

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 14/11/2019.

JOSÉ LUIZ DA SILVA

**Desenvolvimento de detectores nanoestruturados de óxidos metálicos em grafeno para detecção eletroquímica de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradioto

Araraquara  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d Silva, José Luiz da  
Desenvolvimento de detectores nanoestruturados de óxidos metálicos em grafeno para detecção eletroquímica de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência / José Luiz da Silva. – Araraquara : [s.n.], 2017  
211 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Nelson Ramos Stradiotto

1. Vinhaça. 2. Grafeno. 3. Aminoácidos. 4. Cromatografia de troca iônica. 5. Análise eletroquímica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de detectores nanoestruturados de óxidos metálicos em grafeno para detecção eletroquímica de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência"

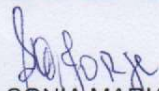
**AUTOR: JOSÉ LUIZ DA SILVA**

**ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO**

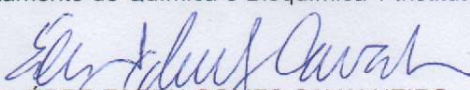
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



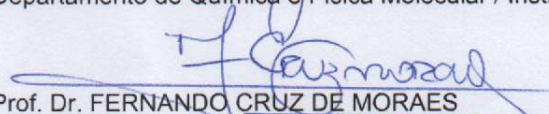
Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO  
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



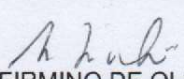
Profa. Dra. SONIA MARIA ALVES JORGE  
Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu



Prof. Dr. ÉDER TADEU GOMES CAVALHEIRO  
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos



Prof. Dr. FERNANDO CRUZ DE MORAES  
Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAr - São Carlos



Prof. Dr. MARCELO FIRMINO DE OLIVEIRA  
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 14 de novembro de 2017

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Maria Neide e José Costa por terem me proporcionado os melhores momentos da minha vida, pelo exemplo de honestidade, amor, afeto, carinho, confiança depositada e por terem acreditado na realização deste sonho, apesar de todas as dificuldades, não pensaram em outra hipótese a não ser proporcionar a opção de estudo.

Ao meu irmão José Leandro, sua esposa Kátia e minha sobrinha, Sophia, que me incentivaram na continuidade dos estudos e a quem amo muito.

À minha avó Luzia Aidano (*in memoriam*), pelo amor e carinho oferecidos, pela admiração que sempre exerci e o exemplo de pessoa que jamais será esquecida. Amarei-te eternamente!

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto pela liberdade, confiança, amizade, orientação, oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pelo exemplo de ética, dedicação e amor à pesquisa.

Às Professoras Dra Maria Valnice, Hideko, Maria Del Pilar e Fabíola pelo amparo à nossa pesquisa, confiança e contínua amizade.

Com todo carinho, agradeço em especial a Maísa Azevedo, Graziela, Acelino, Thulio César, Edervaldo, Daniel, Victor Hugo, Gustavo Murilo, Flávia Unterman e João Carlos pela ajuda nas discussões e dúvidas sobre a realização deste trabalho, carinho e amizade.

A Maísa Azevedo por estar sempre disponível a discussões sobre o desenvolvimento deste trabalho, resoluções de problemas e dúvidas frequentes, amizade e carinho.

A Victor Hugo por ter desenvolvido o eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata, e realização dos estudos sobre a eletrooxidação de alguns aminoácidos.

A José Rodrigues por ter desenvolvido o eletrodo modificado com nanopartículas de óxido de cobre.

A todos os companheiros do Laboratório de Eletroanalítica, NDCom e IPBEN, que sempre tornaram o nosso ambiente de trabalho excelente, saudável e alegre.

A todos amigos, em especial, Igor Amorim, Ronaldo Júnior, Jader, Marcos Moura, Ronaldo Revejes, Nerilson Marques, Andrea, Vinicius e Aline pelo carinho, amizade e momento de descontração que tornaram minha estadia em Araraquara mais agradável.

À Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química e funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa e elaboração da presente tese.

Ao Laboratório de Espectroscopia de Fotoelétrons (LEFE) pelas análises de espectroscopia de fotoelétrons (XPS).

Ao Laboratório de Microscopia Avançada (LMA-IQ) pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A FAPESP pelo financiamento do projeto número 2014/23846-5.

A todos que confiaram em mim, meus sinceros agradecimentos.

Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existe pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles. Por isso, desejo sinceramente que você nunca desista de seus sonhos! (Augusto Cury, 2004)

## RESUMO

A vinhaça de cana-de-açúcar é um coproduto gerado a partir da produção de etanol através da fermentação de carboidratos por leveduras em indústrias de álcool e açúcar, com alto poder poluente (cerca de cem vezes maior do que o esgoto doméstico) e requer alta demanda química de oxigênio. Estima-se que a produção de vinhaça de cana-de-açúcar no Brasil seja entre 265,1 e 370,3 bilhões de litros na safra 2017/2018. O desenvolvimento de métodos para determinação da composição química da vinhaça é de extrema importância para agregar maior valorização a esse coproduto industrial. Com o intuito de avaliar novos processos de aplicação, produção ou extração de aminoácidos a partir da vinhaça, é de fundamental importância a caracterização precisa da composição química desse coproduto. Neste trabalho, foram investigados detectores nanoestruturados de óxido de grafeno reduzido (RGO) contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata para detecção e determinação de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com detecção eletroquímica. Os eletrodos modificados construídos foram caracterizados por voltametria cíclica (CV), espectroscopias de impedância eletroquímica (EIS), fotoemissão de raios X (XPS), Raman e energia dispersiva de raios X (EDX), e microscopias eletrônica de varredura de alta resolução (SEM) e eletrônica de transmissão (TEM). A oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos em meio alcalino foi estudada por CV com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que os aminoácidos estudados não foram oxidados na superfície modificada com RGO. No entanto, os analitos foram oxidados irreversivelmente nas superfícies dos eletrodos modificados com RGO contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata. As separações cromatográficas foram realizadas empregando uma coluna de troca-iônica acoplada com uma pré-coluna e eluição isocrática. Foram avaliados os efeitos do hidróxido, acetato de sódio e água como fase móvel. As separações dos aminoácidos foram completas dentro de 30 min. As respostas dos métodos desenvolvidos melhoraram devido à aplicação de RGO e nanopartículas de óxidos metálicos como modificadores de eletrodo. Os parâmetros analíticos do método desenvolvido foram avaliados. As soluções foram preparadas com concentrações na gama de 1,0×10<sup>-8</sup> a 1,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>. Sob as condições cromatográficas otimizadas, os métodos desenvolvidos utilizando os eletrodos modificados apresentaram uma relação linear com as concentrações dos aminoácidos em duas ordens de grandeza com limites de detecção inferiores a 2,0×10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, sensibilidades maiores do que 3,3×10<sup>5</sup> nA mol<sup>-1</sup> L e excelente coeficiente de correlação ≥ 0,9991. Os métodos analíticos propostos utilizando eletrodos modificados com RGO contendo NiNPs e CuNPs foram aplicados na detecção de aminoácidos em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar com recuperações variando de 95 ± 5 a 102 ± 3 %. A estabilidade e a repetibilidade dos eletrodos modificados foram investigadas. A excelente estabilidade a longo prazo e a repetibilidade dos eletrodos construídos os tornam atraentes como detectores eletroquímicos. Os resultados mostraram que os detectores desenvolvidos podem ser empregados para detecção e quantificação de aminoácidos, livre de interferentes e com precisão em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar.

**Palavras chaves:** Vinhoto de cana-de-açúcar. Óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente. Nanopartículas de metálicas. Aminoácidos. Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência. Detecção amperométrica.



## ABSTRACT

Sugarcane vinasse is a co-product generated from ethanol production from yeast fermentation of carbohydrates in sugar and ethanol plants, with high pollutant power (about a hundred times higher than domestic sewage) and requires high chemical oxygen demand (COD). It is estimated that the sugarcane vinasse production in Brazil will be between 265.1 and 370.3 billion litres in 2017/2018 harvest. The methods development for determining the chemical composition of vinasse is extremely important to add value to this co-product and bioenergy applications. In order to evaluate new application processes, production or extraction of amino acids from vinasse, is fundamental to accurate characterization of the chemical composition of this co-product. In this work, we investigated reduced graphene oxide (RGO) containing nickel, copper and silver metal oxide nanoparticles nanostructured detectors for amino acids detection and determination in sugarcane vinasse using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to electrochemical detection. The modified electrodes constructed were characterized by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), X-ray photoemission spectroscopy (XPS), Raman spectroscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The electrocatalytic oxidation of the amino acids in alkaline medium was studied by CV with scan rate of  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . The results showed that the amino acids studied were not oxidized on the surface modified with RGO. However, the analytes were irreversibly oxidized on the electrode surfaces modified with RGO containing nickel, copper and silver metal oxides nanoparticles. Chromatographic separations were performed employing an ion exchange column coupled to a pre-column and isocratic elution. The effects of sodium hydroxide, sodium acetate, and water as mobile phase were evaluated. Separations of amino acids were complete within 30 min. The electrochemical response and sensitivity of the developed methods improved due to the application of RGO and metal oxides nanoparticles as electrode modifiers. The analytical parameters of the developed method were evaluated. Solutions were prepared with concentrations in range of  $1.0 \times 10^{-8}$  to  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Under optimized chromatographic conditions, the methods developed using the modified electrodes showed a linear relationship towards the amino acid concentrations in two orders of magnitude with detection limits of less than  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , sensitivities greater than  $3.3 \times 10^5 \text{ nA mol}^{-1} \text{ L}$  and excellent correlation coefficient  $\geq 0.9991$ . The analytical methods proposed using modified electrodes with RGO containing NiNPs and CuNPs were applied in the amino acids detection in sugarcane vinasse samples with recoveries varying from  $95 \pm 5$  to  $102 \pm 3\%$ . The stability and repeatability of the modified electrodes were investigated. The excellent long-term stability and repeatability of the prepared modified electrodes make them attractive as electrochemical detectors. The results showed that the developed detectors could be used for amino acids detection and quantification, free of interferences and with precision in sugarcane vinasse samples.

**Keywords:** Sugarcane vinasse. Electrochemically reduced graphene oxide. Metal nanoparticles. Amino acids. High performance anion-exchange chromatography. Amperometric detection.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Comportamento eletroquímico dos aminoácidos ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E) nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  (b; curva preta) e  $1,5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> (c; curva azul) em solução de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (a; curva vermelha) na superfície do GCE com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. ..... 56
- Figura 2 – Voltamogramas cíclicos do óxido de grafeno 1,0 mg mL<sup>-1</sup> em sulfato de sódio 0,50 mol L<sup>-1</sup>. Condições: velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. (A) 1º Ciclo; (B) 2º Ciclo; (C) 3º Ciclo; (D) 4º Ciclo; (E) 5º Ciclo; (F) 10º Ciclo; (G) 20º Ciclo; (H) Sulfato de sódio 0,50 mol L<sup>-1</sup>. ..... 57
- Figura 3 – Comportamento eletroquímico dos aminoácidos ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E) nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (curva pretas) em solução de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curva vermelhas) sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. ..... 58
- Figura 4 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente em NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo.. ..... 59
- Figura 5 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE em soluções de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E). ..... 60
- Figura 6 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente sob potencial de -1,1 V por 210 s em NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. .... 62
- Figura 7 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente sob potencial de -1,5 V por 500 s em NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. .... 63

- Figura 8 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,1 V por 210 s em soluções de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0× 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E)..... 64
- Figura 9 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,5 V por 500 s em soluções de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0× 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E)..... 65
- Figura 10 – Voltamogramas cíclicos da redução eletroquímica do GO 0,50 mg mL<sup>-1</sup> em sulfato de sódio 0,50 mol L<sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>: (A) 1º Ciclo; (B) 2º Ciclo; (C) 5º Ciclo; (D) 10º Ciclo; (E) e 20º Ciclo. .... 67
- Figura 11 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas com potencial de -1,0 V por 30 s sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente em NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo..... 68
- Figura 12 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,0 V por 30 s em soluções de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0× 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E). .... 69
- Figura 13 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,0 V por 50 s em soluções de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0× 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E). .... 70
- Figura 14 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,0 V por 100 s em soluções de NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E). .... 71

- Figura 15 – Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de RGO e NiNPs sobre a superfície do GCE em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo..... 73
- Figura 16 – Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de RGO e NiNPs sobre a superfície do GCE em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo. Inserido: Ampliações das curvas a e b. .... 73
- Figura 17 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas simultaneamente com RGO em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  por CV sobre a superfície do GCE em  $\text{NaOH}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo..... 74
- Figura 18 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas simultaneamente com RGO em meio de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  por CV sobre a superfície do GCE em  $\text{NaOH}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo..... 75
- Figura 19 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  por CV em solução de  $\text{NaOH}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (curva a) e na presença de glicina  $1,0 \times 10^{-3}$  (b),  $2,0 \times 10^{-3}$  (c),  $3,0 \times 10^{-3}$  (d),  $4,0 \times 10^{-3}$  (e),  $5,0 \times 10^{-3}$  (f) e  $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (g) com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . .... 75
- Figura 20 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  por CV em solução de  $\text{NaOH}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (curva a) e na presença de glicina  $1,0 \times 10^{-3}$  (b),  $2,0 \times 10^{-3}$  (c),  $3,0 \times 10^{-3}$  (d),  $4,0 \times 10^{-3}$  (e), e  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (f) com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ..... 76
- Figura 21 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs em RGO sobre a superfície do GCE modificado em duas etapas por amperometria em  $\text{NaOH}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo.... 78

Figura 22 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com RGO e NiNPs em duas etapas por amperometria em solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> (curva a) e na presença de glicina 1,0×10 <sup>-3</sup> (b), 2,0× 10 <sup>-3</sup> (c), 3,0×10 <sup>-3</sup> (d), 4,0×10 <sup>-3</sup> (e), e 5,0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (f) com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> .....	78
Figura 23 – Comportamento eletroquímico dos aminoácidos ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E) nas concentrações de 1,0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (curvas pretas) e 1,5×10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> (curvas azuis) em solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> (curvas vermelhas) sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....	80
Figura 24 – Otimização da eletrodeposição do RGO sobre a superfície do GCE utilizando a técnica de amperometria. (A) Potencial de eletrodeposição (E). (B) Tempo de eletrodeposição. (C) Concentração de óxido de grafeno (C <sub>GO</sub> ). (D) Concentração de sulfato de sódio (C <sub>SS</sub> ). .....	81
Figura 25 – Voltamogramas cíclicos do GCE (a) e RGO/GCE (b) na presença de K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 1,0×10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> em KCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....	84
Figura 26 – Diagramas de IES dos GCE (a) e RGO/GCE (b) com as linhas solidas preta (a) e vermelha (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais (A). Circuitos eletroquímicos equivalentes utilizados para ajustar os diagramas de IES (C). .....	86
Figura 27 – Imagens de SEM do GCE sem modificação (A), GCE modificado com GO (B), GCE modificado com RGO (RGO/GCE) em (C) baixa e (D) alta resolução.....	88
Figura 28 – Espectros de EDX do (A) eletrodo de carbono vítreo sem modificação e modificado com (B) óxido de grafeno (GO/GCE) e (C) óxido de grafeno reduzido (RGO/GCE).....	90
Figura 29 – Espectros de RAMAN dos eletrodos de carbono vítreo sem modificação (A) e modificados com (B) óxido de grafeno (GO/GCE) e (C) óxido de grafeno reduzido (RGO/GCE).....	98
Figura 30 – Espectros exploratórios dos eletrodos modificados com óxido de grafeno (GO/GCE) e óxido de grafeno reduzido (RGO/GCE). .....	91
Figura 31 – Espectros de alta resolução de XPS das regiões de O 1s e C 1s com suas deconvoluções para o GO/GCE e RGO/GCE. ....	93

Figura 32 – Voltamogramas cíclicos de nitrato de prata $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de (a) nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , (b) ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , e (c) nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1} + \text{ácido nítrico } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de $10 \text{ mV s}^{-1}$ .....	99
Figura 33 – Voltamogramas cíclicos do RGO/GCE contendo AgNPs em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b) com velocidade de varredura de $100 \text{ mV s}^{-1}$ .....	101
Figura 34 – Otimização da eletrodeposição das nanopartículas de prata sobre a superfície do RGO/GCE ( $n=3$ ). Curvas da resposta electrocatalítica de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição, (C) composição do eletrólito suporte contendo ácido nítrico (-■-) e nitrato de sódio (-●-), e (D) concentração de nitrato de prata ( $C_{\text{AgNO}_3}$ ). .....	103
Figura 35 – (A) Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das AgNPs sobre a superfície RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de $100 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) 1º ciclo, (b) 3º ciclo, (c) 5º ciclo, (d) 10º ciclo, (e) 13º ciclo e (f) 15º ciclo no intervalo de potencial de 0,40 a 0,90 V. (B) 15º voltamograma ciclo da oxidação das AgNPs.....	105
Figura 36 – Voltamograma cíclico do estudo de velocidade de varredura no intervalo de 10 a $700 \text{ mV s}^{-1}$ do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .....	106
Figura 37 – Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{0,5}$ ) nas correntes de picos anódicos e catódicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .....	107
Figura 38 – Correlação correspondente do potencial de pico ( $E_{A4}$ ) em função do logaritmo da velocidade de varredura ( $\text{Log } v$ ) em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .....	109
Figura 39 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e AgNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas azul (a) e preta (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais (A). (B) Circuito electroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de IES.....	110
Figura 40 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE e (C) AgNPs-RGO/GCE. Histograma da distribuição das AgNPs na superfície do RGO/GCE (D).....	111

Figura 41 – Espectro de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata (AgNPs-RGO/GCE). .....	112
Figura 42 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata (AgNPs-RGO/GCE). .....	113
Figura 43 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Ag 3d com suas deconvoluções para o AgNPs-RGO/GCE. .	114
Figura 44 – Voltamogramas cíclicos de (A) alanina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (B) ácido aspártico $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (C) ácido glutâmico $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> , (D) glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> e leucina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> em solução de NaOH $0,10$ mol L <sup>-1</sup> (curvas vermelhas) sobre a superfície do AgNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de $100$ mV s <sup>-1</sup> .....	116
Figura 45 – Voltamogramas cíclicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10$ mol L <sup>-1</sup> na (a) ausência e presença de glicina $5,0 \times 10^{-4}$ (b), $7,5 \times 10^{-4}$ (c), $1,0 \times 10^{-3}$ (d), $2,5 \times 10^{-3}$ (e), $5,0 \times 10^{-3}$ (f), (g) $7,5 \times 10^{-3}$ (g) e $1,0 \times 10^{-2}$ mol L <sup>-1</sup> (h) com velocidade de varredura de $100$ mV s <sup>-1</sup> . Inserido: Dependência da corrente de pico anódico em função da concentração de glicina.....	117
Figura 46 – Curva de Tafel do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10$ mol L <sup>-1</sup> na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> com velocidade de varredura de $10$ mV s <sup>-1</sup> . .....	118
Figura 47 – Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{0,5}$ ) nas correntes de picos anódicos dos aminoácidos $1,0 \times 10^{-3}$ em solução de NaOH $0,10$ mol . ....	119
Figura 48 – (A) Amperogramas de duplo salto do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10$ mol L <sup>-1</sup> com diferentes concentrações de leucina: (a) $0,0$ , (b) $5,0 \times 10^{-4}$ (c) $7,5 \times 10^{-4}$ , (d) $1,0 \times 10^{-3}$ e (e) $2,5 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> . Os saltos de potencial foram $0,90$ V para oxidação e $0,50$ V para redução. (B) Inserido: Dependência da $I_{cat}/I_d$ em função do $Tempo^{0,5}$ derivado a partir dos dados da curva b.....	121
Figura 49 – Estudo do potencial de oxidação dos aminoácidos glicina (a), alanina (b), ácido aspártico (c), ácido glutâmico (d) e leucina (e) em solução de NaOH $0,10$ mol L <sup>-1</sup> através da amperometria utilizando o AgNPs-RGO/GCE (n= 3)..	122

- Figura 50 – (A) Amperogramas obtidos para adições sucessivas de alanina (a) e glicina (b) em solução de NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  sob agitação utilizando o AgNPs-RGO/GCE com potencial de detecção de  $0,90 \text{ V}$ . (B) Inserido: Curvas analíticas de alanina (a) e glicina (b) obtidas a partir dos amperogramas (A)... 123
- Figura 51 – (A) Voltamograma cíclico de uma solução de sulfato de níquel  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em sulfato de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Inserido: Ampliação do voltamograma..... 132
- Figura 52 – Otimização da eletrodeposição das NiNPs na superfície do RGO/GCE ( $n=3$ ). Curvas do excesso superficial ( $\Gamma$ , -■-) e as respostas eletrocatalíticas ( $\Delta I$ , -●-) das modificações na presença de glicina  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição e (C) concentração de sulfato de níquel ( $C_{\text{NiSO}_4}$ ). ..... 134
- Figura 53 – Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de glicina  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  empregando um NiNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 135
- Figura 54 – Voltamograma cíclico do NiNPs-RGO/GCE em NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 137
- Figura 55 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da passivação do NiNPs-RGO/GCE em NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ : (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 15º Ciclo; (f) 20º Ciclo; (g) 25º Ciclo; e (h) 30º Ciclo. .... 138
- Figura 56 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e NiNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas vermelha (a) e preta (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais. (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de IES. .... 140
- Figura 57 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE, RGO/GCE modificado com nanopartículas metálicas (NiMNPs) de níquel em (D) baixa e (E) alta resolução, e RGO/GCE modificado com nanopartículas de níquel oxidadas (NiNPs) em (F) baixa e (G) alta resolução. .... 141
- Figura 58 – Histogramas apresentando as destruições das (A) NiMNPs e (B) NiNPs sobre a superfície do RGO/GCE..... 142



Figura 59 – Espectros de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo (A) NiMNPs e (D) NiNPs.....	142
Figura 60 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo (A) NiMNPs e (D) NiNPs.....	143
Figura 61 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Ni 2p <sup>3</sup> com suas deconvoluções para o NiNPs-RGO/GCE...	144
Figura 62 – Imagens de (A) TEM e (B) imagens HRTEM do composto NiNPs/RGO, (C) imagem ampliada da área quadrada e (D) padrão de difração cristalina de uma NiNPs.....	146
Figura 63 – Voltamogramas cíclicos obtidos dos (a) GCE sem modificação, (b) NiNPs/GCE, (c) RGO/GCE e (d) NiNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> .....	147
Figura 64 – Voltamogramas cíclicos na ausência (curvas vermelhas) e na presença de alanina (A), leucina (B), glicina (C), ácido glutâmico (D) e ácido aspártico (E) em soluções de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> sobre a superfície do NiNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> e aminoácidos nas concentrações de 5,0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	148
Figura 65 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura do ácido aspártico em NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> . Efeito da (B) velocidade de varredura (v) e (C) raiz quadrada da velocidade de varredura(v <sup>0,5</sup> ) nas correntes de pico anódico e catódico. ....	150
Figura 66 – Efeito do potencial aplicado (n= 3) na resposta amperométrica dos aminoácidos (a) glicina (b) alanina (c) ácido aspártico (d) ácido glutâmico e (e) leucina em solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> . ....	152
Figura 67 – Resposta amperométrica da glicina 1,0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> em NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> por um período de 1000 s com potencial de detecção de 0,55 V e agitação de 1000 rpm.....	153
Figura 68 – Sequência de pulso aplicada na detecção amperométrica pulsada de aminoácidos. ....	154
Figura 69 – Cromatograma de uma mistura de alanina (1), glicina (2) e leucina (3) 5,0×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	155
Figura 70 – Cromatograma de uma mistura de ácido glutâmico (1) e ácido aspártico (2) 2,5×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	157

Figura 71 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:100 com água ultrapura. Picos: alanina (1), glicina (2) e leucina (3). .....	160
Figura 72 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:10 com água ultrapura. Pico: ácido aspártico (1). .....	161
Figura 73 – Voltamograma cíclico de uma solução de sulfato de cobre $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de $25 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	16969
Figura 74 – Otimização da eletrodeposição das CuNPs na superfície do RGO/GCE (n=3). Curvas do excesso superficial ( $\Gamma$ , -■-) e das respostas eletrocatalíticas ( $\Delta I$ , -●-) das modificações na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição e (C) concentração de sulfato de cobre ( $C_{\text{CuSO}_4}$ ). .....	171
Figura 75 – Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o CuNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de $100 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	172
Figura 76 – Voltamograma cíclico do CuNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de $25 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	174
Figura 77 - Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das nanopartículas de cobre na superfície do RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de $50 \text{ mV s}^{-1}$ . .....	175
Figura 78 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e CuNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas preta (a) e vermelha (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais. (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de EIS. ....	176
Figura 79 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE e (C) CuNPs-RGO/GCE. Histograma da distribuição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE (D). .....	177
Figura 80 – Espectros de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo CuNPs. ....	178
Figura 81 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo CuNPs. ....	179
Figura 82 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Cu 2p <sup>3</sup> com suas deconvoluções para o CuNPs-RGO/GCE. ....	180

Figura 83 – Imagens de (A) TEM e (B) imagens HRTEM do composto CuNPs/RGO, (C) imagem ampliada da área quadrada e (D) padrão de difração cristalina de uma CuNPs. ....	182
Figura 84 – Voltamogramas cíclicos na ausência (curvas vermelhas) e na presença de alanina (A), glicina (B), leucina (C), lisina (D) e serina (E) em soluções de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> sobre a superfície do CuNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> e aminoácidos nas concentrações de 1,0×10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> .....	184
Figura 85 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura da alanina 5,0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> em NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> . Efeito da (B) velocidade de varredura (v) e (C) raiz quadrada da velocidade de varredura(v <sup>0,5</sup> ) nas correntes de pico anódico. ....	185
Figura 86 – Sequência de pulso aplicada na detecção amperométrica pulsada dos aminoácidos. ....	187
Figura 87 – Efeito do potencial aplicado (n= 3) na resposta amperométrica dos aminoácidos (a) lisina, (b) alanina, (c) glicina, (d) leucina e (e) serina em solução alcalina.....	188
Figura 88 – Efeito da velocidade da fase móvel sobre os tempos de retenções dos aminoácidos. ....	190
Figura 89 – Cromatograma de uma mistura 5,0×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> de lisina (1), alanina (2), glicina (3), leucina (4) e serina (5).....	190
Figura 90 – Curvas analíticas para detecção dos aminoácidos lisina (A), alanina (B), glicina (C), leucina (D) e serina (E) utilizando o CuNPS-RGO/GCE.....	192
Figura 91 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:100 com água ultrapura (a) e padrões de aminoácidos 1,0×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> (b). Picos: lisina (1), alanina (2), glicina (3), leucina (4) e serina (5).....	194
Figura 92 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:1000 com água ultrapura (a) e padrão de alanina 5,0×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> (b). Pico: alanina (1).....	195

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 1 (Figura 5). ....	61
Tabela 2 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com os eletrodos modificados com o método 2 (Figuras 8 e 9). ....	63
Tabela 3 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 3 com NiNPs eletrodepositadas nos tempos de 30, 50 e 100 s (Figuras 12 a 14). ....	68
Tabela 4 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 4 em Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,10 mol L <sup>-1</sup> . ....	77
Tabela 5 – Parâmetros da resposta eletroquímica da glicina em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 5. ....	79
Tabela 6 – Correntes e potenciais de picos anódico e catódico para o par redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-/3-</sup> (n= 3) obtidos sobre as superfícies dos eletrodos modificado com RGO e não modificado. ....	84
Tabela 7 – Valores dos elementos do circuito equivalente da Figura 26 (B) pela simulação dos espectros de IES da Figura 26 (A). ....	87
Tabela 8 – Potenciais e correntes de picos anódicos (PA) e catódicos (PC) do AgNPs-RGO/GCE na ausência e presença de glicina 1,0×10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> em solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> (Figura 33). ....	102
Tabela 9 – Parâmetros obtidos a partir das correlações lineares obtidas na Figura 37. ....	107
Tabela 10 – Valores do coeficiente de transferência eletrônica ( $\alpha$ ), constante de velocidade eletrocatalítica ( $k_{cat}$ ) e coeficiente de difusão (D) para os aminoácidos estudados com o AgNPs-RGO/GCE. ....	118
Tabela 11 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura. ....	120
Tabela 12 – Parâmetros analíticos obtidos para a oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos em uma solução de NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> sob agitação a partir da técnica de amperometria utilizando o AgNPs-RGO/GCE com potencial de detecção de 0,90 V. ....	124

Tabela 13 – Parâmetros eletroquímicos dos voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs-RGO/GCE em NaOH 0,10 mol L <sup>-1</sup> com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> . .....	139
Tabela 14 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre as correntes de pico anódico (I <sub>pa</sub> ) e catódico (I <sub>pc</sub> ) com a velocidade de varredura (v). .....	151
Tabela 15 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre as correntes de pico anódico (I <sub>pa</sub> ) e catódico (I <sub>pc</sub> ) com a raiz quadrada da velocidade de varredura (v <sup>0,5</sup> ). .....	151
Tabela 16 – Efeito do hidróxido e acetato de sódio no tempo de retenção (t <sub>r</sub> ) e fator de retenção (k) dos ácidos aspártico e glutâmico. ....	156
Tabela 17 – Parâmetros cromatográficos para a separação de aminoácidos. ....	158
Tabela 18 – Desempenho analítico do NiNPs-RGO/GCE utilizado como detector amperométrico na detecção dos aminoácidos (n= 3). ....	159
Tabela 19 – Teores de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar. ....	162
Tabela 20 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre as correntes de pico anódico (I <sub>pa</sub> ) e catódico (I <sub>pc</sub> ) com a raiz quadrada da velocidade de varredura (v <sup>0,5</sup> ). .....	186
Tabela 21 – Efeito do hidróxido no tempo de retenção (t <sub>r</sub> ) e fator de retenção (k) dos aminoácidos. ....	189
Tabela 22 – Parâmetros cromatográficos para a separação de aminoácidos. ....	191
Tabela 23 – Desempenho analítico do CuNPs-RGO/GCE empregado como detector amperométrico na detecção dos aminoácidos (n= 3). ....	193
Tabela 24 – Teores de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar. ....	194

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Forma predominante dos aminoácidos em diferentes meios. ....	55
Esquema 2 – Estrutura molecular dos aminoácidos. ....	56
Esquema 3 – Célula eletroquímica Wall-Jet utilizada nas medidas cromatográficas. ....	130
Esquema 4 – Estrutura molecular dos aminoácidos estudados utilizando o CuNPs-RGO/GCE. ....	183

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$A_e$	Área superficial efetiva
Ag/AgCl	Eletrodo de prata/cloreto de prata
AgNPs-RGO/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BDD	Eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês <i>boron-doped diamond electrode</i> )
$C$	Concentração
CILE	Eletrodo de carbono contendo líquido iônico (do inglês <i>Carbon Ionic Liquid Electrode</i> )
CMEs	Eletrodos quimicamente modificados (do inglês <i>Chemically modified electrodes</i> )
CNT	Nanotubos de carbono (do inglês <i>Carbon Nanotubes</i> )
CoNPs	Nanopartículas de cobalto
CPE	Elemento de fase constante
CuNPs	Nanopartículas de óxido de cobre
CuNPs-RGO/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de cobre
CV	Voltametria cíclica (do inglês <i>Cyclic voltammetry</i> )
$C_v$	Coefficiente de variação
$D$	Coefficiente de difusão
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i> )
$E$	Potencial
EC'	Reação eletroquímica seguida de uma reação química
ECD	Detecção eletroquímica (do inglês <i>Electrochemical Detection</i> )
EDX	Espectroscopia de energia dispersiva de raio X (do inglês <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i> )
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> )
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico

$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
FeNPs	Nanopartículas de ferro
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês <i>Flow Injection Analysis</i> )
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês <i>Glassy Carbon Electrode</i> )
GO	Óxido de grafeno (do inglês <i>Graphene Oxide</i> )
GO/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno
GR	Grafeno
HPAEC	Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Anion-Exchange Chromatography</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HRTEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (do inglês <i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i> )
ID/IG	Razão entre as intensidades dos picos D e G
$I_p$	Corrente de pico
$I_{pa}$	Corrente de pico anódico
$I_{pa}/I_{pc}$	Razão entre as correntes de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ )
$I_{pc}$	Corrente de pico catódico
$k$	Fator de retenção
$k_{app}$	Constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente
$k_{cat}$	Constante de velocidade eletrocatalítica
$k_s$	Velocidade de transferência de carga aparente
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i> )
Log j	Logaritmo da densidade de corrente
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of Quantitation</i> )
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês <i>Multiwall Carbon Nanotubes</i> )
$n$	Número de elétrons transferidos
N	Número de pratos teóricos
NBu <sub>4</sub> BF <sub>4</sub>	Tetrafluoroborato de tetrametilamônio
NiMNPs	Nanopartículas metálicas de níquel
NiNPs	Nanopartículas de óxido de níquel



NiNPs-RGO/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de níquel
NPs	Nanopartículas
PA	Pico anódico
PAD	Detecção amperométrica pulsada
PC	Pico catódico
Q	Carga
R	Constante física dos gases
$R_{ct}$	Resistência de transferência de elétrons
RGO	Óxido de grafeno reduzido (do inglês <i>Reduced Graphene Oxide</i> )
RGO/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido
$R_s$	Resistência da solução
$R_s$	Resolução
RSD	Desvio padrão relativo
S/N	Razão sinal/ruído
SD	Desvio padrão
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i> )
T	Temperatura
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TiO <sub>2</sub>	Óxido de titânio
$t_m$	Tempo morto
$t_r$	Tempo de retenção
$t_r'$	Tempo de retenção ajustado
UV-VIS	Ultravioleta-visível
W	Resistência de Warburg
$\chi^2$	Qui-quadrado
XPS	Espectroscopia de fotoemissão de raios X (do inglês <i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i> )
$\alpha$	Coefficiente de transferência de elétrons
$\alpha$	Fator de separação

$\alpha_s$	Coeficiente de transferência eletrônica
$\Gamma$	Excesso superficial
$\Delta E_p$	Potencial de separação entre os picos anódico e catódico
$\Delta I$	Diferença da corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco
$v$	Velocidade de varredura
$v^{0,5}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>1.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR</b> .....	37
<b>1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA</b> .....	38
<b>1.2.1 Determinação cromatográfica de aminoácidos com detecção eletroquímica</b> .....	39
<b>1.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO</b>	
<b>ELETROQUÍMICA DE AMINOÁCIDOS</b> .....	40
<b>1.4 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DETERMINAÇÃO DE</b>	
<b>AMINOÁCIDOS</b> .....	41
1.4.1 Eletrodos não modificados .....	41
1.4.2 Eletrodos quimicamente modificados .....	43
1.4.2.1 <i>Eletrodos quimicamente modificados com grafeno</i> .....	44
1.4.2.2 <i>Eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas metálicas</i> .....	44
<b>CAPÍTULO II OBJETIVOS</b> .....	47
<b>2.1 OBJETIVOS GERAIS</b> .....	47
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	47
<b>CAPÍTULO III MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO</b>	
<b>COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO</b> .....	48
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	48
<b>3.2 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	51
<b>3.2.1 Reagentes e soluções</b> .....	51
<b>3.2.2 Instrumentação</b> .....	51
<b>3.2.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo</b> .....	52
<b>3.2.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido</b>	
<b>eletroquimicamente</b> .....	52
3.2.4.1 <i>Método 1</i> .....	52
3.2.4.2 <i>Método 2</i> .....	53
3.2.4.3 <i>Método 3</i> .....	53
3.2.4.4 <i>Método 4</i> .....	53
3.2.4.5 <i>Método 5</i> .....	54
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>3.3.1 Comportamento eletroquímico dos aminoácidos em eletrodo de carbono vítreo</b> ...	55
<b>3.3.2 Comportamento eletroquímico do óxido de grafeno</b> .....	57

<b>3.3.3 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente</b> .....	58
3.3.3.1 <i>Método 1</i> .....	59
3.3.3.2 <i>Método 2</i> .....	61
3.3.3.3 <i>Método 3</i> .....	66
3.3.3.4 <i>Método 4</i> .....	72
3.3.3.5 <i>Método 5</i> .....	77
<b>3.3.4 Modificação eletroquímica da superfície do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido</b> .....	79
<b>3.3.5 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido</b> .....	83
<b>3.3.6 Caracterização da superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido</b> .....	88
<b>3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	94
<b>CAPÍTULO IV OXIDAÇÃO ELETROCATALÍTICA DE AMINOÁCIDOS EM ELETRODO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA</b> .....	95
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	95
<b>4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	97
4.2.1 Soluções e reagentes.....	97
4.2.2 Instrumentação .....	97
<b>4.2.3 Modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata</b> .....	97
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>4.3.1 Comportamento eletroquímico da prata sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido</b> .....	99
<b>4.3.2 Otimização da eletrodeposição das nanopartículas de prata sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido</b> .....	100
<b>4.3.3 Comportamento eletroquímico da superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata</b> .....	104
<b>4.3.4 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata</b> .....	109
<b>4.3.5 Caracterização da superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata</b> .....	111

4.3.6 Oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos na superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata ...	115
4.3.7 Respostas amperométrica dos aminoácidos sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata ...	121
4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....	125
<b>CAPÍTULO V DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE NÍQUEL .....</b>	
	126
5.1 INTRODUÇÃO .....	126
5.2 PARTE EXPERIMENTAL .....	129
5.2.1 Reagentes e soluções .....	129
5.2.2 Instrumentação .....	129
5.2.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo .....	130
5.2.4 Modificação eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo contendo óxido de grafeno com nanopartículas de níquel .....	130
5.2.5 Condições cromatográficas .....	131
5.2.6 Preparação da amostra .....	131
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	132
5.3.1 Comportamento eletroquímico do níquel sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido .....	132
5.3.2 Otimização da eletrodeposição de níquel .....	133
5.3.3 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel .....	139
5.3.4 Caracterização superficial do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel .....	140
5.3.5 Estudo do comportamento dos aminoácidos em solução alcalina .....	146
5.3.6 Efeito do potencial aplicado e estabilidade do eletrodo .....	152
5.3.7 Otimização da separação cromatográfica .....	153
5.3.8 Determinação de aminoácidos em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar .....	160
5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....	163

<b>CAPÍTULO VI DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE COBRE .....</b>	<b>164</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>164</b>
<b>6.2 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>166</b>
<b>6.2.1 Reagentes e soluções .....</b>	<b>166</b>
<b>6.2.2 Instrumentação .....</b>	<b>166</b>
<b>6.2.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo .....</b>	<b>166</b>
<b>6.2.4 Modificação eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo contendo óxido de grafeno com nanopartículas de cobre .....</b>	<b>167</b>
<b>6.2.5 Condições cromatográficas .....</b>	<b>167</b>
<b>6.2.6 Preparação da amostra .....</b>	<b>167</b>
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>169</b>
<b>6.3.1 Comportamento eletroquímico do cobre sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido .....</b>	<b>169</b>
<b>6.3.2 Otimização da eletrodeposição de cobre .....</b>	<b>170</b>
<b>6.3.3 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de cobre .....</b>	<b>175</b>
<b>6.3.4 Caracterização superficial do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de cobre .....</b>	<b>177</b>
<b>6.3.5 Estudo do comportamento dos aminoácidos em solução alcalina.....</b>	<b>182</b>
<b>6.3.6 Otimização da separação cromatográfica .....</b>	<b>186</b>
<b>6.3.7 Determinação de aminoácidos em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar .....</b>	<b>193</b>
<b>6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	<b>196</b>
<b>CAPÍTULO VII CONCLUSÕES .....</b>	<b>197</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>198</b>

## CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

### 1.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

O Sistema Agroindustrial da Cana-de-açúcar é um dos mais antigos e está ligado aos principais eventos históricos. Tem grande importância para o Brasil, este que é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o segundo produtor mundial de etanol, sendo responsável por 20% da produção e 20% das exportações mundiais, além de ser o maior produtor e exportador mundial de açúcar (1-3).

Estima-se que a produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2016/2017 seja aproximadamente 657,2 milhões de toneladas, redução de 1,3% em relação à safra anterior. A produção de açúcar deverá crescer 15,5% devido aos preços mais rentáveis (2). Ainda, calcula-se que o Brasil produzirá 27,8 bilhões de litros de etanol, redução de 8,7% referente à safra anterior devido à preferência pela produção de açúcar. Essa produção deverá continuar concentrada na Região Centro-Sul, representando 94,2% do total produzido no país, estando concentrada principalmente no estado de São Paulo (49,3%) (2).

Nos últimos anos, tem-se observado um grande aumento na produção mundial de etanol para combustível (etanol hidratado e anidro) e para usos farmacêutico, industrial e bebidas. Entretanto, cerca de 9 a 14 litros de vinhaça, coproduto gerado na produção de etanol, é produzido para cada litro de etanol obtido, o qual corresponde à produção entre 700 e 900 litros de vinhaça a cada tonelada de cana-de-açúcar processada (4,5).

A vinhaça, coproduto final da fabricação do álcool etílico por via fermentativa, é também conhecida por vinhoto, restilo, caldo ou garapão, dependendo da região. No entanto, o grande problema associado a este efluente é sua força poluente, cerca de cem vezes a do esgoto doméstico (1). A vinhaça apresenta pH entre 3,5 e 5,0, cor castanho-escuro e elevada demanda química de oxigênio (DQO) que varia entre 50 e 150 g L<sup>-1</sup> (4).

A composição da vinhaça varia de acordo com a constituição da matéria-prima, preparo do mosto, fermentação adotada, condução da fermentação alcoólica, tipo de levedura utilizada, método de destilação e tipo de flegma separado (6).

A vinhaça apresenta em sua composição uma mistura de compostos orgânicos e inorgânicos (7). Dentre os seus principais componentes, pode-se destacar: nitrogênio, fósforo, potássio, ácido acético, ácido lático, glicerol, açúcares e sais minerais. Assim, devido ao alto valor fertilizante, geralmente é convertida em adubo. Entretanto, quando descartada no meio

ambiente, pode causar graves problemas ambientais devido à alta concentração de matéria orgânica (8).

O nitrogênio presente na vinhaça de cana-de-açúcar é proveniente dos diversos compostos nitrogenados existentes neste efluente, tais como os aminoácidos aspártico, glutâmico, alanina, leucina, glicina, valina, fenilalanina, prolina e triptofano (9).

A caracterização da composição química dos compostos nitrogenados presentes na vinhaça é geralmente expressa em termos de nitrogênio orgânico (10), nitrogênio amoniacal (10,11), nitrogênio inorgânico (10-12), nitrogênio total de Kjeldahl (5,13) e nitrogênio total (10,11,14), os quais não discriminam os compostos nitrogenados. A presença de aminoácidos foi detectada em vinhaça utilizando um analisador de aminoácidos após separação cromatográfica líquida (9). Os aminoácidos alanina e  $\gamma$ -aminobutírico foram detectados em vinhaça por cromatografia gasosa com detectores de ionização de chama e espectrométrico de massas, respectivamente (15).

Portanto, o desenvolvimento de métodos para determinação da composição química da vinhaça é de extrema importância para agregar maior valorização a esse coproduto industrial, no intuito de avaliar novos processos de aplicação, produção ou extração de compostos nitrogenados a partir do vinhoto. Assim, é de fundamental importância a caracterização exata da composição química desse resíduo.

## 1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise de aminoácidos é de interesse contínuo devido ao importante papel que desempenham em diversos processos biológicos, tais como a síntese de proteínas e vias metabólicas. Até agora, uma grande variedade de métodos para separar e detectar os aminoácidos específicos em amostras de interesse tem sido desenvolvida. No entanto, uma vez que a maioria dos aminoácidos não possui grandes cadeias laterais hidrofóbicas e cromóforos naturais, fluoróforos ou grupos eletroativos para a detecção fotométrica, fluorométrica ou amperométrica, respectivamente, a maioria dos métodos desenvolvidos até o presente utiliza algum tipo de processo de derivatização pré- ou pós-coluna, a fim de melhorar a detecção ou a separação cromatográfica (16).

Entre as técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) configura-se como um método capaz de efetuar a separação, identificação e quantificação de componentes de uma mistura, em



escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade, sendo largamente utilizada como técnica analítica qualitativa e quantitativa (17,18).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Este método está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre as fases móvel e estacionária torna a cromatografia uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (19,20). Avanços recentes nas técnicas de detecção eletroquímica (ECD, do inglês *Electrochemical Detection*) acopladas com a HPLC oferecem uma das mais promissoras soluções para o problema de desenvolvimento de um detector cromatográfico. Isso se deve ao fato de as detecções eletroquímicas proporcionarem boa sensibilidade, seletividade e amplo intervalo linear de resposta. É importante destacar que, neste tipo de detecção, a amostra tem que ser constituída de íons ou compostos eletroativos que sofram oxidação ou redução.

A classificação dos detectores eletroquímicos engloba todos os sistemas de detecção que utilizam a medição de uma propriedade elétrica para monitorar um analito eluído da coluna cromatográfica. Essas propriedades têm sido usadas para formar a base de uma variedade de técnicas de ECD, destacando-se os métodos que utilizam o monitoramento da corrente (detector amperométrico) (21).

O detector amperométrico é um dos detectores mais importantes entre os ECDs. Nele, um determinado potencial é aplicado entre um eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar; e se um analito for eletroquimicamente ativo, cujo potencial seja alcançado com o potencial aplicado, irá ocorrer a redução ou oxidação (22). As aplicações mais importantes estão nas áreas farmacêutica, alimentar, bebidas, neurociência, análises clínicas, bioenergia e meio ambiente. Portanto, a ECD é uma técnica analítica versátil para determinação de analitos eletroativos e iônicos, além de oferecer vantagens superiores em relação a outros detectores comumente utilizados na HPLC.

### **1.2.1 Determinação cromatográfica de aminoácidos com detecção eletroquímica**

A detecção direta de aminoácidos sem realizar derivatização é preferida, quando possível, não apenas por conveniência, flexibilidade, simplicidade e precisão, mas também para evitar os problemas apresentados por meio de processos de derivatização, tais como a repetibilidade, instabilidade da derivatização, reações secundárias e as interferências dos reagentes (16). Logo, há necessidade e demanda por novos detectores eletroquímicos capazes

de promoverem a detecção direta dos aminoácidos com alta sensibilidade e seletividade. A detecção eletroquímica oferece vantagens de instrumentação simples, sensibilidade inerente e extrema seletividade para uso em HPLC. No entanto, o número de aminoácidos que pode ser detectado por amperometria a potencial constante com eletrodos à base de carbono convencionais é limitada (16).

A detecção amperométrica de aminoácidos em amostras de urina humana foi realizada empregando um eletrodo de cobre após separação cromatográfica de fase reversa utilizando solução tampão neutra ou alcalina-terrosa de fosfato ou carbonato como fase móvel. O método desenvolvido apresentou limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) entre  $0,8 \times 10^{-6}$  e  $3,6 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> para os aminoácidos estudados (23).

Foi desenvolvido um método empregando uma programação com diversos potenciais para detecção dos aminoácidos por cromatografia iônica. Tal método apresentou intervalo linear de três ordens de grandeza para a maioria dos aminoácidos com LOD de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (24).

Aminoácidos não derivatizados foram detectados e determinados através de um detector de ouro modificado com filme de níquel e cromatografia iônica. A separação cromatográfica empregou eluição isocrática com hidróxido de sódio como fase móvel. O método apresentou faixa linear entre  $0,2 \times 10^{-6}$  a  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, LOD de  $8,0 \times 10^{-8}$  a  $6,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e sensibilidade entre 0,2 e 9,6  $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$  para os analitos estudados (25).

A detecção e determinação de aminoácido sem derivação foi realizada através da utilização de um detector de carbono vítreo modificado com filme de oxihidróxido de cobre após separação cromatográfica iônica isocrática empregando hidróxido de sódio como fase móvel. Os analitos responderam linearmente no intervalo de concentração de  $1,0 \times 10^{-5}$  a  $1,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> com LOD encontrados de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $4,8 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (26).

Aminoácidos e peptídeos foram determinados diretamente através da oxidação dos analitos por amperometria empregando eletrodos de cobre utilizando cromatografia iônica. A separação cromatográfica empregou eluição isocrática com hidróxido de sódio como fase móvel. Os LOD obtidos ficaram na faixa de  $4,0 \times 10^{-8}$  a  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (27).

### **1.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE AMINOÁCIDOS**

A análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) com detecção eletroquímica também é empregada para detecção e quantificação de aminoácidos. O

princípio da FIA é muito simples e baseia-se na inserção de uma alíquota da solução da amostra, a qual sofre dispersão ao ser conduzida através do percurso analítico por uma solução transportadora, que pode ser o próprio reagente, até o detector (28).

Entre os detectores acoplados a FIA, os mais populares são os espectrofotométricos ultravioleta-visível (UV-VIS), fluorescência e eletroquímico. A detecção eletroquímica oferece vantagens sobre a detecção espectrofotométrica quando as espécies de interesse (analitos) não possuem um grupo cromóforo que absorve na região UV-VIS, ou quando as espécies apresentam baixo coeficiente de absorbância molar. Apresenta também vantagens sobre a detecção fluorimétrica de analitos eletroativos que não têm propriedades fluorescentes, porque não necessita da derivatização. Entre as técnicas eletroquímicas empregadas na detecção em fluxo, as mais exploradas são a coulometria e a amperometria devido a vantagens, tais como baixo limite de detecção, seletividade e uso de instrumentação de baixo custo comparado aos empregados na detecção UV e fluorescência. Os detectores amperométricos têm vantagens sobre os coulométricos, a saber: relação sinal/ruído mais satisfatória e configuração mais simples, sendo, por essa razão, mais utilizados (29).

Um eletrodo de carbono impresso foi modificado com nanopartículas de cobre para análise de aminoácidos não derivatizados por FIA. O método desenvolvido em tampão fosfato (pH 8) apresentou linearidade entre  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>  $\mu$ M e LOD entre  $2,4 \times 10^{-8}$  a  $2,7 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (30).

Aminoácidos foram detectados através de eletrodos de carbono vítreos (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*) modificados com nanotubos de carbono (CNT, do inglês *Carbon Nanotubes*) e níquel-CNT (GCE/Ni-CNT) empregando FIA com detecção amperométrica e hidróxido de sódio (NaOH) como eluente. Os aminoácidos obtiveram uma sensibilidade e LOD aproximados de  $0,043 \mu$ A mmol<sup>-1</sup> L e  $2,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> no GCE/Ni, e  $0,150 \mu$ A  $\mu$ mol<sup>-1</sup> L e  $7,4 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> no GCE/Ni-CNT, respectivamente (31).

## 1.4 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

### 1.4.1 Eletrodos não modificados

A oxidação de  $\alpha$ -aminoácidos (alanina, 2-aminobutírico, norvalina, valina, norleucina, leucina, isoleucina e fenilglicina) foi investigada em eletrodos de prata em solução de NaOH

$\sim 0,13 \text{ mol L}^{-1}$  aplicando potencial constante de  $+0,75 \text{ V}$ . Os resultados indicaram que o mecanismo de oxidação dos  $\alpha$ -aminoácidos leva à formação de nitrila e aldeído (32).

Um eletrodo de cobre foi utilizado no estudo da oxidação de vários compostos orgânicos. Os resultados mostraram que o grupo amino dos  $\alpha$ -aminoácidos é oxidado no potencial de  $0,75 \text{ V}$ . Adicionalmente, foi observado que  $\alpha$ -alanina tem potencial de oxidação em  $0,70 \text{ V}$  em solução alcalina (33). Posteriormente, a oxidação de  $\alpha$ -aminoácidos em eletrodos de cobre foi estudada em meio alcalino. Foi observado que os aminoácidos eram adsorvidos em  $-0,90 \text{ V}$  durante a oxidação (34).

$\beta$ -Alanina apresenta um pico de oxidação irreversível em  $+1,2 \text{ V}$  na superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo tetrafluoroborato de tetrametilamônio ( $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ )  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) (35). Utilizando as mesmas condições,  $\alpha$ -alanina apresenta um pico de oxidação irreversível em  $1,23 \text{ V}$ ; não foram observados picos catódicos (36).

O ácido aspártico apresenta um pico anódico irreversível em  $+1,3 \text{ V}$  na superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando CV (37). Em um estudo posterior, foi observado um pico de oxidação em  $1,0 \text{ V}$  na varredura anódica e um pico de redução em  $-0,54 \text{ V}$  na varredura reversa utilizando em meio de tampão fosfato  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8) (38).

O ácido aspártico se comporta eletroquimicamente como uma amina primária (39). Em outro estudo, foi relatado que o ácido aspártico apresenta um pico catódico no potencial  $-0,50 \text{ V}$  e dois picos anódicos nos potenciais  $+1,5$  e  $+1,9 \text{ V}$  em meio ácido (tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5,0) empregando CV. Além disso, as reações redox deste ácido são irreversíveis em GCE (40).

O ácido glutâmico apresenta um pico anódico irreversível em  $+1,4 \text{ V}$  referente à oxidação do grupo amino na superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo  $\text{NBu}_4\text{BF}_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando CV (41). Em meio tampão fosfato (pH 7,0), o ácido glutâmico apresenta um pico de oxidação em  $+1,50 \text{ V}$  com velocidade de varredura em  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (42).

A eletro-oxidação dos aminoácidos alanina e cisteína foi investigada com um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês *Boron-Doped Diamond Electrode*) e GCE utilizando CV (43). A alanina apresentou um ombro nas varreduras direta e inversa em  $+0,95 \text{ V}$  e corrente limite  $0,3 \mu\text{A}$  no eletrodo de BDD, o mesmo comportamento foi obtido no GCE. A cisteína apresentou um pico de oxidação em  $+0,65 \text{ V}$  para ambos os eletrodos, sendo que o pico foi mais definido no BDD.

A glicina foi estudada em eletrodos de platina (Pt100) utilizando CV (44). Um pico anódico irreversível em meio ácido foi identificado no potencial de +0,39 V. Posteriormente, a superfície do GCE foi modificada através da eletropolimerização da glicina por CV, sendo observada a formação de dois picos, um anódico em +1,6 V e outro catódico em -0,60 V, referentes a oxidação e redução da glicina em tampão fosfato (pH 7,0) (45).

#### 1.4.2 Eletrodos quimicamente modificados

Os eletrodos quimicamente modificados (CMEs, do inglês *Chemically Modified Electrodes*) são formados pela modificação da superfície de um eletrodo com um material condutor ou semicondutor alterando as propriedades eletroquímicas, óticas, elétricas, transporte e outras propriedades desejáveis da superfície do substrato (46–48).

Os CMEs possuem algumas vantagens sobre eletrodos não modificados, contribuindo no desenvolvimento de inúmeras aplicações eletroanalíticas, dentre as quais se incluem electrocatálise e sensores eletroquímicos. As propriedades dos eletrodos modificados dependem da formação e das características do filme formado na superfície do eletrodo. Uma das principais vantagens dos CMEs é a sua capacidade de catalisar a oxidação de algumas espécies que exibem elevado potencial em eletrodos não modificados, aumentando, assim, sua sensibilidade e seletividade (49).

Alguns substratos são mais adequados para a modificação superficial, como os substratos de metais condutores (ouro, prata e platina) e eletrodos de carbono. Uma das etapas mais importantes na modificação dos eletrodos é o pré-tratamento da superfície do substrato, pois o comportamento eletroquímico é extremamente dependente de pequenas variações das propriedades do substrato, tais como cristalinidade, rugosidade e os grupos funcionais químicos superficiais (46).

Os CMEs podem ser operados amperometricamente (ou voltametricamente) e por potenciometria, no entanto, eles são geralmente utilizados como sensores amperométricos. A resposta reflete dois componentes separados: um eletroquímico, usualmente controlado pelo potencial, e um produto químico especial dado pela reação de um modificador químico confinado. Assim, um eletrodo quimicamente modificado apresenta melhores propriedades sobre seletividade e sensibilidade (47,50).

As recentes tendências publicadas sobre o uso de CMEs em sistemas de detecção eletroquímica utilizados nas análises por FIA ou HPLC têm como objetivo indicar as abordagens mais promissoras para aplicações dos CMEs, além de buscar novos materiais de

eletrodo que podem ser operados em potencial aplicado constante sem perda de atividade do eletrodo (51).

#### *1.4.2.1 Eletrodos quimicamente modificados com grafeno*

Dentre os diversos tipos de materiais utilizados na modificação de eletrodos, o grafeno tem atraído muita atenção devido a suas características ópticas, químicas e eletrônicas únicas, além das várias aplicações em nanomateriais, nanotecnologia e sensores eletroquímicos (52,53).

O grafeno é basicamente uma monocamada bidimensional do grafite que possui uma grande área superficial específica que permite a imobilização de grandes quantidades de substâncias, incluindo uma ampla gama de metais, nanopartículas e biomoléculas. Cada átomo na estrutura do grafeno é um átomo da superfície, melhorando a interação molecular e o transporte de elétrons neste material que é altamente sensível às moléculas absorvidas (54).

Devido a essas características, o grafeno possui a habilidade de promover reações de transferência eletrônica quando utilizado como eletrodo, o que possibilita uma alternativa frente aos CNT (55). Além disso, diferentemente da estrutura curvada do nanotubo de carbono, o grafeno possui uma estrutura bidimensional plana e aberta. Portanto, ambos os lados da folha de grafeno podem ser utilizados como suporte para catálise (53).

Por outro lado, as nanopartículas (NPs) de metal têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades químicas e físicas extraordinárias que, em grande parte, diferem dos seus materiais a granel. Ainda, esses materiais possuem propriedades únicas, tais como maior transporte de massa e melhor relação sinal-ruído, podendo, muitas vezes, ser vantajosas para as técnicas eletroanalíticas (56–58).

#### *1.4.2.2 Eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas metálicas*

As NPs podem exibir quatro vantagens exclusivas sobre macroelectrodos, quando usadas para eletroanálise: melhoria do transporte de massa, catálise, elevada área superfície e eficaz controle sobre o microambiente do eletrodo (57). A síntese de vários materiais em nanoescala, como NPs, nanofios de ouro, platina, níquel, entre outros, por técnicas de eletrodeposição (potenciostáticas e galvanostáticas) tem sido publicada. Além disso, o comportamento eletroquímico das nanopartículas depositadas em vários substratos tem sido investigado através de técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria (59).

Triptofano foi determinado simultaneamente com ácido úrico e ácido ascórbico através de um eletrodo de pasta de carbono modificado com zeólita dopada com ferro (III) por voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) em solução tampão fosfato (pH 3,5). O triptofano apresentou pico de oxidação irreversível em 0,90 V utilizando CV. O método desenvolvido apresentou faixa linear de  $2,0 \times 10^{-7}$  a  $1,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e LOD de  $6,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (60).

A oxidação electrocatalítica do triptofano foi investigada com um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *Multiwall Carbon Nanotubes*) e complexo de salofeno de cobalto (II) utilizando CV e DPV. O triptofano em solução tampão acetato 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,0) exibiu um pico anódico irreversível em +0,94 V. Utilizando DPV foi obtida faixa linear de  $5,0 \times 10^{-7}$  a  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, LOD de  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> e sensibilidade  $8,3 \times 10^5$  μA mol<sup>-1</sup> L (61).

Foi estudado o comportamento electroquímico de dezenove aminoácidos. No entanto, apenas seis foram selecionados para detecção com eletrodo de pasta de carbono modificado com MWCNT e óxido de cobre (I), devido às altas correntes de oxidação resultantes em meio de tampão alcalino. A histidina não apresentou electroatividade no eletrodo de pasta de carbono sem modificação em solução tampão fosfato, contudo, apresentou corrente anódica em +0,70 V no eletrodo de pasta de carbono modificado. Os aminoácidos apresentaram faixa linear entre  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> com LOD entre  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> utilizando electroforese capilar (62).

Foi desenvolvido um sensor electroquímico para detecção de aminoácidos e albumina com base em materiais compósitos contendo CNT e micropartículas de níquel. O sensor apresentou sensibilidade entre 19,8 e  $28,8 \times 10^2$  μA mol<sup>-1</sup> L e LOD na faixa de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> (63).

O comportamento electroquímico do triptofano (1 mmol L<sup>-1</sup>) foi estudado em eletrodo de carbono contendo líquido iônico (CILE, do inglês *Carbon Ionic Liquid Electrode*) modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) em solução tampão fosfato. Foi observado um pico anódico do triptofano em +0,79 V no CILE; nos CPE, GCE e no AuNPs/CILE, o pico de oxidação foi observado em +0,83, +0,87 V e +0,57 V, respectivamente. O método desenvolvido com a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) apresentou uma faixa linear entre  $5,0 \times 10^{-6}$  e  $9,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e LOD de  $4,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (64).

Um GCE modificado com filme de óxido/hidróxido de cobre foi desenvolvido e a electroatividade de várias moléculas orgânicas em meio alcalino foi avaliada. Entre essas

moléculas, foram encontrados alguns aminoácidos, os quais apresentaram picos de oxidação em +0,50 V. A faixa linear de concentração dos aminoácidos ficou compreendida entre  $2,0 \times 10^{-4}$  e  $1,6 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> (65).

Alguns aminoácidos foram detectados amperometricamente utilizando um GCE modificado com nanopartículas de óxido de níquel (GCE/NiNPs). Em GCE sem modificação, a serina não apresentou eletroatividade no intervalo de potencial estudado. No GCE/NiNPs, a serina apresentou um processo de oxidação em +0,40 V. Os mesmos resultados foram observados para glicina e alanina a (66).

Foi desenvolvido um sensor para determinar leucina em amostras biológica e farmacêutica. O comportamento eletroquímico deste aminoácido em perclorato de potássio (1,0 mol L<sup>-1</sup>) foi investigado utilizando o GCE, GCE/MWCNT e GCE/MWCNT/nanopartículas de ferro (GCE/MWCNT/FeNPs). Leucina apresentou picos largos e com pouca intensidade no GCE. No GCE/MWCNT/FeNPs, não foi observado nenhuma atividade electrocatalítica do analito. Na superfície do GCE/MWCNT, foram observados dois picos anódicos e um catódico em +0,28, +1,0 e -0,35 V, respectivamente (67).

Triptofano e tirosina foram determinadas por DPV através um GCE modificado com filme nanocompósito de Nafion/óxido de titânio (II)-grafeno (GCE/TiO<sub>2</sub>-GR/Nafion). Triptofano em solução tampão fosfato apresentou picos de oxidação em +0,96 V (GCE), +0,87 V (GCE/GR/Nafion) e +0,79 V (GCE/TiO<sub>2</sub>-GR/Nafion). O método utilizando DPV apresentou uma faixa linear de  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $1,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, sensibilidade de 75,9 μA mmol<sup>-1</sup> L e LOD de  $7,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (68).

Neste trabalho, foram desenvolvidos detectores eletroquímicos baseados em eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente contendo nanopartículas de óxidos de níquel, cobre e prata para detecção e determinação de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detecção eletroquímica.



## CAPÍTULO VII. CONCLUSÕES

O eletrodo de carbono vítreo foi modificado eletroquimicamente com óxido de grafeno reduzido utilizando um método simples de eletrodeposição através da técnica de amperometria, empregando uma suspensão aquosa contendo óxido de grafeno em sulfato de sódio. O eletrodo modificado não revelou nenhuma atividade eletroquímica na presença de aminoácidos, embora se apresente como um excelente substrato para modificação com nanopartículas metálicas e seus óxidos.

Eletrodos de carbono vítreo contendo óxido de grafeno reduzido foram modificados com nanopartículas de óxidos metálicos de prata, níquel e cobre por amperometria, com sucesso. Os aminoácidos apresentaram picos de oxidação irreversíveis em meio alcalino no intervalo de potencial estudado nos eletrodos modificados. Os potenciais de oxidação dos aminoácidos foram menores no eletrodo modificado com nanopartículas de óxidos de níquel em comparação com os eletrodos modificados com óxidos de prata e cobre.

A eletro-oxidação dos aminoácidos glicina, alanina, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico foi investigada empregando o eletrodo modificado com nanopartículas de óxido de prata. A oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos em meio alcalino foi realizada através da mediação de prata (III). O eletrodo modificado apresentou elevada atividade eletrocatalítica, sensibilidade e estabilidade, tornando-se um excelente candidato a detector amperométrico.

Os eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel e cobre foram utilizados como detectores amperométricos acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência. Os aminoácidos apresentaram intervalo linear de concentração de duas a três ordens de grandeza, utilizando eluição isocrática com hidróxido e acetato de sódio como fase móvel. O eletrodo modificado com nanopartículas de óxidos de cobre apresentou limite de detecção e sensibilidade melhores em comparação com eletrodo modificado com nanopartículas de óxidos de níquel que demonstrou maior estabilidade. Os eletrodos foram empregados com sucesso na detecção e quantificação de aminoácidos em amostras de vinhaça de cana-açúcar utilizando os métodos com cromatografia líquida.

Os desafios futuros para a continuidade das pesquisas em vinhaça de cana-de-açúcar podem ser direcionados ao desenvolvimento de novos métodos de análise de um número maior de aminoácidos utilizando os eletrodos modificados com nanopartículas de óxido de prata e óxidos de ferro acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência, e o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção de aminoácidos.

## REFERÊNCIAS

- 1 LAIME, E. M. O. et al. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 16-29, 2011.
- 2 ACOMPANHAMENTO da safra brasileira de cana-de-açúcar. Brasília, DF: Conab, v. 3, n. 4, abr. 2017. 77 p. Safra 2016/17. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_04\\_19\\_11\\_27\\_36\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_4o\\_lev\\_-\\_16-17.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_19_11_27_36_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_16-17.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2017.
- 3 RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.
- 4 ESPAÑA-GAMBOA, E. I. et al. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, 2012. doi:10.1186/1754-6834-5-82.
- 5 AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.
- 6 LIMA, H. H. S. et al. Tratamento físico químico da vinhaça com uso de carvão ativado do bagaço da cana de açúcar. **Revista Enect**, v. 1, n. 1, 2012. Anais do Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia UEPB. Disponível em: <<http://www.editorarealize.com.br/revistas/enect/resumo.php?idtrabalho=89>>. Acesso em: 22 out. 2017.
- 7 CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplication of *Bacillus subtilis* in vinasse and viability to control root-knot in sugarcane. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1283-1288, 2011.
- 8 BATISTA, E. C.; OLIVEIRA, R. T. S. de. Degradação eletroquímica da vinhaça usando eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1517-1520, 2011.
- 9 WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V. T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, n. 97, p. 253-258, 1997.
- 10 PARNAUDEAU, V. et al. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1553-1562, 2008.
- 11 PITA, V. et al. Carbon and nitrogen mineralization of organic wastes from sugarcane distilleries: vinasse and yeast waste. In: RAMIRAN INTERNATIONAL CONFERENCE, 14th, 2010, Lisboa. **Anais...** Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, 2010. Disponível em: <[https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2608/1/REP-Ramiran2010\\_PAPERS.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2608/1/REP-Ramiran2010_PAPERS.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2017.

12 BUENO, P. C. et al. Impacts caused by the addition of wine vinasse on some chemical and mineralogical properties of a Luvisol and a Vertisol in la Mancha (Central Spain). **Journal of Soils and Sediments**, v. 9, n. 2, p. 121-128, 2009.

13 RATANAPARIYANUCH, K. et al. Rapid NMR method for the quantification of organic compounds in thin stillage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 19, p. 10454-10460, 2011.

14 DOELSCH, E. et al. Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, v. 29, n. 6, p. 1929-1935, 2009.

15 DOWD, M. K. et al. Low molecular weight organic composition of ethanol stillage from sugarcane molasses, citrus waste, and sweet whey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 283-288, 1994.

16 PAPPALOUISI, A.; AGRAFIOTOU, P.; SOTIROPOULOS, S. Advances in liquid chromatographic and voltammetric analysis of underivatized amino acids. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 19, p. 2235-2246, 2010.

17 TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

18 AGUIAR, A. C. R. **Preparação, caracterização e utilização de eletrodos de óxidos de níquel na eletrooxidação do furfural**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

19 DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21-25, 1998.

20 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

21 WHITE, P. C. Recent developments in detection techniques for high-performance liquid chromatography. Part I. Spectroscopic and electrochemical detectors: a review. **Analyst**, v. 109, p. 677-697, 1984.

22 HADDAD, P. R.; JACKSON, P. R. **Ion chromatography: principles and applications**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1994.

23 KOK, W. T.; BRINKMAN, U. A. T.; FREI, R. W. Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode. **Journal of Chromatography**, v. 256, n. 1, p. 17-26, 1983.

24 CLARKE, A. P. et al. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2774-2781, 1999.

- 25 CASELLA, I. G.; GATTA, M.; CATALDI, T. R. Amperometric determination of underivatized amino acids at a nickel-modified gold electrode by anion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 878, p. 57-67, 2000.
- 26 CASELLA, I. G.; CONTURSI, M. Isocratic ion chromatographic determination of underivatized amino acids by electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n. 2, p. 179-189, 2003.
- 27 LUO, P.; ZHANG, F.; BALDWIN, R. P. Constant-potential amperometric detection of underivatized amino acids and peptides at a copper electrode. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 1702-1707, 1991.
- 28 MIRANDA, C. E. S. et al. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA – CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 412-419, 2002.
- 29 NOGUEIRA, A. R. A. et al. Sistema polivalente de análises químicas por injeção em fluxo: determinação espectrofotométrica de cálcio, magnésio e fósforo em plantas. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 3, p. 209-216, 1997.
- 30 ZEN, J.-M. et al. Amino acid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrodes. **Analyst**, v. 129, n. 9, p. 841-845, 2004.
- 31 DEO, R. P.; LAWRENCE, N. S.; WANG, J. Electrochemical detection of amino acids at carbon nanotube and nickel-carbon nanotube modified electrodes. **Analyst**, v. 129, n. 11, p. 1076-1081, 2004.
- 32 HAMPSON, N. A. et al. Oxidations involving silver. Part VIII. A study of the oxidation of  $\alpha$ -amino-acids at silver electrodes. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p. 1766-1769, 1970.
- 33 BOARDMAN, W.; EDWARDS, G.; LEE, J. B. Oxidations at copper electrodes: Part 3. A novel copper-catalysed oxidation of acetophenones. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 33, n. 1, p. 95-97, 1971.
- 34 HAMPSON, N. A.; LEE, J. B.; MacDONALD, K. I. Oxidations at copper electrodes: part 4. The oxidation of  $\alpha$ -amino acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 91-99, 1972.
- 35 ZHANG, L.; SUN, Y.-G. Covalente modification of glassy carbon electrodes with  $\beta$ -alanine for voltammetric separation of dopamine and ascorbic acid. **Analytical Sciences**, v. 17, n. 8, p. 939-943, 2001.
- 36 ZHANG, L.; LIN, X.; SUN, Y. Separation of anodic peaks of ascorbic acid and dopamine at an  $\alpha$ -alanine covalently modified glassy carbon electrode. **Analyst**, v. 126, n. 10, p. 1760-1763, 2001.
- 37 ZHANG, L.; LIN, X. Electrochemical behavior of a covalently modified glassy carbon electrode with aspartic acid and its use for voltammetric differentiation of dopamine and ascorbic acid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 7, p. 1669-1677, 2005.

- 38 WANG, X.-G. et al. Voltammetric determination of 2,4-dinitrophenol and 2,5-dinitrophenol using a poly-aspartic acid modified electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1402-1407, 2010.
- 39 LI, J.; ZHANG, X. Fabrication of poly(aspartic acid)-nanogold modified electrode and its application for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 195-203, 2012.
- 40 YU, Z. et al. Voltammetric determination of dopamine and norepinephrine on a glassy carbon electrode modified with poly (L-aspartic acid). **Journal of Chemical Sciences**, v. 124, n. 2, p. 537-544, 2012.
- 41 ZHANG, L.; LIN, X. Covalent modification of glassy carbon electrode with glutamic acid for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid. **Analyst**, v. 126, n. 3, p. 367-370, 2001.
- 42 YU, A.-M.; CHEN, H.-Y. Electrocatalytic oxidation of hydrazine at the poly(glutamic acid) chemically modified electrode and its amperometric determination. **Analytical Letters**, v. 30, n. 3, p. 599-607, 1997.
- 43 CHAILAPAKUL, O. et al. The electrooxidation of organic acids at boron-doped diamond electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 2, n. 6, p. 422-426, 2000.
- 44 HUERTA, F.; MORALLO, E.; ALDAZ, A. Electrochemical behaviour of amino acids on Pt (hkl). A voltammetric and in situ FTIR study. Part III. Glycine on Pt (100) and Pt (110). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 445, n. 1/2, p. 155-164, 1998.
- 45 DEEPA, M. B. et al. Simultaneous electrocatalytic determination of simvastatin and Gemfibrozil at Poly (glycine) modified glassy carbon electrode. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 60-69, 2012.
- 46 PAIM, L. L. **Desenvolvimento de sensores baseados em eletrodos modificados com pentacianonitrosilferratos para determinação de compostos sulfurados em gás natural**. 2011. 202 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- 47 LABUDA, J. et al. Development in voltammetric analysis with chemically modified electrodes and biosensors. **Chemical Papers**, v. 54, n. 2, p. 95-103, 2000.
- 48 DURST, R. A. et al. Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions (IUPAC Recommendations 1997). **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1317-1324, 1997.
- 49 CARMO, D. R.; SILVA, R. M.; STRADIOTTO, N. R. Electrocatalysis and determination of ascorbic acid through graphite paste electrode modified with iron nitroprusside. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 22, n. 2, p. 71-79, 2004.
- 50 MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. Chemically modified electrodes: molecular design for electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 379-390, 1987.

- 51 BALDWIN, R. P.; THOMSEN, K. N. Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection: a review. **Talanta**, v. 38, n. 1, p. 1-16, 1991.
- 52 NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, p. 666-669, 2004.
- 53 ZHOU, M.; ZHAI, Y.; DONG, S. Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 14, p. 5603-5613, 2009.
- 54 ROCHEFORT, A.; WUEST, J. D. Interaction of substituted aromatic compounds with graphene. **Langmuir**, v. 25, n. 1, p. 210-215, 2009.
- 55 LU, J. et al. Nanometal-decorated exfoliated graphite nanoplatelet based glucose biosensors with high sensitivity and fast response. **ACS Nano**, v. 2, n. 9, p. 1825-1832, 2008.
- 56 CHENG, Q. et al. Electrochemical tuning the activity of nickel nanoparticle and application in sensitive detection of chemical oxygen demand. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 46, p. 22845-22850, 2011.
- 57 WELCH, C. M.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 601-619, 2006.
- 58 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241-259, 2010.
- 59 MOHANTY, U. S. Electrodeposition: a versatile and inexpensive tool for the synthesis of nanoparticles, nanorods, nanowires, and nanoclusters of metals. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 41, n. 3, p. 257-270, 2011.
- 60 BABAEI, A. et al. Simultaneous determination of tryptophan, uric acid and ascorbic acid at iron(III) doped zeolite modified carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 226-232, 2008.
- 61 SHAHROKHIAN, S.; FOTOUHI, L. Carbon paste electrode incorporating multi-walled carbon nanotube/cobalt salophen for sensitive voltammetric determination of tryptophan. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 123, n. 2, p. 942-949, 2007.
- 62 DONG, S. et al. Electrochemical behaviors of amino acids at multiwall carbon nanotubes and Cu<sub>2</sub>O modified carbon paste electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 381, n. 2, p. 199-204, 2008.
- 63 LUQUE, G. L.; FERREYRA, N. F.; RIVAS, G. A. Electrochemical sensor for amino acids and albumin based on composites containing carbon nanotubes and copper microparticles. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1282-1287, 2007.
- 64 SAFAVI, A.; MOMENI, S. Electrocatalytic oxidation of tryptophan at gold nanoparticle-modified carbon ionic liquid electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 23, p. 2848-2855, 2010.

- 65 CASELLA, I. G.; GATTA, M. Anodic electrodeposition of copper/oxidehydroxide films by alkaline solutions containing cuprous cyanide ions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 494, n. 1, p. 12-20, 2000.
- 66 ROUSHANI, M.; SHAMSIPUR, M.; POURMORTAZAVI, S. M. Amperometric detection of glycine, L-serine, and L-alanine using glassy carbon electrode modified by NiO nanoparticles. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1005-1011, 2012.
- 67 REZAEI, B.; ZARE, Z. M. Modified glassy carbon electrode with multiwall carbon nanotubes as a voltammetric sensor for determination of leucine in biological and pharmaceutical samples. **Analytical Letters**, v. 41, n. 12, p. 2267-2286, 2008.
- 68 FAN, Y. et al. Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO<sub>2</sub>-graphene composite film. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 1/2, p. 241-247, 2011.
- 69 LIU, J. et al. Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 859, p. 1-19, 2015.
- 70 MAO, Y. et al. Electrochemical sensor for dopamine based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite recognition element. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, p. 291-297, 2011.
- 71 LIAN, W. et al. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 38, n. 1, p. 163-169, 2012.
- 72 SILVA, H. et al. MIP-graphene-modified glassy carbon electrode for the determination of trimethoprim. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, p. 56-61, 2014.
- 73 XU, J.; WANG, Y.; HU, S. Nanocomposites of graphene and graphene oxides: synthesis, molecular functionalization and application in electrochemical sensors and biosensors. A review. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 1, p. 1-44, 2017.
- 74 KONG, L. et al. Molecularly imprinted sensor based on electropolymerized poly (o-phenylenediamine) membranes at reduced graphene oxide modified electrode for imidacloprid determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 185, p. 424-431, 2013.
- 75 SALAVAGIONE, H. J. et al. Chemical sensors based on polymer composites with carbon nanotubes and graphene: the role of the polymer. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 35, p. 14289-14328, 2014.
- 76 FITZER, E. et al. Recommended terminology for the description of carbon as a solid. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 473-506, 1995.
- 77 LIU, C. et al. Direct electrodeposition of graphene enabling the one-step synthesis of graphene-metal nanocomposite films. **Small**, v. 7, n. 9, p. 1203-1206, 2011.

- 78 CUI, F.; ZHANG, X. A method based on electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode for sensitive detection of theophylline. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, p. 167-173, 2013.
- 79 LIN, X.; NI, Y.; KOKOT, S. A novel electrochemical sensor for the analysis of  $\beta$ -agonists: the poly(acid chrome blue K)/graphene oxide-nafion/glassy carbon electrode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 508-517, 2013.
- 80 ZENG, Y. et al. A novel composite of SiO<sub>2</sub>-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 45, n. 1, p. 25-33, 2013.
- 81 YANG, Y. et al. Sensitive and selective electrochemical determination of quinoxaline-2-carboxylic acid based on bilayer of novel poly(pyrrole) functional composite using one-step electro-polymerization and molecularly imprinted poly(o-phenylenediamine). **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 136-143, 2014.
- 82 HILDER, M. et al. Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 9187-9193, 2011.
- 83 AMBROSI, A. et al. Electrochemistry of graphene and related materials. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 14, p. 7150-7188, 2014.
- 84 LUO, J. et al. Facile one-step electrochemical fabrication of a non-enzymatic glucose-selective glassy carbon electrode modified with copper nanoparticles and graphene. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3/4, p. 485-490, 2012.
- 85 ZHANG, Y. et al. Electrochemical deposition of nickel nanoparticles on reduced graphene oxide film for nonenzymatic glucose sensing. **Electroanalysis**, v. 25, n. 4, p. 959-966, 2013.
- 86 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- 87 VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- 88 ZHANG, X. et al. Electrochemical reduction of graphene oxide films: preparation, characterization and their electrochemical properties. **Chinese Science Bulletin**, v. 57, n. 23, p. 3045-3050, 2012.
- 89 VILIAN, A. T. E. et al. An electrocatalytic oxidation and voltammetric method using a chemically reduced graphene oxide film for the determination of caffeic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 423, p. 33-40, 2014.
- 90 MARINGA, A. et al. Characterization and electrocatalytic behaviour of glassy carbon electrode modified with nickel nanoparticles towards amitrole detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 700, p. 86-92, 2013.
- 91 LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, 1979.



- 92 KANG, X. et al. A sensitive nonenzymatic glucose sensor in alkaline media with a copper nanocluster/multiwall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 143-150, 2007.
- 93 LUO, J. et al. A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 709, p. 47-53, 2012.
- 94 CASERO, E. et al. Differentiation between graphene oxide and reduced graphene by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). **Electrochemistry Communications**, v. 20, p. 63-66, 2012.
- 95 JAIN, R. et al. A polyaniline/graphene oxide nanocomposite as a voltammetric sensor for electroanalytical detection of clonazepam. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 3034-3045, 2016.
- 96 GUAN, H. et al. Polyaniline nanofibers obtained by interfacial polymerization for high-rate supercapacitors. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 964-968, 2010.
- 97 LI, H. et al. Theoretical and experimental specific capacitance of polyaniline in sulfuric acid. **Journal of Power Sources**, v. 190, n. 2, p. 578-586, 2009.
- 98 SABATANI, E. et al. Organized self-assembling monolayers on electrodes: part I. Octadecyl derivatives on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 219, n. 1/2, p. 365-371, 1987.
- 99 LEE, J. W. et al. Non-aqueous approach to the preparation of reduced graphene oxide/ $\alpha$ -Ni(OH)<sub>2</sub> hybrid composites and their high capacitance behavior. **Chemical Communications**, v. 47, n. 22, p. 6305-6307, 2011.
- 100 SILWANA, B.; VAN DER HORST, C.; IWUOHA, E. Synthesis, characterisation and electrochemical evaluation of reduced graphene oxide modified antimony nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 592, p. 124-134, 2015.
- 101 ZHANG, L.-R. et al. Preparation of graphene supported nickel nanoparticles and their application to methanol electrooxidation in alkaline medium. **New Journal of Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 1108-1113, 2012.
- 102 MAJDI, S. et al. Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel-curcumin complex modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 14, p. 4622-4629, 2007.
- 103 SONG, Y. H. et al. Architecture of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-graphene oxide nanocomposite and its application as a platform for amino acid biosensing. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 58-65, 2012.
- 104 SONG, Y. et al. Electrochemical and electrocatalytic properties of cobalt nanoparticles deposited on graphene modified glassy carbon electrode: application to some amino acids detection. **Electrochimica Acta**, v. 58, n. 1, p. 757-763, 2011.

- 105 BAHSHI, L. et al. Following the biocatalytic activities of glucose oxidase by electrochemically cross-linked enzyme-Pt nanoparticles composite electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 21, p. 8253-8259, 2008.
- 106 POLSKY, R. et al. Nucleic acid-functionalized Pt nanoparticles: catalytic labels for the amplified electrochemical detection of biomolecules. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 7, p. 2268-2271, 2006.
- 107 RISKIN, M.; TEL-VERED, R.; WILLNER, I. Thermo-switchable charge transport and electrocatalysis using metal-ion-modified pNIPAM-functionalized electrodes. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 15, p. 2474-2480, 2009.
- 108 HELI, H. et al. Fine steps of electrocatalytic oxidation and sensitive detection of some amino acids on copper nanoparticles. **Analytical Biochemistry**, v. 388, n. 1, p. 81-90, 2009.
- 109 SONG, Y. et al. PH-controlled electrocatalysis of amino acid based on electrospun cobalt nanoparticles-loaded carbon nanofibers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 166/167, p. 357-364, 2012.
- 110 TABESHNIA, M. et al. Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 647, n. 2, p. 181-186, 2010.
- 111 LIU, H. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial properties of silver nanoparticles-graphene and graphene oxide composites. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 1-18, 2016.
- 112 DEVASENATHIPATHY, R. et al. Electrochemical synthesis of  $\beta$ -cyclodextrin functionalized silver nanoparticles and reduced graphene oxide composite for the determination of hydrazine. **Electroanalysis**, v. 28, n. 9, p. 1970-1976, 2016.
- 113 HILDER, M. et al. Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspension. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 9187-9193, 2011.
- 114 WANG, Z. et al. Facile preparation of a Pt/Prussian blue/graphene composite and its application as an enhanced catalyst for methanol oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 121, p. 245-252, 2014.
- 115 LIU, C. et al. Direct electrodeposition of graphene enabling the one-step synthesis of graphene - metal nanocomposite films. **Small**, n. 9, p. 1203-1206, 2011.
- 116 NGUYEN, K. T.; ZHAO, Y. Integrated graphene/nanoparticle hybrids for biological and electronic applications. **Nanoscale**, v. 6, n. 12, p. 6245-6266, 2014.
- 117 LI, J. et al. Green synthesis of silver nanoparticles-graphene oxide nanocomposite and its application in electrochemical sensing of tryptophan. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, n. 1, p. 198-206, 2013.

118 HASANZADEH, M. et al. Graphene quantum dots decorated with magnetic nanoparticles: synthesis, electrodeposition, characterization and application as an electrochemical sensor towards determination of some amino acids at physiological pH. **Materials Science & Engineering C**, v. 68, p. 814-830, 2016.

119 FAN, Y. et al. Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO<sub>2</sub>-graphene composite film. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 241-247, 2011.

120 ZHANG, Q. et al. Label-free amino acid detection based on nanocomposites of graphene oxide hybridized with gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 963-970, 2016.

121 HUTTON, L. A. et al. Electrodeposition of nickel hydroxide nanoparticles on boron-doped diamond electrodes for oxidative electrocatalysis. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 5, p. 1649-1658, 2011.

122 DEMOTT, J. M. J.; JAHNGEN, E. G. E. Determination of amino acids at a silver oxide/silver phosphate electrode and the analysis of structure-response relationships. **Electroanalysis**, v. 17, n. 7, p. 599-606, 2005.

123 VANÝSEK, P. Electrochemical Series. In: RUMBLE, J. R. (Ed.). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 98th ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2017-2018. Internet version 2018.

124 LIU, B.; WANG, M. Preparation and characterization of size-controlled silver nanoparticles decorated multi-walled carbon nanotubes and their electrocatalytic reduction properties for hydrogen peroxide. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 50, n. 5, p. 476-481, 2014.

125 HABIBA, K. et al. Synergistic antibacterial activity of PEGylated silver-graphene quantum dots nanocomposites. **Applied Materials Today**, v. 1, n. 2, p. 80-87, 2015.

126 MA, J. et al. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 3350-3352, 2011.

127 MORAES, A. C. M. et al. Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6847-6861, 2015.

128 TRAN, M.-H.; JEONG, H. K. Synthesis and characterization of silver nanoparticles doped reduced graphene oxide. **Chemical Physics Letters**, v. 630, p. 80-85, 2015.

129 JIAO, T. et al. Reduced graphene oxide-based silver nanoparticle-containing composite hydrogel as highly efficient dye catalysts for wastewater treatment. **Scientific Reports**, v. 5, 2015. doi:10.1038/srep11873.

130 SATO, K. et al. Nickel-titanium alloy electrodes for stable amperometric detection of underivatized amino acids in anion-exchange chromatography. **Talanta**, v. 53, n. 5, p. 1037-1044, 2001.

- 131 OLSON, M. P.; KEATING, L. R.; LACOURSE, W. R. Indirect pulsed electrochemical detection of amino acids and proteins following high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1/2, p. 198-204, 2009.
- 132 DING, Y.; YU, H.; MOU, S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 982, n. 2, p. 237-244, 2002.
- 133 JANDIK, P.; CHENG, J.; AVDALOVIC, N. Analysis of amino acid-carbohydrate mixtures by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, n. 3, p. 191-203, 2004.
- 134 YU, H.; DING, Y. S.; MOU, S. F. Some factors affecting separation and detection of amino acids by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 997, n. 1/2, p. 145-153, 2003.
- 135 POLTA, J. A.; JOHNSON, D. C. The direct electrochemical detection of amino acids at a platinum electrode in an alkaline chromatographic effluent. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 6, n. 10, p. 1727-1743, 1983.
- 136 GUO, Y. et al. Analysis of underivatized amino acids by capillary electrophoresis using constant potential amperometric detection. **Electrophoresis**, v. 16, n. 4, p. 493-497, 1995.
- 137 ZAHOU, E.; JÖRNVALL, H.; BERGMAN, T. Amino acid analysis by capillary electrophoresis after phenylthiocarbamylation. **Analytical Biochemistry**, v. 281, n. 1, p. 115-22, 2000.
- 138 SOGA, T.; HEIGER, D. N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1236-1241, 2000.
- 139 WARREN, C. R.; ADAMS, M. A. Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of *Sclerophyllous* species. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 347, p. 1147-1157, 2000.
- 140 MANAENKOV, O. V.; SIDOROV, A. I.; SUL'MAN, E. M. Rapid determination of amino acids by capillary electrophoresis without preliminary derivatization. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 979-982, 2003.
- 141 XI, L. et al. Ion-exchange chromatography combined with direct current amperometric detection at CuNPs/reduced graphene oxide-chitosan composite film modified electrode for determination of monosaccharide composition of polysaccharides from *Phellinus igniarius*. **Talanta**, v. 119, p. 440-446, 2014.
- 142 ZAKY, A. M. Electrochemical dissolution and passivation of Cu-Ni alloys in sodium sulphate aqueous solution. **Universal Journal of Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2013.
- 143 BAJPAI, R. et al. Graphene supported nickel nanoparticle as a viable replacement for platinum in dye sensitized solar cells. **Nanoscale**, v. 4, n. 3, p. 926-930, 2012.

144 ZHOU, G. et al. Oxygen bridges between NiO nanosheets and graphene for improvement of lithium storage. **ACS Nano**, v. 6, n. 4, p. 3214-3223, 2012.

145 GROSVENOR, A. P. et al. New interpretations of XPS spectra of nickel metal and oxides. **Surface Science**, v. 600, n. 9, p. 1771-1779, 2006.

146 CHOI, S. H. et al. Rapid continuous synthesis of spherical reduced graphene ball-nickel oxide composite for lithium ion batteries. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.  
doi:10.1038/srep05786.

147 GIORDANO, G. F. et al. An integrated platform for gas-diffusion separation and electrochemical determination of ethanol on fermentation broths. **Analytica Chimica Acta**, v. 875, p. 33-40, 2015.

148 BLANDEZ, J. F. et al. Nickel nanoparticles supported on graphene as catalysts for aldehyde hydrosilylation. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 412, p. 13-19, 2016.

149 DIEGLE, R. B. et al. An XPS investigation into the passivity of an amorphous Ni-20P alloy. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 135, n. 5, p. 1085-1092, 1988.

150 KIM, K. S.; DAVIS, R. E. Electron spectroscopy of the nickel-oxygen system. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 1, n. 3, p. 251-258, 1972/1973.

151 AGGARWAL, P. S.; GOSWAMI, A. An oxide of tervalent nickel. **Journal of Physical Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 2105-2105, 1961.

152 MIAO, Y. et al. Electrocatalysis and electroanalysis of nickel, its oxides, hydroxides and oxyhydroxides toward small molecules. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 53, p. 428-439, 2014.

153 COWAN, R. L.; STAEHLE, R. W. The thermodynamics and electrode kinetic behavior of nickel in acid solution in the temperature range 25° to 300°C. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 118, n. 4, p. 557-568, 1971.

154 SANTOS, W. T. P. et al. Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.

154 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

156 PEI, J.; LI, X. Determination of underivatized amino acids by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection at an amino acid oxidase immobilized CuPtCl<sub>6</sub> modified electrode. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 367, n. 8, p. 707-713, 2000.

157 LUO, P.; ZHANG, F.; BALDWIN, R. P. Comparison of metallic electrodes for constant-potential amperometric detection of carbohydrates, amino acids and related compounds in flow systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 244, p. 169-178, 1991.

- 158 PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. **Journal of Chromatography A**, v. 961, p. 9-21, 2002.
- 159 COX, J. A.; DABEK-ZLOTORZYNSKA, E. High-performance liquid chromatography of sulfur- containing amino acids and related compounds with amperometric detection at a modified electrode. **Journal of Chromatography**, v. 543, p. 226-232, 1991.
- 160 STULÍK, K. et al. Amperometric flow detection with a copper working electrode-response mechanism and application to various compounds. **Talanta**, v. 35, n. 6, p. 455-460, 1988.
- 161 KAFIL, J. B.; HUBER, C. O. A nickel oxide amperometric detector in the chromatographic separation of amino acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, p. 275-280, 1985.
- 162 SILVA, J. L. et al. Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 374-382, 2017.
- 163 BARBERO, C.; PLANES, G. A.; MIRAS, M. C. Redox coupled ion exchange in cobalt oxide films. **Electrochemistry Communications**, v. 3, n. 3, p. 113-116, 2001.
- 164 LE, W. Z.; LIU, Y. Q. Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating/potential cycling method and its characterization. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 141, n. 1, p. 147-153, 2009.
- 165 CHUSUEI, C. C.; BROOKSHIER, M. A.; GOODMAN, D. W. Correlation of relative X-ray photoelectron spectroscopy shake-up intensity with CuO particle size. **Langmuir**, v. 15, n. 8, p. 2806-2808, 1999.
- 166 NISHINO, F. et al. Formation of CuO nano-flowered surfaces via submerged photo-synthesis of crystallites and their antimicrobial activity. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. doi:10.1038/s41598-017-01194-5.
- 167 ALVES, D. C. B. et al. Copper nanoparticles stabilized by reduced graphene oxide for CO<sub>2</sub> reduction reaction. **Materials for Renewable and Sustainable Energy**, v. 4, n. 2, 2015. doi:10.1007/s40243-015-0042-0.
- 168 LI, Y.-F. et al. As-grown graphene/copper nanoparticles hybrid nanostructures for enhanced intensity and stability of surface plasmon resonance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. doi:10.1038/srep37190.
- 169 CHEN, A. et al. Controlled growth and characteristics of single-phase Cu<sub>2</sub>O and CuO films by pulsed laser deposition. **Vacuum**, v. 83, n. 6, p. 927-930, 2009.
- 170 PENDASHTEH, A.; MOUSAVI, M. F.; RAHMANIFAR, M. S. Fabrication of anchored copper oxide nanoparticles on graphene oxide nanosheets via an electrostatic coprecipitation and its application as supercapacitor. **Electrochimica Acta**, v. 88, p. 347-357, 2013.

171 KO, J. W. et al. Synthesis of graphene-wrapped CuO hybrid materials by CO<sub>2</sub> mineralization. **Green Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 2391-2394, 2012.

172 GARCÍA-MARTÍNEZ, O. et al. Microstructural characterization of nanocrystals of ZnO and CuO obtained from basic salts. **Solid State Ionics**, v. 63/65, p. 442-449, 1993.

173 SANTOS, F. C. U. et al. Electrochemical determination of total reducing sugars from bioethanol production using glassy carbon electrode modified with graphene oxide containing copper nanoparticles. **Fuel**, v. 163, p. 112-121, 2016.

174 BELUOMINI, M. A.; SILVA, J. L. da; STRADIOTTO, N. R. Determination of uronic acids in sugarcane bagasse by anion-exchange chromatography using an electrode modified with copper nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 2347-2353, 2015.