

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS (PPGCEM)

ROSECLER SCACCHETTI KLEIN

**SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM ELETRODO NANOPOROSO PARA
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2020

ROSECLER SCACCHETTI KLEIN

**SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM ELETRODO NANOPOROSO
PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *TRANS-RESVERATROL***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Londrina, para obtenção do grau de “Mestra em Ciência e Engenharia de Materiais”.

Orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé

LONDRINA

2020

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

K64s Klein, Rosecler Scacchetti

Sensor eletroquímico baseado em eletrodo nanoporoso para detecção e quantificação de *trans-resveratrol* / Rosecler Scacchetti Klein. - Londrina, 2020.

83 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Londrina, 2020.

Bibliografia: 75-82

1. Detectores. 2. Eletrodos. 3. Materiais porosos. 4. Nanopartículas. 5. Antioxidantes. I. Monteiro, Johny Paulo, orient. II. Bonafé, Elton Guntendorfer, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. V. Título.

CDD: 620.11

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais (PPGCEM) - Campus Londrina

TERMO DE APROVAÇÃO

**SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM ELETRODO NANOPOROSO PARA DETECÇÃO
E QUANTIFICAÇÃO DE *TRANS-RESVERATROL***

por

ROSECLER SCACCHETTI KLEIN

Dissertação de mestrado apresentada no dia 05 de março de 2020 como requisito parcial para a obtenção do título de **MESTRA EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS** pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Campus Londrina. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos Professores, conforme listado abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro - Orientador
(UTFPR – Campus Apucarana)

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé - Co-orientador
(UTFPR – Campus Apucarana)

Prof. Dr. Sandro Aurelio de Souza Venter - Membro titular
(UTFPR – Campus Apucarana)

Prof. Dr. Roberto de Matos - Membro titular
(UEL – Maringá)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Cava
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais
(UTFPR – Campus Londrina)

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar presente em todos momentos da minha vida. E por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais Cleuza e Bento por toda a educação e apoio para que eu me dedicasse aos meus estudos. E especialmente pelo amor e carinho.

Ao meu irmão Rodrigo, pela sua amizade e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e alegres da minha vida.

Ao professor Johny Monteiro pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho e por toda ajuda e paciência. E aos professores Elton Bonafé e Alessandro Martins por todo apoio e ter colaborado em sanar as minhas dúvidas em relação a este trabalho.

Ao professor Alexei Pinheiro da UTFPR-LONDRINA pelo aprendizado e na colaboração nas análises eletroquímicas.

E aos professores Roberto Matos e Sandro Aurelio de Souza Venter por se disponibilizarem a ler e avaliar esse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de eletroquímica Thais, Ana, Gustavo e Michele por toda cooperação que me deram durante o desenvolvimento da pesquisa, pela companhia e por deixarem o ambiente sempre mais feliz. A minha amiga Katlyn pela sua amizade e a ajuda. E a todos do laboratório LAMMAC pela ajuda e companheirismo.

E à todas as pessoas que, mesmo não mencionadas aqui, fizeram parte desta caminhada me apoiando sempre e torcendo por mim.

Resumo

KLEIN, ROSECLER. S. **Sensor Eletroquímico baseado eletrodo nanoporoso para detecção e quantificação de *trans*-resveratrol**. 2020. 81f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2020.

O estudo sobre antioxidantes tem ganhado destaque em função dos efeitos benéficos para a saúde humana. Por isso a quantificação deles em suas fontes naturais ou artificiais é de grande importância. Dentes os principais antioxidantes, o *trans*-resveratrol (T-RESV) tem tido destaque. Ele é um antioxidante natural polifenólico geralmente encontrado em uvas e também em seus derivados como o vinho tinto e em sucos de uvas. Esse bioativo é encarregado de atividades importantíssimas no corpo humano tais como anti-inflamatórias, antiplaquetária, estrogênica e atua fortalecendo as fibras musculares. Convencionalmente, a determinação dos antioxidantes é feita por técnicas cromatográficas ou eletroforese capilar. Contudo essas técnicas são complexas, necessitam grandes quantidades de reagentes e demandam muito tempo de análise. Nos últimos tempos estudos apontam que os sensores eletroquímicos têm ganhado destaque pois contornam os inconvenientes das técnicas tradicionais, se destacando na rapidez de análises, relativo baixo custo, potencial para miniaturização e elevada sensibilidade. Além disso, esses dispositivos podem ser condicionados para a detecção de antioxidante específico e evitar falsas respostas. Tem sido mostrado também que a presença de nanomateriais condutores, particularmente nanopartículas de ouro (AuNPs) e grafeno, otimizam a resposta analítica do dispositivo. Nesse sentido, foi proposto aqui a construção de um sensor eletroquímico que foi aplicado para detecção de T-RESV. Este sensor operou com um eletrodo de vidro-ITO recoberto com filmes nanoporoso de ouro. Os eletrodos foram modificados com um compósito de nanopartículas de ouro, nafion e α -ciclodextrina (α -CD). Análises por MEV/EDS e FTIR mostraram que um filme homogêneo do compósito foi obtido sobre o eletrodo a partir do gotejamento de uma mistura aquosa das espécies químicas. Além disso foi possível verificar que o nafion atuou efetivamente como suporte para as AuNPs e α -CD, de forma que eles não foram lixiviados da superfície do eletrodo modificado. Testes por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) mostraram que as AuNPs têm um importante papel na melhora da condutividade do eletrodo modificado, já que a resistência de transferência de carga diminui com a sua presença. Testes de detecção por voltametria cíclica (CV) mostraram que a presença da α -CD (agente de reconhecimento) no compósito é essencial pois, na sua ausência, não foi possível detectar o T-RESV. Assim, a α -CD teve efeito importante de reconhecimento e adsorção do analito alvo para que ele fosse determinado no eletrodo modificado. O sensor apresentou excelentes parâmetros analíticos, se comparado com outros sensores de mesma natureza reportados na literatura. O valor de sensibilidade foi de $1,69 \mu\text{A}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, e o LD foi de $0,785 \text{ nmol/L}$. Dessa forma, mostramos aqui a produção de um sensor com excelente desempenho analítico que pode abrir novas perspectivas para detecção seletiva de T-RESV. **Palavras-chave:** eletrodo modificado, nanomaterial, nanopartículas de ouro, nanoporos, *trans*-resveratrol, sensor eletroquímico.

Abstract

KLEIN, ROSECLER. S. **Electrochemical sensor based on nanoporous electrode for detection and quantification of *trans*-resveratrol**. 2020. 86f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2020.

The study on antioxidants has gained prominence due to the beneficial effects on human health. Thus, their quantification in their natural or artificial sources is of great importance. Among the main antioxidants, *trans*-resveratrol (T-RESV) has been highlighted. It is a natural polyphenolic antioxidant generally found in grapes and also in its derivatives such as red wine and grape juices. This bioactive is responsible of in very important activities in the human body such as anti-inflammatory, antiplatelet, estrogenic properties, and acts by strengthening muscle fibers. Conventionally, antioxidants are determined by chromatographic techniques or capillary electrophoresis. However, these techniques are complex, require large amounts of reagents, and require a lot of analysis time. Recently, studies show that electrochemical sensors have gained prominence because they overcome the drawbacks of traditional techniques, standing out in the speed of analysis, relatively low cost, potential for miniaturization and high sensitivity. In addition, these devices can be conditioned for the detection of specific antioxidants to avoid false responses. It has also been shown that the presence of conducting nanomaterials, particularly gold nanoparticles (AuNPs) and graphene, optimize the device analytical response. In this sense, it was proposed here to build an electrochemical sensor that was applied for detection of T-RESV. This sensor operated with a glass-ITO electrode covered with nanoporous gold films. The electrodes were modified with a composite of gold nanoparticles, nafion, and α -cyclodextrin (α -CD). Analysis by SEM/EDS and FTIR showed that a homogeneous film of the composite was obtained on the electrode from the dripping of an aqueous mixture of chemical species. In addition, it was possible to verify that nafion effectively acts as a support for AuNPs and α -CD, so that they were not leached from the electrode surface. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) tests have shown that AuNPs play an important role in improving electrode conductivity, since the charge transfer resistance decreases with their presence. Detection tests by cyclic voltammetry (CV) showed that the presence of α -CD (recognition agent) in the composite is essential because, in its absence, it was not possible to detect T-RESV. Thus, α -CD had an important effect of recognition and adsorption of the target analyte for its detection on the electrode. The sensor presented excellent analytical parameters, when compared with other sensors of the same nature reported in the literature. The sensitivity value was $1,69 \mu\text{A}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the LD was $0,785 \text{ nmol}/\text{L}$. Thus, we show here the production of a sensor with excellent analytical performance that can open new perspectives for selective detection of T-RESV.

Keywords: modified electrode, nanomaterial, gold nanoparticles, nanoporous, *trans*-resveratrol, electrochemical sensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Nyquist (BRETT e BRETT, 1996).....	23
Figura 2: Estrutura química do Nafion (autoria própria).	25
Figura 3: Estrutura química dos isômeros (A) <i>trans</i> -resveratrol e (B) <i>cis</i> -resveratrol. (Autoria Própria).	27
Figura 4: Estrutura da α -ciclodextrina e sua representação esquemática em forma de cone (VONCINA; VIVO, 2013).	28
Figura 5: Processo de deposição das esferas de poliestireno sobre o substrato de vidro previamente hidrofiliado. (A) substrato no interior da placa de petri; (B) tensão superficial do líquido em contato com o substrato; (C) deposição das esferas sobre o substrato de vidro no fundo da placa de petri; (D) rompimento da tensão superficial do líquido e formação da camada desorganizada na superfície da água; (E) adição do surfactante e processo de formação da monocamada compacta alto organizada; (F) captura da monocamada de esferas com um segundo substrato, retirando o excesso de água (CABRAL JÚNIOR et al., 2018).	33
Figura 6: Etapas do procedimento feito para obtenção dos substratos nanoestruturados via recobrimento com filmes de Ti e Au e remoção de PS (CABRAL JÚNIOR et al., 2018).....	34
Figura 7: Imagens das amostras demarcadas para área exposta fixa utilizando o tubo termoretrátil de borracha de 6 mm (Autoria Própria).	35
Figura 8: Célula eletroquímica (Autoria Própria).	36
Figura 9: Representação dos estágios de modificação sobre a superfície amostra nanoporosa e a detecção eletroquímica do T-RESV.....	40
Figura 10: Imagens obtidas por MEV de substrato de vidro-ITO coberto com filme de ouro nanoporoso com magnificação: a) 20.000x e b) 10.000x	42
Figura 11: Voltamogramas obtidos para eletrodos baseados em vidro-ITO cobertos com filme nanoporoso de ouro. Em A) são mostrados voltamogramas obtidos para amostra nanoporosa de ouro na faixa de potencial de -1,0 e +1,5 V (linha vermelha) e na janela segura de potenciais, de -0,8 à 0,8 V (linha preta). Em B) são mostrados voltamogramas para quatro amostras nanoporosas de ouro na janela de trabalho segura. O eletrólito de suporte foi solução de K ₂ SO ₄ 0,1 mol/L e a velocidade de varredura foi de 50 mV/s.....	43

Figura 12: Voltamogramas obtidos para eletrodos de trabalho baseados em vidro-ITO cobertos com filme nanoporoso de ouro em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,1 mmol/L e K_2SO_4 0,1 mol/L, como eletrólito de suporte. Diferentes velocidades de varredura (5, 10, 20, 50, 100 e 150 mV/s) foram empregadas. Inserções: plotes das correntes de pico anódica versus raiz quadrada das velocidades de varredura.	45
Figura 13: Voltamogramas do ITO e da amostra nanoporosa antes e depois da limpeza com H_2SO_4 e depois HNO_3 concentrados por 10 min cada, em solução de K_2SO_4 0,1 mol/L e velocidade de varredura 50 mV/s.	48
Figura 14: Imagens fotográficas dos ângulos de contato gerados para a amostra nanoporosa nos diferentes tempos de limpeza em solução de HNO_3 10% (v/v).	49
Figura 15: Voltamogramas do ITO e da amostra nanoporosa antes e após a limpeza de HNO_3 10% (v/v) por 60 min. A VC foi realizada em solução de K_2SO_4 e velocidade de varredura 50 mV/s.	50
Figura 16: Voltamogramas cíclicos do ITO e da amostra nanoporosa de ouro antes e depois da limpeza em HNO_3 10% (v/v) por 25 min realizados em solução de K_2SO_4 0,1 mol/L e velocidade de varredura 50 mV/s.	51
Figura 17: Voltamogramas cíclicos para eletrodo de vidro-ITO nanoporoso em meio de CuSO_4 20,0 mmol/L e H_2SO_4 0,5 mol/L para determinação das áreas eletroativas de uma amostra nanoporosa limpas com tratamento ácido. A inserção nessa figura mostra um gráfico de corrente versus o tempo durante a varredura anódica (oxidação da monocamada de Cu).	52
Figura 18: Diagramas de Nyquist para diferentes potenciais, para quatro amostras nanoporosas de ouro limpas, usando como espécie eletroativa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 0,5 mmol/L e eletrólito de suporte K_2SO_4 0,1 mol/L em solução desaerada com N_2 por 15 min. A frequência foi de 10 kHz a 10 mHz com amplitude de 10 mV.	54
Figura 19: Diagrama de Nyquist para duas amostras após a limpeza sob valores de potenciais de -50 e -100 mV em uma solução de PBS 20,0 mM e K_2SO_4 0,1 mol/L, amplitude 10 mV e em sistema com O_2 1 atm.	55
Figura 20: Imagem das soluções com uma quantidade de cloreto de ouro, citrato de sódio e borohidreto de sódio constante e variando o volume da solução de CTAB com uma concentração de $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L. A Imagem das amostras	

representando as soluções cujos valores de volumes da esquerda para direita são: 75, 80, 85, e 90 μL , respectivamente.	57
Figura 21: Espectros de absorção de suspensões coloidais de AuNPs sintetizadas em 4 diferentes condições, sendo empregado o mesmo volume de solução do cloreto de ouro, citrato de sódio, borohidreto de sódio e diferentes volumes de solução de CTAB $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L.....	58
Figura 22: Espectros de absorção de suspensões coloidais de AuNPs sintetizadas na condição de 75 μL da solução de CTAB $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L, sendo empregado o mesmo volume de solução do cloreto de ouro, citrato de sódio e borohidreto de sódio. Os espectros foram obtidos dentro de dois dias contados a partir da síntese.....	59
Figura 23: Diagramas de Nyquist da amostra nanoporosa limpa com a deposição de camadas de Nafion, AuNPs/Nafion e AuNPs/Nafion/ α -CD e para valores de potenciais de A) -50 mV e B) -150 mV em uma solução de PBS 20,0 mmol/L e K_2SO_4 0,1 mol/L e em sistema com gás oxigênio à 1 atm.....	60
Figura 24: Espectros de FTIR-ATR para A) nafion e α -CD puros, sobre vidro e B) dos compósitos AuNPs/nafion, AuNPs/nafion/ α -CD e AuNPs/Nafion/ α -CD (amostra emergida por 2hs em água e depois seca), sobre eletrodo contendo filme nanoporoso.....	63
Figura 25: Micrografias de MEV da superfície dos compósitos sobre amostra nanoporosa com magnificação de 10.000x. A) AuNPs/Nafion e B) AuNPs/Nafion/ α -CD.....	65
Figura 26: Análise de EDS para eletrodos recobertos com filme nanoporoso de ouro modificados com A) AuNPs/Nafion e B) AuNPs/Nafion/ α -CD.	66
Figura 27: Comparação dos voltamogramas cíclicos para amostra recobertas com filme nanoporoso de ouro e modificadas com os compósitos A) AuNPs/Nafion e ITO e B) AuNPs/Nafion/ α -CD e ITO, em solução PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, adicionado 2000 μL da solução estoque T-RESV sob um sistema desaerado com N_2 sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s.	68
Figura 28: Voltamogramas cíclicos do ITO e da amostra recoberta com filme nanoporoso de ouro e modificadas com o compósitos AuNPs/Nafion/ α -CD na com adição de etanol puro (500 μL) em uma solução PBS 20,0 mmol/L com o	

eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, sob um sistema desaerado com N_2 sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s..... 69

Figura 29: Voltamogramas cíclicos do ITO e do eletrodo recoberto com filme nanoporoso com e sem modificação com o compósito AuNPs/Nafion/ α -CD em solução PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, 2000 μ L de solução estoque T-RESV sob um sistema desaerado com N_2 sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s..... 70

Figura 30: Voltamogramas cíclicos obtido com eletrodo nanoporoso de ouro modificado com o compósito AuNPs/Nafion/ α -CD referente a detecção do T-RESV. VC foi realizado em solução PBS 20,0 mmol/L, eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L em 50 mL A) ITO e também com a adição de diferentes volumes de solução estoque de T-RESV ($1,31 \times 10^{-7}$ mol/L), em alíquotas de 500 μ L. Os volumes adicionados foram B) 0, C) 500, D) 1000, E) 1500 F) 2000 μ L. O sistema foi desaerado com N_2 e a velocidade de varredura foi 50 mV/s. A varredura foi acompanhada por 20 min após cada adição de alíquota de T-RESV. O voltamograma do vidro-ITO é mostrado para efeitos de comparação em A). .. 72

Figura 31: A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo recoberto com filme nanoporoso de ouro modificado com AuNPs/Nafion/ α -CD para diferentes concentrações de T-RESV (1,29; 2,57; 3,81 e 5,03 nmol/L) e em B) é mostrada curva de calibração obtida a partir das correntes de pico catódica dos voltamogramas da parte A). A inserção em B) apresenta a ampliação da região dos picos catódicas do voltamograma da parte A)...... 73

Lista de abreviaturas e siglas

α -CD - Alfa-ciclodextrina

AuNPs - Nanopartículas de ouro

AuNPs – Nanopartículas de Ouro (Nanoparticles of Gold)

CE - Contra eletrodo

CV - Voltametria cíclica

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva

EIS - Espectroscopia de impedância eletroquímica

Epa - Potencial de oxidação

Epc - Potencial de redução

ER - Eletrodo de referência

ET - Eletrodo de trabalho

FTIR - ATR Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada

Ipa - Pico de corrente anódica

Ipc - Pico de corrente catódica

ITO – Óxido de Índio e Estanho (Indium tin Oxide)

LD - Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

NSL – Litografia de Nanoesfera

pH - Potencial hidrogeniônico

Rct - Resistência e transferência de carga

T-RESV - *Trans*-resveratrol

UPD - Deposição em regime de subtensão (*underpotential deposition*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 SENSORES	20
3.1.2 SENSORES ELETROQUÍMICOS.....	21
3.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	22
3.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA	24
3.4 SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES	24
3.5 SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE <i>TRANS-RESVERATROL</i>	26
3.6 NANOMATERIAIS EM ELETRODOS.....	28
4 METODOLOGIA	31
4.1 MATERIAIS.....	31
4.2 MÉTODOS	31
4.2.1 PREPARAÇÃO DO ELETRODO NANOPOROSO	31
4.2.2 Limpeza dos Eletrodos Nanoporosos	35
4.2.3 Medidas para ângulo de contato dos Eletrodos Nanoporosos	35
4.2.4 Célula Eletroquímica	35
4.2.5 Caracterização dos Eletrodos Nanoporosos por VC e EIS	36
4.2.6 Determinação da área eletroativa dos Eletrodos Nanoporosos	37
4.5 MODIFICAÇÕES NO ELETRODO NANOPOROSO	38
4.5.1. (AuNPs) estabilizadas com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ...	38
4.5.2. Preparação e modificação do eletrodo.....	38
4.5.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	39
4.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	39
4.5.5. Detecção do <i>Trans-Resveratrol</i> (T-RESV)	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS NANOPOROSOS.....	41
5.1.1 Caracterização por microscopia eletrônica	41

5.1.2	Caracterização dos eletrodos por testes eletroquímicos.....	42
5.1.3	Teste de limpeza dos Eletrodos Nanoporosos.....	47
5.1.4	Deposição em regime de subtensão.....	51
5.1.5	Caracterizações por EIS.....	53
5.1.6	Imobilização de AUNPS sobre Eletrodos Nanoporosos.....	56
5.1.7	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier no modo de Reflexão Total Atenuada (FTIR – ATR).....	61
5.1.8	Análise morfológica por MEV e EDS.....	64
5.1.9	Detecção do T-RESV.....	67
5.1.10	Análise da sensibilidade do sensor eletroquímico.....	71
6.	CONCLUSÃO.....	74
7.	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes têm atraído atenção da sociedade por estarem diretamente relacionados com a saúde humana, influenciando assim na qualidade de vida dos indivíduos. Eles têm a função de controlar ou inibir os radicais livres que estão presentes no corpo humano e são obtidos por meio de alimentação saudável (WILSON et al., 2017). Dentre os principais antioxidantes, destaca-se o *trans*-resveratrol (T-RESV). Ele é um antioxidante natural polifenólico normalmente encontrado em uvas e em seus derivados como o vinho tinto e sucos de uvas (SNOPEK et al., 2018). Desta forma, a determinação desse bioativo é fundamental para convalidação da sua eficácia e para o controle de qualidade de produtos ou fármacos. Isso demanda métodos com bom desempenho analítico. Nesse sentido, o uso de técnicas eletroquímicas têm tido destaque na construções de sensores para determinação de antioxidantes (SAVK et al., 2019)(ATTA et al., 2014)

Os sensores são dispositivos que quantificam ou detectam eventos ou mudanças físico-químicas de um modo eficaz provendo uma resposta normalmente baseada em um sinal elétrico ou óptico (WANG et al., 2013). Em um sensor ocorrem dois mecanismos principais: o de reconhecimento e o de transdução. No caso do evento de reconhecimento, uma espécie química receptora é imobilizada no transdutor e é capaz de, idealmente, interagir com elevada seletividade com o analito-alvo. Na etapa de transdução, o evento de reconhecimento é convertido em um sinal mensurável proporcional a concentração da espécie investigada (HASAN et al., 2014). Os sensores eletroquímicos são aqueles que usam um transdutor eletroquímico. O sistema empregado nesses dispositivos é uma célula eletroquímica normalmente composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e um contra-eletrodo (CE). O analito pode ser detectado a partir do sinal de corrente gerado devido as reações redox da espécie alvo que ocorrem na superfície do ET (LI et al., 2018).

Os sensores eletroquímicos vem sendo utilizados para detecção de biomoléculas de grande interesse nas áreas alimentícia, médica e ambiental (LU et al., 2020)(SINGH et al., 2016)(HANAFI et al., 2019). Se comparado com métodos clássicos, como os cromatográficos (particularmente cromatografia

líquida de alta eficiência) ou eletroforese capilar, os sensores eletroquímicos apresentam vantagens como mais baixos limites de detecção, sistemas com instrumentação de menor custo e compactos, utilizam menores quantidades de reagentes, mostra manuseio mais simples e altas seletividade e sensibilidade (DZIAŁBOWSKA; CZACZYK; NIDZWORSKI, 2018).

Dentre as técnicas eletroanalíticas de transdução, aquela considerada a mais potente e sensível para investigação de mudanças de interface é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) (MUÑOZ; MONTES; BAEZA, 2017) (RANDVIIR; BANKS, 2013). A EIS combina a investigação das propriedades resistivas e capacitivas dos materiais com base na perturbação de um sistema em equilíbrio por um sinal de excitação sinusoidal de amplitude pequena. Com isso, é possível a averiguação da superfície por meio da mudança da resistência a transferência de elétrons usando, normalmente, a metodologia de potencial de circuito aberto (OCP) ou por sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ (MUÑOZ; MONTES; BAEZA, 2017).

Uma outra técnica muito utilizada para detecção é a voltametria cíclica (VC) (BARBOSA; GOMEZ; INUTAN, 2018). A VC é umas das técnicas eletroquímicas mais simples e fundamenta-se na aplicação de um potencial que varia continuamente com o tempo, enquanto a corrente é monitorada. Isso faz com que aconteçam reações de oxidação ou de redução de espécies químicas em solução na superfície do eletrodo, as quais podem ser monitoradas avaliando a corrente gerada (SKOOG et al. 2006).

Em vista disso, o desempenho analítico de sensores eletroquímicos está intrinsicamente relacionado com propriedades da superfície do ET (onde o analito é detectado) tais como elevadas condutividade e área superficial. Portanto, a escolha do material que compõe o ET é importante para uma ótima resposta eletroquímica. Dentre os eletrodos mais utilizados, se destacam a platina, carbono vítreo, pasta de carbono e ouro. O ouro é muito utilizado por ser um material de mais baixo custo, quando comparado por exemplo com a platina e o emprego de grafeno e, principalmente, porque ele exhibe grande inércia química, isto é, baixa propensão a sofrer reações químicas (ABDULBARI; BASHEER, 2017). Além disso, modificações de eletrodos com nanomateriais tais como nanopartículas metálicas (KONG et al., 2014), grafeno e óxido de grafeno (MEHMETI et al., 2017), nanotubos de carbono (PEKEC et al., 2012),

entre outros (LI et al., 2019) têm sido amplamente aplicadas. Isso melhora o desempenho analítico do sensor pois melhora a condutividade, pode aumentar a janela de potencial de trabalho, pode ser capaz de inibir processos absorptivos e aumenta a área superficial do eletrodo. Esses aspectos resultam em uma otimização da transferência de elétrons e melhora da resposta do dispositivo.

A inserção de nanoporosidades na superfície do ET pode também ser uma estratégia importante para a melhora de desempenho. O principal aspecto é que isso deve elevar a relação área-volume da superfície, possibilitando um maior número de espécies detectadas na interface. Desta forma, eletrodos de ouro nanoporosos tem encontrado diversas aplicações em catálise heterogênea, eletrocatalise, células de combustível, super capacitores eletroquímicos e em sensores químicos (COLLINSON, 2013a) (JIANG, 2019). Um fator relevante no uso de eletrodos porosos é que ele possa ser obtido com características reproduzíveis. Esse aspecto pode ser difícil de ser alcançado pois, no geral, as técnicas de obtenção não permitem controle preciso do processo de formação dos poros.

A seletividade do sensor com respeito ao analito de interesse é um ponto importante a ser avaliado para garantir que não ocorram falsas respostas. Assim é conveniente utilizar, em um sensor, um receptor que seja altamente seletivo. Em biossensores, uma classe especial de sensor, um biorreceptor é utilizado tais como anticorpos ou enzimas. Essas espécies reconhecem especificamente o analito de interesse baseando-se em uma reação biológica. Os biorreceptores são tidos como excelentes modelos. Alguns receptores mais baratos têm sido aplicados como alternativa aos biológicos. Dentre esses, os mais comuns, para reações de reconhecimento em biossensores são: polímeros molecularmente impressos, as quais reproduzem a atuação de receptores como os anticorpos (LEITE; SANTOS; KUBOTA, 2014), complexos metálicos, que imitam os sítios ativos enzimáticos (PETKOVIĆ et al., 2015) e β -ciclodextrina, para detecção de ácido nicotina e ácido ascórbico (SAHA et al., 2016). Assim, é de grande importância utilizar um receptor (ou biorreceptor, no caso de biossensores) que garanta alta seletividade (ou especificidade) na determinação analítica.

Neste sentido, fez-se aqui a obtenção de um sensor eletroquímico baseado em um novo eletrodo de vidro-ITO recoberto com um filme de ouro contendo arranjo organizado e reproduzível de nanoporos. O filme nanoporoso

foi obtido por uma técnica simples e barata (diferente das técnicas convencionais baseadas em litografia de feixes) denominada de litografia de nanoesferas (NSL). O eletrodo foi então modificado com compósito de nanopartículas de ouro (AuNPs)/náfion que então recebeu α -ciclodextrina (α -CD, agente de reconhecimento molecular) para detecção direta de T-RESV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração do antioxidante T-RESV empregando sensor eletroquímico que usa eletrodo de vidro-ITO recoberto com filme de ouro nanoporoso modificado com nanopartículas de ouro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir filme de ouro nanoporoso reproduzíveis sobre substrato de vidro-ITO;
- Obter área eletroativa dos eletrodos;
- Buscar método ótimo para limpeza dos eletrodos cobertos com filme nanoporoso de ouro;
- Sintetizar AuNPs e estudar o efeito da variação da concentração do estabilizante na síntese;
- Produzir nanocompósitos de AuNPs/nafion/ α -CD;
- Imobilizar compósito AuNPs/nafion/ α -CD sobre eletrodo nanoporoso;
- Caracterizar eletrodo modificado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia infra-vermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FTIR), VC e EIS;
- Estudar a influência das AuNPs no desempenho do eletrodo;
- Estudar o efeito da presença da α -CD para detectar T-RESV;
- Detectar T-RESV a partir de uma solução padrão;
- Validar o sensor eletroquímico por ensaios de linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 SENSORES

Os sensores têm encontrado aplicações importantes nos diversos campos da indústria, como a química, farmacêutica, automobilística, biomédica, de controle ambiental ou alimentar (ADHIKARI; GOVINDHAN; CHEN, 2015)(ADLEY, 2014) (LU et al., 2020)(SINGH et al., 2016)(HANAFI et al., 2019). Nas diferentes etapas produtivas dessas áreas é necessário o uso de sensores que apresentem um alto desempenho analítico. Desta forma, é importante a busca por novos dispositivos de produção mais simples, preço mais acessível e, preferencialmente, incrementando o desempenho analítico. Se comparado com os métodos clássicos de análise quantitativa, tais como CLAE, HPLC ou análise de enzima imuno adsorvida (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), os sensores apresentam uma série de vantagens, tais como: tempo de análise menor, possibilidade de miniaturização, manuseio relativamente fácil, portabilidade, além de baixo custo (PARK et al., 2019).

Para o sensor ser considerado um dispositivo confiável analiticamente, ele deve exibir algumas características essenciais como: elevadas seletividade e sensibilidade, baixo limite de detecção (LD) e curto tempo de resposta (ZOOK; SCHROEDER, 2008). A seletividade refere-se à capacidade de discriminar analitos diferentes, mesmo que forem semelhantes estruturalmente e funcionalmente. Desta maneira, ter uma alta seletividade significa dizer que as substâncias interferentes têm contribuições irrelevantes para o sinal global (MORALES; HALPERN, 2018). O uso de espécies adequadas como receptores contribui fortemente para obtenção de um dispositivo sensorial seletivo.

A sensibilidade é a medida da variação no sinal da resposta pela variação da unidade de concentração do analito. A sensibilidade pode ser identificada através do coeficiente angular da curva analítica (resposta do sistema *versus* concentração do analito). Se a curva analítica for linear numa faixa de concentração, a sensibilidade será constante e independente da concentração nesta faixa. Normalmente esse é o perfil ideal para um dispositivo sensorial (MORALES; HALPERN, 2018). É desejado que os sensores tenham elevadas

respostas frente a baixas concentrações de analito e que apresentam resposta linear.

É fundamental ainda que um sensor exiba um tempo de resposta relativamente curto para que análise se torne prática e apropriada. Além do mais, deseja-se que os sensores sejam capazes de detectar concentrações mínimas de analito, isto é, que exiba baixo limite de detecção (LD) (MORALES; HALPERN, 2018) (ZOOK; SCHROEDER, 2008).

Os sensores podem ser classificados com base nos diferentes mecanismos de transdução de saída, tais como térmico, piezoelétrico, eletroquímico e óptico. Os sensores que empregam o mecanismo eletroquímico são considerados importantes para a indústria em diferentes tipos de aplicações como para eletrólise (conversão eletroquímica de substâncias), o processamento e o acabamento de materiais, as baterias, células de combustível e o tratamento de águas e efluentes (SAPPATI; BHADRA, 2018)(BRETT e BRETT, 1996). Os LDs e sensibilidade de sensores eletroquímicos variam conforme as suas características tais como tipo de eletrodo, modificações no ET, técnica eletroquímica empregada, entre outras.

3.1.2 Sensores Eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são dispositivos que se baseiam no consumo e/ou na geração de espécies eletroativas durante uma interação química. Nesse sistema o transdutor (ET) mensura o sinal eletroquímico gerado por essa interação analito-alvo e o receptor (ABDULBARI; BASHEER, 2017).

As técnicas eletroanalíticas correlacionam diretamente a concentração do analito e uma propriedade elétrica tais como corrente, potencial, condutividade, resistência ou a carga. Devido a facilidade de se obter essas propriedades através dos experimentos, se torna adequada para a quantificação de espécies eletroativas para diversos campos da pesquisa. Dentre os sensores eletroquímicos, os mais comuns são: amperométrico (medida de corrente), potenciométrico (mede potenciais ou acumulação de cargas), condutimétrico (mede a condutividade do meio) e os impedimétricos (mede a impedância) (HASAN et al., 2014) (RANDVIIR; BANKS, 2013). A impedância fornece o comportamento completo sobre a caracterização elétrica de determinado

sistema. Pode ser usada por exemplo para avaliar célula fotovoltaicas (SACCO, 2017), sistemas de corrosão e/ou processor eletrocalíticos (TRIANA; LIZARAZO-MARRIAGA; FLÓREZ, 2013) e para detecção de polifenóis (FU et al., 2012).

Os sensores amperométricos usam a técnica de VC, onde a sua resposta é dada por corrente. Eles foram utilizados, por exemplo, para elaboração de sensores que visaram avaliar a capacidade dos eletrodos feitos com diferentes tipos de casca de uva para detecção dos polifenóis em uva (PAULO; QUÍMICA, 2018). Foi também empregado para produzir sensores eletroquímicos baseados em nanopartículas para detecção de antioxidante em vinho (TORTOLINI et al., 2018)

3.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A EIS é composta por três grandezas físicas resistivas que estão presentes em todos os circuitos elétricos, são eles resistência elétrica (R), reatância indutiva (R_i) e reatância capacitiva (R_c). Os elementos da reatância (R_i e R_c) são as oposições a passagem da corrente, porém eles são dependentes das frequências. Já a resistência não é dependente da frequência. Se, em um sistema elétrico, é aplicado um sinal que oscila a frequências de 1 kHz a 100 kHz, a resistência sempre terá um mesmo valor, enquanto as R_i e R_c vão variar em função da frequência aplicadas sobre elas. Além disso, variam a fase da corrente em relação a tensão. Os sinais mais comuns em sistemas elétricos são corrente e potencial. Em correntes alternadas, a corrente tem seu sentido de circulação no circuito elétrico invertido, periodicamente segundo determinada frequência. Da mesma forma, sob tensão alternada, a polaridade é invertida segundo determinada frequência. Assim sendo, a aplicação do sinal tem a forma de onda e é representada por uma função senoide. Dizemos então que é um sinal senoidal.

A impedância é o somatório desses três componentes R , R_i e R_c , exibindo uma característica vetorial, devido a alteração do ângulo de fase para as duas reatâncias quando é aplicado um sinal de potencial alternado. E esse sinal (potencial) é dado por uma pequena perturbação de aproximadamente 10 mV em um sistema que está em equilíbrio sob frequências que variam desde mHz até alguns kHz (ASTAFEV, 2018)(BRETT e BRETT, 1996). A impedância pode

ser representada através de um número complexo onde a parte real corresponde a resistência elétrica e a parte imaginária as reatâncias. A impedância pode ser interpretada, mais comumente, por meio de um diagrama denominado de diagrama de Nyquist (Figura 1).

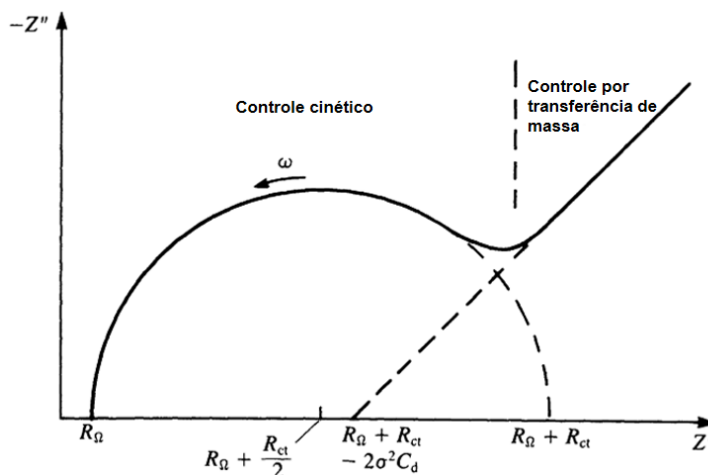


Figura 1: Diagrama de Nyquist (BRETT e BRETT, 1996).

O eixo x é a parte real da impedância que corresponde a valores de resistência ôhmica, onde $z' = R_{\Omega}$. Já, a parte imaginária Z'' é dada pelo eixo y que corresponde aos valores de reatância indutiva (parte positiva) e capacitiva (parte negativa), onde o somatório das duas reatâncias é representado por X, deste modo $Z'' = X$. A impedância é então atribuída ao $|Z|$, e ϕ será sempre o ângulo entre as reatâncias e a resistência ôhmica, onde $\phi = \text{arc.tg}(z)$ (BARD; FAULKNER; BAGOTSKY, 2001) (BRETT e BRETT, 1996). Estudos usando impedância possibilitam obter resultados como: processos interfaciais de eletrodo tais como separação (equivalente a condensadores), transferência de carga (equivalente a resistências) e difusão de espécies eletroativas (BARD; FAULKNER; BAGOTSKY, 2001)(BRETT e BRETT, 1996).

O diagrama de Nyquist é composto por um semicírculo e uma parte linear. O diâmetro do semicírculo tem relação direta com a cinética de transferência de elétrons da reação redox sobre a superfície do eletrodo. O lado esquerdo do semicírculo é referente a aplicação de sinais de alta frequência, fornece informações sobre o controle cinético ou transporte de massa. Se o processo de transferência for muito rápido ou a frequência for baixa, o arco não é visualizado e apenas uma reta com 45° é obtida (CHANG; PARK, 2010) (BRETT e BRETT, 1996)(BARD e FAULKNER, 2001);

3.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA

Uma outra maneira utilizada para avaliar e caracterizar os sensores eletroquímicos é através da VC. A VC é uma técnica de varrimento de potencial que consiste na aplicação ao ET um potencial (E) que varia linearmente com tempo. Ao realizar o varrimento de potencial dentro da faixa definida, potencial mínimo (E_{\min}) e potencial máximo (E_{\max}) permite acontecer reações de oxidação ou redução na superfície do eletrodo de espécies eletroativas na solução (ELGRISHI et al., 2018)(BARD e FAULKNER, 2001)(BRETT e BRETT, 1996). Uma das suas principais aplicações tem sido para identificar mecanismos de reações eletroquímicas para a determinação de espécies existentes em solução e para estudos semiquantitativos de velocidade de reação (STOZHKO et al., 2018)(LIU; WEI; WANG, 2011).

3.4 SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são caracterizados como compostos que podem retardar ou inibir as reações de oxidação provocadas pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). As ERO subdividem em dois grupos, os radiculares: hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}); e os não-radicalares: oxigênio gasoso, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as principais ERN estão o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (KURUTAS, 2016). Em sistemas biológicos, os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações se comparadas ao substrato oxidável, atuam na prevenção da oxidação. Em nível molecular os antioxidantes podem atuar inibindo a formação ou capturando as ERO e ERN ou inibindo as enzimas oxidativas (LÜ et al., 2010) (KURUTAS, 2016).

Devido aos efeitos benéficos a saúde, dosar a quantidade de antioxidante presente durante o período de cultivo de plantas que são ricas nesse bioativo pode gerar informações adicionais ao produto final. Pode ainda contribuir para otimizar o controle de qualidade a todo o momento na produção do fruto e dos

produtos comerciais produzidos com ele. Pode ser útil ainda na tomada de decisões no processo de produção com o intuito de otimizar o produto em função da maior concentração de antioxidante.

Biossensores para identificação de polifenóis em vinhos, por exemplo, tem sido desenvolvido e foi baseado no uso de polifenóis oxidase ou peroxidases (enzimas) como biorreceptores (ANDREI et al., 2016)(GIL; REBELO, 2010). O Tert-butilhidroquinona é um antioxidante sintético que também foi detectado utilizando biossensores baseado em peroxidase de planta natural imobilizado em sepiolita (silicato natural de magnésio hidratado) e incorporado em eletrodo de pasta de carbono contendo nanotubos de carbono e nafion (DE OLIVEIRA et al., 2014).

O nafion (Figura 2) é um polímero interessante e muito utilizado em sensores para dar maior seletividade e estabilidade por causa da sua estrutura tridimensional condutora (GUO, C., SUN, H., ZHAO, X. S. 2012). Este polímero combina uma matriz hidrofóbica (politetrafluoroetileno) com grupos hidrofílicos (ácido sulfônico) arranjados ao longo da cadeia hidrofóbica que possibilita um bom transporte de íons e são responsáveis pela estabilidade morfológica do polímero. O grupo ácido sulfônico são responsáveis pela hidratação e mobilidade protônica na membrana. Além disso o nafion apresenta características antiincrustante, exibe alta permeabilidade iônica, elevada rigidez mecânica e estabilidade térmica (KUSOGLU; WEBER, 2017)(DESAI; SRIVASTAVA, 2013).

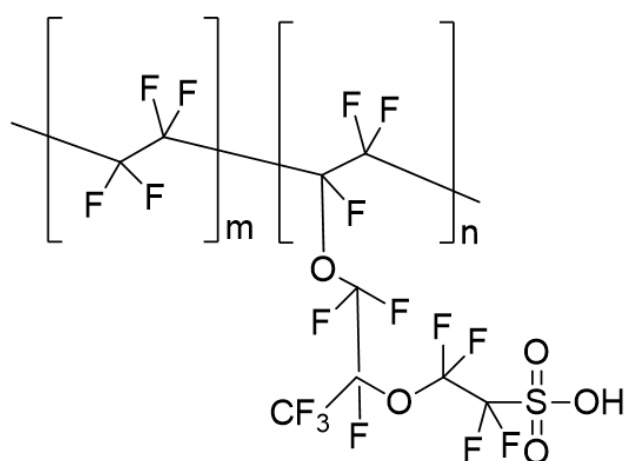


Figura 2: Estrutura química do Nafion (autoria própria).

Adicionalmente, o nafion pode assumir o papel de membrana para impedir que interferentes sejam difundidos para a superfície do eletrodo (XIE et al., 2010; KONG F.Y et al., 2014). Isso é particularmente importante para o sensor pois contribui para a detecção seletiva do analito alvo e é frequentemente usado para a imobilização de receptor (ou biorreceptor) no eletrodo (ZHAO et al., 2006)(MEHMETI et al., 2017)

3.5 SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL

O resveratrol é um antioxidante que tem atraído atenção das indústrias de suplementos alimentares e cosméticas por sua propriedade antioxidante, além de atuar como anti-inflamatório, cardioprotetor, antidiabético, neuroprotetor e anticâncer (KOUSHKI et al., 2018)(SALEHI et al., 2018). O resveratrol é ainda conhecido pelo seu poder antienvhecimento (CATALGOL et al., 2012)(KOUSHKI et al., 2018)(SALEHI et al., 2018). Em um estudo recente de grande importância, publicado em um dos periódicos de maior impacto no mundo, a *Nature*, foi mostrado que o resveratrol atua na preservação da musculatura. Por isso, esse biotivo será administrado para astronautas que são submetidos a longos deslocamentos em que a gravidade é zero e a perda muscular é um problema grave a ser contornado (MORTREUX et al., 2019).

O resveratrol consiste em um composto fenólico, pertencente ao grupo dos flavonóides, presente em cerca de setenta espécies vegetais, em particular, encontrado abundantemente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), tanto na forma *cis* (*cis*-3,5,4'-triidroxiestilbeno), como *trans* (*trans*-3,5,4'-riidroxiestilbeno), Figura 3. A sua síntese acontece principalmente nas cascas dos frutos através de radiação ultravioleta (UV) ou por ataque microbiológico (por exemplo fungos). O isômero *trans* é mais estável do que o *cis* e ao ser exposto por radiação ultravioleta ou presença de calor pode sofrer isomerização formando o isômero *cis* (KUNDU; SURH, 2008) (KOUSHKI et al., 2018).

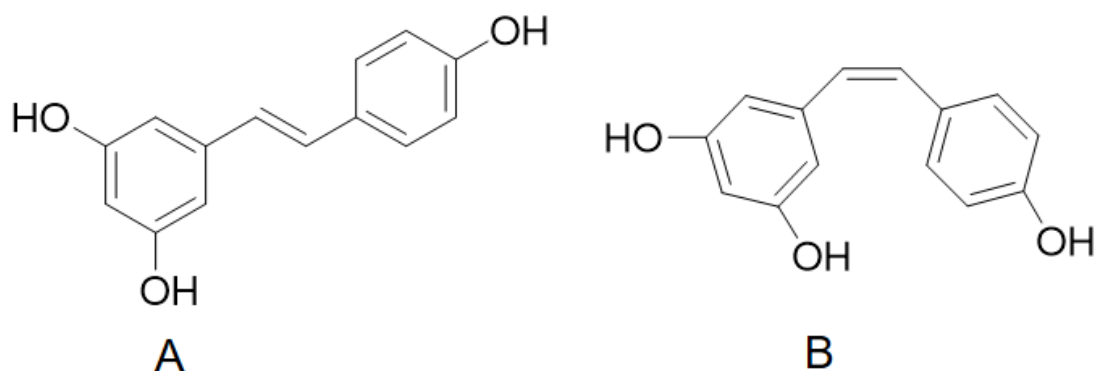


Figura 3: Estrutura química dos isômeros (A) *trans*-resveratrol e (B) *cis*-resveratrol. (Autoria Própria).

O resveratrol tem sido determinado eletroquimicamente utilizando eletrodo modificado com polímeros molecularmente impressos que são estruturas poliméricas que mimetizam o reconhecimento biológico obtidos com elementos de biorreconhecimento (WANG et al., 2019)(WANG et al., 2019)(PEKEC et al., 2012)(AFZAL; DICKERT, 2018). Usando eletrodos baseados em hastes de fibra de carbono e pasta de carbono foi ainda possível determinar seletivamente resveratrol em fármaco, na ausência de um elemento de reconhecimento biológico (AIRADO-RODRIGUEZ et al., 2010). O resveratrol foi também determinado seletivamente através do eletrodo de pasta de carbono modificado com α -ciclodextrina (α -CD). Segundo os autores, a interação entre ambos (resveratrol e α -CD) gera estáveis inclusões tipo “convidado-hospedeiro” devido a formação de uma estrutura tipo “gaiola” (PEKEC et al., 2012). Vale destacar que uma molécula de reconhecimento molecular para resveratrol ainda não tem sido encontrada e o uso da α -CD pode ser uma saída interessante para contornar o problema.

As CDs são definidas como a classe de oligossacarídeos cíclicos que contém unidades de glucopiranosose. As três CDs mais importantes e de ocorrência natural são as α , β ou γ -CD, as quais contêm 6, 7 e 8 monômeros de glicose, respectivamente. A α -CD tem menor número de unidades de glicose e, conseqüentemente, exibe uma estrutura química menor que β e γ -CD. Sendo assim, apresenta uma melhor capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas pouco polares, como o *trans*-resveratrol. A α -CD, Figura

4, exibe uma forma de cone truncado. O cone é constituído por esqueletos de átomos de carbonos das unidades da glicose e também pelos átomos de oxigênio glicosídicos. Esse arranjo estrutural deixa em sua parte interna com caráter hidrofóbico devido os grupamentos C-H. A sua parte exterior exibe características hidrofílicas devido as hidroxilas expostas (VONCINA; VIVO, 2013)(SHARMA; BALDI, 2016).

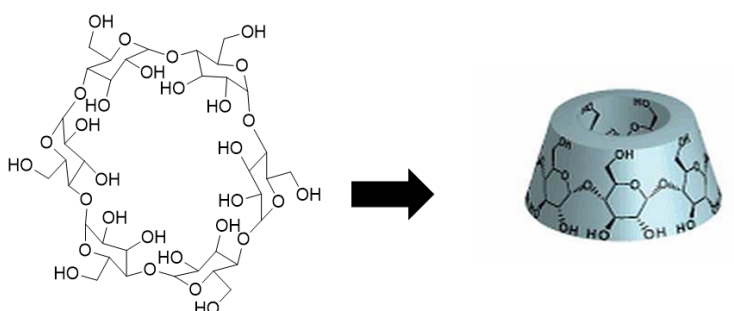


Figura 4: Estrutura da α -ciclodextrina e sua representação esquemática em forma de cone (VONCINA; VIVO, 2013).

3.6 NANOMATERIAIS EM ELETRODOS

A produção de sensores eletroquímicos incorporados por nanomateriais tem atraído atenção da comunidade científica, uma vez que as características dos sensores como robustez, sensibilidade e estabilidade são aprimoradas com a sua utilização (SQUISSATO et al., 2019). Os nanomateriais mais comumente empregados em sensores eletroquímicos são nanopartículas metálicas, o grafeno (ou óxido de grafeno) e até mesmo nanotubos de carbono (KONG et al., 2014)(MEHMETI et al., 2017)(PEKEC et al., 2012)(LI et al., 2019).

As AuNPs exibem elevada condutividade, a qual minimiza a resistência da superfície de eletrodos eletroquímicos e amplificam as respostas. Além disso, possuem uma elevada área superficial, a qual contribui aumentando a superfície sensorial. Esses aspectos melhoram a sensibilidade dos eletrodos. As AuNPs estão entre as mais empregadas e estudadas como modificação de eletrodos pois são facilmente obtidas, apresentam estabilidade, possibilitam funcionalização química da superfície bem definida e exibe propriedades óptico-

eletrônicas e catalíticas singulares (XIE et al., 2010; Ouyang et al., 2012). No entanto, da mesma forma, nanopartículas de platina (LI et al., 2019), de NiO/Ni₂O₃ (LIU et al., 2014), nanopartículas de óxido de ferro (YANG et al., 2014) e de Ru (JO et al., 2014) estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Contudo, a metodologia para a obtenção das AuNPs está entre as mais simples e ocorre via redução do sal de ouro, geralmente o HAuCl₄, usando o citrato como agente redutor e estabilizante (DARUICH DE SOUZA; RIBEIRO NOGUEIRA; ROSTELATO, 2019).

O desenvolvimento de eletrodos com superfícies nanoestruturadas é também uma estratégia interessante pois isso gera um aumento de área superficial do material que contribui para a melhora da sensibilidade, LD e estabilidade (FANG et al., 2012)(VAN HAO et al., 2017). A melhora dessas características também pode ser alcançada utilizando eletrodos metálicos nanoporosos. Tem sido reportado um biossensor eletroquímico baseado em um eletrodo nanoporoso acoplado AuNPs para a detecção da molécula de DNA (HU et al., 2008). Foi observado que os eletrodos nanoporosos de ouro exibem uma cinética de adsorção mais lenta para proteína β -amiloide uma vez que eles foram capazes de manter sua área de superfície eletroquímica ativa, mesmo após exposição prolongada à proteína. Isso é importante, porque indica que o eletrodo funciona por períodos mais prolongados na presença de proteínas sem falha de sensoriamento se comparado com o eletrodo não-poroso (SUMMERLOT et al., 2011). Uma das maneiras mais simples para obtenção de superfícies nanoporosas é a litografia com nanoesferas (NSL). A NSL é uma metodologia eficiente, econômica e viável para a produção controlada de materiais nanoestruturados que apresentam característica de boa homogeneidade de poros e de periodicidade das nanoestruturas. Essa metodologia tem sido usada na obtenção de eletrodos com nanoburacos ou pontos quânticos (HAYNES, C. L.; VAN DUYNE, R. P. J., 2001)(COLSON; HENRIST; CLOOTS, 2013).

Nesse sentido, o desenvolvimento de um material produzido com a combinação nafion/AuNPs/ α -CD em eletrodo de ouro nanoporoso pode gerar um substrato interessante para construção de eletrodos modificados para aplicação em sensores eletroquímicos para detecção de T-RESV que utiliza α -

CD como elemento de reconhecimento molecular. Um sensor eletroquímico com essas características ainda não foi relatado na literatura.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Para produção de uma superfície de vidro-ITO com filme nanoporoso de ouro por NSL foi utilizada uma suspensão aquosa de esferas de poliestireno (PS, Sigma-Aldrich, ca. 0,3 μm de diâmetro), dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDS, Sigma-Aldrich, >99%), etanol (synth, >99,5% ou Científica, >99%) e tetrahidrofurano (THF, Sigma-Aldrich, >99,9%), peróxido de hidrogênio H_2O_2 (synth, 35%). Para as medidas eletroquímicas de VC e EIS foram utilizados ferrocianeto de potássio, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Sigma-Aldrich, $\geq 98,5\%$), sulfato de potássio, K_2SO_4 (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), tampão de fosfato (PBS) e ácido sulfúrico, H_2SO_4 (Alplatec, >99,5%). Para a limpeza do eletrodo foram usados ácido nítrico, HNO_3 (Êxodo Científica, 70%), acetona (Dinâmica, >99,5%) e metanol (Dinâmica, >99,5%). Para a limpeza das celas eletroquímica e vidrarias foi utilizado permanganato de potássio KMnO_4 (Anidrol, >99%). Para a determinação da área eletroativa foram utilizados sulfato de cobre (II), CuSO_4 (Sigma-Aldrich, >99%). Para a síntese de nanopartículas de ouro foram utilizada solução de ácido tetracloroáurico, HAuCl_4 99,9%, a 30% m/v (Aldrich), citrato de sódio, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (Synth), borohidreto de sódio, NaBH_4 (Sigma-Aldrich) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Sigma-Aldrich, 99%). Para a modificação do eletrodo foram usados nafion 117 (1% , 45% meio alcoólico , Sigma-Aldrich), α -CD (Sigma-Aldrich, 99%) e T-RESV (Sigma-Aldrich, >99%). Para preparar o PBS usou-se ácido fosfórico, H_3PO_4 (Synth, 85%) e hidróxido de potássio KOH (Synth, 85%). Para análises eletroquímicas foram utilizados gás de Nitrogênio (99,999% (5N) Linde) e gás de oxigênio (99,999 (5N), Linde).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação do Eletrodo Nanoporoso

Os eletrodos nanoporosos de ouro foram preparados segundo a metodologia descrita por CABRAL JÚNIOR et al.(2018), via metodologia denominada de transferência de flutuante representada esquematicamente na

Figura 5. Inicialmente uma lâmina de vidro limpa (apenas com água) e cortada (1,5 x 1,0 cm) foi colocada dentro de uma placa de petri (Figura 5A). Na sequência foi adicionada água deionizada em quantidade adequada para formar uma interface, sem encobrir o substrato (Figura 5B). Então, 300 μ L de uma suspensão de esferas de PS (0,25% m/v em H₂O/EtOH 1:1) foi gotejada cuidadosamente sobre a superfície do substrato para que ela se espalhasse e alcançasse a interface. Isso iniciou a formação lenta de uma camada irregular de esferas apenas na superfície da água, no momento que a suspensão tocou a interface água/substrato (Figura 5C). Então, a monocamada foi compactada em determinada região da superfície do líquido gotejando uma solução de dodecilbenzenosulfato de sódio 1% m/v, a qual foi cuidadosamente adicionada a mistura (Figura 5D). A compactação da monocamada de PS torna ela mais organizada na superfície da água. Na sequência, sobre a monocamada organizada, um substrato hidrofílico (tratado com solução 3:1 de H₂SO₄ concentrado:H₂O₂, por 30 min) com medidas de 3,0 x 1,0 cm foi adicionado e o líquido em excesso foi extraído cuidadosamente com uma micropipeta. Perturbação na mistura pode inviabilizar a produção de um filme homogêneo sobre o substrato (Figura 5E). Após remoção de cerca de 90% do volume de líquido, o restante da água foi posteriormente seco sob temperatura ambiente. Assim, foi obtido o substrato de vidro-ITO com a monocamada de PS (Figura 5F).

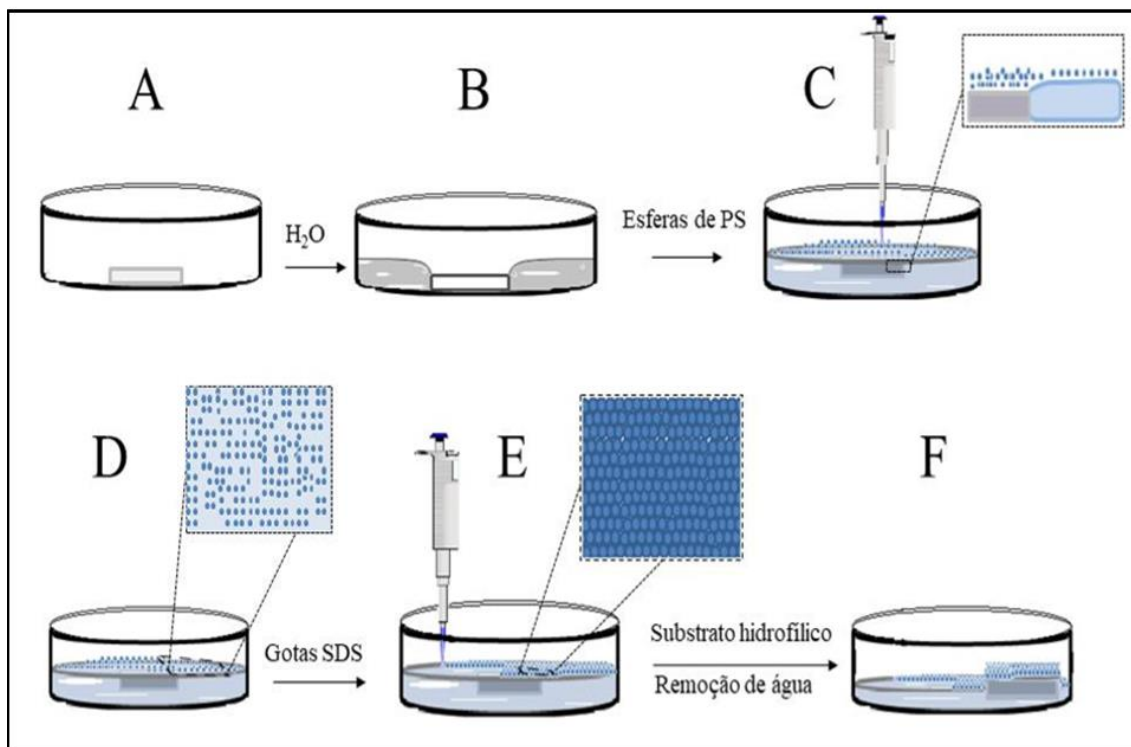


Figura 5: Processo de deposição das esferas de poliestireno sobre o substrato de vidro previamente hidrofílico. (A) substrato no interior da placa de petri; (B) tensão superficial do líquido em contato com o substrato; (C) deposição das esferas sobre o substrato de vidro no fundo da placa de petri; (D) rompimento da tensão superficial do líquido e formação da camada desorganizada na superfície da água; (E) adição do surfactante e processo de formação da monocamada compacta alto organizada; (F) captura da monocamada de esferas com um segundo substrato, retirando o excesso de água (CABRAL JÚNIOR et al., 2018).

Na sequência, o diâmetro das PS da monocamada sobre o vidro-ITO foi reduzido utilizando o desgaste por íons reativos em atmosfera de He. Esse processo foi realizado no interior da câmara de um Plasma Cleaner ((HARRICK PLASMA, Modelo PDC-002) carregado com gás hélio com pressão de 200 mtorr por 45 min. O diâmetro médio das esferas foi reduzido para aproximadamente metade do diâmetro inicial, isto é, para ca. 200 nm. Então uma camada de titânio (Ti) de 10 nm foi sobreposta sobre o filme de PS e sequencialmente adicionado uma camada de ouro com uma espessura de ca. 45 nm. Ambos os filmes foram obtidos via *sputtering*. Para a pulverização do filme de Ti, usou-se o equipamento Auto 500 (13.56 MHz a 200 W, contendo balança de cristal de quartzo acoplada no interior da câmara para o controle da espessura em tempo real). Para obtenção do filme de ouro foi utilizado o equipamento S-CD 050 Sputter Coater – Baltec com corrente de 60 A e tempo de pulverização de 200 s. Por fim, as PS

foram removidas por um banho ultrassônico em uma solução de THF durante 5 min. O diâmetro dos nanoburacos foi confirmado por MEV (marca FEI, modelo Quanta 250). A Figura 6 mostra as etapas descritas.

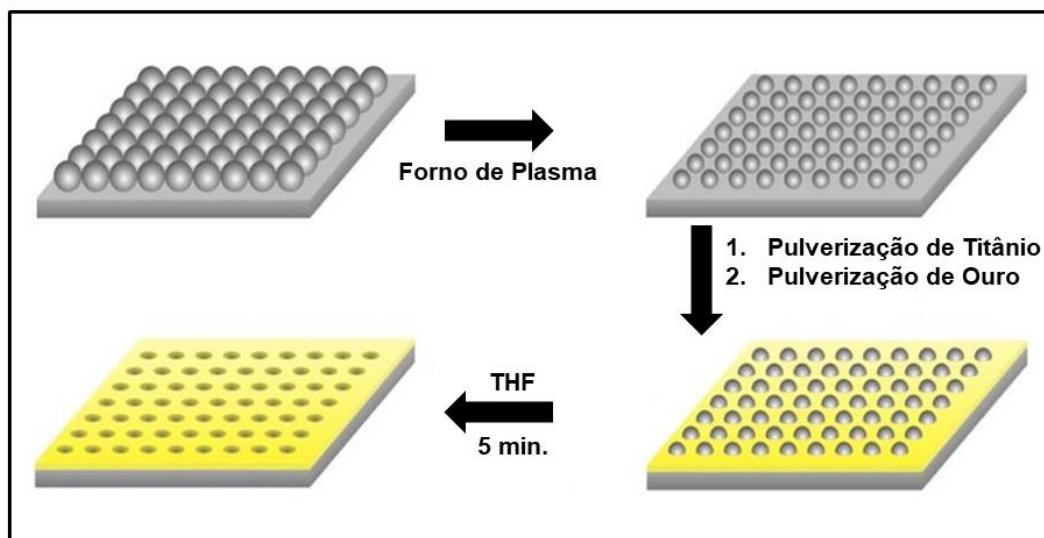


Figura 6: Etapas do procedimento feito para obtenção dos substratos nanoestruturados via recobrimento com filmes de Ti e Au e remoção de PS (CABRAL JÚNIOR et al., 2018).

Foram testadas nesse trabalho um total de 8 amostras de vidro-ITO recobertas com filme nanoporoso de ouro obtidos por NLS. Para realizar os testes eletroquímicos, os eletrodos nanoporosos tiveram sua área de trabalho delimitada usando tubo termoretrátil de borracha de 6 mm. A dimensão da região exposta foi de aproximadamente 1 cm de largura e 1,1 cm de altura como pode ser observado na Figuras 7 para duas das amostras. Essa demarcação foi realizada para todas amostras contendo filme de ouro nanoporoso. Isso foi feito para garantir que a mesma área do eletrodo seja utilizada durante os experimentos.



Figura 7: Imagens das amostras demarcadas para área exposta fixa utilizando o tubo termoretrátil de borracha de 6 mm (Autoria Própria).

4.2.2 Limpeza dos Eletrodos Nanoporosos

Os eletrodos foram limpos por imersão em solução de ácido nítrico 10%. Diferentes tempos de tratamento ácido foram testados.

4.2.3 Medidas para ângulo de contato dos Eletrodos Nanoporosos

Medidas de ângulo de contato foram realizadas para monitorar o processo de limpeza dos eletrodos de vidro-ITO recobertos com filme de ouro nanoporoso. Para realizar as medições de ângulo de contato da superfície do eletrodo de trabalho é importante nivelar a superfície que irá receber a gota na horizontal. Para isso, uma gota de água deionizada é depositada na superfície do substrato, precisamente nivelado na horizontal, por meio de um conta gotas. Em seguida, após 5 s de estabilização, imagens fotográficas foram capturadas para avaliar o perfil da gota que é formado sobre a superfície. Na sequência, foi realizado um ajuste das coordenadas e as medições do ângulo de contato foram obtidas por meio das imagens digitais utilizando o software Solid Works 2018.

4.2.4 Célula Eletroquímica

Para a realização das medidas eletroquímicas foi utilizada uma célula de vidro com capacidade de 100 mL provida de uma tampa de teflon com cinco aberturas. Então, ET (vidro-ITO coberto com filme de ouro nanoporoso), ER (Ag/AgCl em KCl saturado), CE (placa de platina com área 1 cm²), entrada e saída para o sistema de borbulhamento de gás N₂ e O₂ foram acoplados. Uma

imagem fotográfica da célula eletroquímica está mostrada na Figura 8 e os detalhes de como ela foi manufaturada está descrita no Anexo 1.

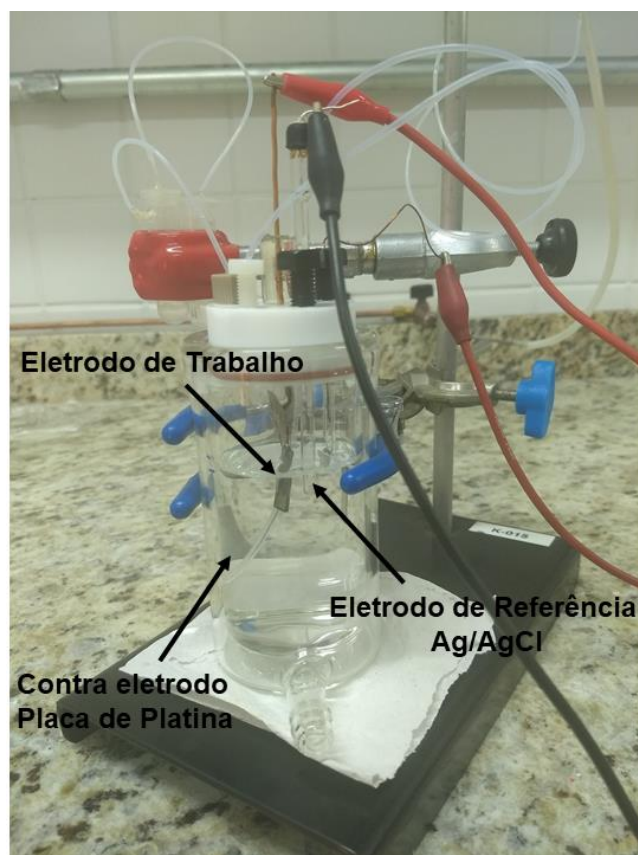


Figura 8: Célula eletroquímica (Autoria Própria).

4.2.5 Caracterização dos Eletrodos Nanoporosos por VC e EIS

Antes da realização das medidas eletroquímicas, as vidrarias e dos demais instrumentos foram deixados de molho em solução de permanganato de potássio durante 48 h, enxaguados com água deionizada, em seguida com solução piranha, acetona e por fim água de mili-Q. Antes de cada medida experimental a célula foi enxaguada por 5 vezes com água mili-Q e depois preenchida com solução de sulfato de potássio K_2SO_4 0,1 M e PBS 20,0 mM (1 M de H_3PO_4 e 1,5 M de KOH, pH = 7,1). O ET foi enxaguado com acetona, etanol e depois com água mili-Q. E o ER e o CE foram enxaguados por 5 vezes com água mili-Q, após serem anteriormente limpos, para então começar a realizar as

medidas eletroquímicas. Antes de iniciar as leituras voltamétricas, o oxigênio dissolvido foi removido das soluções borbulhando-se N_2 durante 15 min.

As medidas eletroquímicas, empregando VC, foram realizadas no Potenciostato/Galvanostato EG&G PAR M 173 e a rampa de potencial EG&G PAR M175 acoplados a um computador. Os experimentos eletroquímicos por VC foram realizados à temperatura ambiente na faixa de -0,8 a 0,8 V e diferentes velocidades de varredura foram exploradas. Sempre foi avaliado o segundo cíclico voltamétrico.

As análises de impedância foram realizadas na faixa de frequência de 10 KHz a 10 mHz. Amplitude do potencial de onda senoidal aplicada foi de 10 mV e os potenciais utilizados foram -50 mV e -150 mV as quais foram próximos aos potenciais de circuito aberto. O teste foi realizado em um sistema com uma quantidade de oxigênio controlado sob pressão de 1 atm e a solução de trabalho foi o PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L. Algumas medidas foram realizadas em outros meios como H_2SO_4 0,5 mol/L, K_2SO_4 0,1 mol/L e $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 0,5 mmol/L.

4.2.6 Determinação da área eletroativa dos Eletrodos Nanoporosos

Para a determinação da área eletroativa, foram obtidas curvas de deposição em regime de subtensão (*underpotential deposition*, UPD). Antes de obter a curva de UPD, o valor do potencial reversível foi determinado em uma solução de H_2SO_4 0,5 mol/L e $CuSO_4$ 20,0 mmol/L recém preparada, desaerada com N_2 por 15 min e em uma velocidade de varredura, sob VC, de 50 mV usando um ET de cobre metálico. O potencial reversível corresponde ao ponto de corrente zero no voltamograma. Então, uma monocamada de cobre foi produzida na superfície do eletrodo nanoporoso sob VC nas mesmas condições experimentais que foram utilizadas para determinação do potencial reversível do eletrodo de cobre metálico. A faixa de potencial utilizada foi de 0,082 à 0,800 V, sendo que 0,082 V foi o potencial reversível determinado.

4.5 MODIFICAÇÕES NO ELETRODO NANOPOROSO

4.5.1. (AuNPs) estabilizadas com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)

As AuNPs estabilizadas com CTAB foram preparadas segundo a adaptação da metodologia descrita por Sidra Amin et al. (2016). Para a síntese adicionou-se, em um balão de 10 mL, uma alíquota de 300 μL da solução estoque de ca. 30% (m/v) de HAuCl_4 . O volume foi completado para gerar um concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L. Toda a solução de HAuCl_4 foi transferida para o béquer e deixada sob constante agitação por 2 min. Então, foram adicionados, gota a gota, 600 μL de solução aquosa de citrato de sódio 38,8 mM (agitação por 2 min) e, sequencialmente, 300 μL de uma solução aquosa $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de borohidreto de sódio, recém preparada. A mistura foi deixada sob agitação por 15 min. Por fim, colocou-se 150 μL de uma solução de CTAB $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L e a solução foi deixada em agitação por mais 15 min. A produção de AuNPs foi caracterizada utilizando espectrofotometria UV-Vis.

4.5.2. Preparação e modificação do eletrodo

Inicialmente duas misturas foram obtidas: 1) AuNPs/náfion e 2) AuNPs/náfion/ α -CD. Para isso, em eppenrdorf, foram adicionados 150 μL de solução de AuNPs recém-preparada, 75 μL de solução de nafion 0,1%. A mistura foi agitada em um agitador vortex (Labnet, VX-200) por 30 min e então ultrasonificado (SCHUSTER, L-100) por mais 30 min. Para obtenção do segundo compósito, o mesmo procedimento experimental foi repetido com a adição extra de 20 μL de uma solução α -CD $2,5 \times 10^{-4}$ g/mL na mistura. Na sequência foram produzidos filmes das duas misturas obtidas sobre a superfície do eletrodo nanoporoso por gotejamento, conforme adaptação do procedimento de AMIN et al., 2016. Para isso, eletrodos de vidro-ITO recoberto com filme nanoporoso de ouro foram limpos em uma solução de HNO_3 10 % durante 5 min e em seguida lavados com água mili-Q e depois foram imersos em metanol por 50 min e depois enxaguados com água mili-Q. Na sequência, o total do volume da mistura AuNPs/náfion foi gotejada cuidadosamente sobre toda área demarcada do

eletrodo e deixado em repouso por 24 h sob temperatura ambiente. Similarmemente, o volume total da mistura CTAB-AuNPs/náfion/ α -CD foi gotejado cuidadosamente sobre o eletrodo já coberto com a mistura 1. Então, o eletrodo ficou sob repouso a temperatura ambiente por mais 24 hrs. Finalmente, o eletrodo modificado foi montado na célula eletroquímica e submetido as análises por EIS e VC para avaliar o comportamento eletroquímico do compósito imobilizado sobre o substrato. Os testes eletroquímicos foram executados em presença da solução na mistura de K_2SO_4 0,1 mol/L com PBS 20,0 mmol/L (pH = 7,1). Para os testes por VC, a solução foi desaerada com N_2 (1 atm) por 15 min e, para o teste por EIS, foi introduzido na célula eletroquímica O_2 (1 atm) por 15 min.

4.5.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos para as amostras nanoporosas modificadas com o compósito CTAB-AuNPs/Náfion/ α -CD antes e depois de serem imersas em água por 2 h. Foram obtidos também espectros para os precursores náfion e α -CD puras. Foi utilizado um espectrofotômetro FTIR Spectrometer Spectrum Two, Perkin Elmer, acoplado ao acessório de reflectância total atenuada (FTIR-ATR). A varredura foi realizada no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras em pó foram misturadas com KBr (~1,0% em massa) e prensadas antes de realizar a medição dos espectros. A análise foi realizada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Londrina.

4.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A morfologia dos compósitos AuNPs/Nafion e AuNPs/Náfion/ α -CD sobre as amostras foram avaliadas por meio de MEV (Shimadzu Superscan SSX-550). E com esse mesmo equipamento fez-se a análises de EDS para avaliar a composição elementar. As amostras foram metalizadas com filme fino de ouro antes de serem submetidas as análises.

4.5.5. Detecção do *Trans-Resveratrol* (T-RESV)

Para a detecção do T-RESV, foi preparada 50 mL de uma solução de K_2SO_4 0,1 mol/L com PBS 20,0 mmol/L (pH = 7,1) e, nela, foi adicionado 2000 μ L de solução estoque de T-RESV $1,31 \times 10^{-7}$ mol/L, preparada em ácido sulfúrico 0,02 mol/L. Sob um sistema desareado com N_2 por 15 min, velocidade de varredura de 50 mV/s e em uma faixa de potencial de -600 mV à 800 mV foi realizada uma VC para avaliar o comportamento eletroquímico do sistema. Então, uma curva analítica foi produzida a partir do sinal do pico catódico realizando VC individuais sobre o sistema com diferentes volumes da solução de T-RESV, sendo eles: 0, 500, 1000, 1500 e 2000 μ L. Onde esses volumes foram colocados de 500 μ L e em 500 μ L pelo o orifício do ET. Após a cada adição da solução de T-RESV, o orifício era rapidamente tampado novamente com o ET, para manter o sistema desareado. Todo o processo da construção do sensor eletroquímico com suas respectivas etapas está esquematicamente apresentado na Figura 9.

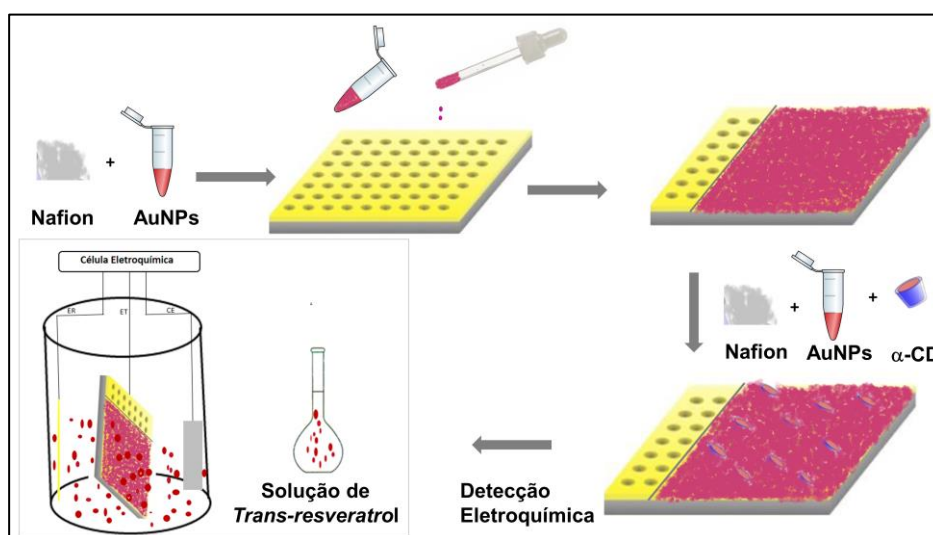


Figura 9: Representação dos estágios de modificação sobre a superfície amostra nanoporosa e a detecção eletroquímica do T-RESV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS NANOPOROSOS

5.1.1 Caracterização por microscopia eletrônica

A técnica de MEV foi empregada para confirmar a obtenção do filme de ouro nanoporoso sobre a superfície do vidro-ITO. Uma fina camada de Ti (ca. 3 nm) foi formada sobre o vidro ITO antes da obtenção do filme de ouro (ca. 45 nm). Isso foi necessário para melhorar a adesão do filme de ouro no substrato de vidro-ITO. Imagens de MEV dos substratos produzidos estão mostradas nas Figura 10. Nota-se uma superfície distribuição de nanoporos com forma aproximadamente esférica distribuídos homogeneamente ao longo de todo o filme de ouro. Os poros apresentaram diâmetro médio ($240,0 \pm 27,8$) nm. Tipicamente, esse tipo de estrutura de buracos incorpora rugosidade na superfície e proporciona uma elevada área de superfície que contribui para processos de adsorção melhorada e implementa a transferência de elétrons. Isso deve possibilitar atividades eletrocatalíticas aprimorada para muitas reações eletroquímicas. Além disso, a utilização de ouro dá uma vantagem extra pois é um metal com uma química bastante conhecida podendo ser prontamente modificado por moléculas contendo grupo tiol com intuito de deixar a superfície seletiva frente a um analito de interesse (TAN et al., 2011),(COLLINSON, 2013).

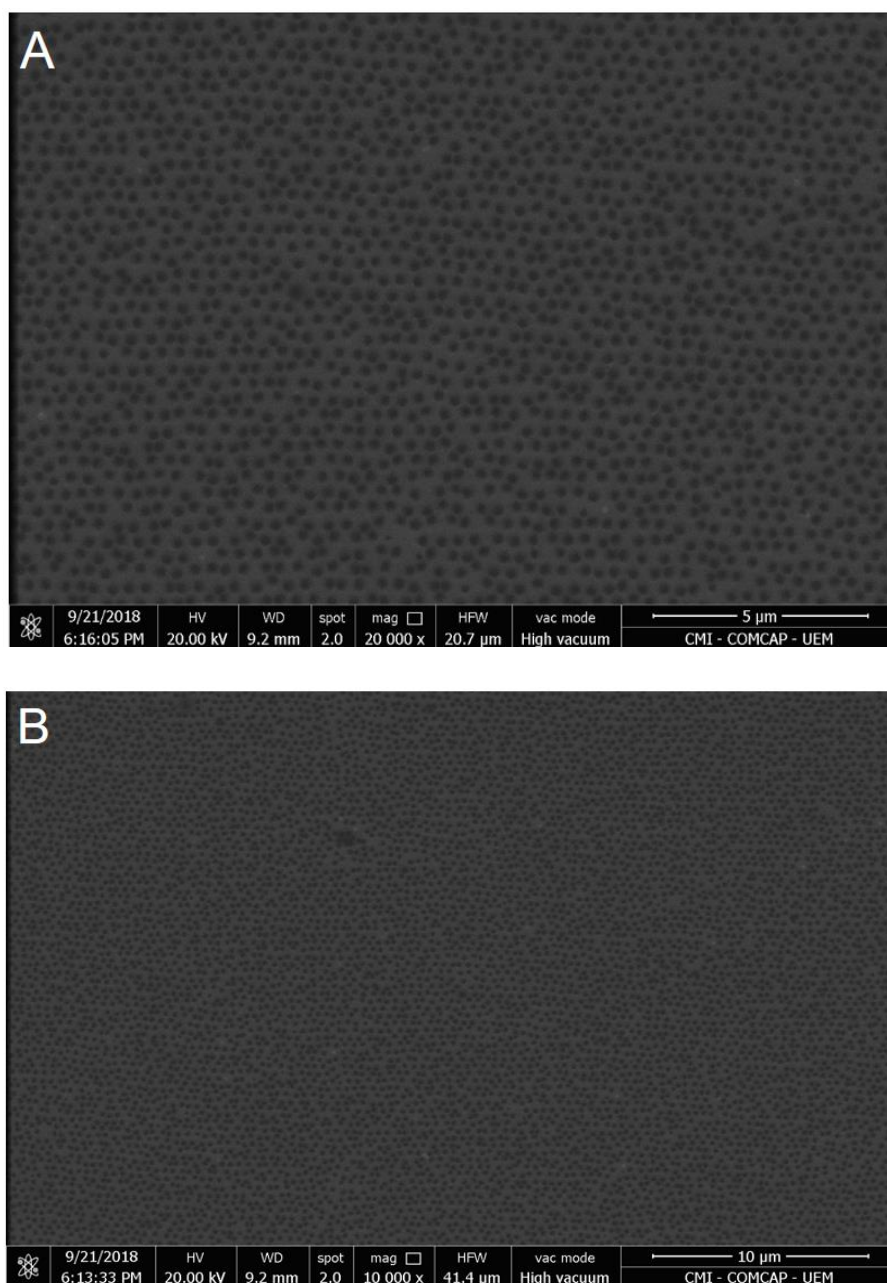


Figura 10: Imagens obtidas por MEV de substrato de vidro-ITO coberto com filme de ouro nanoporoso com magnificação: a) 20.000x e b) 10.000x.

5.1.2 Caracterização dos eletrodos por testes eletroquímicos

Inicialmente, foram utilizadas quatro amostras semelhantes de vidro-ITO recoberto com filme nanoporoso de ouro produzidas conforme metodologia descrita na seção 4.2.1. Testes de VC foram realizados a fim de monitorar o comportamento eletroquímico dos substratos em K_2SO_4 0,1 mol/L, usado como eletrólito de suporte.

Inicialmente foi determinada a faixa de trabalho segura para o eletrodo de trabalho. Uma varredura na faixa entre -1,0 e 1,5 V foi realizada afim de avaliar a ocorrência de possíveis reações redox. A Figura 11A (linha vermelha) mostra o voltamograma cíclico obtido para uma amostra nanoporosa de ouro. Foi possível observar a presença de um pico anódico próximo de 1,20 V. Esse sinal está relacionado com a formação de óxido de ouro. Essa reação é característica para ouro policristalino em meio neutro (WOODS; QUIRK; BURGESS, 2018). Os picos catódicos em 0,25 e 0,65 V devem estar relacionados com a restauração do ouro metálico.

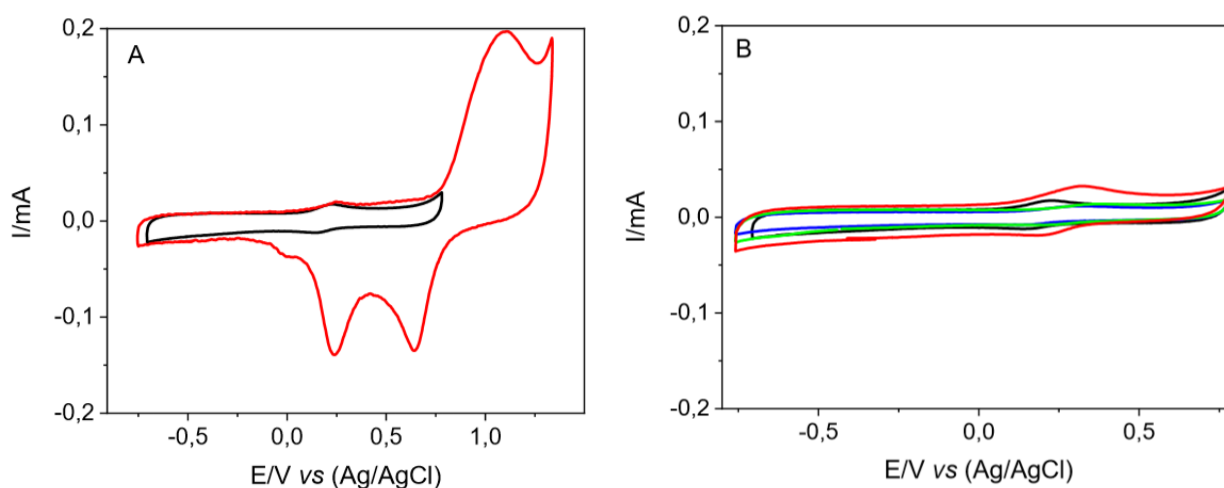


Figura 11: Voltamogramas obtidos para eletrodos baseados em vidro-ITO cobertos com filme nanoporoso de ouro. Em A) são mostrados voltamogramas obtidos para amostra nanoporosa de ouro na faixa de potencial de -1,0 e +1,5 V (linha vermelha) e na janela segura de potenciais, de -0,8 à 0,8 V (linha preta). Em B) são mostrados voltamogramas para quatro amostras nanoporosas de ouro na janela de trabalho segura. O eletrólito de suporte foi solução de K_2SO_4 0,1 mol/L e a velocidade de varredura foi de 50 mV/s.

Nota-se então que a janela segura de potencial para o eletrodo de trabalho ocorre até o limite de 0,8 V. Como mostrado no voltamograma da Figura 11A (linha preta), na faixa entre -0,8 e 0,8V apenas picos muito pequenos de corrente anódico e catódico são observados em 0,25 e 0,15 V, respectivamente. Possivelmente esses sinais estejam relacionados com o par SO_4^{2-}/SO_3^{2-} referente ao eletrólito de suporte (MORENO et al., 2006). A aplicação de potenciais acima de 0,8 V pode ocasionar a formação de óxido do ouro e isso faz com que a morfologia das amostras seja alterada. Por isso a varredura foi fixada até esse limite.

Após a definição da janela de trabalho segura de potenciais, voltamogramas também foram obtidos para as amostras nanoporosas de ouro, as quais estão mostrados na Figura 11B. Os voltamogramas exibiram comportamento semelhante e isso mostra que o método de preparação das superfícies nanoporosas por NSL foi reproduzível. Apesar disso, foi verificado que as amostras apresentaram densidade de corrente diferentes para o par redox $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$. Isso deve ter ocorrido pois, durante a produção das amostras, a espessura do filme e a regularidade do espalhamento de ouro possivelmente tenha variado entre as amostras e isso deve alterar ligeiramente a eletroatividade dos eletrodos.

Voltamogramas para as amostras também foram obtidos em meio de ferricianeto de potássio que apresenta uma reação redox conhecida ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} + e^- \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) e reversível, Figura 12. Sendo assim, os eletrodos nanoporosos foram empregados para monitorar o comportamento redox da espécie eletroativa em teste de VC sob diferentes velocidades de varredura.

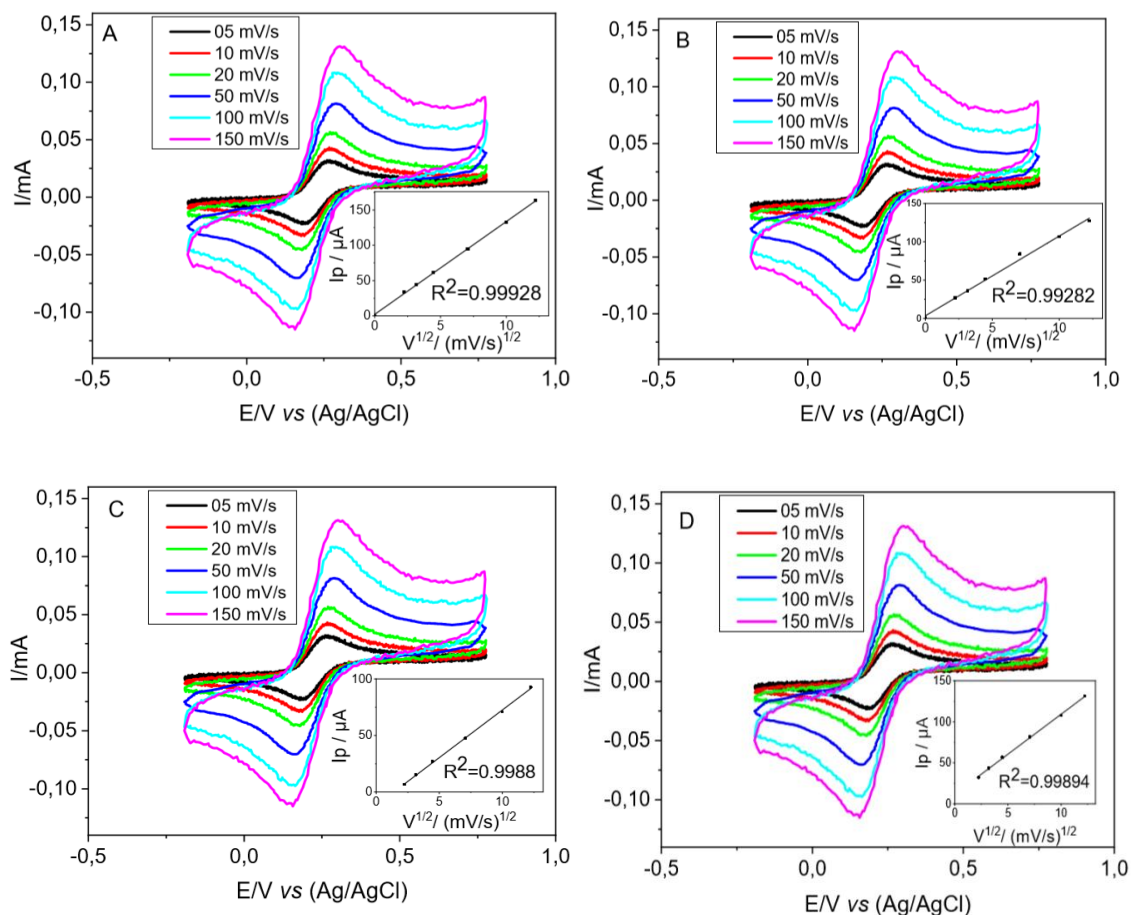


Figura 12: Voltamogramas obtidos para eletrodos de trabalho baseados em vidro-ITO cobertos com filme nanoporoso de ouro em solução de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 0,1 mmol/L e K_2SO_4 0,1 mol/L, como eletrólito de suporte. Diferentes velocidades de varredura (5, 10, 20, 50, 100 e 150 mV/s) foram empregadas. Inserções: plots das correntes de pico anódica versus raiz quadrada das velocidades de varredura.

Constatou-se que, em velocidades maiores de varredura, obtêm-se correntes anódicas e catódicas de maior intensidade, uma vez que, corrente de pico cresce linearmente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura conforme a equação de Randles-Sevick. Um outro detalhe é que, para qualquer velocidade de varredura, os picos anódicos e catódicos estão distantes por aproximadamente 0,06 V. Isso quer dizer que os eletrodos apresentam uma cinética de reação muito rápida frente a esse analito, sendo então um sistema reversível nernstiano (BARD e FAULKNER, 2001). A partir da corrente de pico (i_p , em amperes), velocidade de varredura (v , em V/s), o número de elétrons envolvidos na reação redox (n), coeficiente de difusão (D , em cm^2/s) e a concentração da espécie eletroativa na solução (C_0 , em mol/ cm^3), pode ser

determinada a área eletroativa (A , em cm^2) do eletrodo por meio da Equação 1 de Randles-Sevick (BARD e FAULKNER, 2001).

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (\text{Eq. 1})$$

A corrente de pico anódico para cada amostra foi determinada nas diferentes velocidades de varredura e plotadas como função da raiz quadra das velocidades de varreduras empregadas. As curvas estão mostradas nas inserções dos voltamogramas (Figura 12) para cada amostra e se ajustaram muito bem a um comportamento linear. A partir da inclinação dessas curvas, do valor do coeficiente de difusão para o $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($0,66 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) (KONOPKA S. J., 1970), concentração da solução de ferrocianeto de potássio ($5 \times 10^{-7} \text{ mol}/\text{cm}^3$) e do número de elétrons envolvidos na reação redox (1 elétron) obteve-se o valor da área eletroativa para cada amostra da Figura 12 (A,B,C e D) e os valores estão mostrados na Tabela 1. A área eletroativa média foi de $0,92 \text{ cm}^2$. Essas mesmas amostras apresentam uma área geométrica de aproximadamente $1,1 \text{ cm}^2$ (área demarcada).

Tabela 1: Valores da área eletroativa para cada amostra nanoporosa.

Amostras	Área eletroativa (cm^2)
A	1,13
B	0,90
C	0,76
D	0,90

A reação redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ é reversível, apresenta uma transferência muito rápida de elétrons e os íons tem tempo de residência bastante pequeno nas proximidades do eletrodo. Com isso, o efeito esperado de aumento da área eletroativa causado pela porosidade do filme de ouro não pôde ser evidenciado. Em processos de transferência de carga muito rápido (reversível), o mesmo é controlado exclusivamente por difusão e, portanto, a corrente é proporcional à área geométrica do eletrodo (área de contorno que faz interface com da solução).

Dessa forma, a corrente não é influenciada pela rugosidade da superfície do eletrodo, sendo então a área eletroativa calculada pela equação de Randles-Sevick muito próxima da área geométrica.

A área eletroativa total, considerando o fator de rugosidade devido à porosidade da superfície, pode ser ainda obtida através da técnica UPD. Antes de realizar essa técnica e estimar a área eletroativa real, foi necessário estudar uma melhor maneira para fazer a limpeza para retirada de materiais orgânicos e inorgânicos que possam exibir interferências mais sensíveis nesse teste.

5.1.3 Teste de limpeza dos Eletrodos Nanoporosos

Para prosseguir com as modificações do eletrodo é necessária uma boa limpeza da superfície do ET nanoporoso a fim de remover eventuais impurezas orgânicas residuais que dificultam ou que possam interferir nos sinais eletroquímicos. Três amostras foram submetidas a vários testes de limpeza para encontrar a mais apropriada. A primeira amostra foi limpa em solução “piranha” ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1 (v/v)) por 10 min, depois imersa em H_2SO_4 concentrado (95%) por 10 min e finalmente enxaguada com água mili-Q. Notou-se que a amostra sofreu decação com a remoção completa do filme de ouro e a mesma foi descartada. Já a segunda amostra foi colocada apenas na solução “piranha” e mesmo assim, percebeu-se que o filme metálico foi danificado. A terceira amostra foi submetida a uma limpeza durante 10 min em solução de H_2SO_4 concentrado (95%) e depois por 10 min em meio de HNO_3 (65%). Visualmente a amostra pareceu manter o filme de ouro intacto. O monitoramento da manutenção física do eletrodo durante as etapas de limpeza foi realizado utilizando VC em K_2SO_4 0,1 mol/L. Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 13.

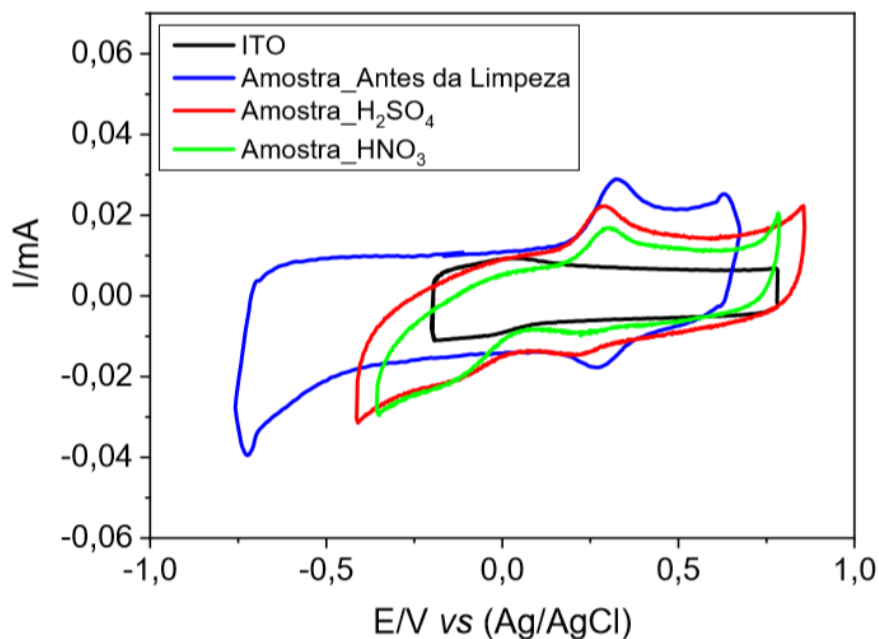


Figura 13: Voltamogramas do ITO e da amostra nanoporosa antes e depois da limpeza com H₂SO₄ e depois HNO₃ concentrados por 10 min cada, em solução de K₂SO₄ 0,1 mol/L e velocidade de varredura 50 mV/s.

Conforme os voltamogramas da Figura 13, nota-se que amostra foi danificada à cada tratamento de limpeza pois observa-se a corrente diminuindo significativamente conforme as etapas de limpeza na superfície do eletrodo.

A partir dos resultados anteriores não satisfatórios de limpeza das amostras e das buscas na literatura sobre a limpeza para eletrodos semelhantes com os que foram utilizados neste projeto, foi encontrado o trabalho de USP; CANCINO; BARBOSA (2015) que foi usado como base para as próximas limpezas. Desta maneira, realizou-se a limpeza para uma outra amostra nanoporosa apenas com solução diluída de HNO₃ à 10% (v/v) e a limpeza foi inicialmente avaliada através do teste de ângulo contato por diferentes tempos de imersão do substrato na solução ácida, sendo eles 0, 20, 30, 50 e 60 min. A molhabilidade é uma interessante propriedade de superfícies sólidas e pode ser investigada por diferentes técnicas dentre elas a gota sésil. A técnica da gota sésil é a mais utilizada para fazer a medida do ângulo de contato formado entre um líquido e uma superfície sólida. Esta técnica baseia-se na deposição de uma gota de um líquido, geralmente a água, em uma superfície a ser avaliada (YUAN; LEE, 2013).

A Figura 14 mostra imagens fotográficas da gota sobre a superfície da amostra nanoporosa após ser imersa em diferentes tempos em solução de HNO_3 10% (v/v). Dependendo da configuração da gota na superfície, ela pode ser definida como: hidrofóbica, quando a superfície apresenta ângulo de contato maior que 90° ; hidrofílicas, quando superfície exibe ângulo de contato menor que 90° ; e superhidrofóbica, quando a superfície apresenta ângulo de contato maior que 150° (Yuan Y., Lee T.R.,2013).

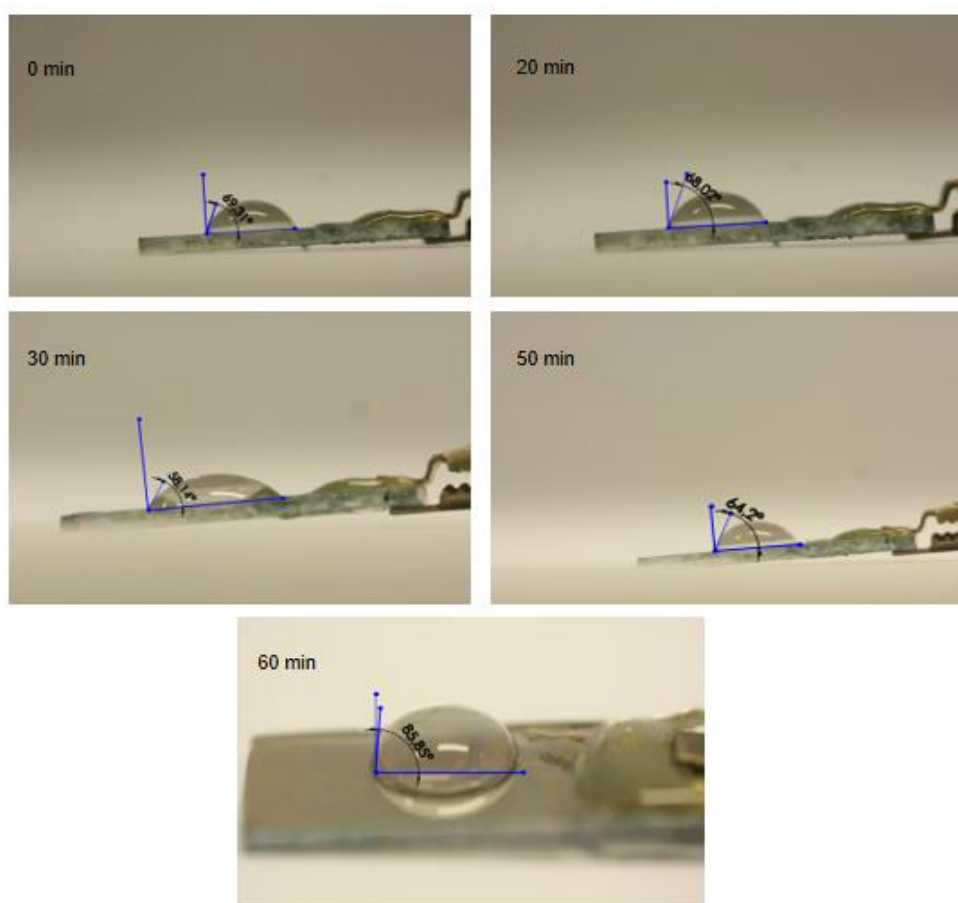


Figura 14: Imagens fotográficas dos ângulos de contato gerados para a amostra nanoporosa nos diferentes tempos de limpeza em solução de HNO_3 10% (v/v).

Analisando a Figura 14, pode ser notado que até os primeiros 30 min de limpeza na solução de ácido nítrico diluído, o ângulo de contato diminui de $69,3^\circ$ para $58,14^\circ$. Isso mostra que a superfície está com maior caráter hidrofílico possivelmente devido a remoção de substâncias orgânicas. Contudo, a partir do tempo de 30 min o ângulo de contato aumentou para $64,2^\circ$ e, depois, em 60 min de tratamento ácido, para $85,86^\circ$. Isso deve ter acontecido possivelmente devido

alterações morfológicas na superfície do eletrodo por conta da remoção de parte do filme de ouro e exposição da superfície mais hidrofóbica do vidro-ITO.

As mudanças morfológicas com o tempo de limpeza em HNO_3 ainda foram acompanhadas por VC. A Figura 15 exibe os voltamogramas antes e após a limpeza da amostra em 60 min. Depois da imersão do eletrodo na solução de HNO_3 , deve ter havido uma perda significativa de material metálico da superfície pois os voltamogramas estão com características distintas antes e após o tratamento ácido.

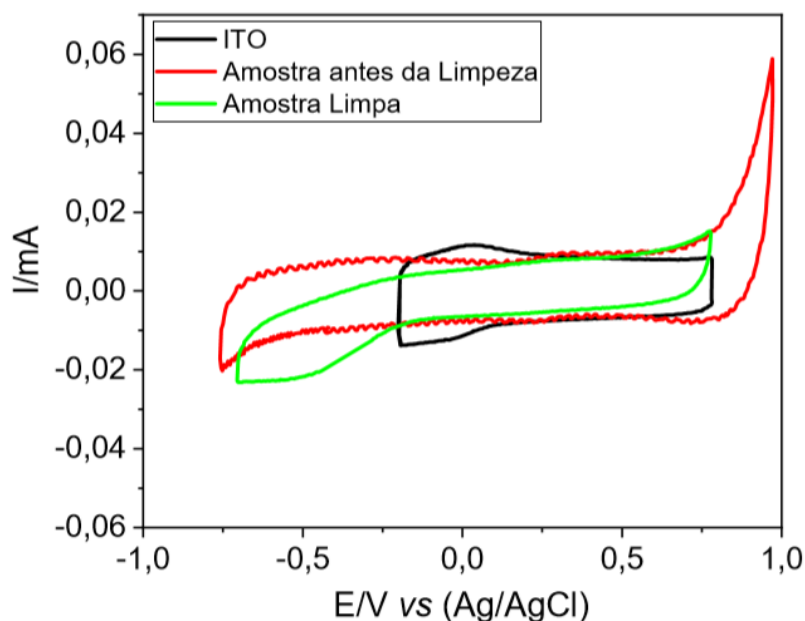


Figura 15: Voltamogramas para o ITO e para a amostra nanoporosa antes e após a limpeza de HNO_3 10% (v/v) por 60 min. A VC foi realizada em solução de K_2SO_4 e velocidade de varredura 50 mV/s.

Em vista disso, optou por escolher o tempo de limpeza em HNO_3 10% como sendo de 25 min, o qual é próximo ao tempo onde o menor ângulo de contato foi observado. Para confirmar se esse tempo é o melhor para a limpeza, uma quinta amostra passou por limpeza sob tratamento ácido por 25 min. Realizou-se uma VC antes e depois da limpeza e os voltamogramas estão apresentados na Figura 16.

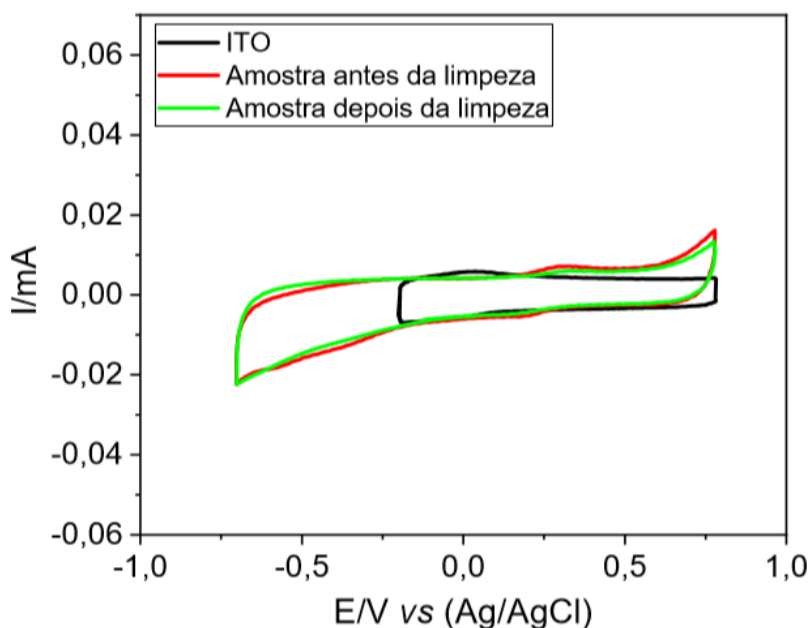


Figura 16: Voltamogramas cíclicos para o ITO e para a amostra nanoporosa de ouro antes e depois da limpeza em HNO_3 10% (v/v) por 25 min realizados em solução de K_2SO_4 0,1 mol/L e velocidade de varredura 50 mV/s.

Verifica-se que não houve variações significativas dos picos de oxirredução característicos após a limpeza para amostra nanoporosa. Tanto o perfil quanto a intensidade dos picos se mantiveram semelhantes antes e após a limpeza. Por isso, o método de limpeza padronizado foi: tratamento em solução de ácido nítrico 10% (v/v) por 25 min. Essa limpeza é muito importante para a deposição do compósito e foi aplicada para todas as amostras usadas nas próximas etapas.

5.1.4 Deposição em regime de subtensão

Para a determinação da área eletroativa do eletrodo nanoporoso usou-se também a técnica de UPD. Esse fenômeno é caracterizado eletroquimicamente pela deposição de uma fase metálica (M) sobre um substrato de outro metal (S) em um potencial mais positivo do que o potencial reversível termodinâmico (Nernst) de redução de metal sobre essa superfície. Isso normalmente acontece quando o cátion metálico a ser depositado encontra uma superfície química que ele tenha mais afinidade (M-S) do que ele tem se depositando sobre ele mesmo (M-M). Isso permite a formação de apenas uma monocamada. Isso ocorre na deposição de Cu sobre Au. A existência da UPD no sistema Cu-Au possibilita mensurar a carga correspondente à oxidação

completa da monocamada e, assim, permitir que seja possível obter a área real dos substratos (SZABO, 1991). Ao atingir o potencial de ca. 0,1 V na varredura catódica da amostra contendo filme ouro, se encontrará formada apenas uma monocamada completa de Cu depositado em regime UPD. A monocamada de Cu é então oxidada na varredura anódica, com a qual é calculada a carga por integração da curva de corrente *versus* tempo (inserção na Figura 17). A Figura 17 mostra os voltamogramas cíclicos para o processo de UPD de Cu para uma amostra nanoporosa limpa conforme metodologia padronizada com tratamento ácido. O segundo ciclo foi usado para determinação da carga.

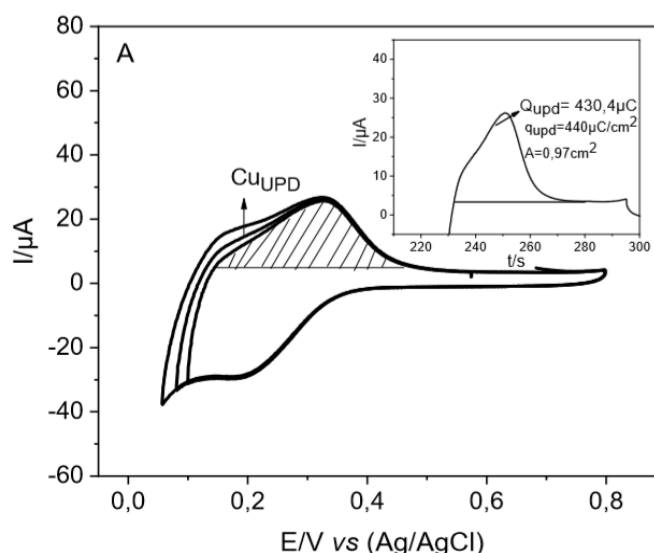


Figura 17: Voltamogramas cíclicos para eletrodo de vidro-ITO nanoporoso em meio de CuSO_4 20,0 mmol/L e H_2SO_4 0,5 mol/L para determinação das áreas eletroativas de uma amostra nanoporosa limpas com tratamento ácido. A inserção nessa figura mostra um gráfico de corrente versus o tempo durante a varredura anódica (oxidação da monocamada de Cu).

A densidade de carga para formação de uma monocamada completa de Cu sobre ouro policristalino liso é estimada em 440 C.cm^{-2} (ZHAO J., NIU L., DONG S., 1999). Através da razão entre carga integrada da amostra pela a carga de uma monocamada de Cu em ouro policristalino liso, tem-se a área eletroativa da amostra nanoporosa. Com base nisso, os valores de área eletroativa calculadas para os dois substratos estudados foram os seguintes: $0,97 \text{ cm}^2$ e $1,59 \text{ cm}^2$, respectivamente. A área geométrica, obtida com um paquímetro, foi de $1,1 \text{ cm}^2$ para ambas amostras. Com isso, observou-se que a área eletroativa da primeira amostra testada foi menor que área geométrica. Isso não era esperado, visto que a nanoporosidade da superfície do eletrodo deveria atuar

incrementando a área eletroativa. Contudo, a amostra do primeiro teste de UPD foi submetida várias vezes a ciclos de limpeza durante os testes preliminares e isso deve ter danificado o filme de ouro nanoporoso. Isso pode ser também comprovado pois a segunda amostra testada, a qual passou por um único ciclo de limpeza padronizada ácida, exibiu área eletroativa maior do que a área geométrica. Isso indica dois aspectos: 1) a limpeza padronizada com tratamento ácido deve ser utilizada com moderação e 2) a presença de um filme nanoporoso atua aumentando cerca de 44% da área eletroativa se comparada com uma superfície de ouro lisa. O aumento da área eletroativa indica que podem ocorrer melhores respostas eletroquímicas, se um eletrodo nanoporoso for utilizado.

5.1.5 Caracterizações por EIS

A EIS foi usada para avaliar a capacidade de transferência de elétrons na superfície de quatro eletrodos de vidro-ITO recoberto com filme nanoporoso e para confirmar modificações do eletrodo. Inicialmente as medidas EIS foram realizadas em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ a 0,5 mmol/L com K_2SO_4 0,1 mol/L, como eletrólito de suporte. A espécie eletroativa $K_3[Fe(CN)_6]$ foi escolhida como sonda para indicar as variações na capacidade de transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie eletroativa. Inicialmente a medida de EIS foi realizada usando o potencial obtido pelo pico anódico da reação redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, a qual foi estimada por VC anteriormente (Figura 12). Além disso, foram usados potenciais imediatamente anteriores e posteriores a posição do pico anódico, as quais representam os potenciais do início e do fim do processo de oxidação, respectivamente. A frequência utilizada foi de 10 kHz a 10 mHz com amplitude de 10 mV e a solução teve oxigênio removido antes dos testes. Os resultados estão apresentados em forma de Diagramas de Nyquists como mostrado na Figura 18.

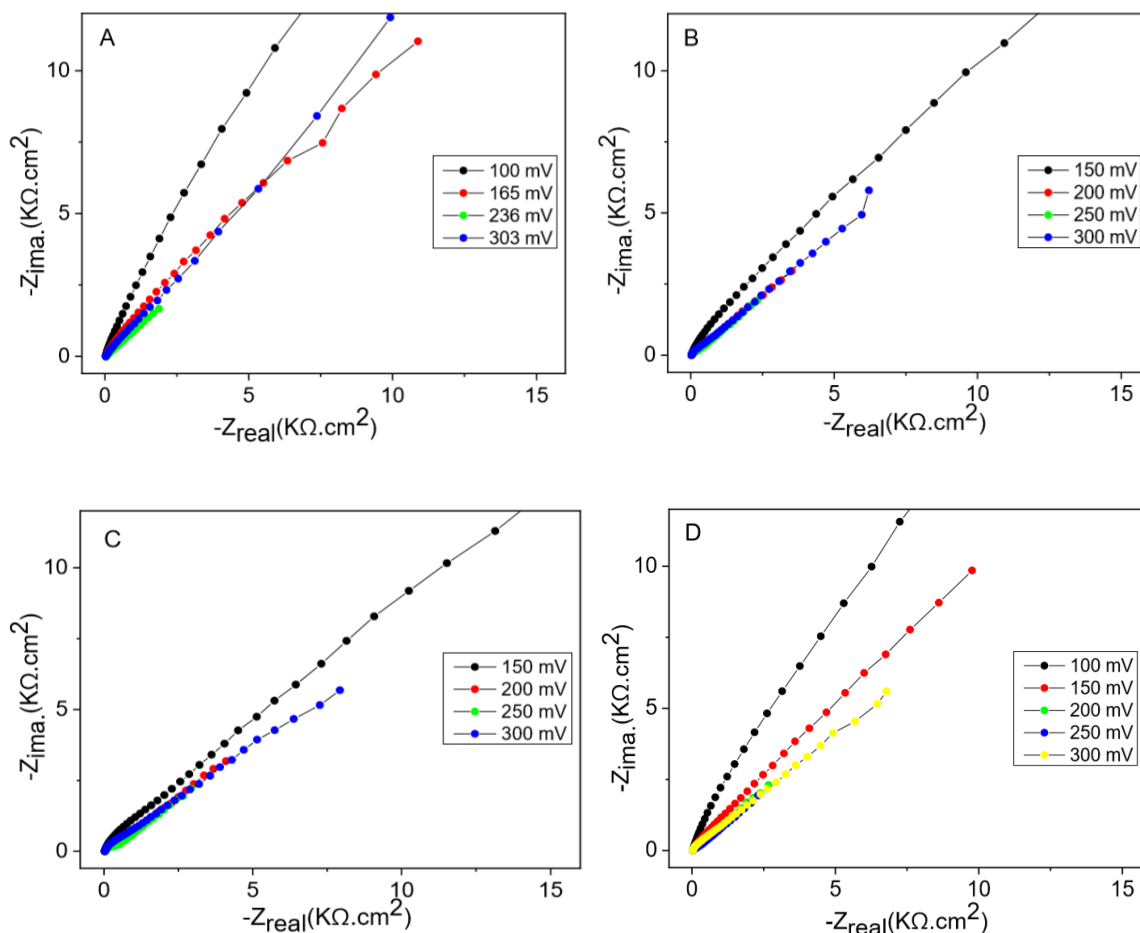


Figura 18: Diagramas de Nyquist para diferentes potenciais, para quatro amostras nanoporosas de ouro limpas, usando como espécie eletroativa $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 0,5 mmol/L e eletrólito de suporte K_2SO_4 0,1 mol/L em solução desaerada com N_2 por 15 min. A frequência foi de 10 kHz a 10 mHz com amplitude de 10 mV.

De modo a investigar a resistência transferência de carga, para os eletrodos nanoporosos, observa-se que os diagramas para todas amostras testadas são semelhantes e mostraram basicamente uma reta com ângulo de 45° . Um ligeiro arco capacitivo pode ser visualizado na região de altas frequências, mas é tão acoplado com o difusional que não dá para determinar a R_{ct} de modo direto, sem um modelo. Isso é típico de processos de oxirredução que ocorre tão rápido que nenhuma resistência à transferência de elétrons acontece (BARD e FAULKNER, 2001). Portanto, o que predomina nesse sistema é o processo difusional, isto é, basta a espécie eletroativa chegar ao eletrodo para que a reação redox ocorra instantaneamente. Isso confirma que nesses sistemas eletroquímicos há uma cinética muito rápida de transferência de elétrons considerando o eletrodo coberto com filme nanoporoso para essa espécie eletroativa (sistema nernstianos, reversível). Isso também confirma o

comportamento já observado nos testes de VC cíclica com essa mesma sonda eletroquímica sob o emprego do mesmo eletrodo (seção 5.1.2).

Como o diagrama de Nyquist só mostra o arco capacitivo para sistemas onde há controle cinético na transferência de elétrons (BARD e FAULKNER, 2001), ele não foi observado neste teste (apenas a parte difusiva é evidente). Um sistema com uma cinética muito rápida de transferência de carga não é adequado para monitorar variações de condutividade da superfície, pois seria necessária uma mudança física muito grande na superfície do eletrodo para que alguma mudança fosse observada com medidas por EIS.

Tendo isso em vista a cinética de transferência muito rápida e a ausência de arco capacitivo para os eletrodos nanoporosos na presença de $K_3[Fe(CN)_6]$, optou-se por escolher um sistema mais capacitivo e mais sensível a mudanças físico-químicas da superfície do eletrodo para ser utilizado como sonda. Desta maneira, utilizou-se um ambiente controlado, com a inserção de O_2 . O O_2 , sob potenciais adequados, sofre redução ($O_{2(g)} + 4 H_{(aq)}^+ + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$) e mostra uma cinética de transferência de elétrons mais lenta do que ocorre com $K_3[Fe(CN)_6]$.

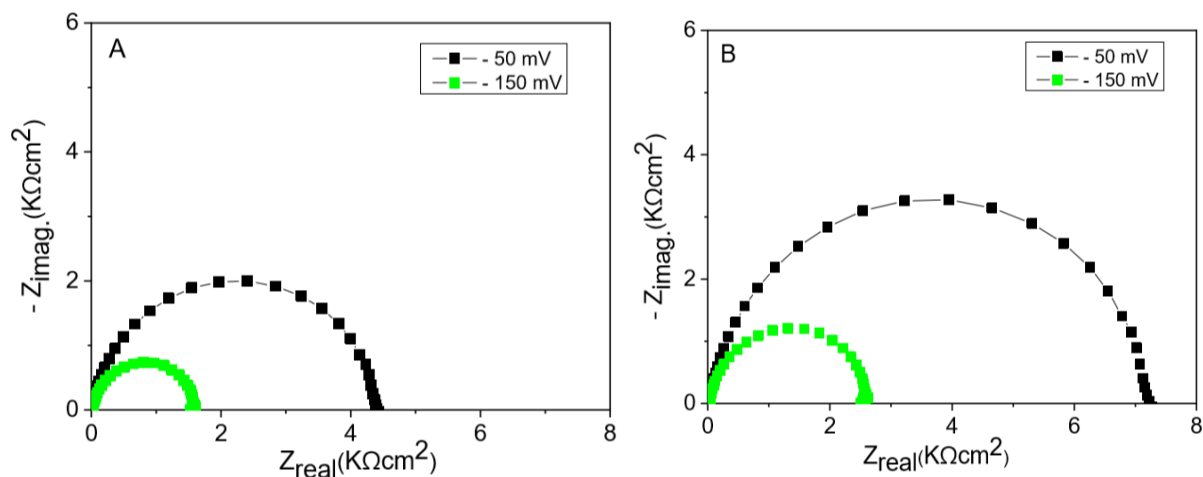


Figura 19: Diagrama de Nyquist para duas amostras após a limpeza sob valores de potenciais de -50 e -100 mV em uma solução de PBS 20,0 mM e K_2SO_4 0,1 mol/L, amplitude 10 mV e em sistema com O_2 1 atm.

A Figura 19 apresenta Diagramas de Nyquist para as medidas de EIS em potenciais de -50 e -150 mV, sob ambiente controlado de O_2 para duas amostras após a limpeza. O eletrólito de suporte utilizado foi PBS 20,0 mM e K_2SO_4 0,1 mol/L. Ficou evidente, para esse sistema, que os diagramas apresentaram o arco

capacitivo em altas frequências que não foram observados anteriormente. A redução de O_2 gasoso é um processo mais lento comparativamente aos processos redox $[Fe(CN)_6]^{-3}/[Fe(CN)_6]^{-4}$. Isso ocorre pois o mecanismo de transferência de elétrons depende da existência de processos adsorptivos sobre o eletrodo (GUO et al., 2019),(DAUM; ENKE, 1969). Assim, esse processo pode ser investigado por EIS em região de controle cinético em ampla faixa de potencial, onde a R_{ct} é elevada o suficiente para ser a principal característica no perfil dos diagramas de Nyquist. Perturbações na condutividade do eletrodo poderão ser monitoradas a partir de obtenção de R_{ct} sob ambiente de O_2 dissolvido. Foi perceptível ainda, para ambas amostras testadas, que ocorre uma diminuição da R_{ct} a medida que o potencial fica mais catódico (passou de -50 mV para -150 mV).

O potencial de -150 mV deve ser mais apropriado em testes para EIS. Mudanças na velocidade da reação de redução de O_2 , devido à modificação físico-química dos eletrodos, deverão ficar mais evidentes sob esta condição de potencial que mostra um arco capacitivo mais fechado (menor R_{ct}) e melhor condutividade.

Considerando que a redução de O_2 sobre os eletrodos nanoporosos resulta em um arco capacitivo característico no diagrama de Nyquist, é possível utilizá-lo como sonda para monitorar adsorções de moléculas na superfície do eletrodo através de medidas de R_{ct} . Em teoria, a adsorção de moléculas orgânicas sobre o eletrodo provocará uma barreira à adsorção de O_2 que, por sua vez, resultará em um aumento na R_{ct} para a redução de O_2 sobre ele.

5.1.6 Imobilização de AUNPS sobre Eletrodos Nanoporosos

É conhecido que a presença de nanomateriais, tais como AUNPS, atuam implementando a resposta analítica do eletrodo pela incorporação de condutividade e pode atuar no aumento da área eletroativa (ARAGAY; MERKOÇI, 2012). Com intuito então de implementar ainda mais as respostas eletroquímicas dos eletrodos, vislumbrou-se primeiramente a imobilização de AuNPs sobre os eletrodos de vidro-ITO cobertos com filme nanoporoso de ouro.

As AuNPs foram produzidas na presença de $NaBH_4$ (agente redutor forte) para provocar a redução dos íons Au^{3+} (do $HAuCl_4$) para Au^0 . CTAB esteve

presente no meio para atuar como agente estabilizante de superfície para manter as partículas produzidas com dimensões nanométricas. Durante a síntese, a solução passou de incolor para uma coloração avermelhada, a qual indica a produção de uma suspensão coloidal de AuNPs (DREADEN et al., 2012). Volumes diferentes de solução CTAB $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L (75, 80, 85, e 90 μ L) foram empregados na síntese. A presença de maiores quantidades de agente estabilizante pode atuar no sentido de produzir partículas menores e com maior relação área de superfície/volume. Foi observado que, independente do volume de solução de CTAB aplicado na síntese, a solução passou de incolor para uma coloração avermelhada, a qual indica a produção de suspensões coloidais de AuNPs em todos os casos (DREADEN et al., 2012). Suspensões com tonalidades de vermelho ligeiramente diferentes foram obtidas, conforme mostrado na Figura 20.

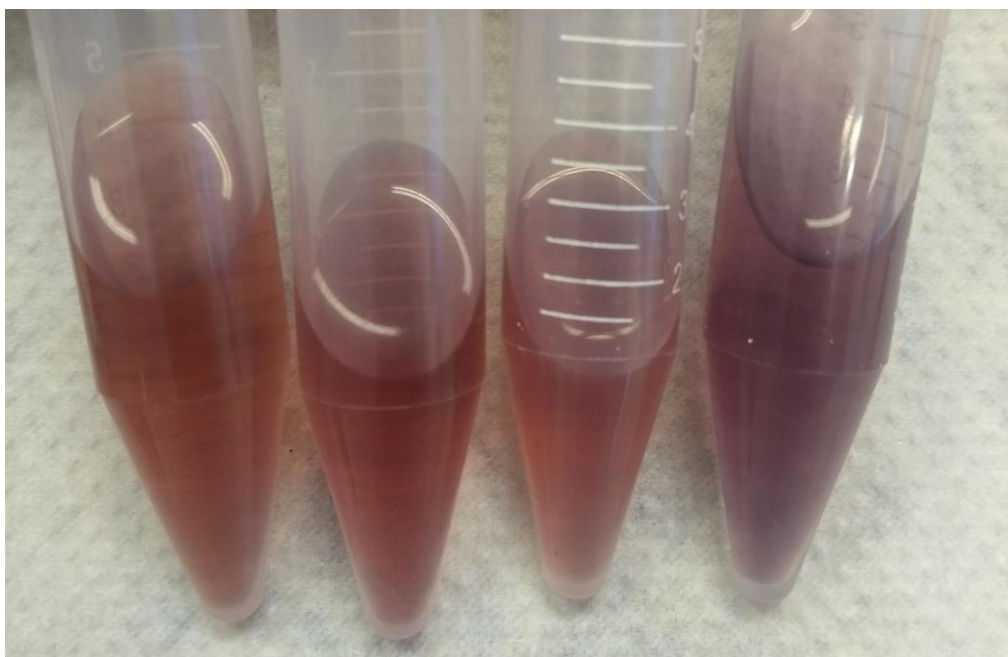


Figura 20: Imagem das soluções com uma quantidade de cloreto de ouro, citrato de sódio e borohidreto de sódio constante e variando o volume da solução de CTAB com uma concentração de $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L. A imagem das amostras representando as soluções cujos valores de volumes da esquerda para direita são: 75, 80, 85, e 90 μ L, respectivamente.

Para as diferentes condições de síntese foram obtidos espectros UV-Vis de cada suspensão, os quais podem ser observados na Figura 21.

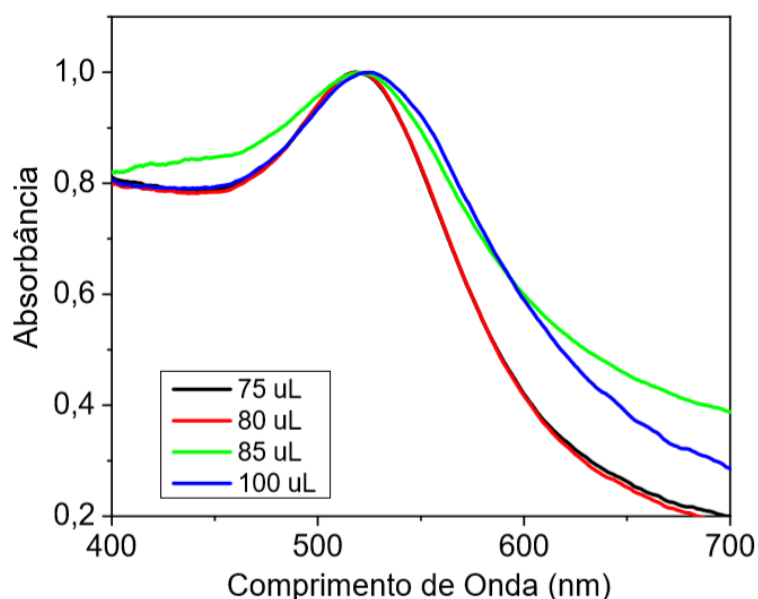


Figura 21: Espectros de absorção de suspensões coloidais de AuNPs sintetizadas em 4 diferentes condições, sendo empregado o mesmo volume de solução do cloreto de ouro, citrato de sódio, borohidreto de sódio e diferentes volumes de solução de CTAB $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L.

A presença de uma banda única de absorção na região de aproximadamente 530 nm indica a formação de nanopartículas de ouro esféricas para todas as condições (DREADEN et al., 2012)(SONAVANE et al., 2008). A presença de bandas de absorção na região do visível estão associadas a excitação de um fenômeno denominado de ressonância de plasmon de superfície localizado e é característica para nanopartículas de metais nobres (LI et al., 2014). Percebe-se ainda que a medida que a quantidade de CTAB no meio aumentou, não houveram mudanças significativas dos comprimentos de onda nos máximos de absorção ou no perfil da banda. Isso indica que nanopartículas com características morfológicas muito semelhantes foram obtidas em todas as condições testadas. O uso de um agente redutor muito forte (NaBH_4) deve impedir que ocorra um crescimento cineticamente mais lento e que possa ser controlado pela ação do agente estabilizante. Sendo assim, foi escolhida a condição de síntese que empregou volume 75 μL de solução de CTAB para testes futuros.

Para que possa ser usada na construção de um sensor, é interessante que AuNPs sejam suficientemente estáveis. Por isso foi realizado uma análise temporal para avaliar as mudanças físico-químicas das AuNPs. A estabilidade

foi acompanhada por meio da aquisição de espectros de absorção por dois dias para a suspensão de AuNPs obtida na condição de síntese selecionada. Os espectros estão apresentados na Figura 22. Nota-se que a banda continua apresentando o mesmo perfil, após 24 h de síntese. Dentro desse período é seguro que as AuNPs sintetizadas mantêm morfologia intacta.

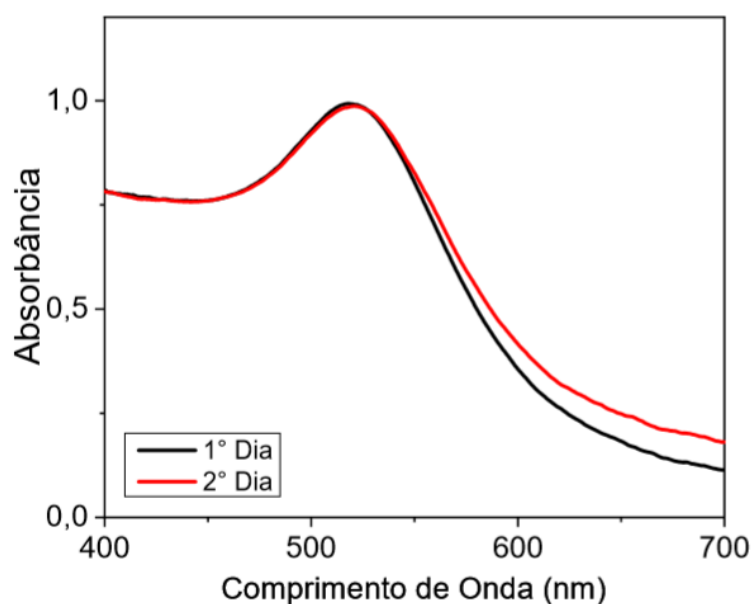


Figura 22: Espectros de absorção de suspensões coloidais de AuNPs sintetizadas na condição de 75 μ L da solução de CTAB $3,65 \times 10^{-3}$ mol/L, sendo empregado o mesmo volume de solução do cloreto de ouro, citrato de sódio e borohidreto de sódio. Os espectros foram obtidos dentro de dois dias contados a partir da síntese.

Para imobilização/fixação das AuNPs na superfície do eletrodo de vidro-ITO coberto com filme de ouro nanoporoso, optou-se por obter inicialmente um compósito de AuNPs e Nafion. A mistura aquosa desses compostos foi gotejada sobre a superfície do eletrodo limpo e o solvente evaporado por 24 hrs. Na sequência foi gotejada uma mistura de AuNPs/Nafion/ α -CD. Da mesma forma, o solvente foi removido por 24 hrs de secagem.

O eletrodo recoberto com náfon, com o compósito AuNPs/nafion e com AuNPs/nafion/ α -CD foi avaliado por EIS com o intuito de investigar a influência das coberturas químicas sobre a superfície do eletrodo. Essa análise eletroquímica foi realizada utilizando solução PBS 20,0 mmol/L com eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L sob os potenciais de -150 e -50 mV. A célula eletroquímica foi preenchida com 1 atm de O_2 . Na Figura 23 são apresentados os Diagramas de

Nyquist obtidos para amostra nanoporosa após cada etapa do recobrimento nos dois diferentes potenciais.

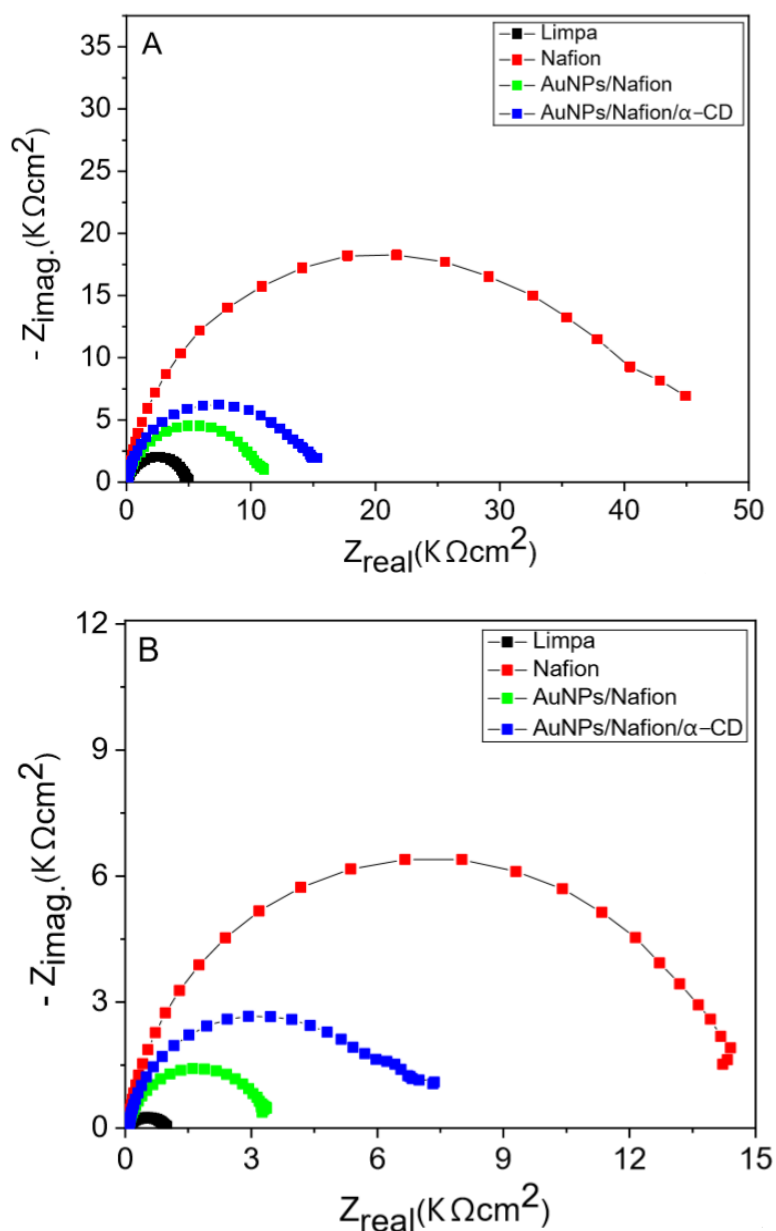


Figura 23: Diagramas de Nyquist da amostra nanoporosa limpa com a deposição de camadas de Nafion, AuNPs/Nafion e AuNPs/Nafion/ α -CD e para valores de potenciais de A) -50 mV e B) -150 mV em uma solução de PBS 20,0 mmol/L e K_2SO_4 0,1 mol/L e em sistema com gás oxigênio à 1 atm.

A partir da Figura 23, inicialmente fica perceptível, para os dois potenciais testados, que ocorre um aumento na R_{ct} quando o nafion é imobilizado sobre o eletrodo se comparado com a amostra limpa contendo apenas o filme de ouro nanoporoso (comparar linhas preta e vermelha). O Náfion é um polímero

condutor, mas está mais relacionado com condutividade baseada em transporte iônico. Sendo assim, a sua matriz orgânica impõe uma resistência grande e uma barreira física para adsorção e redução do O_2 sobre o eletrodo. A R_{ct} é fortemente reduzida quando nesse polímero é incorporado AuNPs. Possivelmente a presença de AuNPs deva melhorar a condutividade eletrônica, indicando que algumas AuNPs entram em contato direto com a superfície nanoporosa de ouro, aumentando a condutividade do eletrodo e diminuindo a R_{ct} (STOZHKO et al., 2018). Contudo, a R_{ct} (linha verde) continua sendo maior que aquela observada para o eletrodo não modificado (linha preta). A inserção de α -CD (mesmo em baixíssima concentração), a qual é uma substância orgânica (oligossacarídeo) não condutora, novamente fez com que houvesse um substancial aumento na R_{ct} .

O Náfion foi empregado na construção do eletrodo nesse trabalho principalmente para servir como um suporte físico do agente de reconhecimento, a α -CD, e das AuNPs sobre o eletrodo. O emprego do eletrodo nanoporoso não modificado seria um desafio pois a imobilização da α -CD deveria ser química sobre Au. O uso de Nafion simplifica muito o método de incorporação da α -CD no eletrodo, a qual foi realizado de maneira simples por gotejamento. Além disso, ficou perceptível ainda que a presença de AuNPs deve contribuir para potencializar a resposta, já que a presença delas propiciou a melhora da condutividade do suporte (nafion). Finalmente fica claro que a EIS, baseando em medidas de R_{ct} da redução de O_2 sobre o eletrodo é útil para monitorar mudanças físico-químicas na superfície do eletrodo. Assim sendo, ele estaria apto a ser utilizado na determinação de T-RESV.

5.1.7 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier no modo de Reflexão Total Atenuada (FTIR – ATR)

Os experimentos de FTIR-ATR foram realizados principalmente para confirmar a incorporação da α -CD no compósito (CTAB-AuNPs/Nafion/ α -CD) sobre o eletrodo. Os testes foram realizados com o eletrodo recoberto com o compósito antes e após a sua imersão na água por 2 horas. A α -CD, receptor importante na construção do sensor vislumbrado aqui, mostra alta solubilidade

em água. Sua estrutura química é do tipo “gaiola”, isto é, sua parte interna é hidrofóbica (teoricamente se ligará com o T-RESV) e parte externa é hidrofílica que a leva ter uma alta solubilidade em água.

Os futuros testes de detecção de T-RESV serão realizados em meio aquoso, a qual poderá então lixiviar α -CD do compósito. Assim sendo é importante avaliar o grau em que isso ocorre. Assim, foram obtidos espectros para Nafion e α -CD puros, sobre um slide de vidro, assim como para os compósitos secos AuNPs/Náfion, AuNPs/Náfion/ α -CD e AuNPs/Náfion/ α -CD (após imersão do eletrodo por 2 h em água), sobre os eletrodos cobertos com filme de ouro nanoporoso.

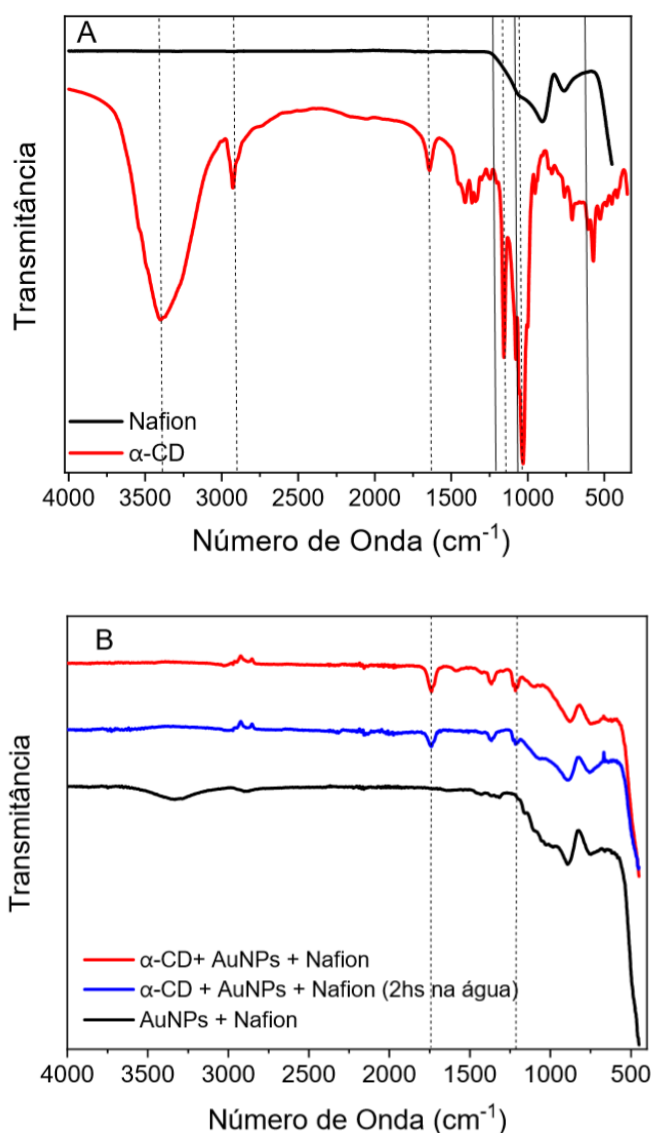


Figura 24: Espectros de FTIR-ATR para A) nafion e α -CD puros, sobre vidro e B) dos compósitos AuNPs/nafion, AuNPs/nafion/ α -CD e AuNPs/Nafion/ α -CD (amostra emergida por 2hs em água e depois seca), sobre eletrodo contendo filme nanoporoso.

Ao avaliar o espectro da α -CD pura (Figura 24A, linha vermelha) constata-se uma banda larga e intensa em 3380 cm^{-1} a qual é característica de estiramento de grupos hidroxilas ($-\text{OH}$) contidas na sua estrutura sacarídica, uma banda próxima de 2920 cm^{-1} que é referente ao estiramento do grupo C–H da estrutura carbônica e uma banda em 1652 cm^{-1} relativo ao dobramento das do grupo H–O–H referente as ligações de hidrogênio na estrutura cônica. Além disso, é possível identificar sinais característicos de sinais de estiramento assimétrico C–O e de C–O–C em 1154 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} , respectivamente. Esses últimos são referentes aos agrupamentos éteres presentes nas ligações

glicosídicas e na cadeia cíclica de cada unidade repetitiva (TEIXEIRA; PEREIRA, 2014).

Com respeito ao espectro relativo ao nafion puro (Figura 24A, linha preta), foram observadas bandas na região entre 620 e 1200 cm^{-1} as quais são referentes ao estiramento $\text{CF}_2\text{-CF}_2$. Especificamente o sinal em 1066 cm^{-1} se referente ao estiramento do grupo sulfônico -SO_3^- (CELE; SINHA RAY; SIKHWIVHILU, 2012).

Foi possível notar que as bandas características do náfon e de algumas da α -CD (principalmente em relação aos sinais referentes aos grupos H-O-H, 1740 cm^{-1} e C-O, 1200 cm^{-1}) apareceram nos espectros para os compósitos (Figura 24B). Vale lembrar que a quantidade de α -CD adicionada para obtenção do compósito é muito pequena e por isso apenas algumas apareçam no compósito, já que as outras bandas estiveram encobertas pelas bandas características do nafion que ocorrem em maior intensidade. As bandas de α -CD encontram-se um pouco deslocadas do espectro da substância pura, indicando interação entre nafion e α -CD durante a formação do compósito (HO; TRUONG; BHANDARI, 2017)(TREASA; KUMARI, 2015).

Com respeito ao teste de imersão do compósito em água, ficou perceptível que as bandas permaneceram praticamente idênticas as que tinham antes da imersão (comparar espectros azul e vermelho da Figura 24B). Isso indica que a α -CD pode não estar sendo lixiviada pela água. Sendo assim, o eletrodo modificado pode ser empregado com segurança em ambientes aquosos.

5.1.8 Análise morfológica por MEV e EDS

As imagens de MEV para os eletrodos cobertos com filme nanoporoso de ouro recobertos com AuNPs/Nafion e AuNPs/Nafion/ α -CD são apresentadas nas Figuras 25A e 25B, respectivamente.

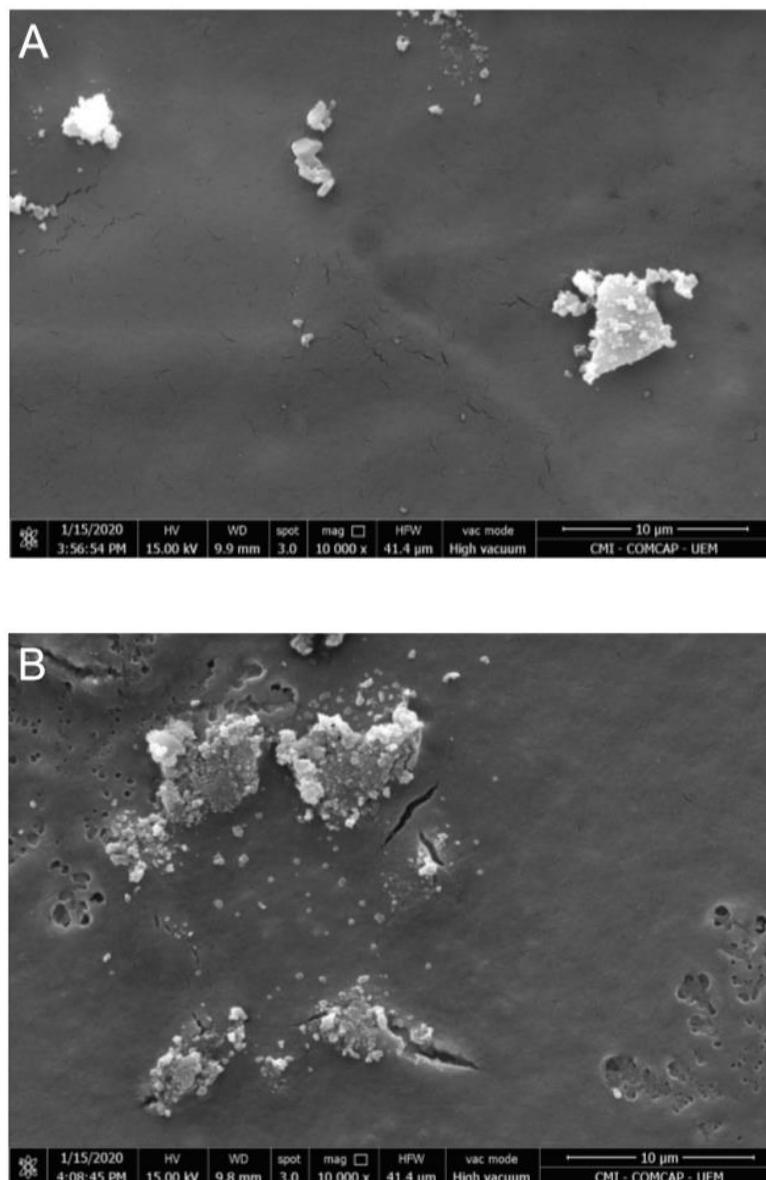


Figura 25: Micrografias de MEV da superfície dos compósitos sobre amostra nanoporosa com magnificação de 10.000x. A) AuNPs/Nafion e B) AuNPs/Nafion/ α -CD.

Conforme mostrado na Figura 25, observa-se a formação de um filme dos compósitos, a qual apresentou-se de forma homogênea. Alguns pontos com glóbulos foram observados, as quais provavelmente estejam relacionados a aglomeração de material. Algumas rachaduras também estão presentes na estrutura do filme possivelmente por conta do processo de secagem. Como esperado, não há diferenças significativas entre as superfícies dos compósitos, dado que α -CD foi incorporado em baixa quantidade.

A análise elementar por EDS também foi realizada para as mesmas amostras e os espectros estão apresentado na Figura 26. Os espectros

revelaram sinais característicos de elementos que estão presentes nas espécies químicas empregadas no preparo dos eletrodos.

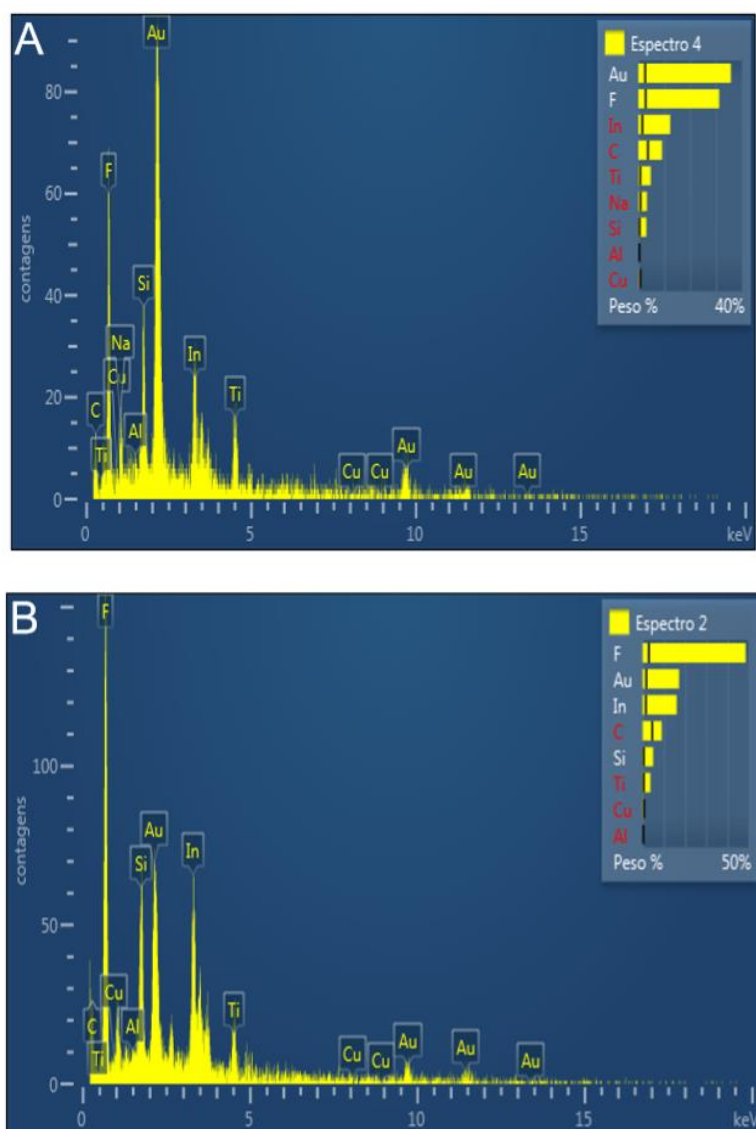


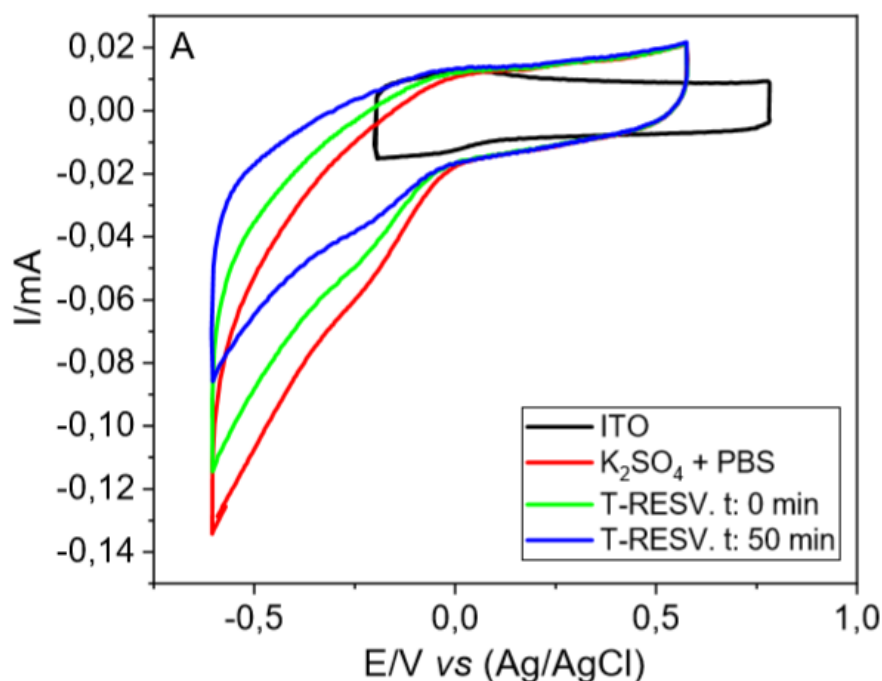
Figura 26: Análise de EDS para eletrodos recobertos com filme nanoporoso de ouro modificados com A) AuNPs/Nafion e B) AuNPs/Nafion/ α -CD.

Os picos referentes a ouro devem estar associados ao filme nanoporoso, AuNPs e principalmente ao próprio preparo da amostra (metalização com ouro). Além disso fica perceptível um pico referente ao flúor que é derivado da estrutura polimérica do nafion. Também são observados picos característicos dos elementos C e O que estão relacionados com as estruturas carbônicas de nafion e α -CD. Além disso, outros picos com menor intensidade como o Ti, usado na produção do filme nanoporoso e os elementos In e Si, referentes ao ITO utilizado

no substrato base para a construção do eletrodo. O cobre é uma impureza muito comum em materiais com ouro metálico e isso justifica o aparecimento do sinal relativo a ele.

5.1.9 Detecção do T-RESV

Inicialmente a CV foi realizada para a detecção do T-RESV empregando-se o eletrodo coberto com filme nanoporoso modificado com AuNPs/ Nafion/ α -CD. A Figura 27 apresenta os voltamogramas cíclicos para as amostras nanoporosas recobertas com AuNPs/Nafion e AuNPs/Nafion/ α -CD. Os testes de VC foram realizados em uma solução de PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, contendo 2000 μ L de uma solução estoque etanólica de T- RESV $1,31 \times 10^{-7}$ mol/L sob um sistema desareado com N_2 sob uma velocidade de 50 mV/s.



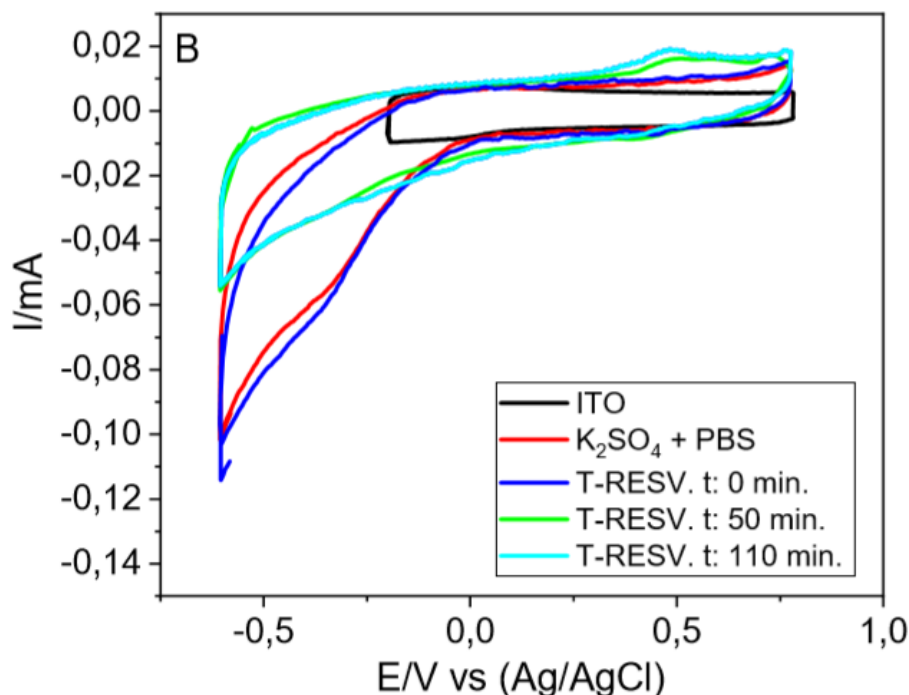


Figura 27: Comparação dos voltamogramas cíclicos para amostra recobertas com filme nanoporoso de ouro e modificadas com os compósitos A) AuNPs/Nafion e ITO e B) AuNPs/Nafion/ α -CD e ITO, em solução PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K₂SO₄ 0,1 mol/L, adicionado 2000 μ L da solução estoque T-RESV sob um sistema desaerado com N₂ sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

Para a superfície sem o elemento de reconhecimento (a α -CD), nenhum processo de oxidação é observado na varredura anódica na faixa de potenciais avaliada. Contudo, foi observado a presença do pico de oxidação em aproximadamente em 500 mV na Figura 27B (ausente na Figura 27A, mesmo após 50 min de incubação). Esse pico deve estar relacionado com a oxidação do T-RESV. Com base nessa suposição, ficaria provado que a presença da α -CD é essencial para que o T-RESV seja adsorvido no compósito e possa ser detectado eletroquimicamente. O processo de adsorção é identificado pelo fato da corrente de oxidação aumentar, até chegar em um estado estacionário. Portanto, a α -CD atuou como “reconhecedor” do T-RESV na análise, como foi visto por PEKEC et al., (2012) que detectou o T-RESV a partir da mistura da pasta de carbono com α -CD.

Para confirmar que o pico de oxidação de 500 mV é realmente do T-RESV e não do etanol (solvente do T-RESV), foi realizada uma adição de etanol puro (500 μ L, sem T-RESV) na solução de trabalho. A Figura 28 exhibe voltamograma cíclico para amostra nanoporosa modificada com o compósito

AuNPS/Nafion/ α -CD realizado em uma solução uma solução de PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L e 500 μ L de etanol absoluto >99,5% sob um sistema desaerado com N_2 , sob uma velocidade de 50 mV/s.

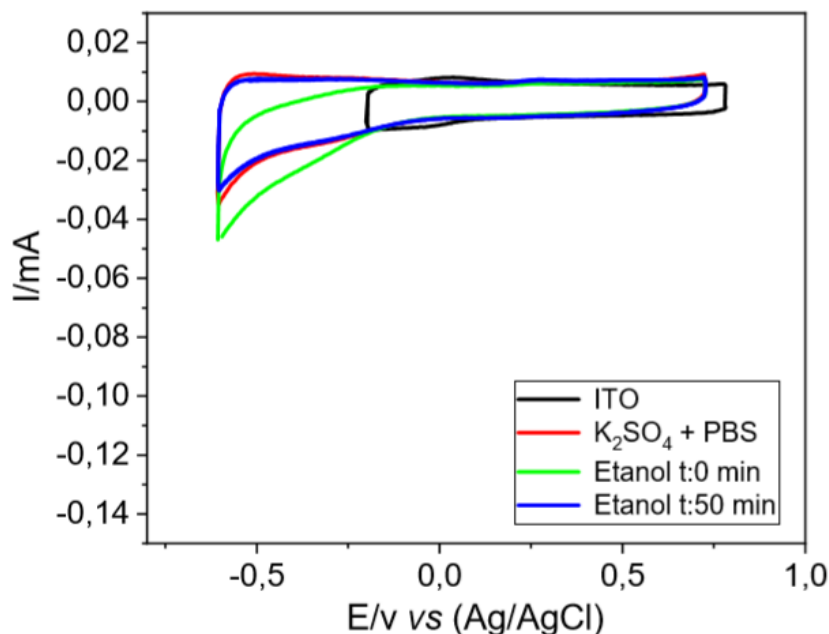


Figura 28: Voltamogramas cíclicos do ITO e da amostra recoberta com filme nanoporoso de ouro e modificadas com o compósitos AuNPs/Nafion/ α -CD na com adição de etanol puro (500 μ L) em uma solução PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, sob um sistema desaerado com N_2 sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

Observa-se que não é encontrado nenhum pico próximo de 500 mV no voltamograma. Deste modo, fica evidente que o etanol não é oxidado na superfície do eletrodo e que o pico em 500 mV está relacionado com o T-RESV.

Entretanto, a estabilidade do T- RESV em meio etanólico é muito baixa, visto que a sua estabilidade é alta em condições ácidas. Desta forma, a solução estoque do T-RESV passou a ser preparada em meio aquoso ácido (pH = 1,2). Estudos mostraram que o T-RESV se apresenta estável por 7 dias em uma temperatura de 37°C nesse ambiente, na qual a solução estoque se degrada em um teor menor do que 1,6%, ou seja, restam pelo menos 98,4% de T-RESV na solução estoque durante uma semana (ZUPANČIČ; LAVRIČ; KRISTL, 2015).

Como o experimento de detecção foi realizado em uma solução tamponada em pH = 7,1, fixou-se um tempo máximo de 1 h para análises envolvendo o T-RESV. Isso foi feito para não haver uma significativa degradação do analito conforme demonstraram os estudos de ZUPANČIČ; LAVRIČ; KRISTL, 2015.

Com intuito de avaliar a detecção do T-RESV nesse novo meio e também para reforçar o importante papel do compósito na determinação desse analito, foram obtidos voltamogramas cíclicos para a amostra contendo filme de nanoporoso de ouro não modificada e modificada com o compósito AuNPs/Nafion/ α -CD. A VC foi realizada em uma solução de PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, 2000 μ L da solução estoque de T-RESV $1,31 \times 10^{-7}$ mol/L preparada em ácido sulfúrico 0,02 mol/L (pH = 1,2), com um sistema desaerado com N_2 e sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

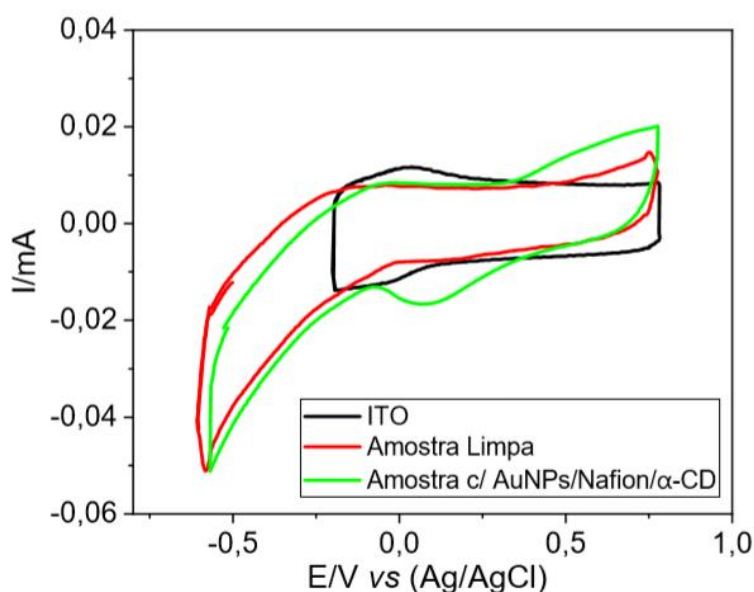


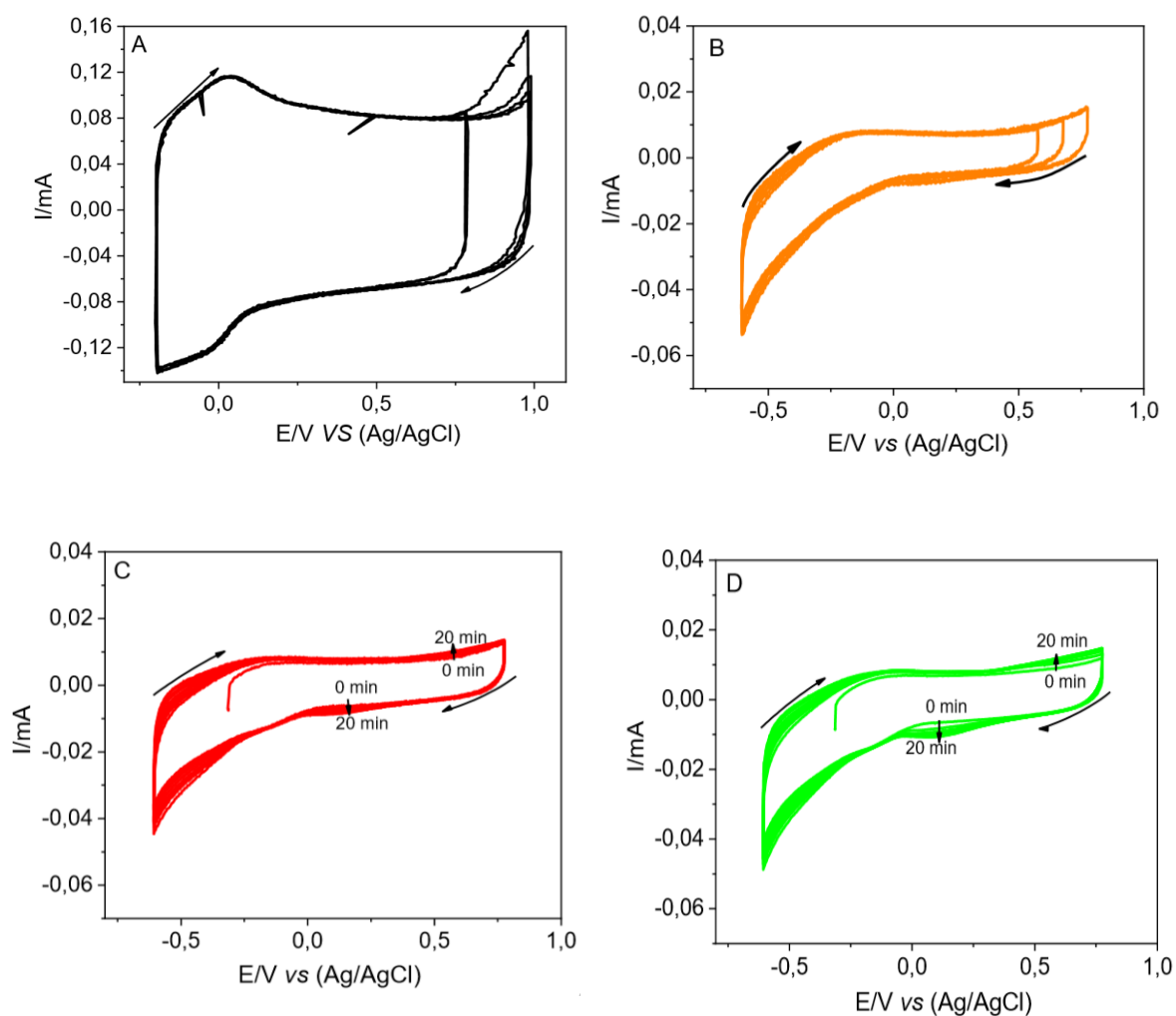
Figura 29: Voltamogramas cíclicos do ITO e do eletrodo recoberto com filme nanoporoso com e sem modificação com o compósito AuNPs/Nafion/ α -CD em solução PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L, 2000 μ L de solução estoque T-RESV sob um sistema desaerado com N_2 sob uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

Na Figura 29 são apresentados os voltamogramas obtidos. Para o eletrodo não modificado (linha vermelha), onde não foi observado o pico de oxidação do T-RESV, mesmo empregando uma concentração relativamente alta de T-RESV (2000 μ L da solução estoque de T-RESV). Por outro lado, como fica claro no voltamograma para o eletrodo modificado com o compósito (linha verde), é possível observar claramente um aumento de corrente ao redor de 500 mV, em uma banda não tão bem definida. Como anteriormente discutido, se trata da região de oxidação do T-RESV. Isso então deixa evidente que a detecção do analito alvo só é possível se o compósito for usado sobre o eletrodo e, como já discutido, se o α -CD estiver presente. Sob preparo da solução estoque em meio

ácido, foi possível ainda verificar que um pico extra catódico bem definido ocorre ao redor de 100 mV (Figura 29, linha verde).

5.1.10 Análise da sensibilidade do sensor eletroquímico

A Figura 30 apresenta os voltamogramas cíclicos que foram obtidos para o vidro-ITO e para amostra nanoporosa de ouro modificada com o composto AuNPs/Nafion/ α -CD, a qual foi submetida a soluções de T-RESV de diferentes concentrações. Para isso, a VC foi realizada em solução PBS 20,0 mmol/L com o eletrólito K_2SO_4 0,1 mol/L em 50 mL e sob adição de diferentes volumes de solução estoque de T-RESV ($1,31 \times 10^{-7}$ mol/L, pH = 1,2) de maneira sequencial, utilizando alíquotas de 500 μ L. O sistema foi desareado com N_2 e a velocidade de varredura foi de 50 mV/s. Os voltamogramas foram coletados, para cada adição de volume, ao longo de 20 min.



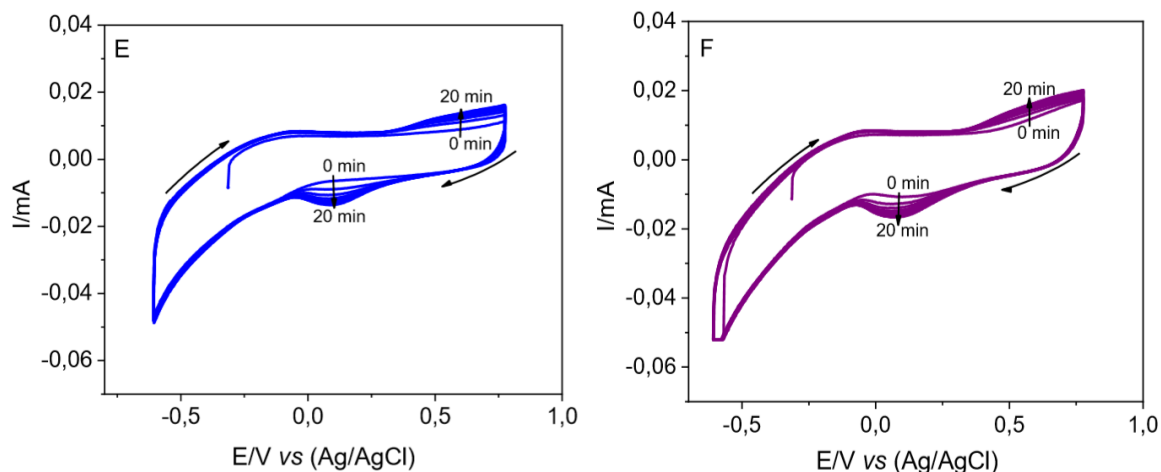


Figura 30: Voltamogramas cíclicos obtido com eletrodo nanoporoso de ouro modificado com o composto AuNPs/Nafion/ α -CD referente a detecção do T-RESV. VC foi realizado em solução PBS 20,0 mmol/L, eletrólito K₂SO₄ 0,1 mol/L em 50 mL A) ITO e também com a adição de diferentes volumes de solução estoque de T-RESV ($1,31 \times 10^{-7}$ mol/L), em alíquotas de 500 μ L. Os volumes adicionados foram B) 0, C) 500, D) 1000, E) 1500 F) 2000 μ L. O sistema foi desaerado com N₂ e a velocidade de varredura foi 50 mV/s. A varredura foi acompanhada por 20 min após cada adição de alíquota de T-RESV. O voltamograma do vidro-ITO é mostrado para efeitos de comparação em A).

Os voltamogramas da Figura 30 mostram o aparecimento dos picos catódico (100 mV) e anódico (ao redor de 500 mV) característicos do T-RESV a partir do momento de sua adição no meio, uma vez que não notou-se nenhum pico referente para Figura 30A e B, o qual a solução de T-RESV não foi adicionada. É possível observar então que, a partir da Figura 30C, a corrente dos picos aumentam na medida que o tempo passa, até alcançar um limite máximo ao redor de 20 min. Estima-se que esse é o tempo necessário para que o T-RESV difunda-se na matriz do composto e sofra adsorção na α -CD. A Figura 31A apresenta os voltamogramas obtidos para as condições da Figura 30 onde houve adição de T-RESV (Figuras 30C, D e E e F), após 20 min. A partir desses, foram obtidas as correntes máximas de pico catódico (100 mV) para cada curva voltamétrica. O pico catódico foi selecionado pois ele se apresentou com perfil mais definido, se comparado com o pico anódico. Fica evidente que as correntes de pico aumentaram a medida que a concentração de T-RESV aumentou. Sendo assim, as correntes máximas de pico catódico foram então plotadas com respeito as concentrações de T-RESV obtidas após cada adição de volume da solução estoque no meio. A Figura 31B apresenta a curva de analítica obtida. A inserção na Figura 31B corresponde aos voltamogramas da Figura 31A ampliados na região do pico catódico.

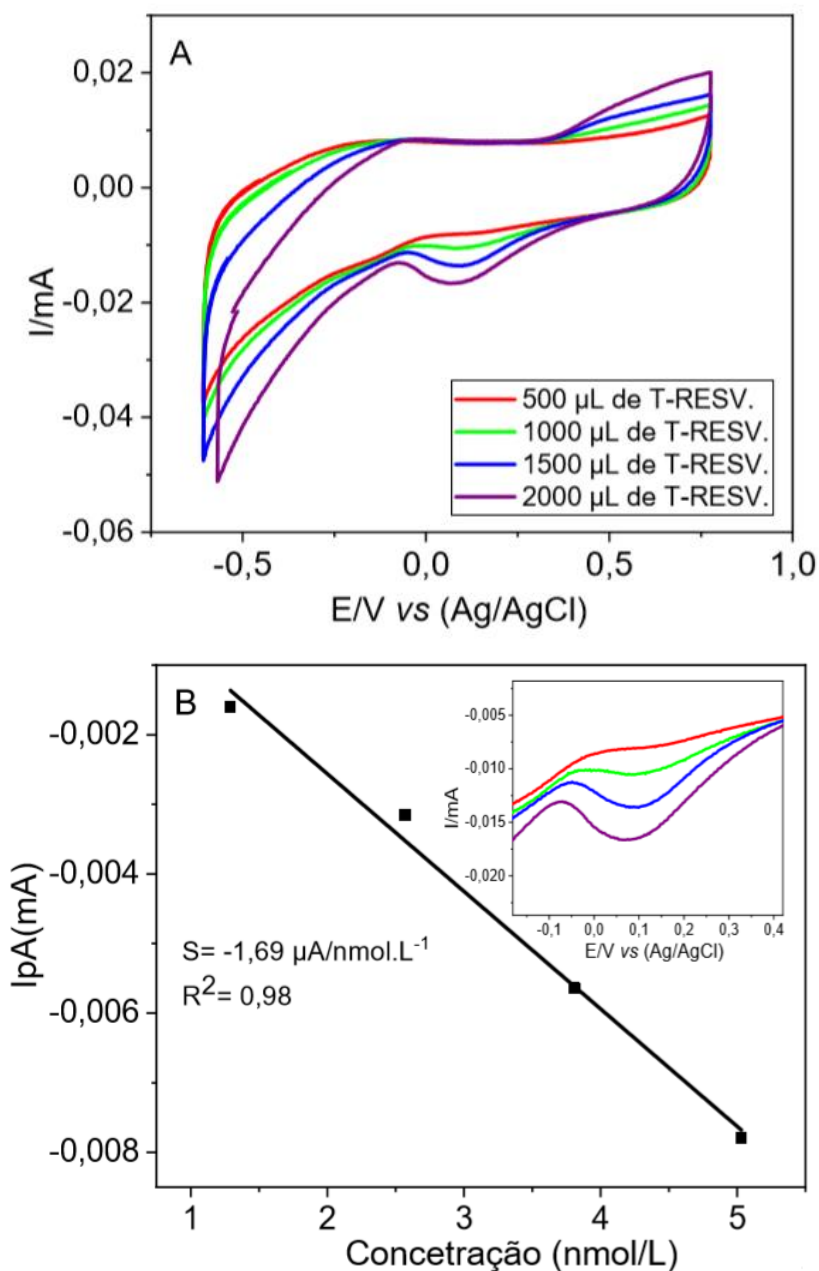


Figura 31: A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo recoberto com filme nanoporoso de ouro modificado com AuNPs/Nafion/ α -CD para diferentes concentrações de T-RESV (1,29; 2,57; 3,81 e 5,03 nmol/L) e em B) é mostrada curva de calibração obtida a partir das correntes de pico catódica dos voltamogramas da parte A). A inserção em B) apresenta a ampliação da região dos picos catódicas do voltamograma da parte A).

A curva analítica (Figura 31B) apresentou um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,98. Isso indica um ajuste linear satisfatório, isto é, a resposta do sensor eletroquímico foi proporcional ao estímulo provocado, considerando a faixa de concentração avaliada. Isso também sugere que a superfície do eletrodo

não foi saturada de antígeno nessa faixa de trabalho. A inclinação da curva de calibração representa o valor numérico de sensibilidade (S) a qual foi $1,69 \mu\text{A}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, isto é, a variação de 1 nmol/L na concentração do T-RESV produz uma variação na corrente de pico de ca. $1,69 \mu\text{A}$, considerando eletrodo com área geométrica de $1,1 \text{ cm}^2$. Esse valor de sensibilidade é muito superior de outros sensores eletroquímicos para a detecção do mesmo analito reportados na literatura (LIU et al., 2017)(GÓMEZ-MONEDERO et al., 2019).

O LD e o limite de quantificação analítico (LQ) (limite de concentração que pode ser quantificado com boa margem de precisão estatística) podem ser obtidos a partir da curva de analítica e do valor de S por meio das Equações 2 e 3, onde $\sigma_{coef.linear}$ é desvio padrão do coeficiente linear da curva e teve valor de $0,402 \mu\text{A}$ (DE FIGUEIREDO et al., 2018) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

$$LD = \frac{3\sigma_{coef.linear}}{S} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$LQ = \frac{10\sigma_{coef.linear}}{S} \quad (\text{Eq. 3})$$

O LD obtido foi de $0,785 \text{ nmol/L}$ e é considerado muito bom, quando comparado aqueles já reportados na literatura para sensores de T-RESV de mesma natureza, as quais estão na faixa de $0,1$ à $32 \mu\text{mol/L}$ (LIU et al., 2017)(ZHANG et al., 2019). Um estudo relatado por PEKEC et al. (2012), na qual foi empregado eletrodo de pasta de carbono e α -CD para detecção de T-RESV, o limite obtido foi pelo menos uma ordem de grandeza maior, $LD = 50 \text{ nmol/L}$. O LQ resultante para o sensor aqui proposto foi de $2,38 \text{ nmol/L}$.

6. CONCLUSÃO

As imagens de MEV do eletrodo nanoestruturado mostraram que uma superfície de ouro nanoporosa foi obtida por NSL. Os nanoporos obtidos tiveram forma aproximadamente circular, permaneceram distribuídos homoganeamente e periodicamente ao longo de todo o filme de ouro. Isso contribuiu para obtenção de eletrodos nanoporosos reprodutíveis. A boa reprodutibilidade ainda pode ser inferida pois os testes por VC mostraram perfis voltamétricos semelhantes para

diferentes amostras obtidas por NSL. Além disso foi possível verificar que a área eletroativa do eletrodo aumentou cerca de 44% quando um eletrodo coberto com filme nanoporoso de ouro foi comparado com um eletrodo contendo filme de ouro policristalino *flat*. Com respeito aos testes de limpeza, dentre todas as metodologias testadas, aquela em que foi empregado HNO₃ 10% por 25 min, seguido de ultrasonificação com acetona (500 s) e enxague com água quente se mostrou mais eficaz na remoção de resíduos e na manutenção da integridade física do filme de ouro nanoporoso.

Pode-se constatar ainda, por meio de análises espectrofotométricas, que as AuNPs sintetizadas possivelmente apresentaram-se com formato esférico. Além disso, constatou-se que o emprego de diferentes concentrações de CTAB na síntese não influenciou de maneira significativa para obter mudanças na morfologia final das nanopartículas.

Os testes VC e EIS mostraram-se que o nafion foi um suporte eficiente para AuNPs e α -CD. Não foram observadas significativas lixiviação e degradação química da α -CD durante as análises. Foi constatado ainda que o compósito foi obtido sobre a superfície dos eletrodos. Isso pode ser comprovado a partir de análises de FTIR-ATR e EDS que mostraram sinais de ligações e elementos químicos característicos, respectivamente, das espécies químicas empregadas na construção dos eletrodos modificados. A partir de análises de EIS foi possível ainda comprovar que as AuNPs têm um efeito importante na melhora da condutividade do suporte (nafion). Foi mostrado que os eletrodos recobertos com o compósito AuNPs/nafion apresentam menor R_{ct} se comparado a um eletrodo recoberto apenas com nafion. Isso pode contribuir para uma melhora de desempenho analítico do eletrodo.

Com respeito aos testes de detecção do T-RESV por VC, foi possível verificar que o analito alvo só pôde ser detectado na superfície do eletrodo se o compósito de AuNPs/nafion/ α -CD for aplicado. Além disso, como principal contribuição desse trabalho, foi possível mostrar que α -CD possui papel fundamental na detecção de T-RESV, já que um eletrodo recoberto apenas com AuNPs/nafion não foi capaz de produzir sinal de oxidação de T-RESV. Assim, a α -CD tem efeito importante de reconhecimento e adsorção do analito-alvo para que ele possa ser determinado no eletrodo. Por fim, foi possível demonstrar que

o sensor apresentou excelentes parâmetros analíticos, se comparado com outros sensores de mesma natureza reportados na literatura. O valor de sensibilidade foi de $1,69 \mu\text{A}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e o LD foi de $0,785 \text{ nmol/L}$. Em suma, mostramos que sensor desenvolvido neste trabalho abriu uma nova oportunidade para detecção seletiva de T-RESV com mais baixo LD e maior sensibilidade.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULBARI, H. A.; BASHEER, E. A. M. Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication. **ChemBioEng Reviews**, v. 4, n. 2, p. 92–105, 2017.
- ADHIKARI, B. R.; GOVINDHAN, M.; CHEN, A. Carbon nanomaterials based electrochemical sensors/biosensors for the sensitive detection of pharmaceutical and biological compounds. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 9, p. 22490–22508, 2015.
- ADLEY, C. Past, Present and Future of Sensors in Food Production. **Foods**, v. 3, n. 3, p. 491–510, 2014.
- AFZAL, A.; DICKERT, F. L. Imprinted oxide and MIP/oxide hybrid nanomaterials for chemical sensors. **Nanomaterials**, v. 8, n. 4, 2018.
- AMIN, S. et al. The efficacy of the Nafion® blended CTAB protected Au nanoparticles for the electrochemical detection of tramadol in wastewater: A parametric investigation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 4, p. 3825–3834, 2016.
- ANDREI, V. et al. A single use electrochemical sensor based on biomimetic nanoceria for the detection of wine antioxidants. **Talanta**, v. 156–157, p. 112–118, 2016.
- ARAGAY, G.; MERKOÇI, A. Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 49–61, 2012.
- ASTAFEV, E. A. Comparing the Method and Hardware for Electrochemical Impedance with the Method of Measuring and Analyzing Electrochemical Noise. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 54, n. 11, p. 1022–1030, 2018.
- ATTA, N. F. et al. Improved host-guest electrochemical sensing of dopamine in the presence of ascorbic and uric acids in a β -cyclodextrin/Nafion®/polymer

- nanocomposite. **Analytical Methods**, v. 6, n. 15, p. 5962–5971, 2014.
- BARBOSA, G. B.; GOMEZ, E.; INUTAN, E. D. Cyclic Voltammetry and Spectrophotometric Determination of Antioxidant Activities of Selected Ginger Species. **Asian Journal of Biological and Life Sciences**, v. 7, n. 3, p. 98–104, 2018.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; BAGOTSKY, V. S. **Electrochemical Methods Fundamentals of Electrochemistry**. [s.l: s.n.].
- CABRAL JÚNIOR, B. P. et al. Cost-effective plasmonic device for label-free streptavidin detection. **Materials Letters**, v. 227, p. 243–246, 2018.
- CATALGOL, B. et al. Resveratrol: French paradox revisited. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 JUL, n. July, p. 1–18, 2012.
- CELE, N. P.; SINHA RAY, S.; SIKHWIVHILU, L. Nafion titania nanotubes nanocomposite electrolytes for high-temperature direct methanol fuel cells. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.
- CHANG, B.-Y.; PARK, S.-M. Electrochemical impedance spectroscopy of composite adhesive joints. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 3, n. 6, p. 207–229, 2010.
- CHIU, Y. DA et al. Scanned by CamScanner 连发 阩. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 1, n. 1, p. 2016, 7 out. 2018.
- COLLINSON, M. M. Nanoporous Gold Electrodes and Their Applications in Analytical Chemistry. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, p. 1–21, 2013a.
- COLLINSON, M. M. Nanoporous Gold Electrodes and Their Applications in Analytical Chemistry. **ISRN Analytical Chemistry**, v. 2013, p. 1–21, 2013b.
- COLSON, P.; HENRIST, C.; CLOOTS, R. Nanosphere lithography: A powerful method for the controlled manufacturing of nanomaterials. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.
- DARUICH DE SOUZA, C.; RIBEIRO NOGUEIRA, B.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714–740, 2019.
- DAUM, P. H.; ENKE, C. G. Electrochemical Kinetics of the Ferri—Ferrocyanide Couple on Platinum. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 653–656, 1969.
- DE FIGUEIREDO, L. C. et al. Development of an ultrasound assisted method for

determination of phytosterols in vegetable oil. **Food Chemistry**, v. 240, n. July 2017, p. 441–447, 2018.

DE OLIVEIRA, T. R. et al. Enzymatic biosensors based on ingã-cipã peroxidase immobilised on sepiolite for TBHQ quantification. **Analyst**, v. 139, n. 9, p. 2214–2220, 2014.

DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. K. Adsorptive stripping differential pulse voltammetric determination of metoprolol at nafion-CNT-nano-composite film sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 176, p. 632–638, 2013.

DREADEN, E. C. et al. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.

DZIĄBOWSKA, K.; CZACZYK, E.; NIDZWORSKI, D. Application of Electrochemical Methods in Biosensing Technologies. **Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis**, 2018.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

FANG, C. et al. Electrochemical fabrication of nanoporous gold. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 2952–2957, 2012.

FU, Y. et al. Study on the polyfurfural film modified glassy carbon electrode and its application in polyphenols determination. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 687, p. 25–29, 1 nov. 2012.

GIL, D. M. A.; REBELO, M. J. F. Evaluating the antioxidant capacity of wines: A laccase-based biosensor approach. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 2, p. 303–308, 2010.

GÓMEZ-MONEDERO, B. et al. Iodine-mediated Oxidation of Resveratrol. An Electroanalytical Study Using Platinum and Glassy Carbon Electrodes. **Electroanalysis**, v. 31, n. 7, p. 1348–1355, 5 jul. 2019.

GUO, C. et al. Construction of a biosensor based on a combination of cytochrome c, graphene, and gold nanoparticles. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 1, p. 12–14, 2019.

HANAFI, R. et al. Electrochemical sensor for environmental monitoring system: A review. **AIP Conference Proceedings**, v. 2169, n. November, 2019.

HASAN, A. et al. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HO, T. M.; TRUONG, T.; BHANDARI, B. **Chapter 5 - Spray-Drying and Glass Transition**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.

HU, K. et al. Electrochemical DNA biosensor based on nanoporous gold electrode and multifunctional encoded DNA-Au bio bar codes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 23, p. 9124–9130, 2008.

JIANG, J. Fabrication of uniform nanoparticulate gold through potential-modulated electrochemical deposition and dissolution of silver in ionic liquids. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 166, n. 15, p. 521–525, 2019.

KONG, F. Y. et al. A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 77–82, 2014.

KOUSHKI, M. et al. Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 8, p. 2473–2490, 2018.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 243–261, 2008.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2016.

KUSOGLU, A.; WEBER, A. Z. New Insights into Perfluorinated Sulfonic-Acid Ionomers. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 3, p. 987–1104, 2017.

LEITE, F. R. F.; SANTOS, W. D. J. R.; KUBOTA, L. T. Selective determination of caffeic acid in wines with electrochemical sensor based on molecularly imprinted siloxanes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 193, p. 238–246, 2014.

LI, K. et al. Gold nanoparticle amplified optical microfiber evanescent wave absorption biosensor for cancer biomarker detection in serum. **Talanta**, v. 120, p. 419–424, 2014.

LI, S. et al. Electrochemical microfluidics techniques for heavy metal ion detection. **Analyst**, v. 143, n. 18, p. 4230–4246, 2018.

LI, X. et al. An electrochemical sensor based on platinum nanoparticles and mesoporous carbon composites for selective analysis of dopamine. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 14, n. 1, p. 1082–1091, 2019.

LIU, K.; WEI, J.; WANG, C. Sensitive detection of rutin based on β -cyclodextrin@chemically reduced graphene/Nafion composite film. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 14, p. 5189–5194, 2011.

LIU, L. et al. Electrochemical evaluation of trans-resveratrol levels in red wine based on the interaction between resveratrol and graphene. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, 2017.

LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

LU, L. et al. Review—Electrochemical Sensors and Biosensors Modified with Binary Nanocomposite for Food Safety. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037512, 2020.

MEHMETI, E. et al. Wiring of glucose oxidase with graphene nanoribbons: an electrochemical third generation glucose biosensor. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 4, p. 1127–1134, 2017.

MORALES, M. A.; HALPERN, J. M. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 3231–3239, 2018.

MORENO, R. G. M. et al. LESÕES EM DNA INDUZIDAS PELA AUTOXIDAÇÃO DE S(IV) NA PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS DE TRANSIÇÃO Ruben G. M. Moreno, María V. Alipázaga, Marisa H. G. Medeiros e Nina Coichev*. v. 29, n. 5, p. 1086–1093, 2006.

MORTREUX, M. et al. A moderate daily dose of resveratrol mitigates muscle deconditioning in a martian gravity analog. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUL, p. 1–6, 2019.

MUÑOZ, J.; MONTES, R.; BAEZA, M. Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture surface and bio-sensing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 201–215, 2017.

PARK, S. Y. et al. Chemoresistive materials for electronic nose: Progress, perspectives, and challenges. **InfoMat**, v. 1, n. 3, p. 289–316, 2019.

PAULO, U. D. E. S. ã. O.; QUÍMICA, I. D. E. Lucas Patricio Hernández Saravia Fabricação de novas superfícies eletroativas para a fabricação de sensores eletroquímicos para oxigênio Lucas Patricio Hernández Saravia Fabricação de novas superfícies eletroativas para a fabricação de sensores eletroquím. 2018.

- PEKEC, B. et al. Electrochemical sensor based on a cyclodextrin modified carbon paste electrode for Trans-resveratrol analysis. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 5, p. 4089–4098, 2012.
- PETKOVIĆ, B. B. et al. Dinuclear copper(II) octaazamacrocyclic complex in a PVC coated GCE and graphite as a voltammetric sensor for determination of gallic acid and antioxidant capacity of wine samples. **Talanta**, v. 132, n. li, p. 513–519, 2015.
- RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. **Electrochemical Impedance Spectroscopy - an overview | ScienceDirect Topics**. [s.l: s.n.].
- SACCO, A. Electrochemical impedance spectroscopy: Fundamentals and application in dye-sensitized solar cells. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 814–829, 2017.
- SAHA, S. et al. Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–12, 2016.
- SALEHI, B. et al. Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. **Biomedicines**, v. 6, n. 3, p. 1–20, 2018.
- SAPPATI, K. K.; BHADRA, S. Piezoelectric polymer and paper substrates: A review. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 11, 2018.
- SAVK, A. et al. Multiwalled carbon nanotube-based nanosensor for ultrasensitive detection of uric acid, dopamine, and ascorbic acid. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, n. September 2018, p. 248–254, 2019.
- SHARMA, N.; BALDI, A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: An overview. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 739–757, 2016.
- SINGH, P. et al. Biomedical Perspective of Electrochemical Nanobiosensor. **Nano-Micro Letters**, v. 8, n. 3, p. 193–203, 2016.
- SNOPEK, L. et al. Contribution of red wine consumption to human health protection. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–16, 2018.
- SONAVANE, G. et al. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 1–10, 2008.
- SQUISSATO, A. L. et al. **Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors for Environmental and Energy Applications**. [s.l: s.n.].
- STOZHKO, N. et al. A nanostructured sensor based on gold nanoparticles and

Actuators, B: Chemical, v. 182, p. 467–481, 2013.

WILSON, D. W. et al. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: An overview.

Antioxidants, v. 6, n. 4, p. 1–20, 2017.

WOODS, A.; QUIRK, A.; BURGESS, I. J. Electrochemical and SEIRAS studies of urea and biuret adsorption on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 819, n. September 2017, p. 152–158, 2018.

YUAN, Y.; LEE, T. R. **Surface Science Techniques**. [s.l.: s.n.].

ZHANG, T. et al. Facial synthesis of a novel Ag₄V₂O₇/g-C₃N₄ heterostructure with highly efficient photoactivity. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 102, n. 7, p. 3897–3907, 2019.

ZHAO, S. et al. Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis. **Bioelectrochemistry**, v. 69, n. 2, p. 158–163, 2006.

ZHAO J., NIU L., DONG S. Technique for Determination of Gold Electrode Area and its Application of Characterization in Self- Assembling Process. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 337, n.1, p. 265-268, 1999.

ZOOK, J. D.; SCHROEDER, N. Sensors as Information Transducers. v. 9, p. 329–359, 2008.

ZUPANČIČ, Š.; LAVRIČ, Z.; KRISTL, J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 196–204, 2015.

Anexo 1: Projeto da célula eletroquímica com medidas em milímetros (mm).