletrooxidação da dopamina, esta foi a condição escolhida para as próximas etapas desse estudo.



Figura 23: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtido com solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LPV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtidos a partir de solução de HAuCl₄ 0,10; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

4.2.3.2. Au- quantidade de ciclos de eletrodeposição

A otimização da quantidade de ciclos de eletrodeposição de Au foi avaliada entre 1 e 15 ciclos de CV com solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ e comparadas com o GC sem modificação. As curvas de DPV obtidas para a DA 50 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹ são apresentadas na Figura 24-A.

Assim como no caso anterior, é observado que para todos os eletrodos modificados com Au, houve ao menos um pequeno aumento do sinal de oxidação da dopamina. Integrando os picos da Figura 24-A, foi obtido o gráfico da Figura 24-B, onde é possível notar que a maior A_{pico} foi aquela obtida para o eletrodo modificado através da eletrodeposição de HAuCl₄ por 10 ciclos.



Figura 24: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10 e 15 ciclos.

Os eletrodos modificados com Au obtidos através de diferentes quantidades de ciclos de eletrodeposição também foram caracterizados com $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ por meio de CV, curva de i_{pico} x $v^{1/2}$, DPV, LSV e EIS, Figuras 25-A, B, C, D e E, respectivamente. A fim de evitar o excesso de curvas e erros na atribuição das curvas, a

Figura 25-A apresenta apenas os voltamogramas obtidos com HAuCl₄ por 15 ciclos (maior i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$) e GC sem modificação (menor i_{pico} para o processo de oxidação com $v = 25 \text{ mV.s}^{-1}$). Os dados relevantes, A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} foram calculados para cada eletrodo e sumarizados na Tabela 7 e utilizados para a construção do PCA, Figura 25-F.

Tabela 7: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos de trabalho sem modificação e obtidos pela eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10 e 15 ciclos. Todos os dados foram obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

	A _{elet} -CV	A _{pico} -DPV	i ₀ -LSV	E _{eq} -LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	$(k\Omega)$	$(k\Omega)$
GC	1,5	3,3x10 ⁻⁶	13	0,24	13	8,3
GC-HAuCl ₄						
1 ciclo	4,8	1,6x10 ⁻⁵	25	0,21	5,0	1,4
GC-HAuCl ₄						
5 ciclos	5,1	2,0x10 ⁻⁵	25	0,22	5,1	1,7
GC-HAuCl ₄						
10 ciclos	5,9	1,8x10 ⁻⁵	29	0,21	4,3	1,0
GC-HAuCl ₄						
15 ciclos	5,3	$1,7x10^{-5}$	30	0,21	4,0	0,71

A partir da Tabela 7 é possível notar que os valores calculados para os eletrodos modificados com Au são bem diferentes daqueles do GC sem Au e não variam tanto entre si, sendo que os maiores valores de A_{elet} , A_{pico} e i₀ foram obtidos para os eletrodos de Au 15, 5 e 10 ciclos, respectivamente. Esta é a razão dos pontos referentes aos eletrodos modificados com filme metálico estarem tão dispersos do lado esquerdo do gráfico, próximo aos vetores de A_{elet} , A_{pico} e i₀, enquanto o GC se encontra isolado no lado oposto, próximo aos vetores restantes. Dessa forma, a quantidade de ciclos que resultou em melhores propriedades eletroquímicas foi a de Au 10 ciclos, que junto com o eletrodo de Au 15 ciclos, apresentam baixos valores de R_{ct}, R_{pol} e E_{eq}, além da maior capacidade de oxidação da dopamina.



Figura 25: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtido com solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 15 ciclos; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LSV; E) EIS para os eletrodos de GC sem modificação e GC/Au obtidos a partir de suspensão de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ por 1, 5, 10 e 15 ciclos. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Sendo assim, quando avaliado apenas o Au como material de substrato, a combinação que gerou o eletrodo modificado com maior capacidade de eletrooxidar a dopamina e melhores propriedades eletroquímicas com K_3 [Fe(CN)₆] foi HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ na solução de partida e 10 ciclos de eletrodeposição.

4.2.4. ERGO/Au

Apesar de, individualmente, os eletrodos modificados obtidos a partir de GO 0,50 mg.mL⁻¹ e 10 ciclos de eletrorredução e HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ e 10 ciclos de eletrodeposição terem apresentado melhores performances eletroquímicas, é provável que o material compósito de ERGO e Au (ERGO/Au) obtido nessas condições gere um filme muito espesso e que acabe por prejudicar o desempenho do eletrodo modificado [84]. Além disso, vale lembrar que o material de substrato ainda será recoberto pelo MIP, o que vai aumentar ainda mais a espessura do filme compósito final (substrato + MIP). Portanto, foi decidido que a condição para a obtenção do ERGO/Au seria GO 0,50 mg.mL⁻¹ e 5 ciclos de eletrorredução seguido da eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ por 5 ciclos.

A Figura 26 apresenta os voltamogramas obtidos para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au em solução de PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0. Para o eletrodo de GC/ERGO é possível observar o aumento da corrente capacitiva e curva similar àquela da Figura 8-A. Em relação ao Au, é evidente o pico de redução, conforme descrito na Seção 4.2.3. e ilustrado na Figura 20-A. Finalmente, para o eletrodo de GC/ERGO/Au são observadas características tanto do ERGO quanto do Au, o que é evidenciado pelo significativo aumento da área do pico de redução dos óxidos metálicos, indicando que a estratégia proposta é eficiente para a obtenção do compósito. Além disso, como será discutido posteriormente, o intenso sinal de redução do ERGO/Au pode ser um importante parâmetro operacional para os sensores eletroquímicos baseados em MIPs, e, até mesmo, uma estratégia de leitura por si só.



Figura 26: CVs obtidas para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/ERGO/Au em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

A modificação do eletrodo com ERGO/Au pode ser confirmada macroscopicamente através da presença de depósitos de material granular e do filme dourado metálico, característico do ERGO e Au, respectivamente, na superfície do eletrodo de trabalho. A fim de ilustrar os perfis dos eletrodos modificados, a Figura 27-A apresenta os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au lado a lado. Além disso, por comparação, os eletrodos de SPE, SPE/ERGO, SPE/Au e SPE/ERGO/Au, Figuras 27-B, C, D e E, respectivamente, foram caracterizados por SEM. Das imagens de SEM, é possível observar que a superfície do eletrodo de ERGO/Au apresentou estrutura similar ao de Au, sendo que as lamelas referentes ao ERGO não foram observadas.



Figura 27: A) Fotografia de eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au; SEMs (ampliação: 50000 x) para B) SPE de carbono; C) SPE/ERGO; D) SPE/Au; E) SPE/ERGO/Au.

Em seguida, os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au foram avaliados para a eletrooxidação de dopamina 50 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, Figura 28-A.



Figura 28: A) DPVs; B) A_{pico} obtidos em solução DA 50 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au.

Assim como já mencionado nas seções anteriores, a partir da Figura 28-A é possível observar que em relação ao GC, a modificação do eletrodo de trabalho com Au e ERGO resultaram em um aumento do pico referente à oxidação da dopamina, sendo que o sinal para este último, foi relevante. Para o eletrodo de GC/ERGO/Au, o sinal observado é apenas um pouco maior e comparável ao do GC/ERGO. Integrando os picos para cada um dos casos, Figura 28-B, é possível observar que a área referente ao sinal do GC/ERGO/Au é aproximadamente igual à soma das áreas obtidas para os eletrodos modificados com ERGO e o Au, sendo que a contribuição do metal para o aumento do sinal não é tão significativa quanto à do ERGO.

Os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au também foram caracterizados com K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ por meio de CV, curva de i_{pico} x $v^{1/2}$, DPV, LPV e EIS Figuras 29-A, B, C, D e E, respectivamente. A fim de evitar o excesso de curvas e erros na atribuição das curvas, a Figura 29-A apresenta apenas os voltamogramas obtidos com o GC/ERGO/Au (maior i_{pico} para o processo de oxidação com v = 25 mV.s⁻¹) e GC (menor i_{pico} para o processo de oxidação com v = 25 mV.s⁻¹). Os dados relevantes, A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} foram calculados para cada eletrodo, sumarizados na Tabela 8 e utilizados para a construção do PCA, Figura 29-F.

	A _{elet} -CV	Apico-DPV	io-LSV	Eeq-LSV	R _{pol} -LSV	R _{ct} -EIS
Eletrodo	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(u.a.)	(µA)	(V)	(kΩ)	$(k\Omega)$
GC	3,9	1,5x10 ⁻⁵	26	0,23	5,3	1,5
GC/ERGO	5,8	5,3x10 ⁻⁵	33	0,23	4,6	0,95
GC/Au	5,2	3,0x10 ⁻⁵	49	0,22	3,8	0,94
GC/ERGO/Au	9,3	7,8x10 ⁻⁵	67	0,21	2,6	0,59

Tabela 8: Valores calculados de A_{elet} , A_{pico} , i_0 , E_{eq} , R_{ct} e R_{pol} para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au. Todos os dados foram obtidos em solução de K_3 [Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

A partir da Tabela 8 e, principalmente, da Figura 29-F, é possível notar que para a sonda de K_3 [Fe(CN)₆] existe um efeito sinérgico entre os filmes de ERGO e Au e, consequentemente, uma melhora das propriedades eletroquímicas do eletrodo modificado com o compósito de ERGO/Au.



Figura 29: A) CV com v = 25, 50, 75 e 100 mV.s⁻¹ para os eletrodos de GC e GC/ERGO/Au; B) Curva de i_{pico} x $v^{1/2}$; C) DPV; D) LPV; E) EIS para os eletrodos de GC, GC/ERGO, GC/Au e GC/ERGO/Au. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. F) PCA considerando as variáveis de A_{elet}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Por fim, embora o ERGO tenha sido por si só o material de substrato responsável pelo considerável aumento do sinal referente à oxidação da dopamina, para os experimentos com a sonda de K₃[Fe(CN)₆], foi observado que para o eletrodo de ERGO/Au, o processo eletroquímico se dá de forma mais eficiente. Além disso, o eletrodo de ERGO/Au permite a avaliação da eficácia do processo de extração do MIP, como será visto em mais detalhes na Seção 4.4.4.2. Dessa forma, o compósito de ERGO/Au foi utilizado como material de substrato nas próximas etapas deste trabalho.

4.3. Eletropolimerização

4.3.1. Características gerais

No que diz respeito ao conceito, teoria e aplicações da eletropolimerização, é possível afirmar que boa parte do avanço na área advém diretamente e está atrelado ao desenvolvimento dos polímeros condutores a partir dos anos 1970 [101].

A eletropolimerização é uma das principais rotas para a síntese dos polímeros condutores, que, de maneira geral, são sistemas orgânicos altamente conjugados que, após dopagem, são capazes de transportar carga ao longo da cadeia principal da macromolécula. A princípio, os polímeros podem sofrer dopagem do tipo *n* ou *p*, assim como os semicondutores, o que leva a um significativo aumento da condutividade do material, alguns exemplos de polímeros deste tipo são: poliacetileno, poli(*p*-fenilenovinileno), polianilina, polipirrol e politiofeno [102].

Diversos outros monômeros também podem ser eletropolimerizados, no entanto, se a estrutura da cadeia obtida não apresentar sistemas altamente conjugados, este material não será, a princípio, um eficiente transportador de cargas. Nesta classe de material é possível citar: poli(*o*-fenilenodiamina), polifenol e poli(*o*-aminofenol) [38, 44].

A eletropolimerização é comumente realizada em uma célula eletroquímica convencional, contendo três eletrodos. A reação se dá de forma simples, rápida, com a

deposição direta do filme polimérico sobre o eletrodo de trabalho e sem geração de resíduos. Algumas das principais variáveis que interferem na reação e, consequentemente, nas propriedades dos filmes obtidos são: monômero e concentração do monômero eletroativo, pH, material de eletrodo de trabalho, solvente, eletrólito de suporte, temperatura [103], técnica e parâmetros eletroquímicos utilizados para a deposição [104]. A influência de alguns desses parâmetros na síntese do filme polimérico será avaliada a seguir.

4.3.2. Monômeros eletroativos

Os monômeros eletroativos avaliados neste trabalho foram *o*-fenilenodiamina, *m*-fenilenodiamina, pirrol e tiofeno, sendo os dois últimos precursores de polímeros condutores, enquanto os dois primeiros podem ser considerados como precursores de polímeros redox [105]. No caso dos polímeros redox, o transporte de carga na macromolécula se dá pelo mecanismo de *hopping*, logo, a condutividade elétrica desses sistemas é muito menor do que aquela observada para os polímeros condutores [105, 106].

Todos os monômeros são solúveis em água, ao menos nas condições reacionais utilizadas, sendo essa condição necessária para a aplicação em biossensores e/ou sensores químicos para análise de espécies de interesse biológico, comerciais e passíveis de polimerização por via eletroquímica.

Os polímeros foram obtidos por CV a partir de solução contendo o monômero eletroativo na concentração de 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, entre -0,5 e 1,0 V, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos, utilizando GC como eletrodo de trabalho.

Os voltamogramas referentes à eletropolimerização de *o*-PD, *m*-PD, Py e Thi são apresentados nas Figuras, 30-A, 31-A, 32-A e 33-A, respectivamente, enquanto os mecanismos genéricos de cada uma das reações são apresentados nas Figuras, 30-B, 31-B, 32-B e 33-B, respectivamente.

Para a eletropolimerização da *o*-PD, Figura 30-A, é possível observar um intenso pico próximo a 0,20 V para o primeiro ciclo da CV e a progressiva redução da corrente observada a partir do segundo ciclo em diante. Este pico de corrente está relacionado à oxidação das espécies em solução pelo eletrodo de trabalho e a formação dos cátions radicais, sejam eles os monômeros no início, ou os dímeros, trímeros, oligômeros e até polímeros ao longo da reação [107]. No que diz respeito ao mecanismo, Figura 30-B, assim como será discutido com mais detalhes na Seção 4.3.1.2., em solução tampão de pH 5,2, é esperado que a etapa inicial do processo seja a protonação da base. Em seguida se dá a transferência de elétron para o eletrodo e, consequentemente, a formação do cátion radical [108]. Posteriormente, ocorre o acoplamento radicalar, preferencialmente na posição *para* ao grupo amino radical. Em relação à estrutura do polímero, a princípio, o mecanismo sugere que o P*o*-PD seja um sistema pouco conjugado [108], no entanto, os constituintes da macromolécula podem sofrer ciclizações e rearranjos, dependendo, principalmente, do pH e eletrólito de suporte, levando a sistemas com maior grau de conjugação [109].



Figura 30: A) CV relativa à eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, por 15 ciclos; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de *o*-PD.

O comportamento eletroquímico da *m*-PD, Figura 31-A, é similar ao isômero *orto*, no entanto, a i_{pico} do primeiro ciclo é menor e as correntes dos ciclos subsequentes decrescem de forma menos acentuada [47]. Além disso, o E_{pico} da oxidação, 0,45 V, é observado em um potencial maior do que a *o*-PD, o que é um indício de que a reação de formação do P*m*-PD é menos favorável que o P*o*-PD.

Em relação ao mecanismo da reação, Figura 31-B, as etapas iniciais se dão de forma semelhante, protonação e formação do radical, o acoplamento também ocorre preferencialmente na posição *para* ao grupo amino radical. De acordo com o mecanismo sugerido, é possível que a estrutura do P*m*-PD seja semelhante à P*o*-PD [110]. Mais detalhes sobre a estrutura das polifenilenodiaminas serão abordados na Seção 4.3.1.2.



Figura 31: A) CV relativa à eletropolimerização de *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, por 15 ciclos; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de *m*-PD.

Para a reação de eletropolimerização do Py, Figura 32-A, diferentemente dos monômeros anteriores, não é observado pico de oxidação em si, apenas uma região de aumento da corrente acima de 0,50 V, principalmente nos primeiros ciclos da CV.

Uma característica interessante do processo de polimerização eletroquímica do Py é retratada na imagem em detalhe da Figura 32-A, que representa as curvas ampliadas referentes aos ciclos iniciais da CV, onde é possível observar que o E_{onset} do primeiro ciclo é de aproximadamente 0,20 V, enquanto o E_{onset} do segundo ciclo é bem menor, aproximadamente -0,10 V, este fato está relacionado à oxidação das espécies previamente polimerizadas (dímeros, trímeros oligômeros e polímeros) ser mais favorecida do que a do monômero em si, visto a maior estabilidade das espécies radicais, devido à maior deslocalização da carga ao longo da macromolécula [102].

Embora não haja consenso na literatura, acredita-se que este fenômeno não seja exclusivo dos polímeros condutores e também ocorra para os Po-PD e Pm-PD, sendo que o mesmo comportamento foi observado para eletropolimerização do Po-PD em pH 7,0 [111, 112].

Em relação ao mecanismo da polimerização do pirrol, Figura 32-B, em pH de 5,2 é esperado que o monômero se encontre na forma neutra e ao transferir o elétron para o eletrodo, o radical formado seja preferencialmente aquele em que o elétron desemparelhado esteja na posição α , devido à maior estabilidade desta forma canônica. Dessa forma, o acoplamento se dá majoritariamente nessa posição ao longo de toda a cadeia [113].



Figura 32: A) CV relativa à eletropolimerização de Py 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, por 15 ciclos. Imagem em detalhe corresponde às curvas do 1° e 2° ciclos de reação; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de Py.

Assim como esperado, para a eletropolimerização do Thi, Figura 33-A, não foi observado pico de oxidação na CV e os voltamogramas se mantiveram quase idênticos ao longo da reação, exceto por uma pequena redução da corrente no potencial máximo aplicado, 1,0 V, de um ciclo para o outro. De fato, o comportamento eletroquímico da solução de Thi evidencia que a polimerização desse monômero é pouco favorecida nas condições reacionais utilizadas. A principal justificativa para essa observação é o alto potencial de oxidação deste monômero, aproximadamente 1,5 V *vs* Ag/AgCl, faixa de potencial inadequada para o uso da água como solvente, por isso a eletropolimerização de Thi é comumente conduzida em acetonitrila e perclorato de tetrabutilamônio como solvente e eletrólito de suporte, respectivamente [38].

Outra condição necessária para a polimerização por via eletroquímica, e não cumprida pelo sistema Thi/água, é que a reação de acoplamento entre os radicais ocorra mais rápido que o ataque nucleofílico do solvente ao radical, o que limita esta reação a oligômeros de poucos membros [102].

Em relação ao mecanismo de eletropolimerização do Thi, é esperado que ocorra de maneira similar ao Py, Figura 33-B.



Figura 33: A) CV relativa à eletropolimerização de Thi 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, por 15 ciclos; B) Mecanismo genérico da reação de eletropolimerização de Thi.

Em relação às correntes observadas nas CVs para eletropolimerização de cada monômero, foi plotada uma curva de i x t, a partir da qual foi possível calcular os valores de i_{pico} (seja um pico propriamente dito como é o caso da *o*-PD e *m*-PD no primeiro ciclo ou o valor de i máxima no ponto de inversão do potencial) de cada ciclo, assim como a razão entre i_{pico} de cada ciclo e i_{pico} do 1° ciclo, dada em %, Figura 34-A.

A partir da Figura 34-A, são notórios os altos valores de corrente de oxidação para os primeiros ciclos das CVs da *m*-PD e, principalmente, da *o*-PD, o que sugere que reação de eletropolimerização desses monômeros é favorável nas condições utilizadas. Além disso, a brusca queda dos valores de % i_{pico} ciclo/i_{pico} 1º ciclo, a abaixo de 10% já a partir do 3º e 5º ciclo para a *o*-PD e *m*-PD, respectivamente, é um indício da formação de um filme polimérico e pouco condutor na superfície do eletrodo de trabalho já nos primeiros ciclos da reação, principalmente para o isômero *orto*, o que dificulta a transferência de elétrons e a formação das novas espécies radicais [44]. A formação do filme polimérico e não condutor é esperada, estudos sobre a eletropolimerização das fenilenodiaminas com QCM confirmam a deposição do material [48, 114].



Figura 34: A) Valores de i_{pico} e % i_{pico} ciclo/i_{pico} 1° ciclo; B) Carga acumulada ao longo das reações de eletropolimerização por CV para os monômeros de *o*-PD, *m*-PD, Py e Thi 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2.

Assim como já mencionado, na Figura 34-A fica evidente que as i_{pico} do primeiro ciclo para o Py e Thi foram bem menores que as observadas para as fenilenodiaminas, sugerindo a menor taxa de conversão desses monômeros aos respectivos polímeros condutores.

Além disso, considerando os valores % ipico ciclo/ipico 1º ciclo, para o Py e, principalmente, Thi, é evidente que a redução se deu de forma menos acentuada nos ciclos iniciais, e se manteve constante em aproximadamente 10% e 35%, respectivamente, a partir do 10° ciclo. Esta observação está diretamente relacionada às melhores propriedades condutoras dos filmes de PPy e PThi, que são capazes de transportar carga ao longo da macromolécula, continuar a oxidar as espécies em solução e gerar os radicais, mesmo após a contínua deposição de material polimérico sobre o eletrodo de trabalho. Dessa forma, tomando o parâmetro % ipico ciclo/ipico 1º ciclo como um indicativo da condutividade do filme polimérico obtido, é possível estabelecer seguinte ordem condutividade crescente de a Po-PD < Pm-PD < PPy < PThi.

Integrando os valores de i x t foi possível calcular a carga acumulada durante a reação de polimerização para cada um dos diferentes monômeros eletroativos, Figura 34-B.

Considerando a carga como tendo sido exclusivamente consumida para a formação do polímero e, utilizando a Equação 2, foi possível estimar a espessura do filme polimérico depositado sobre o eletrodo de trabalho, Tabela 9.

Tabela 9: Valores calculados da espessura dos filmes de P*o*-PD, P*m*-PD, PPy e PThi eletropolimerizados sobre GC partir de solução monomérica 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2.

	Q	MM			F	A_{geo}	espessura
Monômero	(mC)	(g/mol)	Elétrons	ρ (g/cm ³)	(x10 ³ C/mol)	$(x10^{-2} \text{ cm}^2)$	(nm)
o-PD	4,2	108	2	1,4 [115]	96,5	7,1	240
<i>m</i> -PD	3,1	108	2	1,5 [115]	96,5	7,1	170
Ру	1,4	67	2	1,5 [116]	96,5	7,1	45
Thi	1,6	84	2	1,5 [117]	96,5	7,1	66

De fato, a eletropolimerização é um processo complexo e, certamente, nem toda a carga foi consumida na formação do filme. Acredita-se que para todos esses polímeros a estequiometria seja de 2,07 a 2,60 F/mol de monômero reagente. Assim como os mecanismos mais aceitos e diversos experimentos sugerem, para o processo de formação do filme são necessários apenas 2 elétrons/molécula, e a carga adicional é utilizada para a dopagem do filme, ou seja, para carregar a macromolécula. Assim como já discutido, visto que o potencial necessário para a oxidação do monômero é quase sempre maior do que aquele necessário para o carregamento do polímero, os dois processos ocorrem de forma simultânea [102].

A fim de balancear a carga no filme, é consenso que o contra-íon do eletrólito de suporte, solvatado ou não, esteja inserido na rede polimérica, o que leva ao intumescimento do filme e ao aumento da espessura [38]. Dessa forma, a carga e estrutura do eletrólito de suporte [118, 119], assim como o solvente [120], interferem nas propriedades elétricas e mecânicas do filme eletropolimerizado.

Levando em consideração os processos de dopagem e intumescimento que ocorrem no filme polimérico, é provável que a espessura real do filme seja bem diferente da espessura estimada pela carga elétrica consumida, sendo necessário o uso de técnicas apropriadas, diferentes microscopias [121] e espetroscopias [122], para a sua determinação. Um exemplo é o uso de microscopia de força atômica para a determinação da espessura de P*o*-PD obtido a partir de solução de 5 mmol.L⁻¹ em PBS, pH 7,4, por CV durante 15 ciclos, v = 50 mV.s⁻¹, entre 0,0 e 0,9 V sobre Au como eletrodo de trabalho, nessas condições, o valor obtido foi 19,6 ± 5,2 nm [123].

Por fim, no que diz respeito ao uso de polímeros obtidos por eletropolimerização de monômeros eletroativos como MIPs e sua aplicação em sensores eletroquímicos, os parâmetros de condutividade, consequentemente capacidade de sofrer dopagem e intumescimento, assim como a espessura do filme, são de extrema relevância para o desempenho do material, visto que, independente da estratégia de leitura adotada, o analito de interesse deve ser transportado, seja por difusão ou migração, ao longo da cadeia polimérica [35, 38].

<u>4.3.3. pH</u>

De acordo com os mecanismos mais aceitos para a polimerização da *o*-PD e monômeros relacionados, os processos de eletropolimerização e dopagem são altamente dependentes do pH do meio reacional, sendo que a síntese, morfologia e, consequentemente, propriedades do filme obtido são influenciadas por este parâmetro [108, 124].

Dessa forma, foi avaliada a influência do pH na reação de polimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹, por CV, v = 50 mV.s⁻¹, 15 ciclos, em PBS com pHs de 2,5, 5,0 e 7,5. A Figura 35-A representa os voltamogramas dos primeiros ciclos da eletropolimerização, enquanto a Figura 35-B correspondente à carga acumulada durante a reação e i_{pico} para cada ciclo da eletropolimerização.



Figura 35: A) CVs para 1° ciclo; B) Carga acumulada e i_{pico} para cada ciclo da reação de eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pHs 2,5; 5,0 e 7,5.

Primeiramente, comparando as curvas de oxidação da *o*-PD em tampão de acetato pH 5,2, e PBS, pH 5,0, Figuras 30-A e 35-A, respectivamente, é possível afirmar que mesmo em pHs próximos, alguma diferença é observada entre os perfis dos dois voltamogramas, o que mostra que o eletrólito de suporte interfere no processo de polimerização. Além disso, o valor de E_{pico} para a curva obtida em tampão de acetato 0,20 V, é bem menor do que o observado para o PBS, 0,55 V. Esta diferença pode estar relacionada ao eletrólito de suporte em si, assim como ao potencial inicial da reação, -0,50 V e 0,0 V para os tampões de acetato e fosfato, respectivamente.

Analisando os voltamogramas da Figura 35-A, é evidente que o aumento do pH levou à redução da i_{pico}, esta observação pode estar relacionada ao fato de, em pHs menores, o ácido conjugado da *o*-PD (pKb₁ \approx 9,37) ser majoritário no equilíbrio, o que favorece a transferência de carga e a formação do cátion radical durante a etapa inicial da reação [111, 125]. Além disso, para as curvas obtidas em pHs 7,5 e 5,0 os picos são mais largos e em meio neutro, até mesmo um "ombro" bem definido é observado após o pico principal, o que evidencia um processo redox ainda mais complexo, possivelmente, relacionado a sobreoxidação do P*o*-PD [112].

Da mesma forma, a partir da Figura 35-A, é possível observar que o aumento do pH levou ao deslocamento do E_{pico} para valores mais negativos, o que é esperado, visto que íons H⁺ são produzidos após o acoplamento dos cátions radicais de *o*-PD formados na etapa de iniciação. Assim, o processo global é favorecido (uma etapa eletroquímica seguida de outra química), o que leva à redução do potencial de oxidação da *o*-PD em soluções menos ácidas [111, 112].

A extensão da reação e distribuição de produtos, dímeros, trímeros, oligômeros e assim por diante, também estão intimamente relacionadas ao pH do meio reacional. Analisando os produtos obtidos da eletrooxidação da *o*-PD por espectrometria de massas, foi observado que em pH 1,0, dímeros e trímeros foram formados, enquanto em pH 7,0 tetrâmeros também estão presentes em solução [112]. No entanto, mais recentemente, em discordância com o exposto acima, Jiang et al. observaram que em pHs abaixo de 2,6 e acima de 10,6, a etapa de propagação da eletropolimerização foi desfavorecida e apenas dímeros de *o*-PD foram observados em solução, sendo que trímeros ou espécies maiores foram observadas nos pHs de 3,7 e 7,0 [126].

Independente da distribuição dos produtos, as curvas de Q x t da Figura 35-B, dão indícios que não só ocorre a polimerização para todos os pHs avaliados, assim como, é evidente que os primeiros ciclos das CVs são os principais responsáveis pela carga consumida, devido à baixa condutividade do filme de P*o*-PD eletrodepositado e ao bloqueio do eletrodo de trabalho nos ciclos subsequentes.

A partir dos valores de carga, considerando que toda a carga observada está envolvida na eletropolimerização do monômero, e da Equação 2, foi possível estimar a espessura dos filmes obtidos, como sendo, 200, 220 e 150 nm para os pHs 2,5, 5,0 e 7,5, respectivamente. Adicionalmente, considerando a espessura do filme como proporcional à quantidade de material depositado, e consequentemente, à extensão da reação, e desconsiderando eventuais diferenças de condutividade entre os filmes obtidos em diferentes pHs, é possível inferir que, dentre os pHs avaliados, a eletropolimerização de *o*-PD foi mais favorecida nos pHs 2,5 e 5,0.

Além disso, é sabido que a *o*-PD é facilmente oxidada quando em solução, inclusive pelo ar atmosférico, levando, provavelmente, à formação de oligômeros/polímeros, o que é caracterizado pela alteração da cor da solução de transparente para amarelo/marrom [127]. Dessa forma, é possível ter uma ideia de como o pH influencia no processo de oxidação do monômero observando a coloração das soluções de *o*-PD algum tempo após a dissolução, Figura 36. A partir da Figura 36, é possível notar uma alteração da cor das soluções de pHs 2,5 e 5,0 após 2 horas, sendo mais intensa para o menor pH, enquanto a solução de pH 7,0 se manteve transparente. Após 24 horas, é observada uma leve variação de cor mesmo para a solução de pH 7,0, ao passo que as outras duas soluções tiveram uma significativa alteração de cor, sendo ainda mais evidente para o pH de 2,5. Portanto, as observações visuais corroboram os dados voltamétricos, além disso, são incontestáveis a influência do pH na eletropolimerização da *o*-PD e que a reação é favorecida em meios ácido e levemente ácido.



Figura 36: Imagens de diferentes soluções de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹ pHs 2,5; 5,0 e 7,5 após 2 e 24 horas da dissolução do monômero e expostas ao ar atmosférico.

Em relação à estrutura da cadeia polimérica do P*o*-PD, independente da via sintética, duas estruturas são propostas e mais aceitas, Figura 37, sendo elas aquelas contendo: unidades de fenazina, mais conhecida como "escada" (*"ladder"*) e unidades de benzenoide-quinoide 1,4 substituídas, mais conhecida como estrutura "aberta" (*"open"*) [111], sendo que a segunda é a estrutura mais estável e predominante, exceto em meio fortemente ácido, pH abaixo de 1,0. Para os polímeros obtidos a partir da *m*-PD e *p*-PD é considerado que as estruturas de *ladder* e *open* e também estejam presentes [110].


Figura 37: Estruturas sugeridas para o Po-PD, ladder e open.

Ainda sobre a relação entre pH do meio reacional e estrutura polimérica, é esperado que conforme o meio se torne mais básico, o filme obtido se torne menos condutor, devido à progressiva redução das estruturas conjugadas, mais abundantes na *ladder*, ao longo da cadeia polimérica [107], assim como sugere as curvas de i_{pico} x t na Figura 35-B, onde é observado que o filme obtido em pH 2,5 foi aquele que demonstrou maior capacidade de continuar a eletrooxidar o monômero durante os ciclos subsequentes da reação.

Por fim, a eletropolimerização de *o*-PD em meios levemente ácido e neutro, pH entre 5,0 e 7,0, gera filmes com maior quantidade de grupos NH₂ livres na superfície do filme polimérico, devido à estrutura aberta, o que favorece a interação entre o filme e enzimas, biomoléculas ou moléculas orgânicas pequenas, o que torna essa faixa de pH mais indicada para a construção de MIPs.

De fato, no que diz respeito à aplicação de P*o*-PD e polímeros relacionados em MIPs, o pH mais utilizado é por volta de 5,0 [58–60], possivelmente devido à eletrodeposição efetiva do filme sobre o eletrodo, estrutura aberta, além da protonação do grupo amina livre, o que pode favorecer ainda mais a interação com o molde. Diversos são os trabalhos que comparam

os pHs de síntese para esta finalidade e comprovam que os filmes obtidos em meio levemente ácido apresentam melhor desempenho [60, 128].

4.3.4. Concentração monômero

A influência da concentração do monômero na reação de eletropolimerização também foi avaliada. A Figura 38-A apresenta as curvas referentes ao primeiro ciclo das voltametrias obtidas em soluções contendo *o*-PD 5,0; 7,5; 10 e 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, em que é possível observar o perfil similar entre as curvas e o evidente aumento da i_{pico} com o aumento da concentração. Em relação ao E_{pico}, observou-se um pequeno desvio, entre aproximadamente 0,27 V e 0,34 V, para as soluções de *o*-PD 5,0 e 7,5 mmol.L⁻¹, respectivamente.

A Figura 38-B apresenta as curvas de $i_{pico} \ge [o-PD]$ para os três primeiros ciclos da reação. Para a curva obtida no primeiro ciclo entre 5,0 e 10 mmol.L⁻¹, foi obtida uma relação linear, o que sugere que o processo de eletrooxidação do monômero é controlado por difusão [111]. Assim como esperado, para os outros dois ciclos, foi observado a acentuada queda da corrente, devido à formação do filme, e a perda da linearidade entre $i_{pico} \ge [o-PD]$, sugerindo que neste caso o processo deixa de ser limitado pelo transporte de massa e sim por ativação e/ou queda ôhmica [85].



Figura 38: A) CVs para o 1° ciclo; B) Curva de $i_{pico} \propto [o-PD]$ para os três primeiros da reação de eletropolimerização de *o*-PD 5,0; 7,5; 10 e 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2.

4.3.5. Material de eletrodo de trabalho

A fim de avaliar se o material do eletrodo de trabalho interfere no processo de eletropolimerização, eletrodos de GC e Pt com áreas geométricas similares foram utilizados como substratos para a eletropolimerização de *o*-PD. Os filmes foram obtidos por CV a partir de solução de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos. Os voltamogramas dos primeiros ciclos das polimerizações para cada um dos eletrodos são apresentados na Figura 39-A.



Figura 39: A) CVs; B) Carga acumulada para a eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos, utilizando GC e Pt como eletrodos de trabalho.

Integrando os valores de corrente em função do tempo para os 15 ciclos da reação é possível calcular a carga consumida no processo, Figura 39-B, e assim estimar a espessura do filme polimérico, através da Equação 2. A Tabela 10 sumariza os valores de E_{pico}, E_{onset}, i_{pico}, A_{pico} (1° ciclo), Q e espessura assim como a média, desvio padrão e desvio padrão relativo. Comparando os valores da Tabela 10, não se observa diferenças significativas entre os parâmetros avaliados, dessa forma, pode-se concluir que, no que diz respeito à eletropolimerização do filme, o material do eletrodo pouco influencia.

Tabela 10: Valores de E_{pico} , E_{onset} , i_{pico} , A_{pico} (1° ciclo), Q e espessura junto com os valores da média, desvio padrão e desvio padrão relativo para a eletropolimerização de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, v = 50 mV.s⁻¹, por 15 ciclos, utilizado GC e Pt como eletrodos de trabalho.

			A_{pico}			espessura
Eletrodo	Epico (V)	i _{pico} (A)	(u.a.)	Eonset (V)	Q (mC)	(nm)
GC/Po-PD	0,43	$2,5x10^{-4}$	9,8x10 ⁻⁵	0,21	4,9	300
Pt/Po-PD	0,42	$2,5x10^{-4}$	9,2x10 ⁻⁵	0,21	4,4	260
Média	0,42	$2,5x10^{-4}$	9,5x10 ⁻⁵	0,21	4,6	280
Dev. Pad.	$5,2x10^{-2}$	2,1x10 ⁻⁶	4,2x10 ⁻⁶	1,7x10 ⁻³	0,40	24
Dev. Pad. Rel (%)	1,2	0,8	4,4	0,8	8,4	8,4

4.4. MIP

4.4.1. Síntese MIP x NIP

A fim de avaliar se a molécula molde tem alguma influência no processo de síntese dos filmes poliméricos, dopamina e ácido ascórbico foram utilizados como moléculas molde. Os MIPs foram obtidos por CV durante 10 ciclos, a partir de solução de *o*-PD, *m*-PD e Py, todos em concentração de 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, utilizando individualmente dopamina e ácido ascórbico, ambos à concentração de 5,0 mmol.L⁻¹. O Thi foi desconsiderado como candidato para a obtenção do MIP, visto que a polimerização desse monômero é desfavorecida em meio aquoso. Os NIPs foram sintetizados seguindo o mesmo procedimento, exceto a adição da molécula molde.

As duas moléculas foram escolhidas como moléculas molde pois, de acordo a estratégia de classificação de sistemas redox baseada na influência da superfície do eletrodo de carbono sobre a cinética de transferência de elétrons [86], a dopamina e o ácido ascórbico são classificados como moléculas de esfera interna, não afetadas pela presença de óxidos e que necessitam e não necessitam, respectivamente, de adsorção ao eletrodo, sendo elas, portanto, representativas da maior parte das biomoléculas eletroativas e de interesse para o desenvolvimento de sensores/biossensores eletroquímicos [86].

As curvas referentes ao primeiro ciclo da eletropolimerização do NIP, MIP-DA e MIP-AA para os monômeros de *o*-PD, *m*-PD e Py são apresentadas nas Figuras 40-A, B e C, respectivamente. A fim de comparação, os voltamogramas referentes à DA e ao AA 5,0 mmol.L⁻¹ na ausência de monômeros também são apresentados, sendo que a i_{pico} e o E_{pico} foram, respectivamente, 91,8 µA e 0,32 V para a DA, enquanto para o AA, 68,7 µA e 0,25 V.

No caso da eletropolimerização da *o*-PD, Figura 40-A, é possível observar que as moléculas molde oxidam no mesmo potencial que o monômero, além disso, a corrente de

oxidação da *o*-PD é muito maior do que as de DA e AA, e o sinal do monômero acaba por sobrepor as correntes das moléculas molde.

As i_{pico} observadas para o MIP-DA, MIP-AA e NIP foram, respectivamente, 215, 224 e 243 μ A, evidenciando que, embora os moldes sejam eletroativos, eles acabaram por dificultar a eletrooxidação do monômero, possivelmente exercendo a função de antioxidantes e, consequentemente, reduzindo a eficiência da polimerização [129, 130]. Em relação ao E_{pico}, para o MIP-DA e MIP-AA, 0,31 e 0,37 V, respectivamente, observou-se um valor maior que para o NIP, 0,25 V, o que é outro indício de que a DA e o AA desfavorecem a oxidação do monômero e a formação dos radicais necessários para obtenção da macromolécula. Sobre os E_{onset}, comparando os valores do NIP, -0,02 V, e MIP-DA, 0,01 V, não se observa alteração significativa, no entanto, para o MIP-AA, o E_{onset} foi de -0,10 V, este pequeno deslocamento provavelmente está relacionado à oxidação do AA que tem E_{onset} de -0,06 V.

Para os sistemas de P*m*-PD, Figura 40-B, também foram observadas menores i_{pico} para os MIPs de DA e AA, 200 e 177 μ A, respectivamente, do que para o NIP, 217 μ A. Assim como no caso do isômero *orto*, o NIP apresentou menor E_{pico} do que o MIP-DA e MIP-AA, 0,40, 0,50 e 0,52 V, respectivamente. Além disso, como as moléculas molde oxidam em potenciais menores e mais distantes da *m*-PD do que da *o*-PD, a diferença do E_{onset} fica ainda mais evidente para o isômero *meta*, sendo possível observar um significativo deslocamento e um ombro bem definido no voltamograma para o MIP-AA.

Como já discutido na Seção 4.3.2., o Py apresenta correntes de oxidação bem menores e em potenciais mais altos que as fenilenodiaminas, assim, para a síntese de MIPs de Py, Figura 40-C, foi possível observar os sinais referentes à oxidação tanto da DA quanto do AA. Na verdade, parece que, de alguma forma, o Py acaba por favorecer a oxidação das moléculas molde, elevando significativamente as i_{pico} para a DA e AA, 150 e 130 µA, respectivamente. Além disso, para o MIP-DA foi possível observar um pico no sentido negativo de varredura do potencial, a partir de aproximadamente -0,05 V, este pico é referente à redução reversível da DA e não foi observado para os MIPs de P*o*-PD e do P*m*-PD, o que evidencia, mais uma vez, a polimerização menos eficiente do PPy, assim como, o caráter mais condutor do filme formado.



Figura 40: Síntese de MIPs de A) *o*-PD; B) *m*-PD e C) Py, todos com concentração de 15 mmol.L-1 em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, utilizando DA e AA, ambos com concentração de 5,0 mmol.L⁻¹, como moléculas molde. Os NIPs foram sintetizados seguindo o mesmo procedimento, exceto o uso das moléculas molde. As Figuras também apresentam os voltamogramas referentes às moléculas moldes, 5,0 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L-1, pH 5,2, presença dos sem а monômeros.

4.4.2. Fator de impressão (Imprinting Factor, IF)

O desempenho do MIP pode ser avaliado comparando os sinais obtidos pelo MIP e o NIP, termo conhecido como IF, sendo que quanto maior a diferença entre os sinais, mais eficiente é o material como elemento de reconhecimento. Normalmente, o IF é calculado como a razão entre os sinais obtidos para o MIP e o NIP [71, 75], no entanto, neste trabalho, será feita a avaliação apenas qualitativa (diferença de sinal), uma vez que, como será visto a seguir, os sinais obtidos para alguns NIPs foram extremamente baixos, o que levaria a valores de IFs discrepantes.

O IF de MIPs obtidos a partir de soluções de *o*-PD, *m*-PD e Py, com concentrações de monômero de 5,0, 10 e 15 mmol.L⁻¹ e DA 5,0 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, por CV, 10 ciclos, foram avaliados antes e após a extração com solução de DA 50 μmol.L⁻¹ em PBS, 0,2 mol.L⁻¹. Os NIPs foram obtidos nas mesmas condições, exceto pela ausência de DA.

Em relação à extração, a remoção da molécula molde da rede polimérica, o procedimento adotado foi CV em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, 10 ciclos, entre -1,0 e 1,0 V. Apesar de para o NIP não ter sido adicionada a molécula molde durante a síntese, a extração também foi conduzida. Mais detalhes da etapa de extração serão dados na Seção 4.4.4.1.

As curvas de DPVs e A_{pico} referentes à eletrooxidação da DA são apresentadas nas Figuras 41-A e B, 42-A e B e 43-A e B para os MIPs e NIPs de *o*-PD, *m*-PD e Py, respectivamente. Os índices 1, 2 e 3 correspondem aos sistemas obtidos a partir de solução contendo monômero com concentração de 5,0, 10 e 15 mmol.L⁻¹, respectivamente. A fim de avaliar qual a influência do polímero no processo de eletrooxidação da DA, os sinais de MIP e NIP também foram comparados com o do eletrodo de GC sem modificação.

A quase ausência de picos nas curvas de DPV obtidas para os MIPs e NIPs de Po-PD, Figura 41-A, deixa claro que o polímero funciona como uma barreira isolante, impedindo que a molécula eletroativa chegue à superfície do eletrodo de trabalho. Integrando os picos dos voltamogramas, Figura 41-B, é possível confirmar a ação restritiva dos filmes, sendo que, apenas o MIP 1, aquele que foi sintetizado a partir da menor concentração de monômero e, consequentemente, o menos espesso, apresentou algum sinal antes da extração. Após a extração, houve considerável aumento do sinal para o MIP 1. Adicionalmente, o NIP 1 e o MIP 2, também apresentaram picos após a extração, sendo que, para este último, o sinal foi quase imperceptível. Para os NIP e MIP obtidos na condição 3, nenhum sinal foi observado antes e após a extração.

Dessa forma, de maneira geral, os baixos valores de A_{pico} sugerem, mais uma vez, o caráter altamente isolante dos filmes de P*o*-PD. Além disso, é possível afirmar que, principalmente para os filmes mais espessos, o processo extrativo adotado não é suficiente para a liberação das cavidades na rede polimérica, sendo necessário um procedimento mais agressivo.



Figura 41: A) DPVs; B) A_{pico} , sem e após extração, obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com NIPs obtidos a partir de *o*-PD 1) 5,0, 2) 10 e 3) 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Para os MIPs, além do monômero, foi acrescentado DA 5,0 mmol.L⁻¹.

Diferentemente do observado para os filmes de Po-PD, as curvas de DPV para os MIPs e NIPs do isômero *meta*, Figura 42-A, apresentaram ao menos um pequeno pico referente ao processo redox da DA para todos os casos, exceto para os MIP 3 e NIP 3 antes da extração, o que sugere que o filme de P*m*-PD é mais permeável à espécie eletroativa.

Comparando os valores da A_{pico}, Figura 42-B, é evidente que os sinais exibidos pelos MIPs foram maiores do que os dos NIPs, o que sugere que o filmes com impressão molecular sejam mais porosos e permeáveis à difusão da dopamina. Além disso, para os MIPs 1 e 2 após a extração, os sinais obtidos foram maiores que o de GC sem modificação, o que pode ser explicado pelo fato do filme polimérico impresso favorecer a pré-concentração do analito.

Adicionalmente, para os filmes de P*m*-PD o processo de extração eletroquímica se mostrou satisfatório, sendo que os sinais observados tanto para o MIP quanto para o NIP após a extração foram consideravelmente maiores do que aqueles obtidos sem extração. Por fim, como esperado, considerando os MIPs após a extração, quanto mais espesso o filme polimérico depositado sobre o eletrodo, mais difícil é a difusão do analito, sendo que, dessa forma, a ordem crescente de A_{pico} para a oxidação da dopamina foi MIP 3 < MIP 2 < MIP 1.



Figura 42: A) DPVs; B) A_{pico} , sem e após extração, obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com NIPs obtidos a partir de *m*-PD 1) 5,0, 2) 10 e 3) 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Para os MIPs, além do monômero, foi acrescentado DA 5,0 mmol.L⁻¹.

Para as curvas de DPV obtidas com os MIPs e NIPs de PPy, Figura 43-A, foi possível observar os picos de eletrooxidação da DA para todas as condições avaliadas, mesmo sem extração. Dessa forma, é razoável afirmar que os filmes são permeáveis à molécula eletroativa, seja pela menor eficiência da cobertura da superfície do eletrodo de trabalho e/ou maior condutividade do filme polimérico, assim como discutido na Seção 4.3.2.

Comparando os valores de A_{pico} dos eletrodos modificados com filmes de PPy, Figura 43-B, é possível notar que o MIP 1 foi o que apresentou maior sinal, tanto antes quanto após a remoção da molécula molde, enquanto o sinal do NIP 1 após o processo extrativo também aumentou consideravelmente. Para todas as outras condições, os sinais dos NIPs e MIPs não apresentaram diferença significativa entre si e comparáveis com os do GC sem modificação. Além disso, inesperadamente, para os NIPs 2 e 3 após a extração, foram observados sinais maiores do que os respectivos MIPs. Estudos adicionais sobre esse fato serão conduzidos posteriormente.

Dessa forma, é possível afirmar que para os MIPs de PPy não foi observado a interação preferencial entre o MIP e a molécula molde, sendo inviável, nas condições utilizadas, o uso desse polímero como matriz para a construção de elementos de reconhecimento, e, portanto, o PPy foi desconsiderado como candidato a material base para MIPs nas seções posteriores.



Figura 43: A) DPVs; B) A_{pico} , sem e após extração, obtidos em solução DA 50 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, para os eletrodos de GC sem modificação e modificados com NIPs obtidos a partir de Py 1) 5,0, 2) 10 e 3) 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2. Para os MIPs, além do monômero, foi acrescentado DA 5,0 mmol.L⁻¹.

4.4.3. Características operacionais: Po-PD x Pm-PD

Considerando apenas o Po-PD e o Pm-PD como possíveis matrizes poliméricas para a obtenção de MIPs, dois parâmetros devem ser discutidos em mais detalhes, a estabilidade da solução do monômero durante a síntese do filme e a eficiência do processo extrativo.

4.4.3.1. Síntese filme: estabilidade da solução

Como discutido na Seção 4.3.3., a mudança de coloração da solução de *o*-PD, de transparente para o amarelo, é um indício da oxidação química do monômero. Nas condições sintéticas utilizadas, tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2 e exposição ao ar atmosférico, na presença de luz e temperatura ambiente, esse processo ocorre de forma natural e contínua a partir da dissolução do monômero.

A Figura 44-A mostra as soluções de *o*-PD e *m*-PD à 15 mol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, nos instantes 0, 15, 30, 60 e 120 min após a dissolução do monômero, assim como os espectros de UV-Vis para ambas soluções nas mesmas condições. Adicionalmente, a Figura 44-B apresenta as imagens das soluções dos dois monômeros 1, 5, 10 e 30 dias após o respectivo preparo.

Dessa forma, é possível afirmar que o processo de oxidação da *o*-PD se dá rapidamente, o que pode ser um problema para a síntese reprodutível de MIPs de P*o*-PD, visto que durante o tempo total de preparo dos filmes, dissolução do monômero + mistura das soluções + eletropolimerização, é possível que ocorra a alteração do estado de oxidação do monômero e até mesmo formação de oligômeros, consequentemente, levando a filmes com estruturas e propriedades diferentes das esperadas.

Por outro lado, para o ensaio conduzido em escala de horas, a solução do isômero *meta* permaneceu transparente e nenhum pico de absorção foi observado nos espectros de UV-Vis. Em relação ao experimento ao longo de dias, até 10 dias após o preparo, a solução permaneceu transparente, sendo nítido o escurecimento da solução apenas 30 dias após a dissolução do monômero.



Figura 44: A) Imagens das soluções de *o*-PD e *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, 0, 15, 30, 60 e 120 min após a dissolução do sólido, assim como, os espectros de UV-Vis para ambas soluções nas mesmas condições. B) Imagens das soluções de *o*-PD e *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, 1, 5, 10 e 30 dias após a dissolução do sólido.

4.4.3.2. Extração

Uma etapa fundamental para o desempenho apropriado dos MIPs como elemento de reconhecimento em sensores químicos e biossensores é a remoção adequada do molde da matriz polimérica. Além disso, tanto para os MIPs quanto para os NIPs, durante a etapa de extração, ocorre a entrada de moléculas do solvente na matriz, o que torna o filme mais permeável e facilita o transporte de massa ao longo do polímero.

Comparando as Figuras 41-B e 42-B é possível notar que após a extração por CV em PBS, o sinal da DA aumenta consideravelmente para os filmes de P*m*-PD, enquanto para o filme de P*o*-PD, principalmente para aqueles obtidos a partir das soluções mais concentradas de monômero, o pico da dopamina continua imperceptível, o que está relacionado ao caráter mais restritivo desse filme, assim como ao fato de o processo extrativo utilizado parecer não ter sido suficiente para desobstruir os filmes de P*o*-PD.

A fim de analisar a influência da etapa de extração no desempenho dos filmes, NIPs de Po-PD obtidos a partir de solução de o-PD 15 mol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, por 10 ciclos, foram avaliados indiretamente em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹, sem extração e após serem submetidos a diferentes estratégias de extração, sendo elas: a) agitação magnética em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, por 1 hora; b) CV em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, -0,5 a 1,0 V, por 10 ciclos; c) agitação magnética em solução de H₂O/etanol (1;1, v/v), por 1 hora e d) ultrassom em solução aquosa NaOH 0,1 mol.L⁻¹ por 10 min.

As Figuras 45-A e B mostram, respectivamente, curvas de CV e EIS, antes e depois da extração, seguindo cada uma das estratégias supracitadas, sendo que apenas para o tratamento de ultrassom em solução de NaOH foi possível ver os picos do processo redox para a sonda na CV e a significativa redução da R_{ct} no ensaio de EIS, o que deixa claro que esse foi o único método extrativo capaz de desobstruir a matriz. No entanto, por ser um tratamento bastante agressivo, é possível que além da desobstrução do filme, tenha ocorrido a deformação e/ou até

mesmo a dessorção do filme da superfície do eletrodo, o que é inviável para a aplicação sensores eletroquímicos que utilizam MIPs como elemento de reconhecimento.

Dessa forma, seja pelo menor IF, menor estabilidade da solução de síntese e a necessidade de estratégias mais abruptas para a extração dos filmes obtidos a partir de Po-PD, o Pm-PD se mostrou o polímero mais eficaz para a construção de MIPs e aplicação em sensores eletroquímicos, sendo este o material utilizado nas seções posteriores.



Figura 45: A) CVs; B) EISs obtidas para os eletrodo de GC modificado com NIP de *o*-PD 15 mmol.L⁻¹ em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹, sem extração e após extração por: agitação magnética em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, por 1 hora; CV em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, -0,5 a 1,0 V, por 10 ciclos; agitação magnética em solução de H₂O/etanol (1;1, v/v), por 1 hora e ultrassom em solução aquosa NaOH 0,1 mol.L⁻¹ por 10 min.

4.4.4. Compósitos de ERGO/Au/Pm-PD para detecção direta de DA

4.4.4.1. Síntese

Conforme descrito na Seção 4.2.4., o eletrodo de GC foi inicialmente modificado com ERGO, a partir de suspensão de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol.L⁻¹, por CA durante 5 ciclos. Depois, o eletrodo de GC/ERGO foi recoberto com Au, a partir de solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ por CV, durante 5 ciclos. Por fim, o compósito de GC/ERGO/Au/MIP foi obtido pela eleletropolimerização de *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ e DA 5,0 mmol.L⁻¹ por CV, durante 10 ciclos. O GC/ERGO/Au/NIP foi sintetizado seguindo procedimento idêntico, exceto o uso de DA na última etapa.

A Figura 46 apresenta as curvas de CV referentes ao primeiro ciclo da eletropolimerização do MIP e o NIP. Apenas para o MIP, foi observado um "ombro" bem determinado em aproximadamente 0,15 V. Este sinal está relacionado à eletrooxidação da dopamina, e foi observado nessas condições devido à maior sensibilidade do sistema, conferida pelo substrato de ERGO/Au. Quando o MIP é eletropolimerizado diretamente sobre o GC, Figura 39-B, o "ombro" não foi observado. Ainda comparando a síntese dos filmes de P*m*-PD sobre os eletrodos de GC e GC/ERGO/Au, não foi observado um significativo aumento da i_{pico} para os filmes obtidos sobre o eletrodo modificado, no entanto, os picos se mostraram bem mais largos que aqueles obtidos apenas sobre o GC, sendo que, a carga acumulada para o primeiro ciclo da CV quando o eletrodo de GC foi previamente modificado, detalhe da Figura 46, é cerca de 60% maior para ambos os filmes.

Dessa forma, é provável que o filme de ERGO/Au tenha efeito eletrocatalítico sobre a eletropolimerização do P*m*-PD, no entanto, como o processo é controlado por difusão, semelhante à eletropolimerização de *o*-PD diretamente sobre o GC, Seção 4.3.4., a i_{pico} não seja significativamente alterada, enquanto o alargamento do pico esteja relacionado ao recobrimento da maior área eletroativa do eletrodo modificado.



Figura 46: CVs referentes ao 1° ciclo da eletropolimerização do MIP, *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ e DA 5,0 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2 sobre o eletrodo de GC/ERGO/Au. O NIP foi obtido, seguindo o mesmo procedimento, exceto a adição da molécula molde. Imagem em detalhe: carga acumulada para o 1° ciclo da CV para os NIPs e MIPs eletropolimerizados sobre os eletrodos de GC e GC/ERGO/Au.

4.4.4.2. Extração

Assim como descrito na Seção 4.4.2., a CV em PBS se mostrou eficiente para a extração dos filmes de P*m*-PD sobre o eletrodo de GC.

As curvas de CV referentes ao primeiro e décimo ciclos da extração obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP são apresentadas na Figura 47-A. Como mencionado na Seção 4.2.4., para o eletrodo de GC/ERGO/Au, o intenso pico negativo está relacionado à redução dos óxidos de Au. Para os eletrodos modificados com o NIP e o MIP, o pico de redução observado foi bem menor, evidenciando a presença de P*m*-PD.

Comparando as curvas obtidas durante o primeiro e décimo ciclos da CV, detalhe da Figura 47-A, foi observado que para todos os sistemas avaliados houve um pequeno deslocamento do E_{pico} para valores mais positivos, o que sugere a desobstrução do eletrodo durante a extração e o favorecimento do processo redox.

Além disso, integrando os picos de redução dos óxidos metálicos, A_{pico}AuOx, para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP durante o primeiro e décimo ciclos da CV, Figura 47-B, foi possível observar o aumento da área conforme o avanço do processo extrativo para todos os três sistemas testados. Dessa forma, acredita-se que o acompanhamento da A_{pico}AuOx possa servir como uma ferramenta simples e rápida para avaliar a eficiência do processo extrativo e estimar a partir de qual ciclo ocorre a efetiva desobstrução do filme polimérico, levando à otimização do processo. Estudos adicionais sobre esta questão operacional são necessários e serão conduzidos posteriormente.



Figura 47: A) CVs; B) $A_{pico}AuO_x$ referentes ao 1° e 10° ciclos da extração por CV em PBS 0,2 mol.L⁻¹ para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP.

As curvas de DPV para os sistemas de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP em solução de DA 10 μ mol.L⁻¹ em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, antes e após a extração são mostradas na Figura 48-A. Assim como para os NIPs e MIPs de P*m*-PD eletropolimerizados diretamente sobre o GC, Figura 42-A, o pico de eletrooxidação de DA não

foi observado para os eletrodos de GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP antes da extração. No entanto, após a extração por CV, os picos foram observados tanto para o NIP quanto para o MIP.

Calculando os valores de A_{pico}, Figura 48-B, foi possível observar que o sinal para o GC/ERGO/Au/MIP é consideravelmente maior do que o do GC/ERGO/Au/NIP, o que comprova a maior permeabilidade do MIP em relação ao NIP.

Além disso, visto que o sinal da dopamina foi observado tanto para o GC/ERGO/Au/MIP quanto para o GC/ERGO/Au/NIP, é possível afirmar que além da remoção do molde (o que obviamente acontece apenas no caso do MIP), durante a etapa de extração também ocorre a desobstrução do filme, principalmente devido à entrada do solvente/eletrólito de suporte, o que é fundamental para que a espécie eletroativa chegue à superfície do eletrodo de trabalho.



Figura 48: A) DVs; B) A_{pico} para DA 10 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹ para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP sem extração e após extração.

4.4.4.3. Desempenho GC/ERGO/Au/MIP para DA

Após a extração, as curvas de DPV obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP em soluções contendo diferentes concentrações de DA, entre 5,0 e 50 μmol.L⁻¹, em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, foram comparadas, Figura 49-A.

A partir das curvas de DPV, tomadas em triplicata para cada um dos sistemas, foi possível calcular os valores de A_{pico} , média e desvio padrão e construir uma curva analítica, Figura 49-B. Os coeficientes angulares obtidos para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP foram, respectivamente, 6,91, 6,27 e 11,2 (u.a.µmol⁻¹.L⁻¹), e R² de no mínimo 0,99 para as três retas.

O coeficiente angular do GC/ERGO/Au/MIP foi cerca de 62% e 79% maior que os obtidos para o GC/ERGO/Au e GC/ERGO/Au/NIP, respectivamente, e indica a maior sensibilidade do MIP. Além disso, para as concentrações de DA a partir de 25 µmol.L⁻¹ foi observado que o sinal do GC/ERGO/Au/MIP foi superior ao do GC/ERGO/Au, o que sugere que o filme polimérico impresso favorece a absorção da espécie eletroativa e a pré-concentração do analito próximo à superfície do eletrodo.



Figura 49: A) DPVs; B) Curvas analíticas de A_{pico} x [DA] obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP, após extração, em soluções de DA 5,0, 10, 15 e 20 μ mol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

Em relação à especificidade, a fim de avaliar se o eletrodo de GC/ERGO/Au/MIP tem alguma interação preferencial com a DA, o ácido úrico (UA) foi tratado como interferente. O UA foi escolhido, pois apesar da estrutura molecular ser bem diferente da DA, os potenciais de

oxidação dos dois analitos são próximos [131, 132]. Além disso, o UA é uma importante biomolécula, presente em concentrações consideráveis nos fluídos biológicos onde a DA é normalmente encontrada e analisada, e por isso, é comum que nos trabalhos sobre o desenvolvimento de sensores eletroanalíticos para DA, o UA seja tomado como interferente [133–135].

As Figuras 50-A e B mostram, respectivamente, as curvas de DPV e os valores de A_{pico} (valores absoluto e normalizado pelo GC/ERGO/Au) para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP obtidos em solução de UA 250 µmol.L⁻¹ em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.



Figura 50: A) DVs; B) A_{pico} (valores absoluto e normalizado pelo GC/ERGO/Au) obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP, após extração, em soluções de UA 250 µmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

Comparando os valores de A_{pico}, é possível observar que os sinais do GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP foram, respectivamente, 50% e 80% daquele obtido para o GC/ERGO/Au, sendo que a diferença pouco significativa, principalmente para o MIP, indica que o filme impresso não é exclusivo para a DA e também permite a difusão do UA. Adicionalmente, acredita-se que a diferença entre os sinais do GC/ERGO/Au/MIP e GC/ERGO/Au/NIP seja justificada pela maior porosidade do filme impresso, o que favorece, em relação ao NIP, a difusão tanto da molécula molde quanto do interferente.

As respostas dos eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP para soluções contendo simultaneamente DA (entre 10 e 20 μ mol.L⁻¹) e UA 250 μ mol.L⁻¹ em PBS, 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0 são mostradas na Figura 51-A.



Figura 51: A) DVs; B) A_{pico} obtidas para os eletrodos de GC/ERGO/Au, GC/ERGO/Au/NIP e GC/ERGO/Au/MIP, após extração, em soluções de DA 10 µmol.L⁻¹ + UA 250 µmol.L⁻¹, DA 15 µmol.L⁻¹ + UA 250 µmol.L⁻¹ e DA 20 µmol.L⁻¹ + UA 250 µmol.L⁻¹, todas em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

A Figura 51-B apresenta os valores de A_{pico} obtidos para DA e UA, individualmente, para cada um dos eletrodos e concentrações avaliadas. Em relação ao UA, para os três eletrodos foi possível notar a considerável redução do sinal com o aumento da concentração de DA, o que pode estar relacionado à saturação do eletrodo de trabalho e/ou ao aumento da intersecção dos picos, o que faz com que parte do sinal do UA seja considerado como DA. Adicionalmente, assim como observado quando o UA foi avaliado individualmente, a ordem crescente da A_{pico}, independente da condição, foi GC/ERGO/Au/NIP < GC/ERGO/Au/MIP < GC/ERGO/Au.

No que se refere à DA, como esperado, foi observado o aumento da A_{pico} com o aumento da concentração de DA para os três sistemas, sendo que o GC/ERGO/Au/MIP foi aquele que, notadamente, apresentou os maiores sinais para a eletrooxidação da dopamina, o que indica novamente, a interação preferencial do MIP com o analito utilizado como molde.

Além disso, é interessante notar que para os eletrodos de GC/ERGO/Au e GC/ERGO/Au/NIP, o somatório dos sinais de DA + UA se manteve aproximadamente constante durante todo o ensaio. No entanto, para o GC/ERGO/Au/MIP houve o aumento do sinal conforme o aumento da concentração de DA, o que pode ser mais um indício de que o MIP possui grande capacidade de absorver o analito molde na matriz polimérica.

Dessa forma, considerando o sistema proposto para a leitura direta da dopamina e os resultados observados, é possível inferir que:

A) Após a extração, o eletrodo de GC/ERGO/Au/MIP se mostrou bastante permeável à DA e apresentou alguma interação preferencial com a molécula molde, tanto para a análise individual quanto simultânea, considerando o UA como interferente. Além disso, foi observado que os sinais referentes à eletrooxidação da dopamina para o MIP foram superiores aos do GC/ERGO/Au, o que pode estar relacionado à grande capacidade da matriz polimérica em absorver a molécula molde;

B) Em relação à especificidade do eletrodo, a pequena diferença das A_{pico} do GC/ERGO/Au e o GC/ERGO/Au/MIP para a eletrooxidação do UA quando o interferente foi considerado individualmente, sugere que o filme polimérico não é exclusivo ao molde e permite a difusão de outras moléculas pela matriz de P*m*-PD. No entanto, é necessário levar em consideração que

a concentração de UA utilizada foi bem superior à de DA. Além disso, quando DA e UA foram analisados simultaneamente, foi evidente que a resposta do GC/ERGO/Au/MIP à molécula molde foi muito superior àquela observada para o interferente.

C) Por fim, independente do analito e condição avaliada (individual ou simultânea), o filme de GC/ERGO/Au/NIP apresentou as menores respostas, possivelmente devido à maior compactação e menor permeabilidade do filme. Dessa forma, é provável que o NIP sirva como um bloqueio, dificultando a chegada das espécies em solução (analito, eletrólito e solvente) à superfície do eletrodo. Adicionalmente, visto que as morfologias do MIP e NIP podem variar consideravelmente, talvez a estratégia mais correta para a avaliação da especificidade fosse a síntese de MIPs com diferentes moléculas moldes, por exemplo, MIPs para DA e UA, e comparação do desempenho desses materiais.

4.4.5. Compósitos de SPE/ERGO/Au/Pm-PD para detecção de dNTPs

Assim como mencionado na Seção 1.6., a construção de sensores eletroquímicos utilizando SPE como plataforma confere ao sistema uma série de vantagens, tais como, pequeno volume de trabalho, praticidade, portabilidade, baixo custo e descartabilidade, todas elas essenciais para a construção de sensores e biossensores para a análise de espécies de interesse biológico.

Visto que, em última instância, o objetivo deste trabalho foi propor uma metodologia sintética e operacional a respeito da tecnologia dos MIPs para a aplicação em sistemas bioanalíticos, é interessante avaliar a possibilidade de transferir a metodologia desenvolvida sobre o eletrodo convencional de GC para o SPE.

Além disso, dado que boa parte das biomoléculas de interesse analítico não é eletroativa ou apresenta pouca eletroatividade, é necessário avaliar a metodologia proposta utilizando a leitura indireta com sonda eletroquímica. Dessa forma, foi sintetizado o compósito de SPE/ERGO/Au/MIP utilizando o nucleotídeo dATP como molécula molde. A especificidade do filme foi avaliada pela comparação das respostas eletroquímicas do sistema à sonda de K₃[Fe(CN)₆] antes e após a extração, assim como, após a incubação em diferentes soluções de interferentes, dGTP e dTTP, e por fim, novamente em solução contendo a molécula de interesse. Para efeito de comparação, os eletrodos de SPE/ERGO/Au/NIP (sem molécula molde) e SPE/ERGO/Au (sem filme polimérico) também foram sintetizados e avaliados nas mesmas condições.

4.4.5.1. Desoxinucleotídeos: estrutura e eletroatividade

As fórmulas estruturais dos nucleotídeos de dATP, dGTP, dCTP e dTTP são apresentadas na Figura 52, sendo que as duas primeiras são derivadas de purinas e as últimas de pirimidinas.



Figura 52: estruturas químicas dos nucleotídeos dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

Antes da avaliação do SPE como plataforma eletroquímica para os filmes poliméricos, a capacidade dos dNTPs sofrerem eletrooxidação foi avaliada por DPV, individualmente, utilizando GC/ERGO/Au como eletrodo de trabalho e solução de dNTP 1,0 mmol.L⁻¹, em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, Figura 53.



Figura 53: DPVs obtidas para o eletrodo de GC/ERGO/Au em solução individual de cada dNTP 1,0 mmol.L⁻¹, em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Embora diversos trabalhos apresentem evidências de que os dNTPs são eletroativos sobre diversos materiais de eletrodo [136], nas condições avaliadas, para todas as espécies apenas um pequeno sinal eletroquímico foi observado entre 1,3 e 1,5 V. A diferença entre o descrito na literatura e o observado na Figura 53 pode estar relacionada à presença do Au, visto que o eletrodo de GC modificado com o RGO se mostrou bastante sensível à oxidação das bases nitrogenadas em diversas condições de anelamento [137].
Dessa forma, devido à baixa eletroatividade dos dNTPS nas condições avaliadas, eles podem ser considerados espécies não eletroativas e, portanto, modelos viáveis para a construção de sensores baseados em MIP com leitura indireta.

4.4.5.2. Modificação de SPE com ERGO/Au/MIP e NIP de Pm-PD

A modificação do eletrodo de SPE seguiu o procedimento idêntico àquele utilizado para o GC e descrito nas Seções 4.1. e 4.2.4., sendo eles: limpeza/ativação do eletrodo por CV em solução de H₂SO₄, eletrorredução de GO por CA e eletrodeposição de Au por CV, Figuras 54-A, B e C, respectivamente.

Por fim, o SPE/ERGO/Au/MIP foi obtido por CV, a partir de solução contendo *m*-PD 15 mmol.L⁻¹ e dATP 5,0 mmol.L⁻¹ em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,2, entre -0,5 e 1,0 V, 50 mV.s⁻¹, durante 5 ciclos. A quantidade de ciclos de eletropolimerização foi reduzida, a fim de obter um filme menos espesso e assim favorecer a difusão da sonda de K_3 [Fe(CN)₆]. Para a obtenção do SPE/ERGO/Au/NIP foi seguido o mesmo procedimento, exceto a utilização do dATP. As curvas de CV obtidas para os eletrodos de SPE/ERGO/Au no tampão de acetato e posteriormente para a eletropolimerização de cada um dos filmes poliméricos (1° ciclo) são apresentadas na Figura 54-D.



Figura 54: A) CVs referentes à limpeza/ativação eletroquímica em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ dos eletrodos de SPE (1° ciclo); B) CAs referentes à eletroredução de GO 0,50 mg.mL⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹ sobre os SPEs; C) CVs referentes à eletrodeposição de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹ sobre os eletrodos de SPE/ERGO (1° CVs NIP $(m-PD \ 15 \ mmol.L^{-1})$ ciclo); D) referentes à síntese do e MIP (m-PD 15 mmol.L⁻¹ + dATP 5,0 mmol.L⁻¹) em tampão de acetato 0,2 mol.L⁻¹ (1º ciclo) sobre os eletrodos de SPE/ERGO/Au, as CVs obtidas apenas com o eletrólito de suporte também são apresentadas.

4.4.5.3. Desempenho SPE/ERGO/Au/MIP para dATP

Após a síntese dos filmes poliméricos, os eletrodos de SPE/ERGO/Au, SPE/ERGO/Au/NIP e SPE/ERGO/Au/MIP foram extraídos por CV, em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, entre -1,0 e 1,0 V, v = 100 mV.s⁻¹, durante 5 ciclos.

Visto a baixa eletroatividade do analito e a necessidade da sonda, comumente o procedimento para a leitura indireta se dá em duas etapas, primeiramente, o eletrodo modificado

com o filme polimérico é incubado em solução contendo o analito de interesse/interferente (etapa de religação), em seguida, o eletrodo é transferido para a solução que contém a sonda (etapa de leitura). A princípio, desde que o analito seja estável e não interaja com a sonda, acredita-se ser possível o uso de uma única solução que contenha tanto o analito/interferente quanto a sonda. No entanto, essa não é prática observada na literatura, possivelmente por alguma competição entre sonda e analito pelos sítios de religação, o que levaria à redução de desempenho do MIP.

Dessa forma, neste a trabalho a incubação foi realizada em solução de dNTP 1,0 mM em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0, por CA, com o seguinte programa de potencial: 0,0 V por 5 s seguido de -0,5 V por 25 s, 10 ciclos. Para ilustrar o procedimento, a incubação de SPE/ERGO/Au, SPE/ERGO/Au/NIP e SPE/ERGO/Au/MIP em solução de dATP é apresentada na Figura 55, sendo que as curvas similares de i x t para os três eletrodos indicam que, para a etapa de incubação, não há diferença considerável entre eles.



Figura 55: CAs referentes à incubação dos eletrodos de SPE/ERGO/Au, SPE/ERGO/Au/NIP e SPE/ERGO/Au/MIP em solução de dATP 1,0 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹, pH 7,0.

Em seguida, os eletrodos de SPE/ERGO/Au (A), SPE/ERGO/Au/NIP (B) e SPE/ERGO/Au/NIP (C) foram caracterizados por CV, DPV, LPV e EIS, Figuras 56-A, B, C e D, respectivamente, utilizando a sonda K_3 [Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹ nas seguintes condições: 1) sem extração, 2) após extração, após incubação em 3) dTTP, 4) dGTP e 5) dATP, todos os nucleotídeos em concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹.

Os valores de i_{pico}-CV, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para cada um dos casos foram calculados e sumarizados na Tabela 11. Visto a pequena i_{pico}-CV observada e a dificuldade de sua determinação (principalmente para os casos de baixa v), diferente das seções anteriores, não houve a variação de v e, portanto, a A_{elet} não foi determinada pela equação de Randles-Sevcik, o parâmetro avaliado foi apenas a i_{pico}-CV para a v = 50 mV.s⁻¹.

e GC/ERGO/Au/MIP (C) para as seguintes condições 1) sem extração, 2) após extração, após incubação em 3) dTTP, 4) dGTP e 5) dATP, os três nucleotídeos em concentração de 1,0 mmol.L⁻¹ em PBS 0,2 mol.L⁻¹. Todos os dados foram Tabela 11: Valores calculados de i_{pico}, A_{pico}, i_o, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} para os eletrodos GC/ERGO/Au (A), GC/ERGO/Au/NIP (B) obtidos em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

Condição	Legenda	ipico-CV (µA)	A _{pico} -DPV (x10 ⁻⁷ u.a.)	i₀-LPV (µA)	Eeq-LPV (V)	R _{pol} -LPV (kΩ)	Ret-EIS (kO)
SPE-ERGO-Au_sem extração	A-1	30	7,9	44	0,12	5,9	1,8
SPE-ERGO-Au_após extração	A-2	32	7,9	40	0,11	6	1,8
SPE-ERGO-Au_incubação dTTP	A-3	30	6,9	41	0,11	6,3	16
SPE-ERGO-Au_incubação dGTP	A-4	27	5,1	37	0,11	6,7	2,2
SPE-ERGO-Au_incubação dATP	A-5	26	4,8	38	0,10	6,9	3
SPE-ERGO-Au-NIP_sem extração	B-1	5,2	6,7	1,0	0,076	29	58
SPE-ERGO-Au-NIP_após extração	B-2	6,5	3,5	2,6	0,10	53	69
SPE-ERGO-Au-NIP_incubação dTTP	B-3	3,0	3,7	2,0	0,10	22	352
SPE-ERGO-Au-NIP_incubação dGTP	B-4	6,3	3,5	3,3	0,10	52	296
SPE-ERGO-Au-NIP_incubação dATP	B-5	6,2	3,3	2,0	0,093	65	75
SPE-ERGO-Au-MIP_sem extração	C-1	9,8	5,4	14	0,12	13	9,3
SPE-ERGO-Au-MIP_após extração	C-2	5,2	3,8	5,8	0,13	25	20
SPE-ERGO-Au-MIP_incubação dTTP	C-3	3,9	3,8	6,1	0,12	25	16
SPE-ERGO-Au-MIP_incubação dGTP	C-4	5,1	4,0	7,2	0,11	26	153
SPE-ERGO-Au-MIP_incubação dATP	C-5	6,1	4,0	4,9	0,086	22	26

A partir dos valores da Tabela 11, foi realizado o cálculo do PCA e a construção do gráfico *biplot*, Figura 56-E, em que é possível notar que, independente da condição, os pontos foram agrupados em três regiões distintas, A, B e C, sendo que cada uma delas está relacionada ao respectivo eletrodo utilizado na aquisição dos dados, a única exceção foi o ponto C-5, SPE/ERGO/Au/MIP incubado em dATP, que foi deslocado para a região B, indicando que, de alguma forma, a interação entre a molécula molde e o MIP se deu de maneira diferente daquela observada nas demais condições e mais próxima ao comportamento do SPE/ERGO/Au/NIP.



Figura 56: A) CV, v = 50 mV.s⁻¹; B) DPV; C) LPV; D) EIS para os eletrodos de SPE/ERGO/Au (A), SPE/ERGO/Au/NIP (B) e SPE/ERGO/Au/MIP (C) nas seguintes condições: 1) sem extração, 2) após extração, após incubação em 3) dTTP, 4) dGTP e 5) dATP. Todas as leituras foram conduzidas em solução de K₃[Fe(CN)₆] 5,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol. L⁻¹. E) PCA considerando as variáveis de i_{pico}, A_{pico}, i₀, E_{eq}, R_{pol} e R_{ct} nas condições supracitadas.

Cabe salientar que o exposto acima diz respeito ao observado em um único experimento, certamente, estudos adicionais são necessários para avaliar em mais detalhes a especificidade do sistema SPE/ERGO/Au/MIP-P*m*-PD na análise de espécies não eletroativas e de interesse biológico com leitura indireta.

Além disso, para este experimento em específico, foi fundamental o uso da análise multivariada, visto que a análise individual de cada parâmetro não apresentou uma clara relação, a diferenciação do sistema só foi possível quando os dados foram tomados em conjunto.

No entanto, acredita-se que a metodologia pode ser promissora e inovadora para a construção de biossensores, especificamente, imunossensores.

Por fim, assim como observado para os eletrodos de GC/ERGO/Au na Seção 4.4.4.2., o pico referente à redução do Au pode ser um indício da eficiência do processo extrativo. Além disso, acredita-se que esse pico por si só pode servir como ferramenta de leitura indireta, visto que, a princípio, na ausência do analito de interesse durante a etapa de incubação, a matriz polimérica estaria desimpedida e solvente/eletrólito poderiam difundir livremente, chegando à superfície do eletrodo e fornecendo os elétrons necessários para a redução dos óxidos metálicos. No entanto, na presença do analito de interesse, a matriz polimérica estaria mais impedida, consequentemente, a difusão das espécies em solução seria prejudicada e o sinal referente à redução do metal seria menor do que no caso anterior.

A vantagem dessa abordagem seria a praticidade, visto que a "sonda" já estaria na composição do próprio eletrodo. Além disso, não havendo a necessidade da sonda de K_3 [Fe(CN)₆], os processos de incubação e leitura poderiam ser conduzidos em uma única solução, assim como no caso da leitura direta, reduzindo as etapas e tempo total de análise.

5. Conclusão

De maneira geral, este trabalho pode ser considerado como um estudo sobre eletroquímica aplicada ao desenvolvimento de materiais e à eletroanalítica, visto que toda a metodologia sintética e operacional apresentada foi baseada em técnicas eletroquímicas, mostrando a versatilidade das mesmas e usufruindo de todas as suas vantagens para a obtenção de compósitos de ERGO/Au/P*m*-PD, tais como, síntese rápida, simples (sem necessidade de vidrarias e equipamentos diversos, apenas célula eletroquímica e eletrodos), reprodutível, sem uso de agentes redutores, em meio aquoso e deposição direta dos filmes sobre o eletrodo de trabalho.

A princípio, cada uma das etapas foi avaliada individualmente. Para o ERGO, os filmes foram obtidos por CA, sendo que GO com concentração de 0,50 mg.mL⁻¹ na suspensão de partida e 10 ciclos de eletrorredução foi a condição sintética em que se obteve o eletrodo modificado com maior capacidade de eletrooxidar a dopamina e melhores propriedades eletroquímicas para o K₃[Fe(CN)₆].

No que diz respeito aos metais, os filmes foram obtidos por CV sobre GC. Os eletrodos modificados com Ag, Au, Cu, Pd e Pt foram avaliados em relação à capacidade de eletrooxidar a dopamina, assim como, às propriedades eletroquímicas para o K_3 [Fe(CN)₆], sendo que o filme de Au, obtido a partir de solução de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ e 10 ciclos de eletrodeposição foi o sistema que apresentou melhor desempenho.

Em relação ao compósito de ERGO/Au, a condição utilizada foi GO 0,50 mg.mL⁻¹ e 5 ciclos de eletrorredução por CA seguido da eletrodeposição por CV de HAuCl₄ 0,50 mmol.L⁻¹ por 5 ciclos. O filme resultante apresentou características tanto do ERGO quanto do Au e um grande efeito sinérgico para o processo de transferência de elétrons com a sonda de K_3 [Fe(CN)₆], para a dopamina, o sinal obtido para o compósito de ERGO/Au foi quase idêntico ao do eletrodo modificado apenas com o ERGO.

No que diz respeito à eletropolimerização, a técnica utilizada foi a CV e os monômeros avaliados foram *o*-PD, *m*-PD, Py e Thi, sendo que a *o*-PD também foi utilizada como modelo para estudos adicionais sobre a influência do pH, concentração do monômero e material de eletrodo de trabalho na síntese do filme polimérico. Além disso, a fim de avaliar a influência da molécula molde no processo de eletropolimerização, dopamina e AA foram avaliados como moldes para MIPs de P*o*-PD, P*m*-PD e PPy, enquanto os NIPs foram sintetizados seguindo o mesmo procedimento, exceto o uso das moléculas molde.

Posteriormente, MIPs de P*o*-PD, P*m*-PD e PPy foram sintetizados a partir de diferentes concentrações de monômeros (5,0, 10 e 15 mmol.L⁻¹) sobre GC utilizando dopamina (5,0 mmol.L⁻¹) como molécula molde. Os NIPs foram obtidos seguindo o mesmo procedimento, exceto o uso da dopamina. Após a extração por CV, as respostas dos MIPs foram comparadas às dos NIPs, sendo que apenas os eletrodos modificados com P*o*-PD e P*m*-PD apresentaram alguma diferença significativa.

Considerando apenas os polímeros de P*o*-PD e P*m*-PD como candidatos a materiais para a síntese de MIPs, a estabilidade da solução monomérica durante a etapa de eletropolimerização e as estratégias extrativas necessárias para a remoção do molde foram avaliadas, sendo que, para ambos os casos, o polímero obtido a partir do isômero *meta* apresentou resultados mais satisfatórios e, portanto, este material foi considerado como monômero mais adequado para a eletropolimerização dos MIPs.

Adicionalmente, a metodologia proposta e o material de ERGO/Au/Pm-PD-MIP desenvolvido foi aplicado à análise de espécies eletroativas (dopamina e ácido úrico) e não eletroativas (desoxinucleotídeos trifosfatados) por leituras direta e não direta, respectivamente.

No caso da análise direta da dopamina, quando os analitos foram considerados individualmente, o GC/ERGO/Au/MIP apresentou maior sensibilidade à DA do que o GC/ERGO/Au e GC/ERGO/Au/P*m*-PD-NIP, coeficiente angular da reta cerca de 62% e 78%

maior, respectivamente. Quando foi considerado apenas o UA, o sinal observado para o GC/ERGO/Au/MIP foi cerca de 80% daquele obtido para o GC/ERGO/Au. Adicionalmente, foi avaliada a resposta do MIP proposto às espécies DA e UA simultaneamente em solução e, novamente, o sinal do MIP para a DA foi bem superior ao observado para os dois outros eletrodos, evidenciando, dessa forma, a interação preferencial entre material impresso e molécula molde.

relação à análise de espécies Em não eletroativas com 0 filme de ERGO/Au/Pm-PD-MIP, o compósito foi sintetizado sobre SPE, dATP foi a molécula molde e dGTP e dTTP foram tratados como interferentes. Os sinais obtidos para os eletrodos de SPE/ERGO/Au, SPE/ERGO/Au/Pm-PD-MIP e SPE/ERGO/Au/Pm-PD-NIP sem extração, após extração e incubação em cada um dos dNTPs foram comparados por diferentes técnicas eletroquímicas e utilizados para a construção do PCA, onde foi possível observar três grupos distintos, cada um relacionado a um eletrodo, e o único ponto deslocado do seu respectivo grupo foi justamente aquele referente ao SPE/ERGO/Au/Pm-PD-MIP após a incubação na solução de dATP, indicando, mais uma vez, a interação preferencial entre o MIP e a molécula molde.

Por fim, o trabalho apresentou estratégias operacionais inovadoras para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados na tecnologia MIPs obtidos por eletropolimerização de monômeros eletroativos, sendo elas i) utilizar o pico de redução do óxido metálico, ressaltado pelo ERGO, como indicativo da eficiência do processo extrativo, assim como ferramenta de leitura indireta por si só e ii) uso das técnicas eletroquímicas de CV, DPV, LSV e EIS juntamente com PCA como procedimento prático, simples, robusto e intuitivo para a caracterização de eletrodos modificados com a sonda de K₃[Fe(CN)₆].

6. Referências

- Vasapollo, G.; Sole, R. Del; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, *12* (9), 5908–5945. https://doi.org/10.3390/ijms12095908.
- (2) Cormack, P. A.; Elorza, A. Z. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation. J. Chromatogr. B 2004, 804 (1), 173–182. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013.
- (3) Lorenzo, C. A.; Concheiro, A. *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*; Lorenzo, C. A., Concheiro, A., Eds.; Smithers Rapra: Shawbury, UK, **2013**.
- López, M. C. B.; Castañón, M. J. L.; Ordieres, A. J. M.; Blanco, P. T. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2004, 23 (1), 36–48. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00102-5.
- (5) Moral, N. P.; Mayes, A. . Comparative Study of Imprinted Polymer Particles Prepared by Different Polymerisation Methods. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *504* (1), 15–21. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00533-6.
- (6) Jia, M.; Zhang, Z.; Li, J.; Ma, X.; Chen, L.; Yang, X. Molecular Imprinting Technology for Microorganism Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 106, 190–201. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.011.
- (7) Yang, B.; Fu, C.; Li, J.; Xu, G. Frontiers in Highly Sensitive Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors: Challenges and Strategies. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 105, 52–67. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.011.
- Uzun, L.; Turner, A. P. F. Molecularly-Imprinted Polymer Sensors: Realising Their Potential. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 76, 131–144. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.013.
- (9) Gui, R.; Jin, H.; Guo, H.; Wang, Z. Recent Advances and Future Prospects in Molecularly Imprinted Polymers-Based Electrochemical Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2018, 100, 56–70. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.058.
- (10) Bănică, F. G. *Chemical Sensors and Biosensors*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2012**. https://doi.org/10.1002/9781118354162.
- (11) Song, S.; Xu, H.; Fan, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1* (4), 433–440. https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.433.
- (12) Wang, X.; Lu, X.; Chen, J. Development of Biosensor Technologies for Analysis of Environmental Contaminants. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2014, 2, 25–32. https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.04.001.
- (13) Ejeian, F.; Etedali, P.; Tehrani, H. A. M.; Soozanipour, A.; Low, Z. X.; Asadnia, M.; Kafrani, A. T.; Razmjou, A. Biosensors for Wastewater Monitoring: A Review. *Biosens. Bioelectron.* 2018, *118*, 66–79. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.019.
- (14) Lv, M.; Liu, Y.; Geng, J.; Kou, X.; Xin, Z.; Yang, D. Engineering Nanomaterials-Based Biosensors for Food Safety Detection. *Biosens. Bioelectron.* 2018, 106, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.049.

- (15) Rotariu, L.; Lagarde, F.; Renault, N. J.; Bala, C. Electrochemical Biosensors for Fast Detection of Food Contaminants Trends and Perspective. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016, 79, 80–87. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.017.
- (16) Bahadır, E. B.; Sezgintürk, M. K. Applications of Commercial Biosensors in Clinical, Food, Environmental, and Biothreat/Biowarfare Analyses. *Anal. Biochem.* 2015, 478, 107–120. https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011.
- (17) Peris, M.; Gilabert, L. E. Electronic Noses and Tongues to Assess Food Authenticity and Adulteration. *Trends Food Sci. Technol.* 2016, 58, 40–54. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.014.
- (18) Squissato, A. L.; Almeida, E. S.; Silva, S. G.; Richter, E. M.; Batista, A. D.; Munoz, R. A. A. Screen-Printed Electrodes for Quality Control of Liquid (Bio)Fuels. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 108, 210–220. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.024.
- (19) Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O'Kennedy, R. J. Antibody Production, Design and Use for Biosensor-Based Applications. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009, 20 (1), 10–26. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.010.
- (20) Patris, S.; Vandeput, M.; Kauffmann, J. M. Antibodies as Target for Affinity Biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 239–246. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.005.
- (21) Bollella, P.; Gorton, L. Enzyme Based Amperometric Biosensors. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *10*, 157–173. https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.06.003.
- (22) Kurbanoglu, S.; Ozkan, S. A.; Merkoçi, A. Nanomaterials-Based Enzyme Electrochemical Biosensors Operating through Inhibition for Biosensing Applications. *Biosens. Bioelectron.* 2017, 89, 886–898. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.102.
- (23) Zhao, W. W.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. Photoelectrochemical Enzymatic Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92*, 294–304. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.009.
- (24) Diculescu, V. C.; Paquim, A. M. C.; Brett, A. M. O. Applications of a DNA-Electrochemical Biosensor. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 23–36. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.019.
- (25) Palenzuela, C. L. M.; Fernández, B. M.; López, M. S. P.; Ruiz, B. L. Electrochemical Genosensors as Innovative Tools for Detection of Genetically Modified Organisms. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015, 66, 19–31. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.006.
- (26) Li, F.; Yu, Z.; Han, X.; Lai, R. Y. Electrochemical Aptamer-Based Sensors for Food and Water Analysis: A Review. *Anal. Chim. Acta* 2019, 1051, 1–23. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.058.
- (27) Negahdary, M. Aptamers in Nanostructure-Based Electrochemical Biosensors for Cardiac Biomarkers and Cancer Biomarkers: A Review. *Biosens. Bioelectron.* 2020, 152, 112018. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112018.
- (28) Wang, L.; Zhang, Y.; Wu, A.; Wei, G. Designed Graphene-Peptide Nanocomposites for Biosensor Applications: A Review. *Anal. Chim. Acta* 2017, 985, 24–40. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.054.
- (29) Karimzadeh, A.; Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; Guardia, M. de la. Peptide Based Biosensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *107*, 1–20.

https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.018.

- (30) Wangchareansak, T.; Thitithanyanont, A.; Chuakheaw, D.; Gleeson, M. P.; Lieberzeit, P. A.; Sangma, C. A Novel Approach to Identify Molecular Binding to the Influenza Virus H5N1: Screening Using Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). *Med. Chem. Commun.* 2014, 5 (5), 617–621. https://doi.org/10.1039/C3MD00272A.
- (31) Burlage, R. S.; Tillmann, J. Biosensors of Bacterial Cells. J. Microbiol. Methods 2017, 138, 2–11. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.023.
- (32) Ahmed, A.; Rushworth, J. V.; Hirst, N. A.; Millner, P. A. Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, 27 (3), 631–646. https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13.
- (33) Piletsky, S.; Canfarotta, F.; Poma, A.; Bossi, A. M.; Piletsky, S. Molecularly Imprinted Polymers for Cell Recognition. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38* (4), 368–387. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.10.002.
- (34) Sharma, P. S.; Dabrowski, M.; D'Souza, F.; Kutner, W. Surface Development of Molecularly Imprinted Polymer Films to Enhance Sensing Signals. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2013, 51, 146–157. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.006.
- (35) Malitesta, C.; Mazzotta, E.; Picca, R. A.; Poma, A.; Chianella, I.; Piletsky, S. A. MIP Sensors – the Electrochemical Approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402 (5), 1827– 1846. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5405-5.
- (36) Adam, H.; Stanislaw, G.; Folke Ingman. Chemical Sensors: Definitions and Classifitation. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63* (9), 1247–1250.
- (37) Stradiotto, N. R.; Yamanaka, H.; Zanoni, M. V. B. Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14* (2), 159–173. https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003.
- (38) Sharma, P. S.; Pietrzyk-Le, A.; D'Souza, F.; Kutner, W. Electrochemically Synthesized Polymers in Molecular Imprinting for Chemical Sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402 (10), 3177–3204. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5696-6.
- (39) Suryanarayanan, V.; Wu, C.; Ho, K. Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors. *Electroanalysis* **2010**, *22* (16), 1795–1811. https://doi.org/10.1002/elan.200900616.
- (40) Spieker, E.; Lieberzeit, P. A. Molecular Imprinting Studies for Developing QCM-Sensors for Bacillus Cereus. *Procedia Eng.* 2016, 168, 561–564. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.11.525.
- (41) Golker, K.; Olsson, G. D.; Nicholls, I. A. The Influence of a Methyl Substituent on Molecularly Imprinted Polymer Morphology and Recognition – Acrylic Acid versus Methacrylic Acid. *Eur. Polym. J.* 2017, 92 (November 2016), 137–149. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.043.
- (42) Byrne, M. E.; Park, K.; Peppas, N. A. Molecular Imprinting within Hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (1), 149–161. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00246-0.
- (43) Byrne, M. E.; Salian, V. Molecular Imprinting within Hydrogels II: Progress and Analysis of the Field. *Int. J. Pharm.* **2008**, *364* (2), 188–212. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.002.
- (44) Erdőssy, J.; Horváth, V.; Yarman, A.; Scheller, F. W.; Gyurcsányi, R. E.

Electrosynthesized Molecularly Imprinted Polymers for Protein Recognition. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 179–190. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.018.

- (45) Ates, M.; Karazehir, T.; Sarac, A. S. Conducting Polymers and Their Applications. *Curr. Phys. Chem.* **2012**, *2*, 224–240.
- (46) Das, T. K.; Prusty, S. Review on Conducting Polymers and Their Applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 2012, 51 (14), 1487–1500. https://doi.org/10.1080/03602559.2012.710697.
- (47) Duran, B.; Bereket, G.; Duran, M. Electrochemical Synthesis and Characterization of Poly(*m*-Phenylenediamine) Films on Copper for Corrosion Protection. *Prog. Org. Coatings* 2012, 73 (2–3), 162–168. https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.10.008.
- (48) Ayankojo, A. G.; Reut, J.; Boroznjak, R.; Öpik, A.; Syritski, V. Molecularly Imprinted Poly(*meta*-Phenylenediamine) Based QCM Sensor for Detecting Amoxicillin. *Sensors Actuators B Chem.* 2018, 258, 766–774. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.194.
- (49) Wang, B.; Pan, S.; Qin, Y.; Tan, W.; Tao, Y.; Li, K.; Kong, Y. Synthesis of Efficient Electrocatalyst for Oxygen Reduction Reaction by Using Poly(*m*-Phenylenediamine) as the Interlayer Spacer and the Sources of N-Doped Carbon and MnO. *Synth. Met.* 2017, 224, 92–98. https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.12.028.
- (50) Li, W.; Wu, H.; Chen, J.; Xue, H.; Kong, Y. Synthesis of Size-Controllable Pt Nanoparticles Decorated-Poly(*m*-Phenylenediamine) and Its High Catalytic Activity for Methanol Oxidation. *Synth. Met.* **2013**, *185–186*, 56–60. https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2013.09.042.
- (51) Shanmugham, C.; Rajendran, N. Poly(*m*-phenylenediamine)-coated 316L SS: A Promising Material for Bipolar Plates in PEMFC Environment. *Mater. Corros.* 2019, 70 (9), 1646–1656. https://doi.org/10.1002/maco.201810524.
- (52) Huang, M. R.; Rao, X. W.; Li, X. G.; Ding, Y. B. Lead Ion-Selective Electrodes Based on Polyphenylenediamine as Unique Solid Ionophores. *Talanta* 2011, 85 (3), 1575– 1584. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.049.
- Yu, W.; Zhang, L.; Wang, H.; Chai, L. Adsorption of Cr(VI) Using Synthetic Poly(*m*-Phenylenediamine). J. Hazard. Mater. 2013, 260, 789–795. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.045.
- (54) Sang, P. L.; Wang, Y. Y.; Zhang, L. Y.; Chai, L. Y.; Wang, H. Y. Effective Adsorption of Sulfate Ions with Poly(*m*-Phenylenediamine) in Aqueous Solution and Its Adsorption Mechanism. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2013**, *23* (1), 243–252. https://doi.org/10.1016/S1003-6326(13)62452-8.
- (55) Wang, H.; Yuan, T.; Huang, L.; He, Y.; Wu, B. C.; Hou, L.; Liao, Q.; Yang, W. Enhanced Chloride Removal of Phosphorus Doping in Carbon Material for Capacitive Deionization: Experimental Measurement and Theoretical Calculation. *Sci. Total Environ.* 2020, 720, 137637. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137637.
- (56) Cheng, X.; Sun, P.; Zhang, S.; Sun, D.; Jiang, B.; Wang, W.; Xin, X. Self-Assembly of *m*-Phenylenediamine and Polyoxometalate into Hollow-Sphere and Core-in-Hollow-Shell Nanostructures for Selective Adsorption of Dyes. *J. Mol. Liq.* **2019**, 287, 110982. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.110982.
- (57) Xiong, T.; Yuan, X.; Wang, H.; Wu, Z.; Jiang, L.; Leng, L.; Xi, K.; Cao, X.; Zeng, G.

Highly Efficient Removal of Diclofenac Sodium from Medical Wastewater by Mg/Al Layered Double Hydroxide-Poly(*m*-Phenylenediamine) Composite. *Chem. Eng. J.* **2019**, *366*, 83–91. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.069.

- (58) Elshafey, R.; Radi, A. E. Electrochemical Impedance Sensor for Herbicide Alachlor Based on Imprinted Polymer Receptor. J. Electroanal. Chem. 2018, 813, 171–177. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.036.
- (59) Liu, Y.; Liang, Y.; Yang, R.; Li, J.; Qu, L. A Highly Sensitive and Selective Electrochemical Sensor Based on Polydopamine Functionalized Graphene and Molecularly Imprinted Polymer for the 2,4-Dichlorophenol Recognition and Detection. *Talanta* 2019, 195, 691–698. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.052.
- (60) Beluomini, M. A.; da Silva, J. L.; Sedenho, G. C.; Stradiotto, N. R. D-Mannitol Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer on Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide Decorated with Gold Nanoparticles. *Talanta* 2017, *165*, 231–239. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.040.
- (61) Ayankojo, A. G.; Reut, J.; Ciocan, V.; Öpik, A.; Syritski, V. Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensor for Electrochemical Detection of Erythromycin. *Talanta* 2020, 209, 120502. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120502.
- (62) Kidakova, A.; Boroznjak, R.; Reut, J.; Öpik, A.; Saarma, M.; Syritski, V. Molecularly Imprinted Polymer-Based SAW Sensor for Label-Free Detection of Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor Protein. *Sensors Actuators B Chem.* 2020, 308, 127708. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127708.
- (63) Chen, D.; Feng, H.; Li, J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. *Chem. Rev.* 2012, *112* (11), 6027–6053. https://doi.org/10.1021/cr300115g.
- (64) Compton, O. C.; Nguyen, S. T. Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials. *Small* 2010, 6 (6), 711–723. https://doi.org/10.1002/smll.200901934.
- (65) Justino, C. I. L.; Gomes, A. R.; Freitas, A. C.; Duarte, A. C.; Santos, T. A. P. R. Graphene Based Sensors and Biosensors. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2017, *91*, 53–66. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.003.
- (66) Kuila, T.; Mishra, A. K.; Khanra, P.; Kim, N. H.; Lee, J. H. Recent Advances in the Efficient Reduction of Graphene Oxide and Its Application as Energy Storage Electrode Materials. *Nanoscale* 2013, 5 (1), 52–71. https://doi.org/10.1039/c2nr32703a.
- (67) Bagri, A.; Mattevi, C.; Acik, M.; Chabal, Y. J.; Chhowalla, M.; Shenoy, V. B. Structural Evolution during the Reduction of Chemically Derived Graphene Oxide. *Nat. Chem.* 2010, 2 (7), 581–587. https://doi.org/10.1038/nchem.686.
- (68) Shao, Y.; Wang, J.; Engelhard, M.; Wang, C.; Lin, Y. Facile and Controllable Electrochemical Reduction of Graphene Oxide and Its Applications. *J. Mater. Chem.* 2010, 20 (4), 743–748. https://doi.org/10.1039/b917975e.
- (69) Liang, Y.; Yu, L.; Yang, R.; Li, X.; Qu, L.; Li, J. High Sensitive and Selective Graphene Oxide/Molecularly Imprinted Polymer Electrochemical Sensor for 2,4-Dichlorophenol in Water. Sensors Actuators, B Chem. 2017, 240, 1330–1335. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.137.

- (70) Liu, P.; Zhang, X.; Xu, W.; Guo, C.; Wang, S. Electrochemical Sensor for the Determination of Brucine in Human Serum Based on Molecularly Imprinted Poly-o-Phenylenediamine/SWNTs Composite Film. Sensors Actuators, B Chem. 2012, 163 (1), 84–89. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.011.
- (71) Chen, L.; Lian, H. T.; Sun, X. Y.; Liu, B. Sensitive Detection of L-5-Hydroxytryptophan Based on Molecularly Imprinted Polymers with Graphene Amplification. *Anal. Biochem.* 2017, 526, 58–65. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.017.
- (72) Plowman, B. J.; Bhargava, S. K.; O'Mullane, A. P. Electrochemical Fabrication of Metallic Nanostructured Electrodes for Electroanalytical Applications. *Analyst* 2011, 136 (24), 5107–5119. https://doi.org/10.1039/c1an15657h.
- (73) Campbell, F. W.; Compton, R. G. The Use of Nanoparticles in Electroanalysis: An Updated Review. Anal. Bioanal. Chem. 2010, 396 (1), 241–259. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3063-7.
- (74) Wang, C.; Astruc, D. Recent Developments of Metallic Nanoparticle-Graphene Nanocatalysts. *Prog. Mater. Sci.* **2018**, *94*, 306–383. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.01.003.
- (75) Chen, J.; Huang, H.; Zeng, Y.; Tang, H.; Li, L. A Novel Composite of Molecularly Imprinted Polymer-Coated PdNPs for Electrochemical Sensing Norepinephrine. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 65, 366–374. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.011.
- (76) Gu, Y.; Yan, X.; Li, C.; Zheng, B.; Li, Y.; Liu, W.; Zhang, Z.; Yang, M. Biomimetic Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer with Nitroreductase-like Activity for Metronidazole Detection. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 77, 393–399. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.09.060.
- (77) Roy, E.; Patra, S.; Tiwari, A.; Madhuri, R.; Sharma, P. K. Introduction of Selectivity and Specificity to Graphene Using an Inimitable Combination of Molecular Imprinting and Nanotechnology. *Biosens. Bioelectron.* 2017, 89, 234–248. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.056.
- (78) Li, J.; Xu, Z.; Liu, M.; Deng, P.; Tang, S.; Jiang, J.; Feng, H.; Qian, D.; He, L. Ag/N-Doped Reduced Graphene Oxide Incorporated with Molecularly Imprinted Polymer: An Advanced Electrochemical Sensing Platform for Salbutamol Determination. *Biosens. Bioelectron.* 2017, *90*, 210–216. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.016.
- (79) Amatatongchai, M.; Sroysee, W.; Jarujamrus, P.; Nacapricha, D.; Lieberzeit, P. A. Selective Amperometric Flow-Injection Analysis of Carbofuran Using a Molecularly-Imprinted Polymer and Gold-Coated-Magnetite Modified Carbon Nanotube-Paste Electrode. *Talanta* 2018, 179, 700–709. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.064.
- (80) Li, M.; Li, Y. T.; Li, D. W.; Long, Y. T. Recent Developments and Applications of Screen-Printed Electrodes in Environmental Assays-A Review. *Anal. Chim. Acta* 2012, 734, 31–44. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.018.
- (81) Metters, J. P.; Kadara, R. O.; Banks, C. E. New Directions in Screen Printed Electroanalytical Sensors: An Overview of Recent Developments. *Analyst* 2011, 136 (6), 1067. https://doi.org/10.1039/c0an00894j.
- (82) Beitollahi, H.; Mohammadi, S. Z.; Safaei, M.; Tajik, S. Applications of Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Modified Screen-Printed Electrodes: A Review. *Anal.*

Methods 2020, 12 (12), 1547–1560. https://doi.org/10.1039/C9AY02598G.

- (83) Kadara, R. O.; Jenkinson, N.; Banks, C. E. Characterization and Fabrication of Disposable Screen Printed Microelectrodes. *Electrochem. commun.* 2009, *11* (7), 1377– 1380. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.05.010.
- (84) Allen J. Bard, L. R. F. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd, **2000**.
- (85) Brett, A. M.; Brett, C. *Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações*, 1st ed.; Almedina, Ed.; **1996**.
- (86) McCreery, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (7), 2646–2687. https://doi.org/10.1021/cr068076m.
- (87) Yi, Y.; Weinberg, G.; Prenzel, M.; Greiner, M.; Heumann, S.; Becker, S.; Schlögl, R. Electrochemical Corrosion of a Glassy Carbon Electrode. *Catal. Today* 2017, 295, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.07.013.
- (88) Qiao, J. X.; Luo, H. Q.; Li, N. B. Electrochemical Behavior of Uric Acid and Epinephrine at an Electrochemically Activated Glassy Carbon Electrode. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2008, 62 (1), 31–35. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.012.
- (89) Jollife, I. T.; Cadima, J. Principal Component Analysis: A Review and Recent Developments. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2016, 374 (2065). https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202.
- (90) Lever, J.; Krzywinski, M.; Altman, N. Points of Significance: Principal Component Analysis. *Nat. Methods* **2017**, *14* (7), 641–642. https://doi.org/10.1038/nmeth.4346.
- (91) Mkhoyan, K. A.; Contryman, A. W.; Silcox, J.; Stewart, D. A.; Eda, G.; Mattevi, C.; Miller, S.; Chhowalla, M. Atomic and Electronic Structure of Graphene-Oxide. *Nano Lett.* 2009, 9 (3), 1058–1063. https://doi.org/10.1021/nl8034256.
- (92) Kauppila, J.; Kunnas, P.; Damlin, P.; Viinikanoja, A.; Kvarnström, C. Electrochemical Reduction of Graphene Oxide Films in Aqueous and Organic Solutions. *Electrochim. Acta* 2013, 89, 84–89. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.10.153.
- (93) Toh, S. Y.; Loh, K. S.; Kamarudin, S. K.; Daud, W. R. W. Graphene Production via Electrochemical Reduction of Graphene Oxide: Synthesis and Characterisation. *Chem. Eng. J.* 2014, 251, 422–434. https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.004.
- (94) Thangamuthu, M.; Gabriel, W. E.; Santschi, C.; Martin, O. J. F. Electrochemical Sensor for Bilirubin Detection Using Screen Printed Electrodes Functionalized with Carbon Nanotubes and Graphene. *Sensors (Switzerland)* 2018, 18 (3). https://doi.org/10.3390/s18030800.
- (95) Dubouis, N.; Grimaud, A. The Hydrogen Evolution Reaction: From Material to Interfacial Descriptors. *Chem. Sci.* 2019, 10 (40), 9165–9181. https://doi.org/10.1039/c9sc03831k.
- (96) Nørskov, J. K.; Bligaard, T.; Logadottir, A.; Kitchin, J. R.; Chen, J. G.; Pandelov, S.; Stimming, U. Trends in the Exchange Current for Hydrogen Evolution. *J. Electrochem. Soc.* 2005, *152* (3), J23. https://doi.org/10.1149/1.1856988.
- (97) Giri, S. D.; Sarkar, A. Electrochemical Study of Bulk and Monolayer Copper in Alkaline Solution. J. Electrochem. Soc. 2016, 163 (3), H252–H259.

https://doi.org/10.1149/2.0071605jes.

- (98) Gotti, G.; Fajerwerg, K.; Evrard, D.; Gros, P. Electrodeposited Gold Nanoparticles on Glassy Carbon: Correlation between Nanoparticles Characteristics and Oxygen Reduction Kinetics in Neutral Media. *Electrochim. Acta* 2014, *128*, 412–419. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.172.
- (99) Lin, T. H.; Hung, W. H. Electrochemical Deposition of Gold Nanoparticles on a Glassy Carbon Electrode Modified with Sulfanilic Acid. J. Electrochem. Soc. 2009, 156 (2), D45. https://doi.org/10.1149/1.3033524.
- (100) Liu, Y.; Huang, Z.; Xie, Q.; Sun, L.; Gu, T.; Li, Z.; Bu, L.; Yao, S.; Tu, X.; Luo, X.; Luo, S. Electrodeposition of Electroreduced Graphene Oxide-Au Nanoparticles Composite Film at Glassy Carbon Electrode for Anodic Stripping Voltammetric Analysis of Trace Arsenic(III). *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *188*, 894–901. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.113.
- (101) Scott, J. C. History of Conductive Polymers. In *Nanostructured Conductive Polymers*; Eftekhari, A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, **2000**; pp 3–17.
- (102) Heinze, J. Electrochemistry of Conducting Polymers. In *Organic Electrochemistry*; Henning Lund, O. H., Ed.; Marcel Dekker, Inc., **2000**; pp 1309–1339.
- (103) Kassim, A.; Basar, Z. B.; Mahmud, H. N. M. E. Effects of Preparation Temperature on the Conductivity of Polypyrrole Conducting Polymer. *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci.* 2002, *114* (2), 155–162. https://doi.org/10.1007/BF02704308.
- (104) Karami, H.; Nezhad, A. R. Investigation of Pulse-Electropolymerization of Conductive Polypyrrole Nanostructures. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, 8 (6), 8905–8921.
- (105) Bilal, S.: Ali A. H.: R. Spectroelectrochemistry of Shah. Holze. Poly(o-Phenylenediamine): Polyaniline-like Segments in the Polymer Structure. *Electrochim.* Acta 2011, 56 (9), 3353-3358. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.01.005.
- (106) Li, X. G.; Huang, M. R.; Duan, W.; Yang, Y. L. Novel Multifunctional Polymers from Aromatic Diamines by Oxidative Polymerizations. *Chem. Rev.* 2002, 102 (9), 2925– 3030. https://doi.org/10.1021/cr010423z.
- (107) Losito, I.; De Giglio, E.; Cioffi, N.; Malitesta, C. Spectroscopic Investigation on Polymer Films Obtained by Oxidation of *o*-Phenylenediamine on Platinum Electrodes at Different PHs. J. Mater. Chem. 2001, 11 (7), 1812–1817. https://doi.org/10.1039/b1016261.
- (108) Sayyah, S. M.; El-Deeb, M. M.; Kamal, S. M.; Azooz, R. E. Electropolymerization of o-phenylenediamine on Pt-Electrode from Aqueous Acidic Solution: Kinetic, Mechanism, Electrochemical Studies and Characterization of the Polymer Obtained. J. Appl. Polym. Sci. 2009, 112 (6), 3695–3706. https://doi.org/10.1002/app.29802.
- (109) Sestrem, R. H.; Ferreira, D. C.; Landers, R.; Temperini, M. L. A.; do Nascimento, G. M. Synthesis and Spectroscopic Characterization of Polymer and Oligomers of *ortho*-Phenylenediamine. *Eur. Polym. J.* 2010, 46 (3), 484–493. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2009.12.007.
- (110) Bláha, M.; Trchová, M.; Morávková, Z.; Humpolíček, P.; Stejskal, J. Semiconducting Materials from Oxidative Coupling of Phenylenediamines under Various Acidic Conditions. *Mater. Chem. Phys.* **2018**, 205, 423–435.

https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.11.007.

- (111) Camurri, G.; Ferrarini, P.; Giovanardi, R.; Benassi, R.; Fontanesi, C. Modelling of the Initial Stages of the Electropolymerization Mechanism of *o*-Phenylenediamine. *J. Electroanal.* Chem. 2005, 585 (2), 181–190. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.08.016.
- (112) Losito, I.; Palmisano, F.; Zambonin, P. G. *o*-Phenylenediamine Electropolymerization By Cyclic Voltammetry Combined With Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2003, 75 (19), 4988–4995. https://doi.org/10.1021/ac0342424.
- (113) Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G. The Mechanisms of Pyrrole Electropolymerization. *Chem. Soc. Rev.* 2000, 29 (5), 283–293. https://doi.org/10.1039/a807124a.
- (114) Tu, X.; Xie, Q.; Xiang, C.; Zhang, Y.; Yao, S. Scanning Electrochemical Microscopy in Combination with Piezoelectric Quartz Crystal Impedance Analysis for Studying the Growth and Electrochemistry as Well as Microetching of Poly(*o*-Phenylenediamine) Thin Films. J. Phys. Chem. B 2005, 109 (9), 4053–4063. https://doi.org/10.1021/jp044731n.
- (115) Sulimenko, T.; Stejskal, J.; Prokeš, J. Poly(Phenylenediamine) Dispersions. J. Colloid Interface Sci. 2001, 236 (2), 328–334. https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7415.
- (116) Qi, Z.; Pickup, P. G. Size Control of Polypyrrole Particles. *Chem. Mater.* **1997**, *9* (12), 2934–2939. https://doi.org/10.1021/cm970280q.
- (117) Otero, T. F.; Santamaria, C.; Angulo, E.; Rodriguez, J. Electrogeneration of Thick Polythiophene Films on Stainless Steel. Synth. Met. 1993, 55 (2–3), 1574–1579. https://doi.org/10.1016/0379-6779(93)90287-7.
- (118) Zhang, X.; Wang, S.; Lu, S.; Su, J.; He, T. Influence of Doping Anions on Structure and Properties of Electro-Polymerized Polypyrrole Counter Electrodes for Use in Dye-Sensitized Solar Cells. J. Power Sources 2014, 246, 491–498. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.07.098.
- (119) Kassim, A.; Davis, F. J.; Mitchell, G. R. The Role of the Counter-Ion during Electropolymerization of Polypyrrole-Camphor Sulfonate Films. *Synth. Met.* 1994, 62 (1), 41–47. https://doi.org/10.1016/0379-6779(94)90197-X.
- (120) Downard, A. J.; Pletcher, D. The Influence of Water on the Electrodeposition of Polypyrrole in Acetonitrile. J. Electroanal. Chem. 1986, 206 (1–2), 139–145. https://doi.org/10.1016/0022-0728(86)90263-9.
- (121) Drzeżdżon, J.; Jacewicz, D.; Sielicka, A.; Chmurzyński, L. A Review of New Approaches to Analytical Methods to Determine the Structure and Morphology of Polymers. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 470–476. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.013.
- (122) Kim, D. R.; Cha, W.; Paik, W. K. Ellipsometric Studies on Polypyrrole and Polyaniline. *Synth. Met.* **1997**, *84* (1–3), 759–760. https://doi.org/10.1016/s0379-6779(96)04133-1.
- (123) Wu, C. C.; Chang, H. C. Estimating the Thickness of Hydrated Ultrathin Poly(*o*-Phenylenediamine) Film by Atomic Force Microscopy. *Anal. Chim. Acta* 2004, 505 (2), 239–246. https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.073.

- (124) Samanta, S.; Roy, P.; Kar, P. Influence of PH of the Reaction Medium on the Structure and Property of Conducting Poly(*o*-Phenylenediamine). *Mater. Today Proc.* 2015, 2 (4–5), 1301–1308. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.07.046.
- (125) Yano, J. Electrochemical and Structural Studies on Soluble and Conducting Polymer from *o*-Phenylenediamine. J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. **1995**, 33 (14), 2435– 2441. https://doi.org/10.1002/pola.1995.080331416.
- (126) Jiang, J.; Zhang, G. M.; Li, L.; Zhang, H.; Li, N.; Wang, Y. Y.; He, J.; Mao, F. J.; Yu, K. On-Line Monitoring of Transient Radicals and Oligomers: *o*-Phenylenediamine Electrooxidation Mechanism Study by Mass Spectrometry. *Microchem. J.* **2020**, *153* (November 2019). https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104390.
- (127) Wang, Y.; Hu, J.; Zhuang, Q.; Ni, Y. Enhancing Sensitivity and Selectivity in a Label-Free Colorimetric Sensor for Detection of Iron(II) Ions with Luminescent Molybdenum Disulfide Nanosheet-Based Peroxidase Mimetics. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 80, 111– 117. https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.037.
- (128) Yan, C.; Liu, X.; Zhang, R.; Chen, Y.; Wang, G. A Selective Strategy for Determination of Ascorbic Acid Based on Molecular Imprinted Copolymer of *o*-Phenylenediamine and Pyrrole. *J. Electroanal. Chem.* 2016, 780, 276–281. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.09.046.
- (129) Waffo, A. F. T.; Yesildag, C.; Caserta, G.; Katz, S.; Zebger, I.; Lensen, M. C.; Wollenberger, U.; Scheller, F. W.; Altintas, Z. Fully Electrochemical MIP Sensor for Artemisinin. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018, 275 (August), 163–173. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.018.
- (130) Li, H.; Guan, H.; Dai, H.; Tong, Y.; Zhao, X.; Qi, W.; Majeed, S.; Xu, G. An Amperometric Sensor for the Determination of Benzophenone in Food Packaging Electropolymerized Imprinted Materials Based on the Molecularly 811-815. Poly-o-Phenylenediamine Film. Talanta 2012, 99, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.033.
- (131) Zou, C.; Zhong, J.; Li, S.; Wang, H.; Wang, J.; Yan, B.; Du, Y. Fabrication of Reduced Graphene Oxide-Bimetallic PdAu Nanocomposites for the Electrochemical Determination of Ascorbic Acid, Dopamine, Uric Acid and Rutin. *J. Electroanal. Chem.* 2017, 805, 110–119. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.10.020.
- (132) Zhu, Q.; Bao, J.; Huo, D.; Yang, M.; Hou, C.; Guo, J.; Chen, M.; Fa, H.; Luo, X.; Ma, Y. 3D Graphene Hydrogel-Gold Nanoparticles Nanocomposite Modified Glassy Carbon Electrode for the Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid. *Sensors Actuators, B Chem.* 2017, 238, 1316–1323. https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.116.
- (133) Li, Y.; Song, H.; Zhang, L.; Zuo, P.; Ye, B. ce; Yao, J.; Chen, W. Supportless Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Modified Nanoporous Microrod for Determination of Dopamine at Trace Level. *Biosens. Bioelectron.* 2016, 78, 308–314. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.063.
- (134) Li, Y.; Liu, J.; Liu, M.; Yu, F.; Zhang, L.; Tang, H.; Ye, B. C.; Lai, L. Fabrication of Ultra-Sensitive and Selective Dopamine Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Modified Graphene Carbon Nanotube Foam. *Electrochem. commun.* 2016, 64, 42–45. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2016.01.009.

- (135) Yang, J.; Hu, Y.; Li, Y. Molecularly Imprinted Polymer-Decorated Signal on-off Ratiometric Electrochemical Sensor for Selective and Robust Dopamine Detection. *Biosens. Bioelectron.* 2019, 135, 224–230. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.054.
- (136) Paleček, E.; Bartošík, M. Electrochemistry of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (6), 3427–3481. https://doi.org/10.1021/cr200303p.
- (137) Zhou, M.; Zhai, Y.; Dong, S. Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide. *Anal. Chem.* 2009, *81* (14), 5603–5613. https://doi.org/10.1021/ac900136z.

Súmula curricular

Nome: Wanderson Sirley Reis Teixeira

Local e data de nascimento: Alta Floresta-MT, 01/08/1989 Ensino médio: ETEC Dr. Domingos Minicucci Filho, Botucatu-SP, 2006 Graduação: Bacharelado em Química, Instituto de Química USP-São Paulo, 2012 Mestrado: Química Fundamental, Instituto de Química USP-São Paulo, 2015

1) Atuação acadêmica

Trabalhos Publicados

Cordeiro, J. R.; **Teixeira, W. S. R.**; Lippi, R.; Li, R. W. C.; Ventura, L. Gruber, J. Measuring air pressure with a polymeric gas sensor. Química Nova, **2010**, 33 (10), 2272-2273. https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000041.

Teixeira, W. S. R.; Santos, M. S. F.; Gruber, J.; Gutz, I. G. R.; Lopes, F. S. Talanta Determination of Neutral Diols and Carboxylic Acids Formed during Glycerol Electrooxidation by Capillary Electrophoresis with Dual C 4 D. *Talanta* **2018**, *178* (September 2017), 1040–1045. <u>https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.088</u>.

Mioni, M. S. R.; Ribeiro, B. L. D.; Peres, M. G.; **Teixeira, W. S. R**.; Pelícia, V. C.; Rodrigo Garcia Motta; Labruna, M. B.; Ribeiro, M. G.; Sidi-Boumedine, K.; Megid, J. Realtime Quantitative PCR - Based Detection of Coxiella Burnetii in Unpasteurized Cow's Milk Sold for Human Consumption. *Zoonoses and Public Health* **2019**, 66, 695-700. https://doi.org/10.1111/zph.12609.

Mioni, M. S. R.; Sidi-Boumedine, K.; Dalanezi, F. M.; Joaquim, S. F.; Denadai, R.; Teixeira,
W. S. R.; Labruna, M. B.; Megid, J. New Genotypes of Coxiella Burnetii Circulating In Brazil and Argentina. *Pathogens* 2020, *9* (30), 1–11. <u>https://10.3390/pathogens9010030</u>.

Participação em eventos

Pereira, J. G.; Gonçalves, W. B.; **Teixeira, W. S. R.**; Sampaio, A. N. C. E.; Mioni, M. R. S.; Martins, O. A.; Megid, J.; Gruber, J. Electronic nose based on ionogel doped with Fe3O4 particles applied for discrimination of spoilage and pathogenic microorganisms in raw meats. 30° Congresso Brasileiro Microbiologia - CBM 2019, 2019, Maceió-AL. 30° Congresso Brasileiro Microbiologia - CBM 2019, 2019.

Pereira, J. G.; Gonçalves, W. B.; **Teixeira, W. S. R.**; Sampaio, A. N. C. E.; Mioni, M. R. S.; Martins, O. A.; Megid, J.; Gruber, J. Fast detection of foodborne pathogens: an interdisciplinary approach. 30° Congresso Brasileiro Microbiologia - CBM 2019, 2019, Maceió-AL. 30° Congresso Brasileiro Microbiologia - CBM 2019, 2019.

Teixeira, W. S. R.; Leme, M. K. S.; Gruber, J.; Megid, J.; Cesarino, I. Development of electroanalytical sensors based on electropolymeric films and molecular imprinting technology. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (41^a RASBQ), 2018, Foz do Iguaçu-PR. 41^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (41^a RASBQ), 2018.

2) Atuação profissional

Assistente de Suporte Acadêmico II, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-UNESP-Botucatu, 2016 - atualmente.