



UNESP– Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química – Araraquara
Departamento de Química Analítica



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES DESCARTÁVEIS DE OURO NANOESTRUTURADO
MODIFICADOS COM COMPLEXO METÁLICO VISANDO DETECÇÃO *IN SITU* DE
CORANTES SEMIPERMANENTES DE CABELO**

BRYAN CARLOS HUAYHUAS CHIPANA

Orientadora: Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

Araraquara
2014

Dados Curriculares

Bryan Carlos Huayhuas Chipana

Dados pessoais

Nascimento: 09 de dezembro de 1986

Nacionalidade: Peruana

Naturalidade: Lima

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Bruno Huayhuas Ccopa e Fidelia Chipana Huayhuas

Profissão: Químico

Endereço: Av. Alberto Toloi 185, Quitandinha, Araraquara CEP 14800-105.

Formação Acadêmica

Graduação: Bacharel em Química concluído em 2011. Universidade Nacional de Engenharia (UNI), Lima-Peru.

Participações em eventos

XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica SIBEE.

Eletrodos impressos modificados com monocamadas autoarranjadas para determinação de metronidazol em diversos tipos de amostras. Campos do Jordão, Abril 2013.

31º Congreso Latinoamericano de Química – CLAQ-2014.

Desenvolvimiento de sensores descartables de oro nanoestructurado modificados con complejos metálicos visando la detección in-situ de colorantes semipermanentes de cabello. Lima – Peru. Aceito para apresentação em Outubro de 2014.

Artigos publicados:

Chipana, B.C.H.; Gomero, J.C.M.; Sotomayor, M.D.P.T. Nanostructured screen-printed electrodes modified with self-assembled monolayers for determination of metronidazole in different matrices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2014**. Disponível em: <http://www.jbcs.sbq.org.br/imagebank/pdf/140470AR.pdf>.

DEDICATORIA

*Aos meus Pais, Bruno e Fidélia, pelo carinho, amor,
confiança e por me servirem de inspiração em tudo,
Aos meus irmãos, Maritza e Freddy, pelo amor,
paciência e grande apoio incondicional. À minha tia Alicia,
por ter me dado todo esse amor desde que eu era criança.
Dedico também à minha família toda, pelos conselhos e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Bruno e Fidelia pelo grande amor e carinho que sempre me brindam em todas as etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Maritza e Freddy, pelo carinho, conselhos e grande apoio ao longo destes anos, a meu sobrinho Gean Piero de 3 anos, pelos momentos de alegria e diversão.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas pelos grandes momentos que cada um teve em diferentes etapas de minha vida.

À Professora Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, pela orientação, paciência, apoio no estágio para culminar o TCC e também a grande oportunidade de me desenvolver como profissional neste Mestrado.

Ao Professor Juan Carlos Gomero Morales pela oportunidade de sair do PERU para fazer um estágio e pela orientação brindada no TCC.

Aos moradores da república Xurupitas Farm: Alan, Rodolfo, Jardes, Tiago, Ricardo, Lima, Renan, Leonardo, Roberth, Victor (Gota), Antonio (Tonhão) que fizeram acolhedora minha estadia durante estes anos, e aquelas pessoas que conheci ali, que mesmo não sendo moradores tem me acolhido também.

Aos integrantes do grupo de eletroanalítica GEAr, e em especial à Maricely, Rosário, André, Ademar, Juliano, Guilherme, Elsa e os professores Hideko, Nelson e Valnice que contribuíram na minha formação como profissional.

Aos meus amigos de formatura Javier, Rosário, Jaime pelas conversas, brincadeiras, e por compartilhar ideias e experiências.

A todos os funcionários do Instituto de química, pela ajuda e compreensão.

À FAPESP (Proc. 2008/10449-7) pelo apoio a esta Dissertação.

À CAPES pelo Bolsa concedida.

RESUMO

Ao longo do tempo, o uso exagerado de corantes de cabelo, em forma geral, tem apresentado um grande crescimento, e dessa forma os compostos utilizados nessas formulações comerciais tem apresentado interesse, devido a que alguns deles possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Entre os corantes que se estudam encontra-se a 2-nitro-*p*-fenilenodiamina e a 4-nitro-*o*-fenilenodiamina, que são os utilizados nas formulações comerciais de corantes semipermanentes.

O presente trabalho explora metodologias para a construção de sensores que apresentem sensibilidade e seletividade suficientes para a detecção de analitos utilizados na indústria cosmética de tintura para cabelo. O sensor para o corante 2-nitro-*p*-fenilenodiamina, que apresentou resultados mais promissores, foi construído usando uma superfície de ouro nano-estruturado, modificado com monocamadas de mercaptopropanossulfonato de sódio (MPS), para obter uma superfície com carga negativa, seguido das etapas de formação das multicamadas de quitosana, dodecil sulfonato de sódio (SDS) e ftalocianina de níquel (TsNiPc) obtidos pela técnica layer-by-layer (LBL) em forma alternada. A partir da otimização dos parâmetros, como pH (3,5), número de multicamadas ($n = 10$) e eletrólito suporte (tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram escolhidas condições para obter o melhor desempenho do sensor. A resposta do sensor foi avaliada em batelada por voltametria de onda quadrada, e em fluxo por amperometria, obtendo limites de detecção de $1,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Na aplicação do sensor, o valor de recuperação do corante em água de torneira propositalmente contaminada foi de 97%, e o valor encontrado em uma amostra comercial mostrou um erro de 4,5% em relação ao valor de referência.

Palavras-chave: Ouro nano-estruturado, layer-by-layer, monocamadas auto-arranjadas, 2-nitro-*p*-fenilenodiamina e 4-nitro-*o*-fenilenodiamina.

ABSTRACT

Due to the indiscriminate use of hair dyes generally has shown a tremendous growth for a long time. The compounds used in their formulations have shown commercial interest, because some of these hair dyes have mutagenic and carcinogenic properties. Among these dyes that we studied are the 2-nitro-*p*-phenylenediamine and 4-nitro-*o*-phenylenediamine, which are used in commercial formulations as semi-permanent hair dye. The present work explores methods to build sensors that have sufficient sensitivity and selectivity for the detection of analytes used in the cosmetic industry for hair dyes. The sensor for the 2-nitro-*p*-phenylenediamine, shows more promising results, which was constructed using a nanostructured gold surface modified with monolayers of sodium mercaptopropanosulfonate (MPS) to obtain a surface with a negative charge, followed by the steps for the formation of multilayer with chitosan, sodium dodecyl sulphonate (SDS), and nickel phthalocyanine (TsNiPc) obtained by the technical layer-by-layer (LBL) in alternating fashion. Some parameters such as pH (3.5), number of multilayers ($n = 10$) and supporting electrolyte (Britton-Robinson buffer 0.1 mol L^{-1}), were optimized to obtain the best performance of the sensor. The sensor response was evaluated in batch by Square Wave Voltammetry and flow injection analysis, obtaining a detection limit of $1.2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ respectively. For the application of sensors, the recovery of the analyte in a sample of tap water contaminated on the purpose was 97%, and the value found in a commercial sample showed an error of 4.5% in relation to the reference value.

Keywords: Nanostructured gold, layer-by-layer, self-assembled monolayer, 2-nitro-*p*-phenylenediamine, 4-nitro-*o*-phenylenediamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura e componentes do fio do cabelo humano humano	19
Figura 2.	Fase do crescimento do cabelo	20
Figura 3.	Estrutura química dos analitos 2-nitro-p-fenilenodiamina e 4-nitro-o-fenilenodiamina	24
Figura 4.	Esquema do comportamento de um eletrodo modificado na transdução da sinal amperométrico.....	26
Figura 5.	Esquema do processo de formação de filmes pelo método recobrimento por secagem.	27
Figura 6.	Esquema do processo de formação de filmes pelo método de imersão	27
Figura 7.	Etapas do processo de formação de filmes pelo metodo de spin coating.....	28
Figura 8.	Estrutura de moléculas anfifílicas na interface água - ar do filme de Langmuir	29
Figura 9.	Esquema da formação de filmes Langmuir-Blodgett.....	30
Figura 10.	Partes de uma molécula na formação de SAM's	31
Figura 11.	Alguns defeitos extrínsecos e intrínsecos na formação de SAM's	32
Figura 12.	Representação esquemática da formação de multicamadas pela técnica LBL em uma superfície carregada.....	33
Figura 13.	Estrutura química de alguns polieletrólitos mais utilizados.	34
Figura 14.	Representação esquemática de um polieletrólito em uma solucao com força ionica fraca (esquerda) e forte (direita).....	35
Figura 15.	Representação da associação entropicamente conduzida entre cadeias de polieletrólito negativas e positivas acompanhadas pela liberação de água e contraíons mediante complexação.	36
Figura 16.	Perfil do potencial em função do tempo na voltametria cíclica.....	38
Figura 17.	Voltamograma de uma reação redox reversível	38
Figura 18.	Equipamento utilizado na voltametria cíclica	39
Figura 19.	Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada	42
Figura 20.	Voltamogramas de onda quadrada em processo redox de um sistema reversível(1) e um processo redox de um sistema irreversível(2)	42
Figura 21.	Potencial em função do tempo para um experimento de cronoamperometria	43

Figura 22.	Compartimento do sistema FIA para eletrodos DROPSENSE®	48
Figura 23.	Eletrodo serigrafado da DROPSENSE® empregado nesta dissertação	49
Figura 24.	Diagrama de Pourbaix do eletrodo de ouro a 25°C	55
Figura 25.	Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro a uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ em uma solução KOH 0,5 mol L ⁻¹	56
Figura 26.	Voltamograma do ouro em uma solução KOH 0.5 mol L ⁻¹	57
Figura 27.	Voltamogramas do ouro em uma solução ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ (esquerda) e em solução KOH 0.5 mol L ⁻¹ (direita).....	59
Figura 28.	Voltamograma do eletrodo de ouro pre tratado mediante pulsos.	60
Figura 29.	Voltamograma de ouro em uma solução KOH 0,5 mol L ⁻¹ com eletrodos SPE e com eletrodos externos.	62
Figura 30.	Microscopias eletrônicas de varredura dos eletrodos de ouro rugoso (A) e liso (B).....	63
Figura 31.	Microscopias de força atômica do ouro nanoestruturado.(A)vista lateral. (B) vista de cima	63
Figura 32.	Esquema da formação de monocamadas auto-organizadas de tiol na superfície do eletrodo de ouro nano estruturado	64
Figura 33.	Estruturas químicas dos tióis usados neste trabalho	65
Figura 34.	Voltamograma de eletrodos de ouro pre tratado e com diferentes tióis em uma solução de Fe(CN) ₆ ^{3-/4-}	66
Figura 35.	Esquema da transferência eletrônica em uma solução de ferri-ferro com moncamadas não compactas.	67
Figura 36.	Voltamograma das monocamadas auto-arranjadas de 3-mercaptopropanossulfonato de sódio (MPS) suportadas em superfície de ouro sólido (A) e de ouro nano-estruturado (B) em uma solução KOH 0,5 mol L ⁻¹ com uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	69
Figura 37.	Voltamograma das monocamadas auto-arranjadas de cisteamina em ouro sólido (A) e ouro nano-estruturado (B). Em solução KOH 0,5 mol L ⁻¹ com uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	70
Figura 38.	Esquema de formação de auto-arranjo eletrostático camada por camada. Os procedimentos 1 e 3 representam a adsorção de polieletrólitos de carga oposta. Os procedimentos 2 e 4 representam a lavagem.....	71

Figura 39.	Resposta eletroquímica dos sistemas Au sólido, Au _{nanoporoso} , Au-MPS-(Quitosana-TsFePc) ₁₅ em solução de 2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas em solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3 e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	72
Figura 40.	Voltamogramas de onda quadrada da resposta do sensor Au-MPS-(Quitosana-TsFePc) ₁₅ ao analito 2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina em solução tampão BR de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3, f de 80 Hz e E_p de 70 mV.	74
Figura 41.	Resposta eletroquímica dos sistemas Au sólido, Au nanoporoso, Au-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc) ₁₅ em solução de 4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas em tampão de Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3 e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	75
Figura 42.	Voltamogramas de onda quadrada da resposta do sensor Au-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc) ₁₅ ao analito 4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina em solução tampão BR de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3, amplitude de pulso de 70 mV e frequência de 80 Hz.	76
Figura 43.	Resposta dos eletrodos modificados com multicamadas em uma solução $22,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina a pH 3,5 $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	78
Figura 44.	Voltamograma ciclicos para os sensores a base de Au _{nano} -MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc) ₁₀ e a base de Au-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc) ₁₀	80
Figura 45.	Perfil de resposta do sensor para o 2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina em soluções tampão de BR com diferentes valores de pH a 25°C	81
Figura 46.	Perfil da influência do tampão na resposta do sensor proposto para o 2NPPD.	82
Figura 47.	Mudanças do pico anódico com o número de camadas do filme sensor para uma solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,5 contendo 2NPPD $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	83
Figura 48.	Porcentagem de resposta do sensor proposto para vários compostos avaliados. Medidas realiadas em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5.	84
Figura 49.	Estrutura química da glutatona oxidada.....	85

Figura 50.	Voltamograma cíclico do sensor proposto na presença de glutatona reduzida	85
Figura 51.	Voltametria de onda quadra para o sensor proposto na presença de 2NPPD, nas condições otimizadas de preparação e análise	86
Figura 52.	Curva de calibração obtida dos dados de VOQ.	87
Figura 53	Voltametria de Onda Quadra de 2-NPPD em uma solução tampão Britton Robinson a um pH de 3,5	88
Figura 54.	Curva de calibração do sensor à base de eletrodo de ouro com orientação.....	89
Figura 55.	Diagrama obtido com o sensor proposto para soluções de 2-NPPD em (a) $4,5 \times 10^{-6}$; (b) $9,0 \times 10^{-6}$; (c) $1,4 \times 10^{-5}$; (d) $1,8 \times 10^{-5}$ (e) $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	90
Figura 56.	Curvas analíticas na região de aumento de concentrações e inversa, obtidas a partir dos dados da Figura 57.....	91
Figura 57.	Perfil da repetibilidade das medidas do sensor proposto em FIA, para uma solução injetada de 2NPPD de $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em carregador de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3,5.....	92
Figura 58.	Curva de adição de padrão usada na análise de tintura de cabelo masculina comercial.	93
Figura 59.	Perfil das 5 amostras de água de torneira contendo cada uma $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 2NPDD. Medidas realizadas usando solução carregadora de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3,5.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição de tinturas permanentes da base precursora (Robbins, 1994).....	23
Tabela 2.	Composição de tinturas permanentes da base oxidante.	23
Tabela 3.	Relação das áreas ativas do eletrodo de ouro sólido e o nanoestruturado	58
Tabela 4.	Otimização da frequência (f , Hz) usada na Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) para a resposta do sistema Au-MPS-(Quitosana-TsFePc) ₁₅ para o 2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina.	73
Tabela 5.	Otimização da amplitude de pulso da onda quadrada para a resposta do sistema Au-MPS-(Quitosana-TsFePc) ₁₅ para o 2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina.	73
Tabela 6.	Determinação de PPD em uma amostra de corante capilar usando o nosso procedimento	93
Tabela 7.	Determinação de 2NPPD em amostras de água de torneira fortificada.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

2NPPD	2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina
4NOPD	4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina
SAM's	<i>Self-assembled monolayers</i>
TsFePc	Ftalocianina de ferro tetrasulfonada
TsNiPc	Ftalocianina de níquel tetrasulfonada
SDS	Dodecil sulfonato de sódio
TsMxPc	Ftalocianina de metal tetrasulfonada
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
UE	União Européia
LBL	<i>Layer-by-layer</i>
PEMU	Multicamadas de polieletrólitos
SPE	<i>Screen printed electrodes</i>
FIA	Análises de injeção em fluxo
CISTE	Cisteamina
MPS	Mercaptopropanossulfonato
MUA	Ácido mercaptoundecanóico
AFM	Microscopia de força atômica
LOQ	Limite de quantificação
LOD	Limite de detecção
BR	Britton-Robinson
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Sumário

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Fisiologia e anatomia do cabelo	18
1.2	Produtos cosméticos	21
1.3	Tinturas Capilares	22
1.3.1	Classificação das tinturas capilares	22
1.4	Revisão bibliográfica dos compostos 2NPPD e 4NOPD:	24
1.5	Eletrodos quimicamente modificados	26
1.5.1	Recobrimento por secagem (drop casting).....	26
1.5.2	Recobrimento por imersão (dip coating).....	27
1.5.3	Recobrimento por rotação (spin coating).....	28
1.6	Técnicas para formação de filmes	29
1.6.1	Filmes Langmuir-Blodgett	29
1.6.2	Monocamadas auto-organizadas (SAM's).....	30
1.6.3	Layer-by-layer	32
1.6.3.1	Poli-eletrólitos.....	33
1.6.3.2	Mecanismo de crescimento das camadas.....	35
1.7	Técnicas eletroquímicas	37
1.7.1	Voltametria cíclica.....	37
1.7.2	Voltametria de onda quadrada	41
1.7.3	Cronoamperometria	43
2	OBJETIVOS	45
3	PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1	Procedimento experimental e soluções	47
3.2	Equipamentos	48
3.3	Pré-tratamento do eletrodo de ouro	49
3.4	Modificação da superfície de eletrodo de ouro	50

3.4.1	Modificação com Cisteamina	50
3.4.2	Modificação com Mercaptopropanosulfonato	50
3.4.3	Modificação com Ácido mercaptoundecanóico.....	50
3.5	Formação de multicamadas pela técnica layer-by-layer	50
3.5.1	Multicamadas SAM cisteamina – TsFePc/Quitosana/TsFePc	51
3.5.2	Multicamadas SAM Mercaptopropanosulfonato - Quitosana/TsFePc.....	51
3.5.3	Multicamadas SAM Mercaptopropanosulfonato – Quitosana/ TsNiPc.....	51
3.5.4	Multicamadas de Mercaptopropanossulfonato - Quitosana/SDS/Quitosana/TsFePc	52
3.5.5	Multicamadas de Mercaptopropanossulfonato – Quitosana/SDS/Quitosana/TsNiPc	52
3.6	Preparo das amostras	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Obtenção e caracterização do ouro nano-estruturado	55
4.1.1	Estudo eletroquímico no ouro	55
4.1.2	Avaliação do tratamento do ouro no aumento da area ativa.....	56
4.1.3	Cálculo da área ativa do ouro policristalino	57
4.1.4	Comportamento de Au nanoestruturado em meio básico e acido	59
4.1.5	Prétratamento do Au por aplicação de pulsos de potencial	60
4.1.6	Perfil de resposta eletroquímico do sistema SPE	61
4.1.7	Caracterização morfológica do eletrodo de ouro	62
4.2	Estudo das monocamadas auto-organizadas de ouro (SAM's).....	64
4.3	Estudo das multicamadas layer-by-layer	70
4.3.1	Estudo do eletrodo SAM-MPS-(Quitosana-TsFePc)n.....	71
4.3.2	Estudo do eletrodo SAM-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc)n	74
4.3.3	Avaliação da influência do surfactante na preparação de filmes	77
4.3.4	Estudo da influência do pH na resposta do sensor para 2NPPD.....	80
4.3.5	Estudo da influência do tampão na determinação de 2NPDD.....	81

4.3.6	Otimização do numero de camadas no filme LBL	82
4.4	Estudo de seletividade.....	83
4.5	Características analíticas do sensor proposto para 2NPPD	86
4.6	Acoplamento do sensor a sistema em fluxo.....	90
4.7	Determinação de 2 NPPDem amostras reais	92
4.7.1	Análise de tintura de cabelo masculina.....	92
4.7.2	Análise de água de torneira enriquecida com 2NPPD	94
5	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS.....	101

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

No mercado, existem disponíveis vários tipos de produtos para coloração dos cabelos, que variam desde simples shampoos até as mais complexas tinturas. Estes produtos serão muitas vezes descritos como sendo de "Nível 3" em particular para os corantes de oxidação ou permanentes [1]. Adicionalmente, deve ser destacado que atualmente a demanda tem aumentado tanto que além do público feminino, muitos destes produtos têm sido direcionados para o mercado masculino e adolescente, ambos em crescente expansão [2]. É de se esperar que com o aumento do uso destes produtos cosméticos, a quantidade de rejeitos lançados ao ambiente produzidos por seu uso também tenha aumentado, e pesquisas no sentido de avaliar os efeitos destes corantes no meio ambiente tem sido intensificadas, principalmente nas áreas de degradação, avaliação da toxicidade e de identificação e quantificação.

1.1 Fisiologia e anatomia do cabelo

O cabelo é um tecido complexo, cuja estrutura e biologia são apenas parcialmente compreendidas. Não é uma fibra homogênea, mas é constituído por células queratinizadas, coladas pelo complexo de membrana celular que, juntos, formam três estruturas concêntricas: a cutícula, córtex e a medula (Figura 1a) [3]. O cabelo se origina a partir do folículo capilar (Figura 1b) localizado 3 - 5 mm abaixo da superfície da pele. O folículo de cabelo é rodeado por um sistema capilar rico que proporciona o crescimento do cabelo, com o material metabólico necessário. O centro de germinação em torno do bulbo capilar, papila, é formado por células da matriz (queratinócitos e melanócitos) presentes na membrana basal.

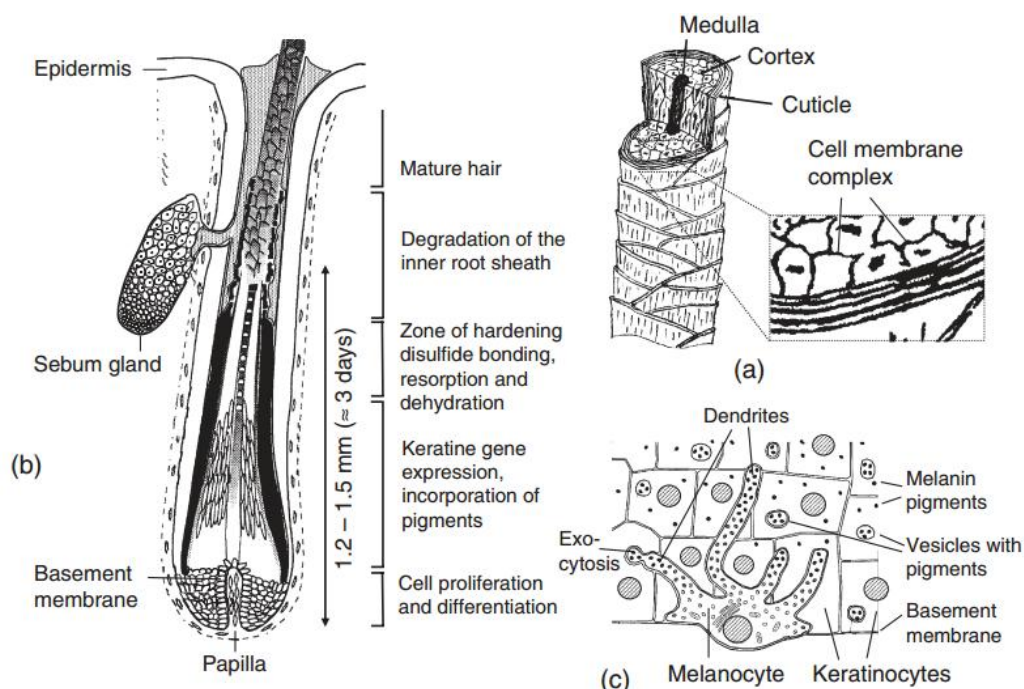


Figura 1. Estrutura e componentes do fio do cabelo humano humano: (a) Formação de cabelo em um folículo de células da matriz sobre a membrana basal ao eixo do cabelo maduro. (b) Os melanócitos sobre a membrana basal do córtex sintetizam melanina nos melanossomas, que são descarregados em vesículas em queratinócitos por um mecanismo excitotóxico. Ali, as membranas das vesículas e melanossomas são digeridos e continuam a ser os pigmentos de melanina (c). Figura retirada da referência [3].

A cor do cabelo é produzida pelos melanócitos localizados na camada basal em contato com a membrana basal (Figura 1c). Melanócitos produzem pigmentos de melanina nos melanossomas e têm dendritos longos que penetram nos queratinócitos vizinhos e nas vesículas de descarga dos melanossomas.

O ciclo de crescimento do cabelo é composto pelas etapas anágena (crescimento ativo), catágena (transição) e telógena (repouso) (Figura 2). O comprimento individual de cabelo depende da duração da etapa e a taxa de crescimento. Os valores médios para estas etapas são 4 – 8 anos, algumas semanas e 4 – 6 meses, respectivamente. O crescimento do cabelo no couro cabeludo varia em média de 0,6 – 1,4 cm por mês [4].

Porém, existem diferenças significativas tanto nas proporções anágena/telógena do cabelo e taxa de crescimento em vários sítios anatômicos; ambos os parâmetros são dependentes de raça, sexo, idade e estado de saúde. Em um determinado momento, aproximadamente 85% do cabelo no couro cabeludo de adultos está na fase de crescimento (anágena), com os 15% restantes na fase de repouso, telógena.

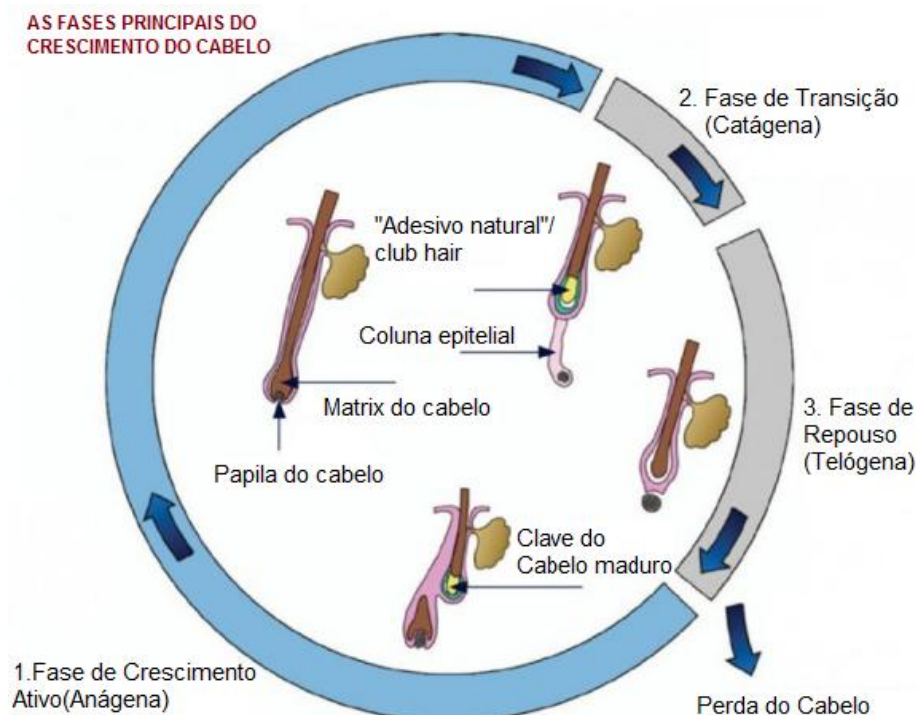


Figura 2. Fases do crescimento do cabelo. extraído da referência [5].

Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration (FDA)* é o órgão responsável pelo controle de qualidade dos produtos cosméticos [6]. Já a França adotou o sistema de Cosmetovigilância para garantir a qualidade e segurança dos produtos comercializados no País [7]. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão nacional competente que atua na vigilância sanitária do setor de cosméticos. A legislação tem sido adaptada às exigências do MERCOSUL, da União Europeia e demais países, não só para facilitar os processos de importação e exportação de produtos cosméticos, como também, para garantir maior margem de segurança ao uso desses produtos. Assim a partir de 31 de dezembro de 2005, obrigou-se a implementação do sistema de Cosmetovigilância em todas as empresas fabricantes e/ou importadoras de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes [8].

O sistema de Cosmetovigilância foi criado para facilitar a comunicação, sobre problemas decorrentes do uso, defeitos de qualidade ou efeitos indesejáveis dos produtos a que se refere e também para melhorar o acesso do consumidor às informações sobre esses produtos. Através do sistema de Cosmetovigilância, as empresas fabricantes e/ou importadoras de produtos cosméticos deverão ter registro de todos os relatos feitos pelos consumidores em relação a problemas causados por cosméticos, e avaliá-los. A partir dessa avaliação devem ser tomadas medidas com o intuito de garantir a qualidade e

segurança do produto em questão. No caso de situações que impliquem em risco à saúde do usuário, as empresas deverão notificar à ANVISA sobre o relato [9].

1.2 Produtos cosméticos

De acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2003, cosméticos, produtos de higiene e perfumes são: “Preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas de uso externo nas diversas partes do corpo humano, tais como pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais, protegê-los ou mantê-los em bom estado” [10].

Os produtos denominados **cosméticos** são aqueles produtos para uso externo, destinados à proteção ou ao embelezamento das diferentes partes do corpo, tais como pós-faciais, talcos, cremes de beleza, creme para as mãos e similares, máscaras faciais, loções de beleza, soluções leitosas, cremosas e adstringentes, loções para as mãos, bases de maquiagem e óleos cosméticos, *blushes*, batons, lápis labiais, protetores solares, bronzeadores, rímeis, sombras, delineadores, **tinturas capilares**, agentes clareadores de cabelos, preparados para ondular e para alisar cabelos, fixadores de cabelos, laquês, brilhantinas e similares, loções capilares, depilatórios e epilatórios, preparados para unhas e outros [11].

O mercado mundial de cosméticos e perfumes movimentou 454,1 bilhões de dólares em 2013, apresentado um crescimento de 1,7% ao ano anterior. Os Estados Unidos, maior consumidor desses produtos apresentaram um crescimento de 1,8%, enquanto países como Brasil, que se recuperou após uma queda do crescimento, em 2011 teve um crescimento de 18%, no entanto sem crescimento em 2012. Porém, em 2013, o setor brasileiro de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos faturou mais de 43 bilhões de dólares, registrando um crescimento percentual entre os dez maiores mercados do mundo. Atualmente, o Brasil detém 9,5% do mercado global, contra 9,7% da China e 16,1% dos Estados Unidos. Os três primeiros colocados são seguidos pelo Japão (8,6%), Alemanha (4,2%), Reino Unido (3,7%), França (3,7%), Rússia (3,1%), Itália (2,7%) e México (2,4%). Na América Latina o Brasil é líder do mercado de produtos cosméticos [12].

O consumo de produtos cosméticos no Brasil aumenta a cada ano e diante desse mercado em ascensão, as indústrias estão constantemente desenvolvendo novos produtos e processos e, por isso mesmo, seus componentes devem ser seguros, de modo a não oferecer riscos à saúde dos consumidores. Dessa forma, os sistemas de Cosmetovigilância e Controle de Qualidade de tais produtos são extremamente importantes para garantir a qualidade e a segurança dos produtos disponíveis ao consumidor.

1.3 Tinturas Capilares

O uso das tinturas capilares nos remonta no mínimo, 4.000 anos atrás. Os primeiros registros de uso estão no Egito, onde foram encontradas múmias egípcias com o cabelo colorido com henna. No Império Romano, pentes de chumbo mergulhados no vinagre eram utilizados para escurecer cabelos grisalhos. A partir do século XVII, surgiram inúmeras receitas e livros sobre cosméticos. Nessa época, começaram também a surgir os profissionais da cosmética e suas prescrições incluíam, com frequência, banhos de vinho ou de leite nos cabelos [13]. Hoje, milhões de pessoas utilizam tinturas capilares. Muitos produtos e técnicas estão disponíveis, e a composição depende do tipo de coloração.

1.3.1 Classificação das tinturas capilares

As formulações comerciais de coloração para cabelo podem ser classificadas em permanentes, semipermanentes e temporárias. Os produtos de **coloração permanente** são formulados com uma base precursora e com uma base oxidante (exemplo peróxido ou surfactantes) que contém o precursor do acoplador da cor. Este tipo de tintura é formado no ato da coloração. O acoplador precursor consiste em surfactantes, compostos alcalinos, precursores, agente redutor e água (Tabelas 1 e 2). Já que o peróxido é instável em solução alcalina, o acoplador precursor e o oxidante têm que ser armazenados em separado [14].

Tabela N° 1: Composição de tinturas permanentes da base precursora [14].

Componente	% Massa de cada componente para uma dada cor			
	Marrom escuro	Marrom claro	Vermelho	Preto
Dodecil benzeno sulfonato a 50% (v/v)	14,0	14,0	14,0	14,0
Cocodietanolamida	9,0	9,0	9,0	9,0
Neodol 91 – 2,5	6,0	6,0	6,0	6,0
NH ₄ OH	6,0	6,0	6,0	6,0
Na ₂ SO ₃	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>p</i> -fenilenodiamina	0,4	--	--	0,4
<i>o</i> -aminofenol	0,3	0,4	--	0,2
<i>p</i> -aminofenol	--	--	0,4	--
4-metil-5-aminofenol	--	--	0,4	--
<i>m</i> -aminofenol	--	--	--	0,2
Água	64,0	63,9	63,9	63,9

Tabela N° 2: Composição de tinturas permanentes da base oxidante.

Componente	Massa (%)
H ₂ O ₂ a 30% (v/v)	50,0
Dodecil benzeno sulfonato a 50% (v/v)	33,0
Ácido fosfórico	1,0
Água	16,0

Produtos de **coloração semipermanentes** de cabelo não requerem qualquer mistura ou peróxido. A formulação consiste de solventes, surfactantes, corante, fragrância, regulador de pH (compostos ácidos ou alcalinos). Os solventes mais utilizados são água e glicóis ou derivados de glicol. Os tipos de corantes utilizados são derivados de aminas aromáticas neutras, de **aminas nitro aromáticas** ou derivados de antraquinona. Os corantes podem ser classificados como mono-, di-, ou tri-nucleares, dependendo do número de anéis no corante. Estudos têm mostrado que tinturas de cabelo constituídas por corantes mononucleares de baixa massa molar têm uma maior taxa de enxague, liberando uma maior quantidade de substâncias poluentes ao meio ambiente. Já corantes

de ordem maior, com massas molares mais elevadas, são capazes de atingir a posição mais profunda do cabelo e permite uma cor mais duradoura.

Formulações de **coloração temporária** são constituídas por uma mistura de aditivos como surfactante, regulador de pH e corantes. Estes produtos estão disponíveis nas formas de géis, mousses e *sprays*, e podem ser facilmente removidas do cabelo após uma ou várias lavagens, devido a que não apresentam amônia na sua composição.

1.4 Revisão bibliográfica dos compostos 2-nitro-*p*-fenilenodiamina (2NPPD) e 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (4NOPD)

Os compostos 2-nitro-*p*-fenilenodiamina e 4-nitro-*o*-fenilenodiamina são compostos que podem ser considerados dentro da classificação de corantes semipermanentes ou tinturas semipermanentes [15].

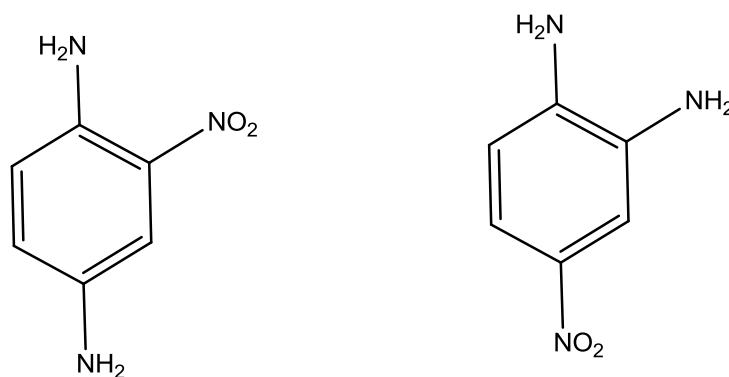


Figura 3: Estrutura química dos analitos 2-nitro-*p*-fenilenodiamina e 4-nitro-*o*-fenilenodiamina.

No entanto, em 1976 Kirkland e Venitt [16] reportaram a atividade mutagênica de ambos compostos, comprovando que a 2-nitro-*p*-fenilenodiamina causa maior dano cromossômico em bactérias que o composto 4-nitro-*o*-fenilenodiamina. Ambos compostos têm sido reportados como potentes mutagênicos em bactérias, e estudos têm mostrado que tinturas contendo 2NPPD e 4NOPD são carcinogênicas para ratos [17- 18].

Yourick *et al.* [19], realizaram um estudo *in vitro* para medir a absorção e metabolismo de 2NPPD em pele humana e em rato, comparando os resultados com estudos prévios [20], os ensaios indicaram que 2NPPD penetra rapidamente, tanto na pele humana como na pele de rato. Os trabalhos foram realizados sob condições que simulam as condições normais de utilização do consumidor, aproximadamente 5 – 10% para o 2NPPD.

Devido ao crescimento da indústria cosmética e em especial o das tinturas de cabelo no mundo inteiro o volume de efluentes contendo estes contaminantes emergentes tem aumentado exponencialmente nos últimos anos. Em relação aos corantes de cabelo estatísticas mostram que aproximadamente 35% das mulheres e 10% dos homens na Europa, Japão e Estados Unidos usam tinturas de cabelo. Entretanto, ainda são desconhecidos detalhes sobre a toxicidade e/ou genotoxicidade destes compostos e seus derivados, e por tal razão estudos visando elucidar seus efeitos desfavoráveis ao meio ambiente têm atraído muito a atenção. A utilização de determinadas substâncias cosméticas já é proibida em formulações de acordo com o anexo II da Diretiva dos Cosméticos da UE [21], considerando suas propriedades toxicológicas e/ou carcinogênicas.

Nesse sentido, sensores altamente seletivos e sensíveis podem ajudar no controle ambiental desses poluentes emergentes. Esses dispositivos podem ser sensores eletroquímicos, dentre os quais destacam-se os sensores biomiméticos, que podem ser definidos como um subtipo de “biossensores enzimáticos”, nos quais o eletrodo é modificado com uma substância redox com estrutura análoga ao sítio ativo de alguma enzima tomada como modelo [22].

Os sensores biomiméticos são uma nova estratégia experimental que tem sido usada para obter sensores amperométricos mais estáveis e duradouros que os biossensores convencionais que possuem como base materiais biológicos. Estes dispositivos visam vencer as limitações dos biossensores enzimáticos tais como disponibilidade, custo e instabilidade das enzimas assim como promover uma melhora na transferência eletrônica entre eletrodo/sítio ativo (complexo redox) substrato, desde que nos sensores biomiméticos o “sítio ativo” encontra-se descoberto, diferente do que acontece nas enzimas, onde o sítio ativo encontra-se rodeado pela densa camada de aminoácidos residuais [23].

Pensando nisto, este trabalho visa o desenvolvimento de sensores biomiméticos sensíveis e seletivos para determinação de corantes semipermanentes de cabelo. Para conferir seletividade aos sensores serão usados catalisadores biomiméticos que imitem o sítio ativo da enzima P450, que catalisa muitas reações biologicamente importantes nos organismos, dentre elas degradação de pesticidas e xenobióticos, assim como metabolização de fármacos [24]. Para aumentar a sensibilidade dos sensores, os mesmos serão preparados sobre superfícies de ouro nano estruturados, com a finalidade de

aumentar a área superficial do eletrodo base, melhorar a transferência eletrônica e subsequentemente melhorar a atividade eletrocatalítica do sistema.

1.5 Eletrodos quimicamente modificados

Funcionalizar eletrodos ou modificar as superfícies com filmes seletivos é uma das formas mais comuns, nos dias atuais, para estudos eletroanalíticos em áreas como biotecnologia, medicina, engenharia, química, entre outras [25-26]. Isso ocorre, pois uma das principais possibilidades de aplicação desses filmes é na transdução de sinais derivados de moléculas alvo, por exemplo, em biossensores amperométricos (Figura 4) [27].

Existem diferentes métodos para a formação de filmes finos na superfície de suportes, que serão detalhadas a seguir.

1.5.1 Recobrimento por secagem (*drop casting*)

É o processo que consiste no depósito de uma gota de solução na superfície do eletrodo (ou suporte) e posterior evaporação do solvente de forma espontânea (à temperatura ambiente). A desvantagem deste tipo de recobrimento é que ela não consegue atingir toda a superfície do eletrodo de forma homogênea, tal como se mostra na Figura 5.

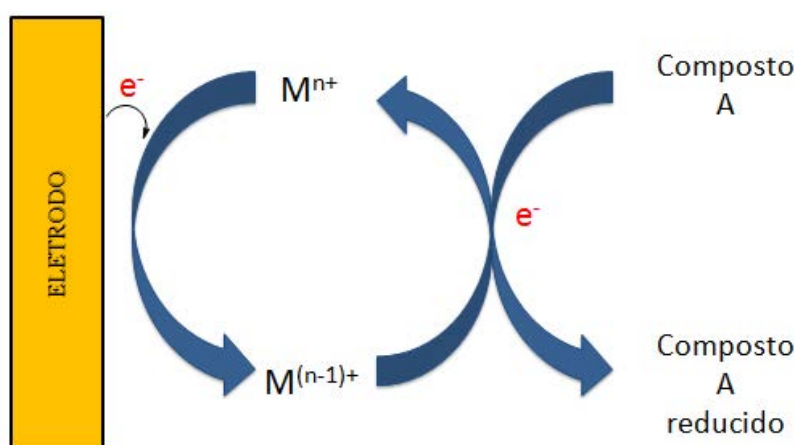


Figura 4: Esquema do comportamento de um eletrodo modificado na transdução da sinal amperométrico.

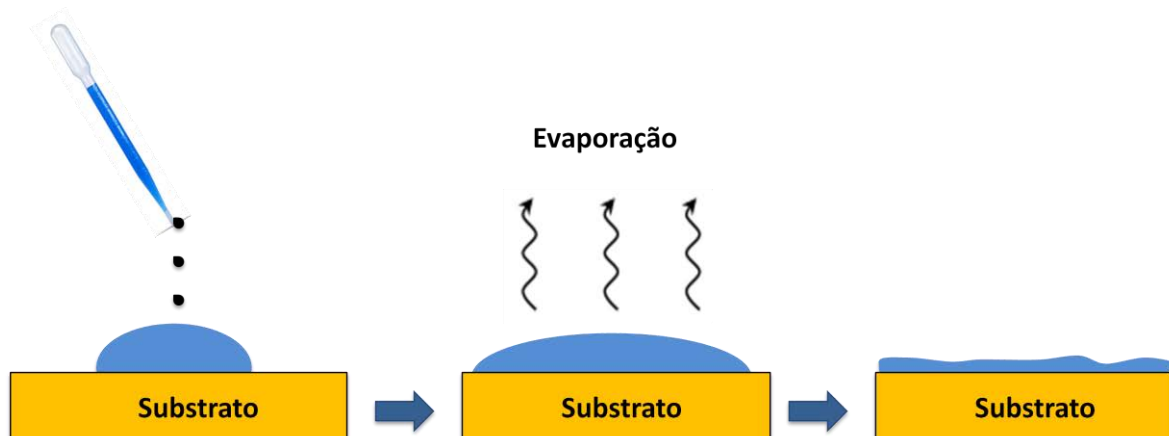


Figura 5: Esquema do processo de formação de filmes pelo método recobrimento por secagem.

1.5.2 Recobrimento por imersão (*dip coating*)

O processo no qual o substrato a ser modificado (eletrodo) é mergulhado na solução e depois retirado a uma velocidade controlada, é chamado de *dip coating*. Este processo consegue formar filmes homogêneos e pode ser realizado manualmente. Dentre suas vantagens se encontram, a não necessidade de equipamento sofisticado, como no caso da *sping coating*, e é muito utilizado na formação de filmes pelas técnicas Lagmuir-Blodgett (LB), *layer-by-layer* (LBL) e monocamadas auto-organizadas (SAM).

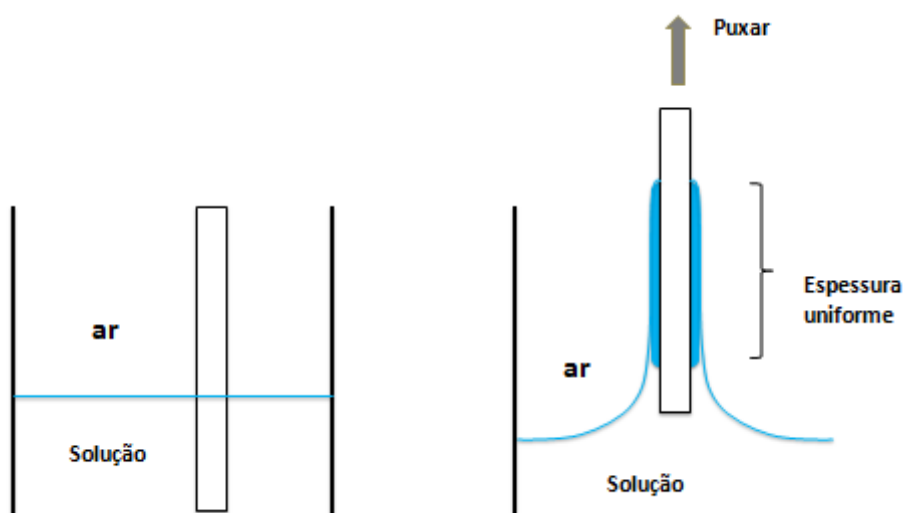


Figura 6: Esquema do processo de formação de filmes pelo método de imersão.

1.5.3 Recobrimento por rotação (*spin coating*)

É um método comum para a produção de filmes finos uniformes sobre superfícies planas. A evaporação do solvente da dispersão pode ser acelerada por *spin-coating*. Neste processo, uma quantidade excessiva de suspensão é colocada sobre a superfície do equipamento e, a seguir é aplicada uma rotação a velocidade elevada em torno do eixo perpendicular ao plano do substrato, a fim de espalhar o fluido homogeneamente usando a força centrífuga gerada. Devido à aceleração centrífuga, a maior parte da suspensão é arremessada para fora da borda do substrato, deixando uma película fina de partículas, após a evaporação do líquido na superfície.

O processo *spin-coating* pode ser dividido nas quatro fases mostradas na Figura 7; a deposição, os estados de giro *spin up* e *spin off*, e a evaporação que ocorre durante todo o processo.

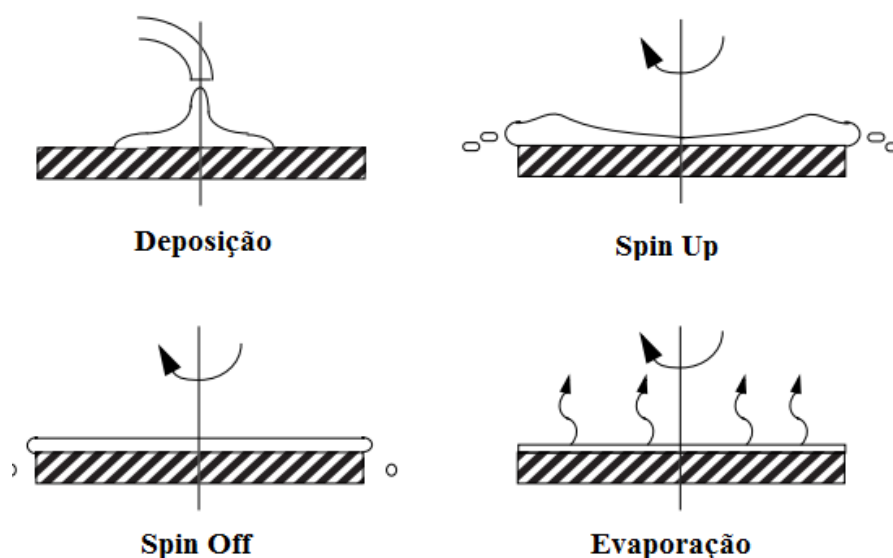


Figura 7: Etapas do processo de formação de filmes pelo método de spin coating. Adaptado da referência [28].

Películas finas de diferentes espessuras podem ser depositadas por *spin coating*, onde a espessura da película pode ser estimada como sendo inversamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de centrifugação. Entretanto, com o aumento da espessura do revestimento, torna-se mais difícil encontrar uma mistura de solvente/soluto que seque antes de chegar à borda do substrato. Por esta razão, filmes mais grossos são ocasionalmente formados pela sobreposição de vários filmes finos, oferecendo revestimentos mais homogêneos.

1.6 Técnicas para formação de filmes

1.6.1 Filmes Langmuir-Blodgett

A técnica de Langmuir-Blodgett (LB), uma das técnicas mais antigas para formação de filmes, baseia-se nas propriedades particulares que possuem algumas moléculas orgânicas, chamadas de anfifílicas, tais como surfactantes, lipídeos, fosfolipídios ou glicolipídeos de se orientar em uma interface ar/água para minimizar a energia livre e formar uma monocamada insolúvel chamada de filme de Langmuir. Os materiais anfifílicos são compostos por duas regiões moleculares distintas: uma cabeça hidrofílica que é facilmente solúvel em água, e uma cauda hidrofóbica, que é solúvel em solventes não polares (Figura 8).

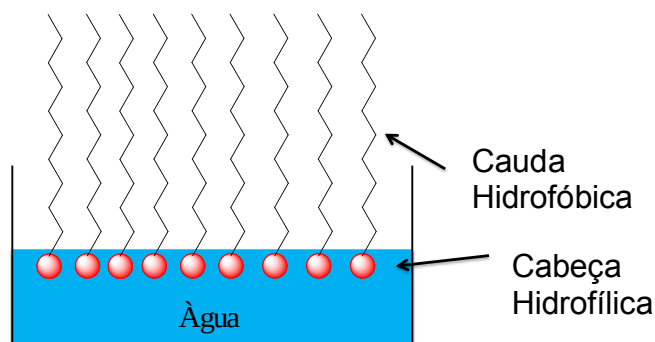


Figura 8: Estrutura de moléculas anfifílicas na interface água-ar do filme de Langmuir. Adaptado da referência [29].

O procedimento seguinte para a formação do filme em um substrato metálico (mostrado na Figura 9) consiste em: (i) no espalhamento das moléculas anfifílicas em solução (dispersão), (ii) formação da película interfacial e (iii) uma vez que a pressão de superfície é suficientemente elevada para assegurar a coesão lateral na película interfacial, ocorre a imersão do substrato sólido na solução, e a monocamada de flutuação pode ser transferida, como um “tapete” da superfície da água sobre uma placa de “substrato” sólido.

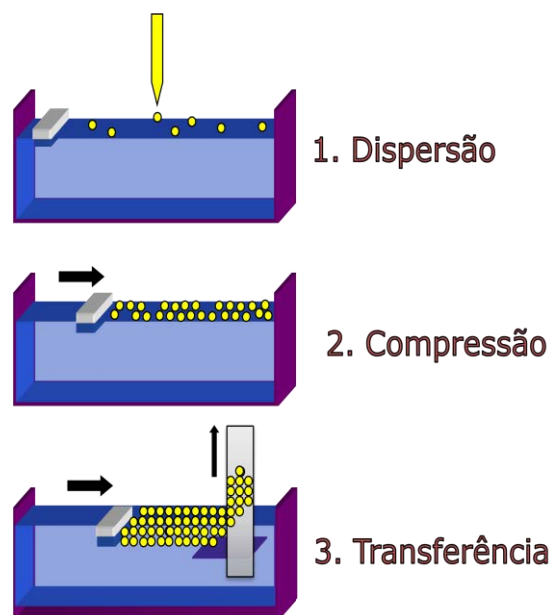


Figura 9: Esquema da formação de filmes Langmuir-Blodgett. Adaptado da referência [29].

1.6.2 Monocamadas auto-organizadas (SAM)

A formação de monocamadas auto-organizadas (SAM: *Self Assembled Monolayers*) em suportes sólidos é uma técnica mais nova do que a técnica de LB, que é considerada uma técnica clássica. Há 20 anos que o uso de SAM vem crescendo, devido às vantagens que oferece em comparação com o método clássico, principalmente pela simplicidade do procedimento de formação.

Denominam-se monocamadas auto-organizadas (SAM) as estruturas moleculares ordenadas, que se obtêm pela adsorção espontânea de certos tipos de moléculas orgânicas, a partir de um meio gasoso ou líquido, sobre a superfície de sólidos (ouro, prata, etc.) ou líquidos (mercúrio) [30]. Durante o processo de auto-organização estas moléculas se organizam em estruturas complexas com um menor número de graus de liberdade. Este processo está governado pela interação entre a superfície e algum átomo da molécula, que normalmente forma uma ligação covalente com o suporte sólido, e por forças de van der Waals entre as moléculas adsorvidas [31].

Nas moléculas que formam as monocamadas auto-organizadas pode-se distinguir três partes importantes: a cabeça, que possui afinidade pelo substrato formando geralmente uma ligação covalente, um exemplo é formado entre o Au e S; a cauda, que atua como espaçador ou uma ponte intermolecular entre o eletrodo metálico e a solução, e cujas interações laterais dão estabilidade e um melhor empacotamento da

monocamada; e o grupo funcional terminal que se encontra em contato com a dissolução e vai fornecer as propriedades da superfície da monocamada (Figura 10).

Devido a que o processo de auto-organização é termodinamicamente controlado, se considera que SAM são estruturas altamente organizadas, e que se formam com o menor número possível de defeitos controlando certos parâmetros na formação das mesmas. No entanto, as SAM's apresentam estruturas muito mais complicadas do que os simples ordenamentos assumidos (Figura 11). As causas dos defeitos nas SAM's são intrínsecas e extrínsecas. O último é devido a fatores externos, tais como a lavagem do substrato, métodos de preparação e a pureza das soluções de adsorção. A intrínseca, no entanto, é devida à natureza da própria organização da monocamada, tal como um comportamento dinâmico do sistema complexo.

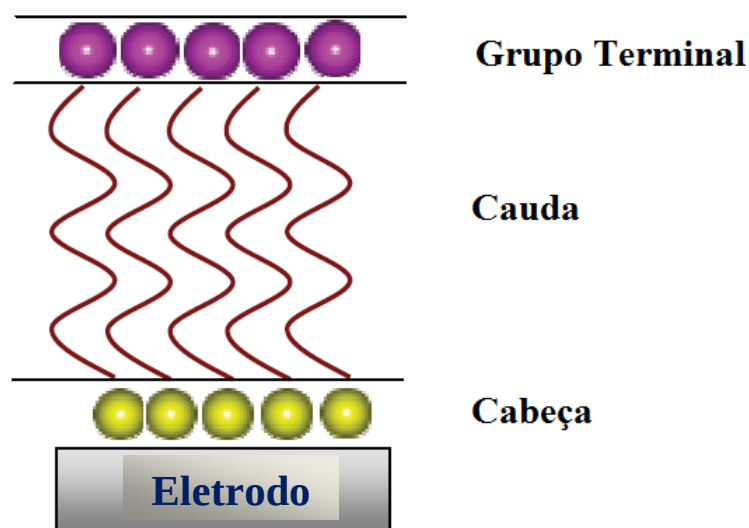


Figura 10: Partes das moléculas na formação de SAM. Adaptado de referência [32]

Alguns defeitos das SAM

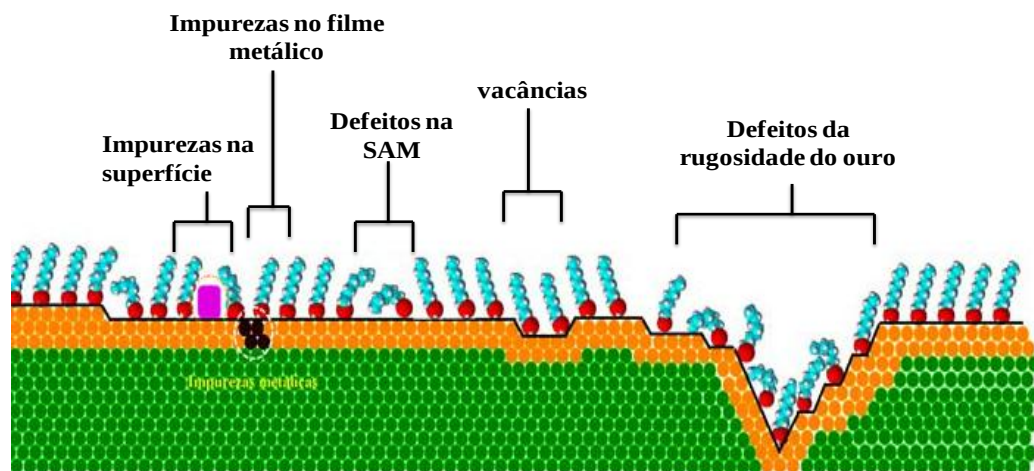


Figura 11: Alguns defeitos extrínsecos e intrínsecos na formação de SAM. Adaptado da referência [33].

1.6.3 Filmes montados através da técnica LBL (*layer-by-layer*)

A técnica de obtenção de filmes finos de polieletrólitos foi primeiramente descrita por Iler em 1966 [34]. No entanto, no início de 1990, o método ganhou bastante atenção após Decher [35] desenvolver o processo de formação de filmes finos por deposição alternada de polieletrólitos carregados positivamente e negativamente sobre uma superfície também eletrostaticamente carregada (Figura 12). Este procedimento foi denominado técnica de montagem camada por camada (LBL), e desde então, centenas de artigos publicados acerca de filmes de multicamadas de polieletrólitos (PEMU) feitas pelo método LBL. A técnica de montagem LBL fornece-nos baixo custo, alta reprodutibilidade, ambientalmente amigável, e robusta para construir filmes finos de espessura que pode variar entre alguns nanômetros a micrometros, que podem ser usados em diferentes tipos de aplicações, desde eletrônicas a bioeletrônicas, para a melhora da superfície de dispositivos elétricos [36-37], separadores iônicos [38], liberação controlada de fármacos [39], corrosão [40] e sensores [41].

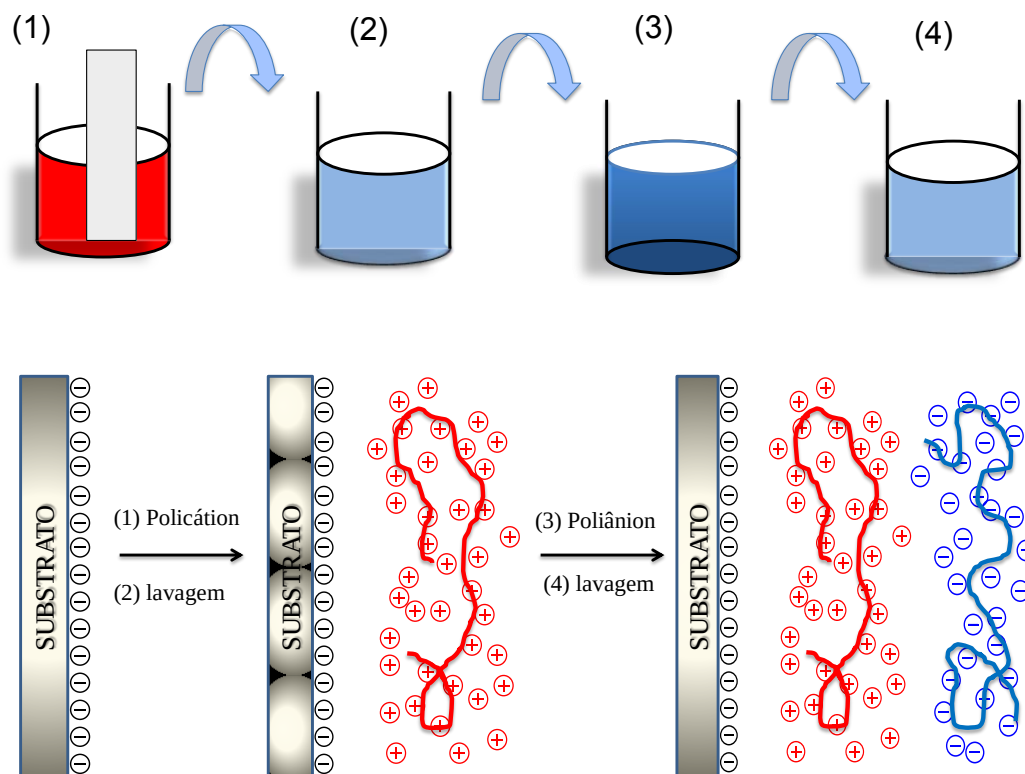


Figura 12: Representação esquemática da formação de multicamadas pela técnica LBL em uma superfície carregada. Adaptado da referência [42].

A técnica LBL, ao contrário das técnicas comuns (tais como deposição no vácuo, deposição Langmuir-Blodgett, SAM, entre outras) tem poucas limitações, à diferença das outras técnicas, que só trabalham em alguns tipos de materiais e em condições específicas. Por outro lado, a técnica LBL permite usar uma ampla gama de polieletrólitos, tais como polímeros [39], DNA [43] e corantes [44]. O procedimento é realizado em condições ambientais e não precisa de equipamentos especiais, e nem de condições à vácuo.

1.6.3.1 Polieletrólitos

Os polímeros são macromoléculas de alta massa molar, que contém na sua estrutura unidades repetitivas [45]. Eles têm sido estudados ao longo do tempo em diversas áreas, tais como eletrônica, plásticos, etc. Polímeros que apresentam cargas nas unidades repetitivas são chamados de polieletrólitos. Polieletrólitos com carga positiva são chamados de policátions, polieletrólitos com carga negativa são chamados de poliânions,

e polieletrólitos com carga positiva e negativa são chamados de polizwiteriônicos (Figura 13).

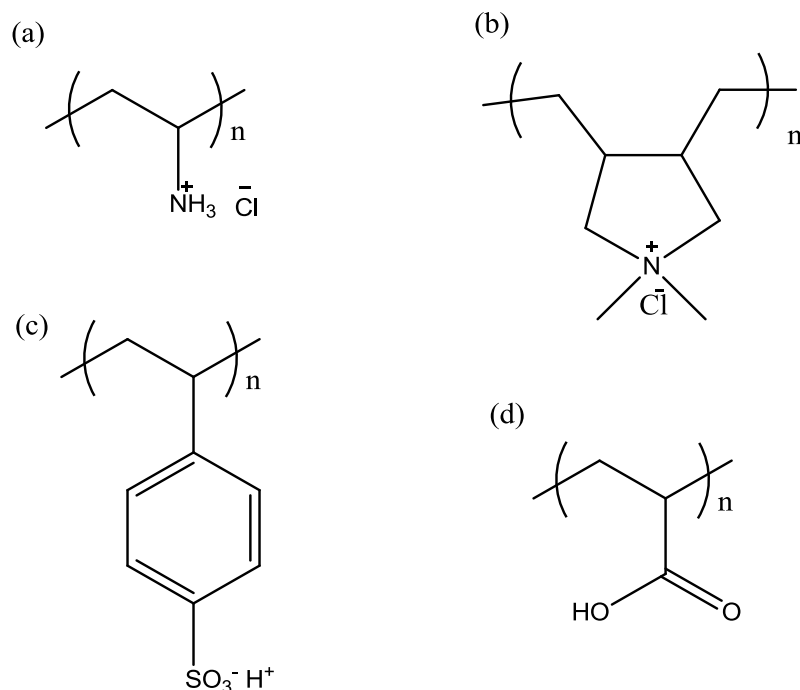


Figura 13: Estrutura química de alguns polieletrólitos mais utilizados poli(hidrocloreto de alilamina) (a), poli(cloreto de dialilmetilamônio) (b), poli(ácido estireno sulfônico)(c) e poli(ácido acrílico) (d) [42]

Quando um polieletrólito é dissolvido em água ou em algum solvente polar, ele adquire um número grande de cargas distribuídas ao longo da cadeia polimérica. Os polieletrólitos são nomeados de fortes quando estão completamente dissociados, independente do pH da solução, e fracos quando se encontram parcialmente ionizados, similarmente com o que ocorre na classificação de eletrólitos fortes e fracos.

A conformação do polieletrólito em solução dependerá da força iônica do solvente, da concentração do polieletrólito e da carga do polímero. Em uma solução com força iônica fraca, as cargas tendem a ficar livres do efeito do contra-íon do solvente, e sentem a repulsão entre as unidades repetitivas do outro polieletrólito. Em uma solução com força iônica forte, as cargas do polieletrólito estão ocultas e a interação repulsiva entre os grupos carregados diminui, adotando uma estrutura conformacional mais flexível (Figura 14).

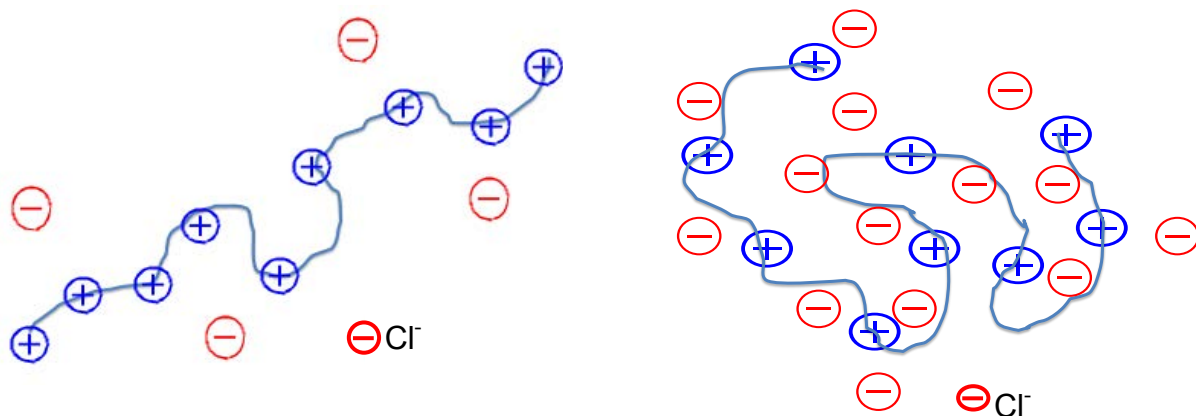


Figura 14: Representação esquemática de um polieletrólito em uma solução com força iônica fraca (esquerda) e forte (direita). Adaptado da referência [42].

1.6.3.2 Mecanismo de crescimento das camadas

As aplicações de multicamadas de polieletrólito têm crescido exponencialmente, embora ainda exista pouca explicação científica do que ocorre no campo de preparação de multicamadas de polieletrólitos, no que diz respeito ao mecanismo de crescimento destes filmes, composição do polieletrólito e conformação. Por tal razão, diferentes trabalhos têm-se focado no estudo do mecanismo de crescimento dos polieletrólitos em superfícies carregadas [46].

Acredita-se que a interação entre os grupos com cargas opostas das cadeias de polieletrólito é principalmente eletrostática, o que resulta numa estrutura iônica reticulada. A formação das multicamadas de polieletrólitos ocorre provavelmente, pela perda de água e de contra íons na solução, tal como se mostra na Figura 15.

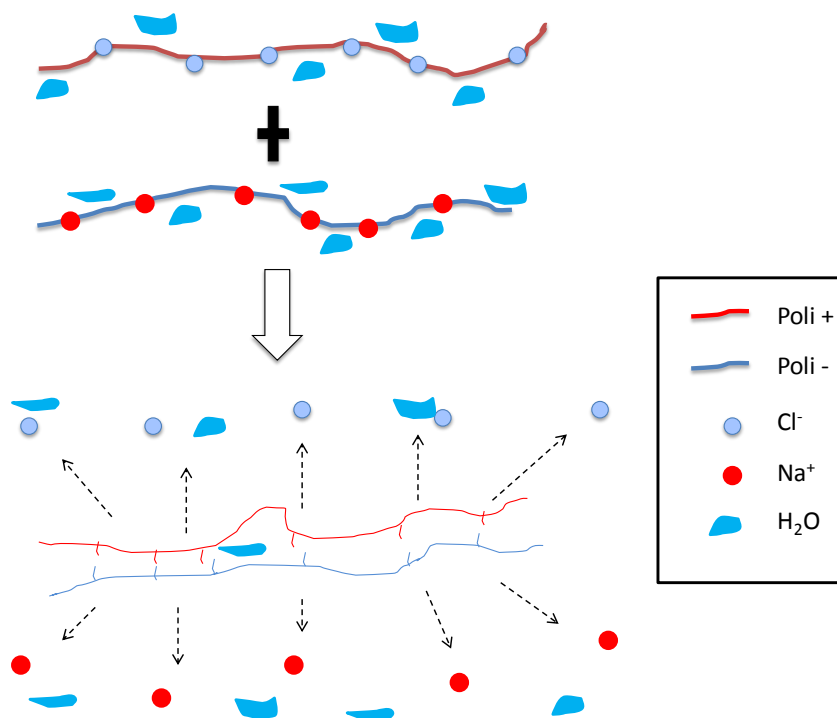


Figura 15: Representação da associação entropicamente conduzida entre cadeias de polieletrólito negativas e positivas acompanhadas pela liberação de água e contraíons mediante complexação. Adaptado da referência [42].

Existem dois mecanismos propostos que explicam o crescimento de multicamadas de polieletrólitos, o crescimento linear onde o incremento da espessura constante é observado com a deposição das camadas [47-48], e o crescimento exponencial onde pelo menos um polieletrólito difunde-se a través do filme [46]. O crescimento linear foi observado em polieletrólitos ionizados fortemente e totalmente carregados, onde a formação de uma ligação eletrostática entre as cadeias do polieletrólito com carga oposta é entrópica e cineticamente favorecida, levando a interdifusão limitada entre ambos os polieletrólitos. O crescimento exponencial foi observado em filmes arranjados de polieletrólitos fracos, tais como poli(ácido glutâmico), poli(L-lisina) e ácido hialurônico [49].

Muitos estudos têm sido realizados para explicar o crescimento de acumulação dos polieletrólitos, tais como a distribuição de carga da massa para a superfície, a quantidade de interpenetração do polieletrólito, e o incremento de espessura com o número de camadas [46].

1.7 Técnicas eletroquímicas

1.7.1 Voltametria cíclica.

A polarização potenciodinâmica cíclica mais conhecida como voltametria cíclica é uma técnica experimental fundamental em eletroquímica, sendo uma das principais ferramentas para o estudo de processos eletródicos.

Na voltametria cíclica (VC) é aplicada ao sistema uma variação linear do potencial, a partir de um potencial inicial (E_1) até um valor final (E_2), após o qual o sentido da varredura é invertido, sendo o efeito total do estímulo da forma de uma onda triangular. Em cada momento, o potencial aplicado, responde à seguinte equação (1):

$$E = E_i \pm vt \quad (1)$$

Onde v é a velocidade de variação do potencial com o tempo, $\delta E/\delta t$, e é conhecida como velocidade de varredura. E_i , no sentido de varredura direta é o E_1 e na varredura reversa é o E_2 .

Na Figura 16, se mostra a onda triangular, onde o potencial varia linearmente com tempo (em uma determinada velocidade de varredura, v) a partir de um valor E_1 para um valor E_2 , então pode-se voltar para o mesmo valor inicial E_1 ou outro valor E_3 e assim por diante em múltiplos ciclos. A velocidade de varredura usada é geralmente entre alguns mV s^{-1} até 100 V s^{-1} .

Com o estímulo anterior, é traçada a resposta da corrente do sistema em função do potencial aplicado (que por sua vez, está em função do tempo) obtendo-se o gráfico de corrente-potencial, ou voltamograma cíclico (Figura 17). A forma exata da curva depende do tipo de processo que tem lugar no eletrodo de trabalho. Os limites de potenciais definem as reações eletródicas possíveis a ocorrer, e a velocidade de varredura de potencial define a escala de tempo em que o processo eletroquímico vai ser examinado.

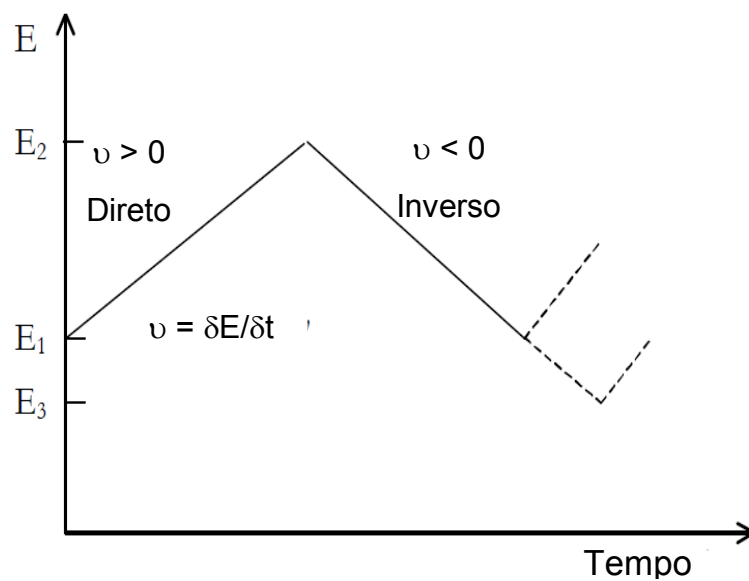


Figura 16: Perfil do potencial em função do tempo na voltametria cíclica. Estimulo da onda triangular. Adaptado da referência [50].

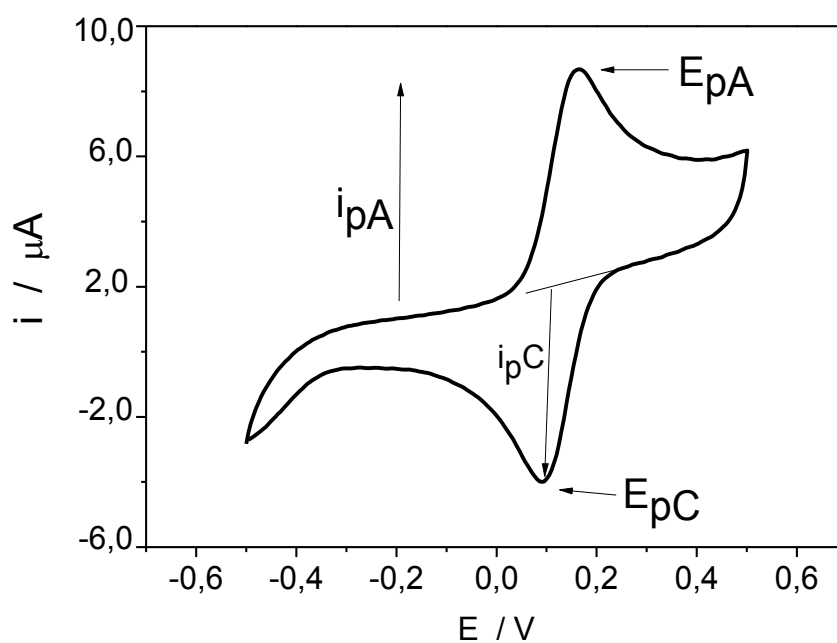


Figura 17 Voltamograma cíclico de uma reação redox reversível $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 1 mol L^{-1} , $v=50 \text{ mV s}^{-1}$.

O equipamento necessário para a realização de medidas voltamétricas é um potenciostato com programação de potencial. As medidas são realizadas em células eletroquímicas com três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de

referência e um eletrodo auxiliar, ou contra-eletrodo, mergulhados em solução contendo o analito e eletrólito suporte.

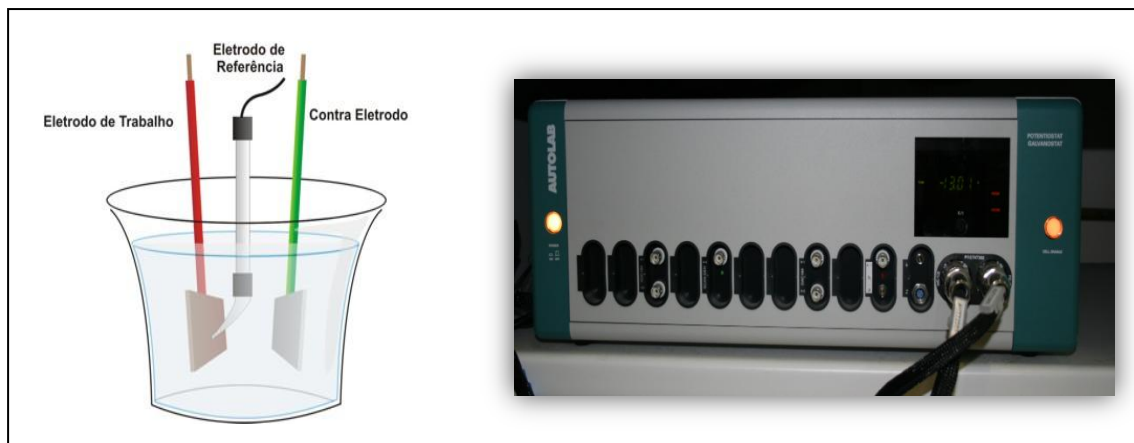


Figura N° 18: Equipamento utilizado nas medidas de corrente em função do potencial (potenciostato) e a respectiva célula eletroquímica de três eletrodos.

A voltametria cíclica é frequentemente a primeira técnica utilizada em um estudo eletroanalítico, sendo largamente empregada como critério de diagnóstico qualitativo dos processos que ocorrem na interface. Utilizando como variáveis a velocidade de varredura e os potenciais iniciais e finais, é possível identificar processos de oxidação, redução e de adsorção/dessorção e determinar se eles acontecem em apenas uma ou várias etapas, ou ainda se correspondem a um processo reversível ou irreversível. Assim, utilizando voltamogramas cíclicos com faixas de potencial e velocidade de varredura adequada, é possível obter condições reprodutíveis da superfície de uma infinidade de materiais metálicos e ligas.

Na voltametria cíclica podem ser reconhecidos sistemas reversíveis segundo a reação 1:



onde O e R são as espécies oxidadas e reduzidas solúveis, sob a análise da curva I vs E, a corrente depende do controle cinético e do controle difusional, observando-se um crescimento da corrente na medida em que aumenta o sobrepotencial, atingindo um pico de corrente, quando a reação começa a ser controlada por difusão. Este pico de corrente é um parâmetro característico da voltametria.

Na Figura 17 mostra-se o voltamograma cíclico obtido para uma reação reversível que transfere $1e^-$, onde a espécie eletroquímica está em solução. Se o potencial for varrido durante o intervalo em que a reação de oxidação é produzida ($R \rightarrow O$), inicialmente, e após a alteração do potencial aplicado, a oxidação de R na superfície é promovida e, portanto, a densidade de corrente anódica aumenta. Esta densidade de correntes continua a aumentar até que a concentração de superfície torna-se zero e, portanto, a reação torna-se controlada pela difusão. Na medida em que a concentração de superfície é mantida em zero, e com o tempo o fluxo da espécie oxidada para a superfície diminui, e assim, a densidade de corrente diminui, e, desta forma tem um pico de resposta. Para a varredura reversa, a reação de transferência de elétrons no eletrodo é $O \rightarrow R$, de modo que a corrente muda de sinal. A corrente catódica também gerará um pico, passando por um processo semelhante ao descrito acima.

A análise por voltametria cíclica conduz em alguns casos para certos sistemas à obtenção de parâmetros termodinâmicos e do coeficiente de difusão.

No caso de uma espécie que reage muito rapidamente com a superfície de um eletrodo (caso reversível), o potencial formal de media onda ($E'_{O/R}$) é dado pela equação 2.

$$E'_{O/R} = \frac{(E_p^A + E_p^C)}{2} \quad (2)$$

onde E_p representa o potencial da corrente de pico e os sobrescritos A e C, representam os processos anódicos e catódicos, respectivamente.

O coeficiente de difusão da espécie em solução até a superfície do eletrodo em um dado eletrólito, pode ser determinado a partir de gráficos de corrente de pico, i_p , em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, $v^{1/2}$, usando a equação de Randles-Sevcik [51] a 298 K (equação 3).

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_R^{1/2} v^{1/2} C_R^* \quad (3)$$

onde a corrente de pico, i_p , é dada em Amperes; a área ativa do eletrodo, A (cm^2); a concentração da espécie eletroativa no seio da solução é C_R^* (mol cm^{-3}); o coeficiente de difusão D_R ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e a velocidade de varredura, v (V s^{-1}).

Em processos quase-reversíveis, a taxa de transferência de elétrons é insuficiente para manter a espécie de equilíbrio na interface solução/eletrodo, então, a forma do voltamograma é diferente. Em uma velocidade de varredura baixa, o sistema se comporta como um sistema reversível devido a que a mudança no potencial é lenta e o sistema tem tempo para que o material adjacente à superfície esteja em equilíbrio com o potencial aplicado. No entanto, quando a velocidade de varredura aumenta a velocidade de transferência de elétrons não é correspondido com a velocidade de varredura, e as concentrações superficiais de sistema redox não conseguem se equilibrar. Isto é evidenciado pelo aparecimento retardado da corrente de pico e a consequente separação do potencial anódico e catódico de pico. Se o processo é completamente irreversível ausência de pico é observada quando a varredura de potencial é invertida. Além disso, o potencial de pico, E_p , depende da velocidade de varredura.

1.7.2 Voltametria de onda quadrada

Esta é uma técnica de pulso que oferece vantagens como maior intensidade de sinal, melhores resolução do pico, medidas mais rápidas e maior sensibilidade, podendo seu limite de detecção ser comparado ao de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Também a corrente faradáica pode ser coletada num intervalo de tempo adequado para diminuir a contribuição da corrente capacitiva. A análise de seus parâmetros característicos permite ainda, a avaliação mecanística e cinética dos processos eletródicos. Nesta técnica, são impostos um pulso direto e um pulso inverso (Figura 19). No primeiro é produzida uma corrente catódica i_1 e no segundo uma corrente anódica, i_2 . No ponto 1, os elétrons fluem do eletrodo para o analito, e no ponto 2 na direção inversa. As correntes são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante (Δi) de forma diferencial, ou seja, como as duas correntes têm sinais opostos, sua diferença é maior que qualquer uma das correntes em separado. Os limites de detecção para esta técnica voltamétrica são da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. A forma da curva de corrente vs potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura (amplitude do pulso de potencial); que varia de acordo com uma escada de potencial, E_s (incremento) e período τ (duração do pulso). O perfil da variação de potencial com a corrente está representado (Figura 20) e consiste na sobreposição de uma onda quadrada a uma função rampa escalonada em degraus (Figura 19). Durante cada pulso catódico, o analito se reduz na superfície do eletrodo, e durante o pulso anódico, o analito reduzido volta a se oxidar. O fato que se utilizem um pulso direto e

inverso faz com que a voltametria de onda quadrada ganhe ligeiramente da voltametria de pulso diferencial nos limites de detecção, além do mais, que essa técnica pode chegar a velocidades de varredura maiores do que a voltametria de pulso diferencial.

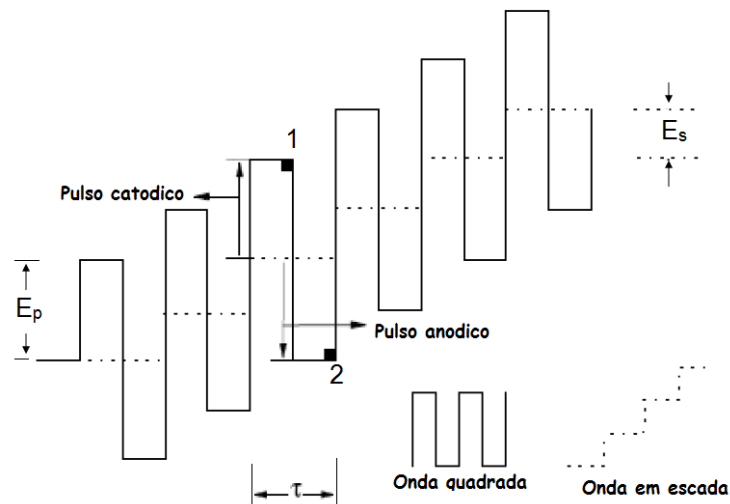


Figura 19: Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada. E_p : potencial de pico; E_s : potencial de passo, τ : frequência. Adaptado da referência [52].

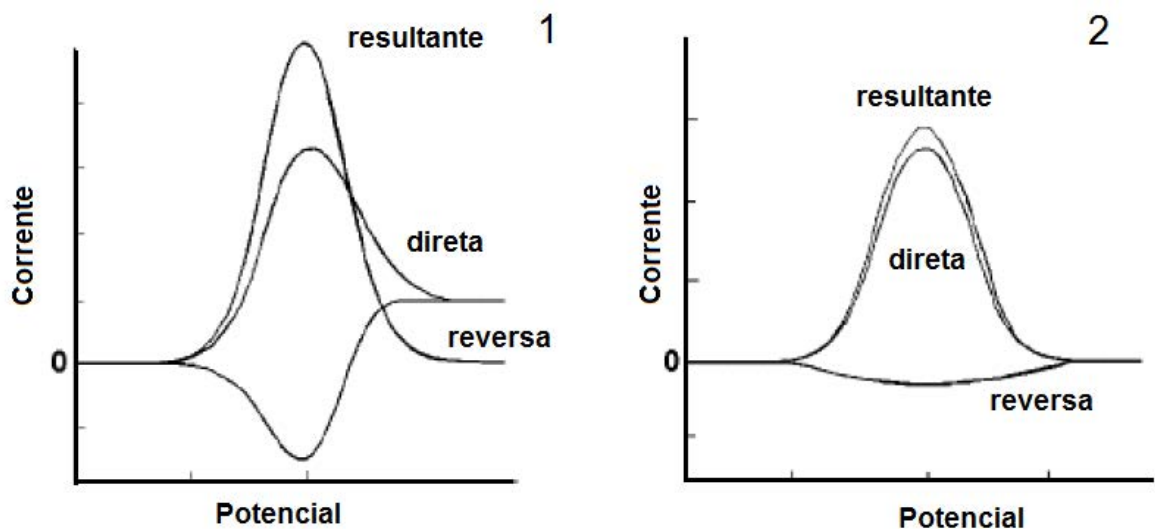


Figura 20: Voltamogramas de onda quadrada em processo redox de um sistema reversível (1); e em um processo redox irreversível (2). Adaptado da referência [52].

1.7.3 Cronoamperometria

A cronoamperometria consiste na aplicação de um potencial fixo e o registro da corrente em função do tempo, a resposta da corrente e sua variação é monitorada durante um intervalo de tempo suficiente para que haja completa redução ou oxidação do composto estudado.

Na Figura 21, se mostra o esquema da perturbação de potencial aplicada ao eletrodo de trabalho em função do tempo, usada na cronoamperometria.

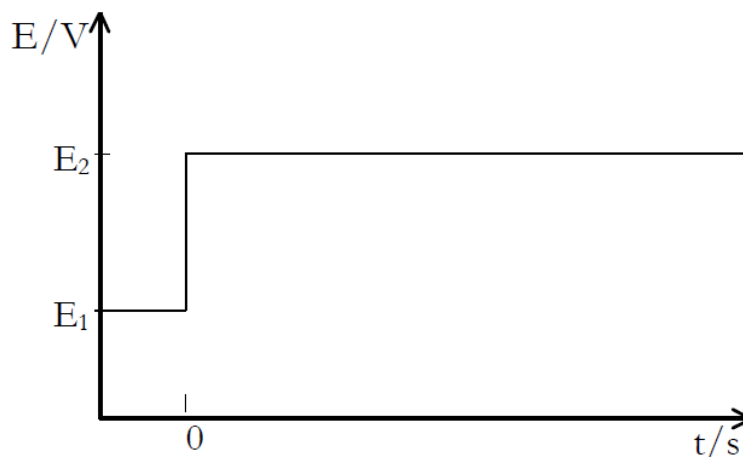


Figura 21: Potencial em função do tempo para um experimento de cronoamperometria. Adaptado da referência [50].

Capítulo 2

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo o estudo, caracterização e aplicação de sensores à base de ouro nano-estruturado e catalisadores biomiméticos da enzima P450 para detecção dos corantes 2-nitro-*p*-fenilenodiamina e o 4-nitro-*o*-fenilenodiamina, usados nas tinturas de cabelo semipermanentes.

Capítulo 3

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimentos Experimentais e soluções

A limpeza eletroquímica dos eletrodos de ouro foi realizada empregando voltametria cíclica em hidróxido de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (J. T. Baker) e seguido da imersão em álcool etílico (ACS PA Synth). Para o pré-tratamento do eletrodo de ouro foi empregada uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

Para a formação das diferentes SAM sobre a superfície de ouro foram empregados a cisteamina ($\geq 98\%$ Sigma-Aldrich) dissolvida em etanol anidro (J. T. Baker) e mercaptossulfonato de sódio (MPS 90% Sigma-Aldrich) dissolvida em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido mercaptoundecanóico ($\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$ - 98% Sigma-Aldrich) dissolvida em etanol (Sigma-Aldrich).

Para a formação de multicamadas LBL sobre a superfície de ouro foram empregados a quitosana (ACS alta pureza - Sigma Aldrich) dissolvida em ácido acético (ACS PA Synth) e levado a pH 3,8, o dodecilsulfonato de sódio (Sigma Aldrich) dissolvida em água Milli-Q, ftalocianina tetrassulfonada de níquel (Sigma Aldrich) e ftalocianina tetrassulfonada de ferro (Sigma Aldrich).

Para as medidas eletroquímicas foram empregadas a solução tampão fosfato e Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, que foi preparada dissolvendo 2,48 g de ácido bórico ($>99,5\%$ ACS Sigma Aldrich) com 2,3 mL de ácido acético (ACS PA Synth) e 2,7 mL de ácido fosfórico (85% Mallinnckrodt). A seguir, a mistura foi levada ao ultrassom por 10 min. para sua completa dissolução. Na preparação da solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 foram empregados fosfato de sódio monobásico e dibásico fornecidos pela Sigma.

Além dos tampões, foram empregados ferricianeto e ferrocianeto de potássio ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) em concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Na preparação das soluções padrão foram empregados 2-nitro-*p*-fenilenodiamina (Sigma Aldrich 90% .) e 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (Sigma Aldrich 90%) dissolvidos em água.

As soluções citadas foram preparadas empregando-se água deionizada Milli-Q ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

3.2 Equipamentos

As imagens topográficas para as superfícies de ouro modificado foram realizadas usando um microscópio de força atômica AFM Agilent 5500, acoustic AC mode, constante de mola (spring constants) 42 N m^{-1} e frequência resonante de 320 kHz.

As análises da superfície do eletrodo de ouro foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura FE-SEM de alta resolução, equipado com fonte de elétrons de emissão de campo, JEOL JSM 7500F.

As medidas em batelada, de voltametria cíclica, voltametria de varredura linear e de amperometria a potencial controlado foram efetuadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12 AUTOLAB® com software GPES 4.9.007 (“General Purpose Electrochemical System”) para o tratamento dos dados.

Uma célula eletroquímica de compartimento único com volume de 10 mL foi utilizada para as medidas, juntamente com um sistema de três eletrodos. Foram usados eletrodos impressos (SPE, *screen printed electrodes*) comerciais adquiridos da Drop Sense® curados a baixa e alta temperaturas (AT e BT), que contém no conjunto um eletrodo de pseudo referência de prata, eletrodo de trabalho (diâmetro = 4 mm) e contra-eletrodo de ouro. Também foram usados nos experimentos de tratamento de superfície do ouro, eletrodo de referência comercial $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$ da Analion® e fio de platina ($A_{\text{geom}} = 4 \text{ cm}^2$) como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

As análises em FIA foram realizadas em um potenciostato Palm Sense® versão 4,3 usando uma célula em fluxo do tipo *thin layer* adquirido da DROPSENSE® (Figura 22), construída em acrílico e sistema de imã para fechamento da mesma.



Figura 22: Célula em fluxo da DROPSENSE® usada nas medidas em FIA.

Empregou-se também um pH metro da marca Digital Gehaka modelo mPA 210®, para a obtenção das medidas de pH, um ultrassom modelo Ultracleaner 1850a da Unique®, para dispersão das soluções e uma Balança analítica Mettler–Toledo®, modelo AG 245 para as pesagens dos reagentes, e dos padrões.

3.3 Pré-tratamento do eletrodo de ouro

Neste procedimento para a nano-estruturação do eletrodo de ouro foi apenas usado o eletrodo de trabalho do SPE, um eletrodo de referência externo de $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{\text{sat}}$ e um espiral de Pt externo. Uma vez que o uso do contra-eletrodo do próprio sistema SPE resultou na formação de superfícies não homogêneas e não reprodutíveis. A conexão de apenas o eletrodo de trabalho do sistema SPE, ocorreu conectando o terminal desse eletrodo (**1** na Figura 23) ao potenciostato usando um conector do tipo “jacaré” e deixando livres os contatos correspondentes o referência e contra-eletrodo. Inicialmente foi realizado um tratamento galvanostático em potencial de 2 V durante 180 segundos em tampão fosfato (pH 7) a fim de se obter uma película de óxidos de Au. Imediatamente depois, foi realizada uma varredura catódica em solução tampão fosfato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7, na faixa de potencial entre +2 e -0,2 V, para a redução do óxido de ouro, previamente formando, e assim obter a superfície rugosa.

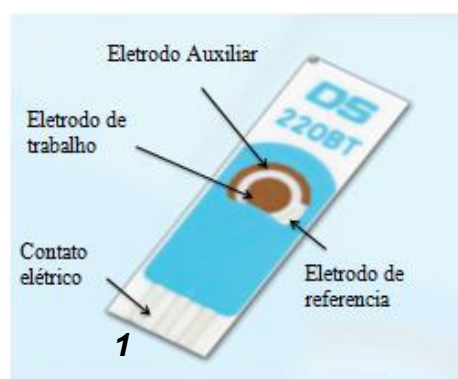


Figura 23 Eletrodo serigrafiado da DROPSENSE® empregado nesta dissertação.

3.4 Modificação da superfície de eletrodo de ouro

Foram estudados três diferentes compostos para a modificação da superfície de ouro da Drop-Sense: a cisteamina, o ácido mercaptopropanossulfonato e o ácido mercapto-undecanóico. Estes três compostos por apresentarem enxofre, se ligam ao Au por ligação covalente formando a SAM. Algumas das seguintes condições do procedimento como a relação entre tempo e concentração já foram estudadas em um trabalho prévio [54].

3.4.1 Modificação com cisteamina

A modificação do eletrodo de ouro com cisteamina foi realizada pela imersão (*dip coating*) do eletrodo de ouro em um béquer contendo 10 mL da solução aquosa de cisteamina de concentração $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ por um período de 3 horas à temperatura ambiente. Após o período de imersão, a lavagem do eletrodo foi realizada por imersão em água deionizada, para retirada das moléculas fisicamente adsorvidas, e a seguir, os eletrodos foram secos com nitrogênio.

3.4.2 Modificação com mercaptopropanossulfonato

A modificação do eletrodo de ouro com mercaptopropanossulfonato (MPS) foi efetuada pela imersão do eletrodo de ouro em 10 mL de uma solução de MPS $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em ácido sulfúrico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para evitar a oxidação do enxofre. Após o período de imersão de 3 horas, a lavagem do eletrodo foi realizada por imersão em água deionizada.

3.4.3 Modificação com ácido mercaptoundecanóico

A modificação do eletrodo de ouro com mercapto-undecanóico (MUA) foi realizada pela imersão do eletrodo de ouro em 10 mL de uma solução etanólica de MUA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após o período de imersão 10 horas, a lavagem do eletrodo foi realizada por imersão em água deionizada.

3.5 Formação de multicamadas pela técnica layer-by-layer

A formação de multicamadas pela técnica LBL sobre as SAM's previamente formadas, foi realizada utilizando diferentes modificadores baseados nas cargas da superfície do ouro modificado com SAM.

3.5.1 Multicamadas sobre Au-SAM de CISTE–TsFePc-Quitosana/TsFePc

O eletrodo de Au modificado pela SAM de cisteamina (CISTE), foi imerso em uma solução aniônica de ftalocianina de ferro tetrassulfonada (TsFePc) preparada em água na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Após foi lavada em água durante 3 minutos, em seguida foi imersa em uma solução catiônica de quitosana de concentração 1 g L^{-1} preparada em solução aquosa (2% ácido acético) a pH 3,8 durante 10 minutos, retirado e enxaguado em água por mais 3 minutos, e imediatamente depois imerso novamente na solução aniônica de TsFePc $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ durante 10 minutos. O procedimento foi repetido por várias vezes, intercalando a quitosana e a TsFePc.

3.5.2 Multicamadas sobre Au-SAM de MPS-Quitosana/TsFePc

O eletrodo de Au modificado pela SAM de MPS foi imerso em solução catiônica de quitosana, como indicado no item anterior de concentração 1 g L^{-1} durante 10 minutos, retirado e enxaguado em água por 3 minutos e imediatamente depois, imerso em uma solução aniônica de ftalocianina de ferro tetrassulfonada (TsFePc) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ durante 10 minutos. O procedimento foi repetido por várias vezes.

3.5.3 Multicamadas sobre Au-SAM de MPS-Quitosana/TsNiPc

O eletrodo de Au modificado pela SAM de MPS foi imerso em solução catiônica de quitosana de concentração 1 g L^{-1} preparada em solução aquosa (2% ácido acético) a pH 3,8 durante 10 minutos, retirado e enxaguado em água por 3 minutos e imediatamente depois imerso em uma solução aniônica de ftalocianina de níquel tetrassulfonada (TsNiPc) preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em água durante 10 minutos. O procedimento foi repetido por várias vezes até atingir superfícies estáveis e condutoras.

3.5.4 Multicamadas sobre Au-SAM de MPS-Quitosana/SDS/Quitosana/TsFePc

O eletrodo de Au modificado pela SAM de MPS, foi imerso em solução catiônica de quitosana de concentração 1 g L^{-1} preparada em solução a pH 3,8 durante 10 minutos, retirado e enxaguado em água por 3 minutos e imediatamente depois imerso em uma solução de SDS 1% durante 10 minutos. A seguir, o eletrodo de ouro foi lavado com água e posteriormente imerso em uma solução de catiônica de quitosana 1 g L^{-1} e depois em uma solução aniônica de ftalocianina de ferro tetrassulfonada (TsFePc) preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em água durante 10 minutos. O procedimento foi repetido por várias vezes a partir de quitosana SDS até atingir superfícies estáveis e condutoras.

3.5.5 Multicamadas sobre Au-SAM de MPS-Quitosana/SDS/Quitosana/TsNiPc

O eletrodo de Au modificado pela SAM de MPS foi imerso em solução catiônica de quitosana de concentração 1 g L^{-1} preparada em solução a pH 3,8 durante 10 minutos, retirado e enxaguado em água por 3 minutos e imediatamente depois imerso em uma solução de SDS 1% durante 10 minutos. A seguir, o eletrodo de ouro foi lavado com água e posteriormente imerso em uma solução de catiônica de quitosana 1 g L^{-1} e depois em uma solução aniônica de ftalocianina de níquel tetrassulfonada (TsNiPc) preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em água durante 10 minutos. O procedimento foi repetido por várias vezes a partir de quitosana SDS até atingir superfícies estáveis e condutoras.

3.6 Preparo das amostras

As análises das formulações comerciais de corante de cabelo foram realizadas em batelada usando amperometria para o produto comercial contendo *p*-fenilenodiamina, que foi indiretamente quantificado usando o sensor à base de Au-MPS-Quitosana/SDS/Quitosana/TsNiPc descrito no item 3.5.5.

Para isto, 1,0 g destas formulações foram diluídas com 30 mL de água deionizada e mantida sob agitação constante durante 30 minutos. A seguir, 20 μL desta solução foi transferida diretamente para a célula eletroquímica contendo 10,0 mL de solução tampão BR (pH 3,5).

Amostras de água também foram analisadas. Para tal, cinco amostras de água de torneira foram fortificadas com uma solução de $15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-NPPD. A seguir,

foram injetados 50 μL diretamente na célula eletroquímica contendo o sensor de tampão com eletrólito d BR 0,1 mol L^{-1} (pH 3,5).

Capítulo 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização do ouro nano-estruturado

4.1.1 Estudos eletroquímicos do ouro

O eletrodo de ouro apresenta uma grande vantagem diante dos outros metais, pois não reage com o oxigênio do meio ambiente, devido a que a reação não é favorável termodinamicamente [53].

O processo adotado para a obtenção das nanoestruturas de ouro na superfície dos eletrodos baseia-se no diagrama de Pourbaix mostrado Figura 24 onde claramente explica quais espécies, e em que pH são as predominantes. Particularmente, no potencial aplicado (2 V) e no pH de trabalho (tampão fosfato pH 7) segundo esse diagrama tem-se que as espécies em equilíbrio são $\text{Au}(\text{OH})_3/\text{AuO}_2$.

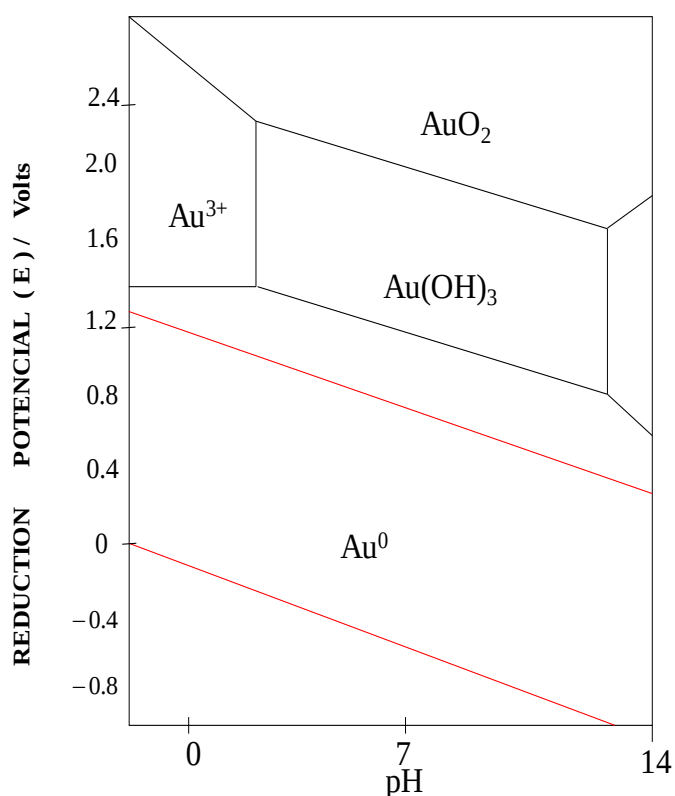


Figura 24: Diagrama de Pourbaix do eletrodo de ouro a 25 °C [54].

Assim, no intuito de aumentar a área superficial dos eletrodos, a presença destas duas espécies permitirá a obtenção de superfícies mais rugosas, devido a que na redução destas espécies libera-se oxigênio proveniente da espécie AuO_2 e da solução de medida,

deixando espaços (nanoestruturados) na superfície do eletrodo [55]. Permitindo assim a formação de nano-estruturas que promoverão um aumento na área superficial do eletrodo.

4.1.2 Avaliação do tratamento do ouro no aumento da área ativa

Na Figura 25 apresenta-se a comparação dos voltamogramas para o eletrodo nano-estruturado (segundo proposto neste trabalho e descrito na parte experimental) e um eletrodo sem tratamento. Nos quais o pico de redução, E_{C1} , foi usado para o cálculo da área ativa de ambos os eletrodos, com pré-tratamento (nano-estruturado) e sem tratar.

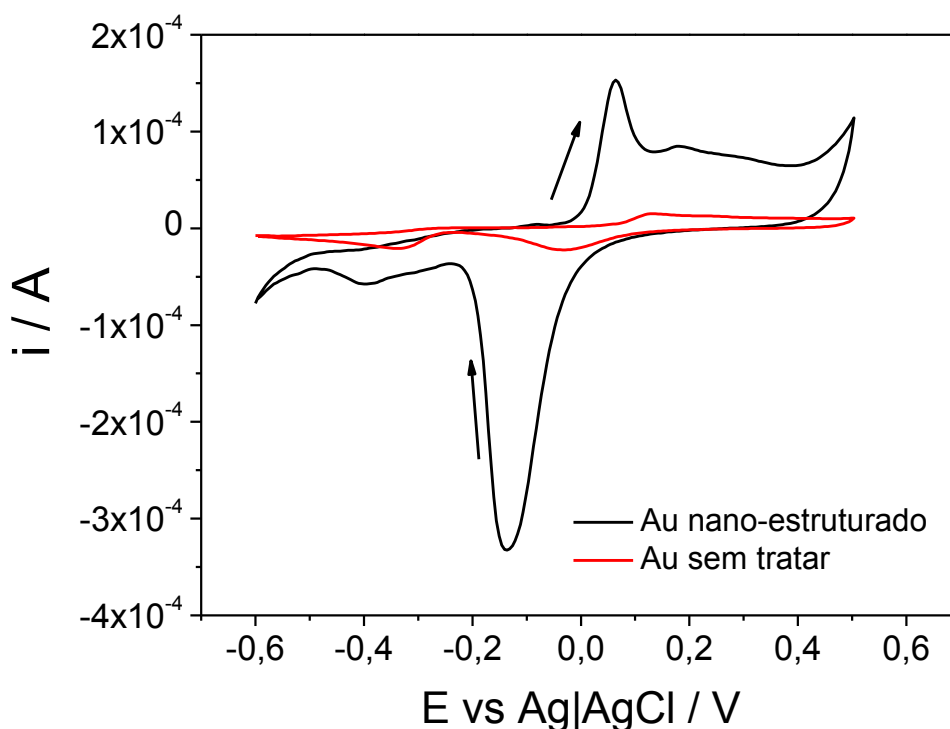


Figura 25: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em uma solução $\text{KOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Claramente, pode se observar que após o tratamento eletroquímico da superfície do ouro a área ativa mostrada pelo voltamograma é muito maior, com base no pico de redução correspondente ao β -óxido comumente usado para quantificar a área ativa destes eletrodos.

4.1.3 Cálculo da área ativa do ouro policristalino

A área ativa do ouro policristalino foi determinada utilizando-se o método desenvolvido por Burshtein [56]. Segundo este método, a área correspondente ao início da formação de óxidos de ouro até o **mínimo de Burshtein**, como pode ser observado a partir do voltamograma cíclico da Figura 26, corresponde à formação de uma monocamada de óxido de ouro sobre a superfície deste. Sendo possível calcular a densidade de carga (Q_o) na redução. O mínimo de Burshtein é utilizado para calcular o potencial máximo que tem que ser atingido. Uma vez que se atingem potenciais maiores mais óxido seria formado e consequentemente mais óxido seria reduzido gerando um erro no cálculo de área.

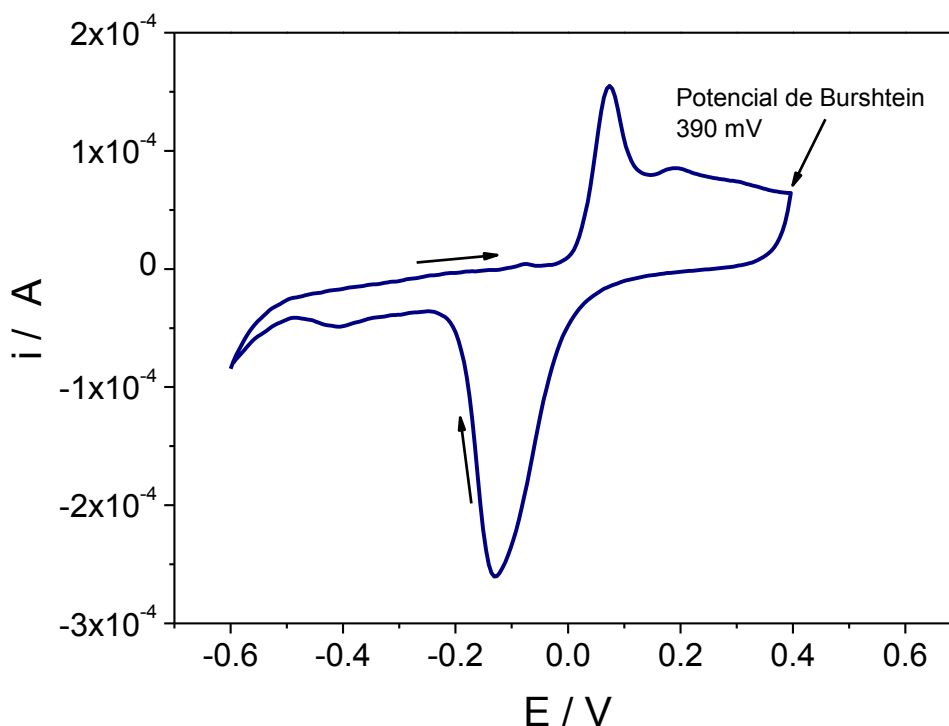


Figura 26 Voltamograma do ouro em uma solução KOH 0,5 mol L⁻¹

Depois de obter o potencial no qual ocorre a formação da primeira camada, determinou-se Q como descrito a seguir.

A determinação da carga Q para cálculo da área ativa do eletrodo de ouro é baseada na área da corrente catódica, que representa a remoção de uma monocamada de oxigênio da superfície. Assim a área é determinada pelas seguintes equações 4 e 5:

$$Q = \frac{1}{v} \int_{Ti}^{Tf} IdE \quad (\text{equação 4})$$

A contribuição capacitiva pode gerar erro no cálculo da área real, devido a uma pequena região de acúmulo de carga interfacial (zona de dupla camada elétrica). Desta forma, deve-se integrar a região de corrente correspondente à resposta da dupla camada capacitiva e subtraí-la obtendo-se (equação 5).

$$Q = \frac{1}{v} \int_{Ti}^{Tf} IdE - Q_{dc} \quad (\text{equação 5})$$

Na qual Q_{dc} é a carga da dupla camada capacitiva e a constante “v” é uma constante da formação de uma monocamada de ouro sobre a superfície de Au, $390 \mu\text{C cm}^{-2}$ [57], resultando nos dados apresentados na Tabela 3.

Tabela N° 3: Relação das áreas ativas do eletrodo de ouro sólido e o nanoestruturado

Área do eletrodo sólido de Au (cm^2)	Área de Au rugoso (cm^2)	Razão área rugoso / área sólido
0,137	2,46	18,9

Com os dados de área ativa e área geométrica ($0,125 \text{ cm}^2$) dos eletrodos, foi possível calcular o fator de rugosidade (equação 6) de cada um deles.

$$FR = \frac{\text{Area Real}}{\text{Area Geométrica}} \quad (\text{equação 6})$$

$$FR = \frac{0,137 \text{ cm}^2}{0,125 \text{ cm}^2} = 1,09$$

Obtendo-se os valores de 1,09 e 19,7, para os eletrodos não tratados e tratados respectivamente. Na literatura se relata que se o FR é mais cerca de 1 é considerado melhor no entanto isso difere de outros autores que reportam fator de rugosidade muito maior e maiores limites de detecção [58].

4.1.4 Comportamento do Au nanoestruturado em meio básico e ácido.

A seguir se apresentam os voltamogramas em diferentes pH para observar o comportamento do eletrodo nesses meios e para poder ter a faixa de resposta capacitiva.

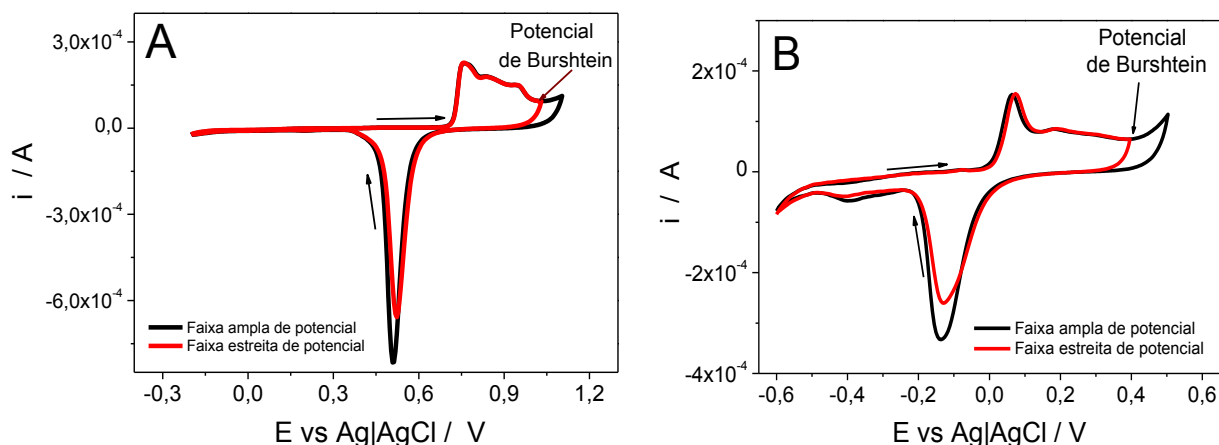
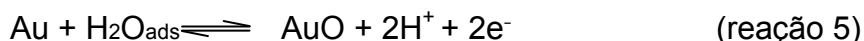
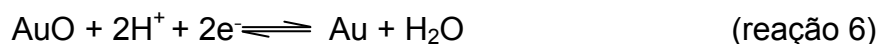


Figura 27: Voltamogramas do eletrodo de ouro pre tratado em uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (A) e em solução de KOH 0,5 mol L⁻¹ (B) e o correspondente potencial de Burshtein.

Através da Figura 27A, pode-se observar o perfil voltamétrico do ouro policristalino em meio ácido, onde é possível visualizar durante a varredura anódica o início da formação de uma monocamada de óxido de Au em aproximadamente 0,75 V, conforme a reação:



Posteriormente, estes óxidos são reduzidos, durante a varredura catódica, dando origem a um pico intenso em 0,5 V, de acordo com a reação reversa:



Estas características voltamétricas apresentadas estão de acordo com dados previamente publicados na literatura sob condições ácidas [59-60].

Assim também, foi avaliado o perfil voltamétrico do ouro policristalino em meio básico (Figura 27B) onde se mostra mudança no início da formação de óxido de Au em

aproximadamente 0,1 V, e na varredura catódica, o pico de corrente muda para -0,1 V. Nestes resultados se observa o comportamento do eletrodo em diferentes meios, verificando que os potenciais de pico em meio ácido são maiores.

4.1.5 Pré-tratamento do Au por aplicação de pulsos de potencial

Foi também realizado um pré-tratamento adicional para o ouro seguindo o procedimento criado por Perdriel e Arvia [62], posteriormente adotado por Rezai e Damiri [61] visando aumentar a área ativa do eletrodo e comparar seu desempenho na quantificação dos analitos propostos, com o eletrodo nano-estruturado proposto neste trabalho.

Para tal, o eletrodo foi submetido à aplicação de potenciais de $E_a = 1,5$ V com tempos de ciclo $t_a = 6$ s e $E_c = 0,6$ V com tempo de ciclo de $t_c = 20$ s, durante 6 horas, mostrando o procedimento (inserido) e a resposta na Figura 28.

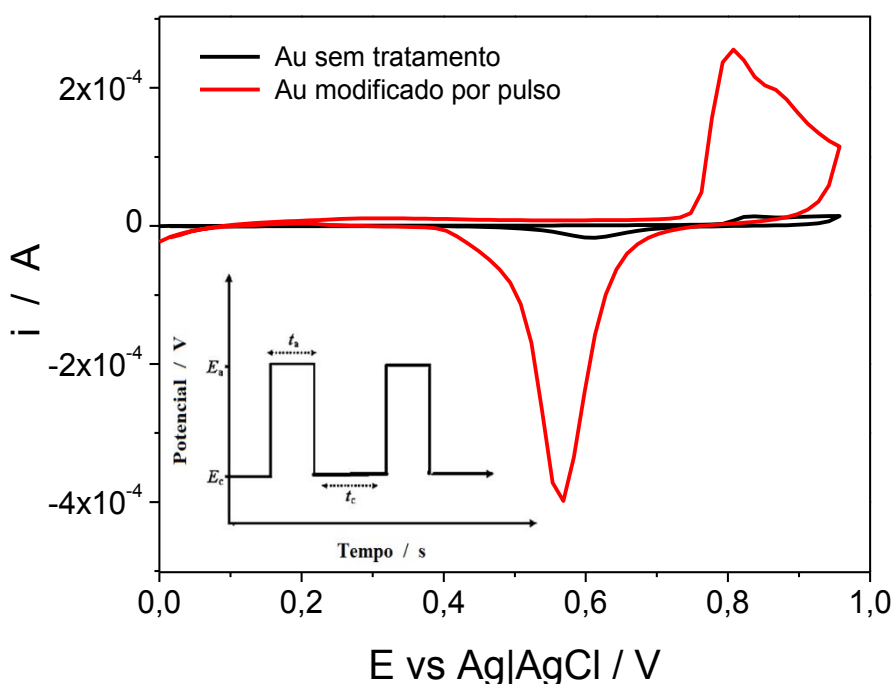


Figura 28: Voltamograma do eletrodo de ouro pré tratado mediante pulsos de potencial em meio ácido, por cronoamperometria em E_c 0,6 V durante 6 s e E_a 1,5 V durante 20 s

Segundo este método a área superficial obtida foi de $1,944 \text{ cm}^2$, que apresenta um valor próximo ao obtido durante o procedimento proposto (Tabela 3). No entanto, o procedimento para garantir esta área superficial teve de um tempo de aproximadamente

6 horas (700 ciclos) o que seria inviável na preparação de sensores. Adicionalmente, além deste método, existem muitos outros reportados na literatura que empregam tempos maiores para obter superfícies rugosas e atingirem superfícies com maior fator de rugosidade [62]. Mostrando que o método proposto para a obtenção do Au de alta área superficial nano-estruturado é mais vantajoso em relação daqueles apresentados na literatura.

4.1.6 Perfil de resposta eletroquímico do sistema SPE

Como foi mencionado no procedimento experimental, visando obter eletrodos nano-estruturados reproduzíveis, o pré-tratamento do eletrodo de ouro foi realizado com eletrodos externos de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$ e fio de platina como eletrodos de referência e contra-eletrodo respectivamente. Entretanto, para avaliar o uso do sistema SPE, o mesmo foi testado sob as condições antes avaliadas para o sistema de três eletrodos convencional e os resultados obtidos são mostrados na Figura 29.

Basicamente, a diferença entre o uso dos eletrodos externos e o SPE foi na mudança dos potenciais de pico e na largura do pico catódico. O primeiro fato é devido à diferença no potencial padrão dos eletrodos de referência. Já a largura do pico catódico, pode se explicar devido à limitação da reação pelo contraeletrodo devido que a área do eletrodo nano estruturado poderia ser maior do que o contraeletrodo. No entanto, a área ativa calculada em ambos os casos, foi próxima. Desta forma, os estudos posteriores puderam ser realizados usando os três eletrodos do próprio sistema SPE.

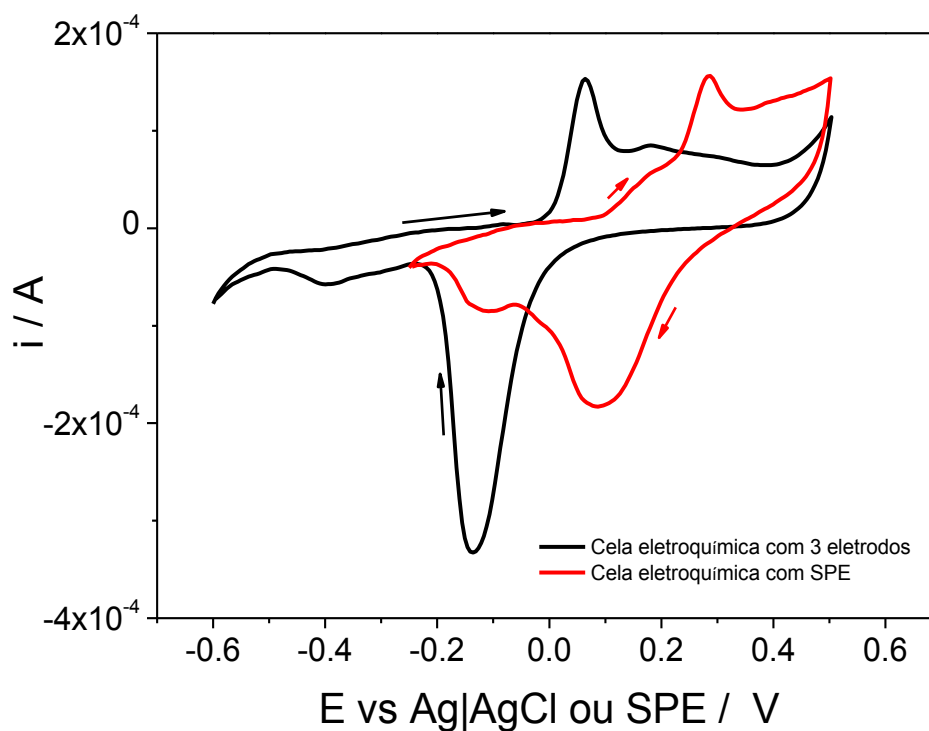


Figura 29: Voltamograma de ouro em uma solução KOH 0,5 mol L⁻¹ em célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos e em célula eletroquímica com SPE.

4.1.7 Caracterização morfológica do eletrodo de ouro nano-estruturado

Nas Figuras 30A e 30B mostram-se as análises superficiais dos eletrodos de ouro nano-estruturado e sólido, respectivamente. Pode-se observar que o ouro nano-estruturado (Figura 30A) apresentam alta rugosidade, e portanto maior área ativa, do que um eletrodo de ouro sem tratamento (Figura 30B). desta forma, espera-se que a sensibilidade para a detecção do composto alvo também seja maior.

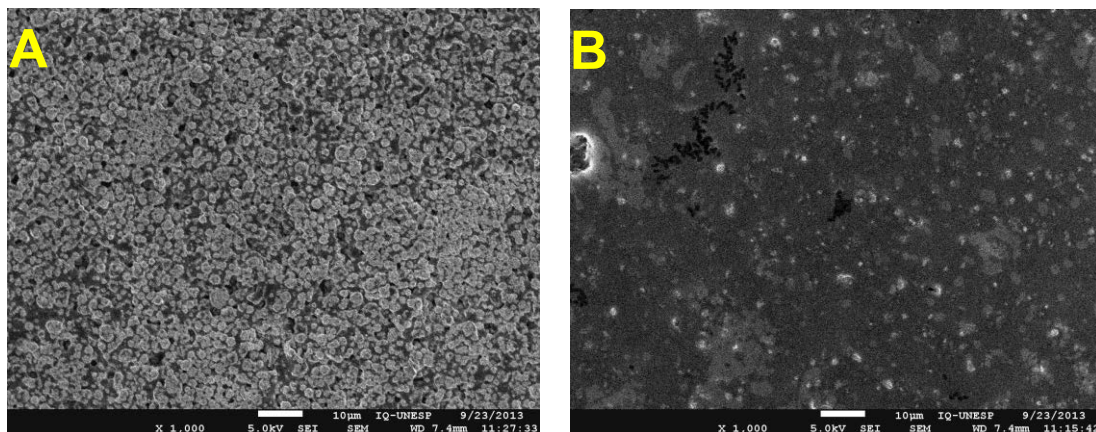


Figura 30: Microscopias eletrônicas de varredura dos eletrodos de ouro nano-estruturado (A) e sem pré-tratamento (B).

A Figura 31 mostra a microscopia de força atômica (AFM) onde se observa que a superfície de ouro apresenta uma superfície altamente rugosa (Figura 31A) e homogênea (Figura 31B), mostrando através destas imagens, que foi possível a obtenção de superfície altamente rugosa com grande número de sítios disponíveis para a adsorção de espécies devido a essas “imperfeições”.

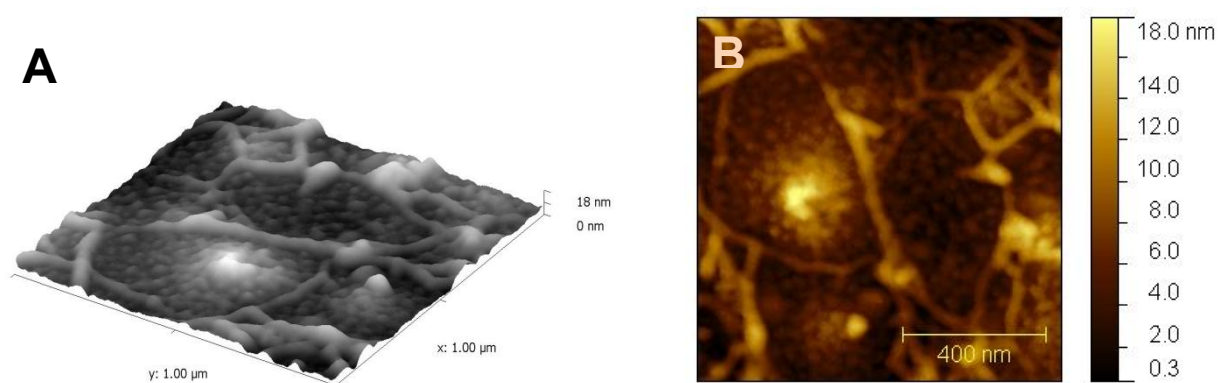


Figura 31: Microscopias de força atômica do ouro nanoestruturado.(A) Vista lateral e (B) Vista de cima.

4.2 Estudo das monocamadas auto-organizadas de ouro (SAM)

O mecanismo pelo qual ocorre a quimissorção de enxofre no ouro é apresentado na Figura 32 [55].

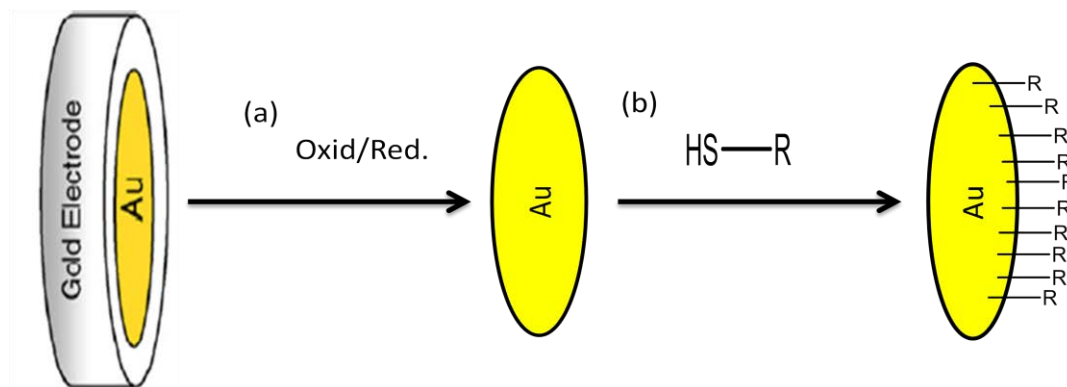
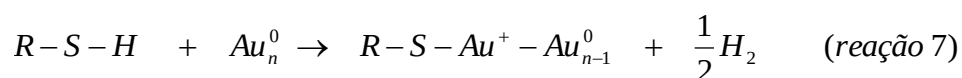


Figura 32: Esquema da formação de monocamadas auto-organizadas de tiol na superfície do eletrodo de ouro nanoestruturado.

De acordo com o que é observado, esse processo de quimissorção pode ser dividido em duas etapas. A primeira ocorre quando o enxofre se adsorve na superfície do eletrodo de ouro num meio aquoso ou etanólico. Na segunda etapa, em meio alcalino, ocorre a desprotonação do enxofre com a subsequente formação da ligação RS-Au segundo a reação 7.



Para avaliar a formação de monocamadas na superfície do eletrodo foi registrado um voltamograma que mostra a resposta do eletrodo de ouro com SAM na presença da sonda redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Na Figura 34 observa-se que os voltamogramas de Au e Au-MPS são quase idênticos havendo uma diferença pouco significativa nos potenciais de pico anódico e catódico indicando que a superfície do eletrodo possui boa condutividade e consequentemente ocorre transferência de elétrons na superfície do eletrodo, isto pode ser explicado devido a que a monocamada formada não está totalmente compacta nem homogênea.

A literatura relata que existe uma relação da eficiência na formação de monocamadas com o número de carbonos do tiol usado [53], o qual explica-se pelas forças de van der Waals muito fracas existentes, que fazem que a monocamada fique não homogênea, no caso de menor quantidade de átomos de carbono (Figura 33). Isto pode ser claramente verificado na Figura 34, onde a monocamada formada por ácido mercaptoundecanóico (MUA) apresenta um perfil completamente diferente dos outros dois.

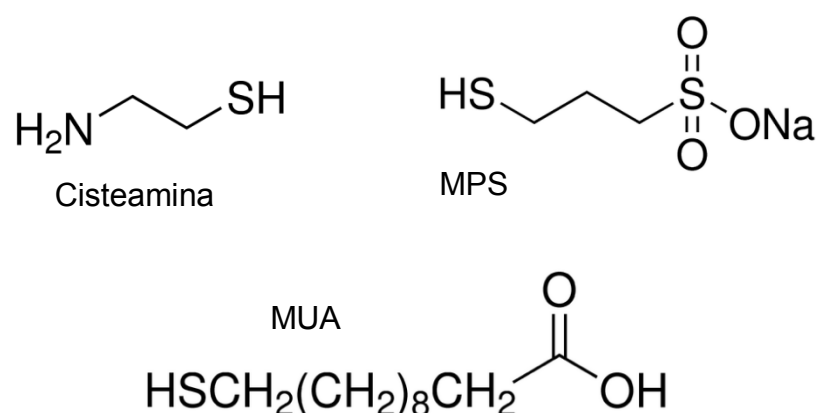


Figura 33 Estruturas químicas dos tióis usados neste trabalho

No caso do eletrodo de ouro modificado com monocamada de MUA, o voltamograma obtido apresenta menor intensidade de corrente indicando que a superfície do ouro foi “bloqueada” pela SAM de MUA. Uma vez que, neste caso o rearranjo da monocamada é mais favorecido, devido a que as interações de *van der Waals* entre as cadeias de hidrocarbonetos (11 C vs 3 para MPS ou 2 para CISTE) do tiol é mais forte, formando assim, monocamadas mais compactas e que bloqueiam a transferência eletrônica na superfície do ouro-SAM.

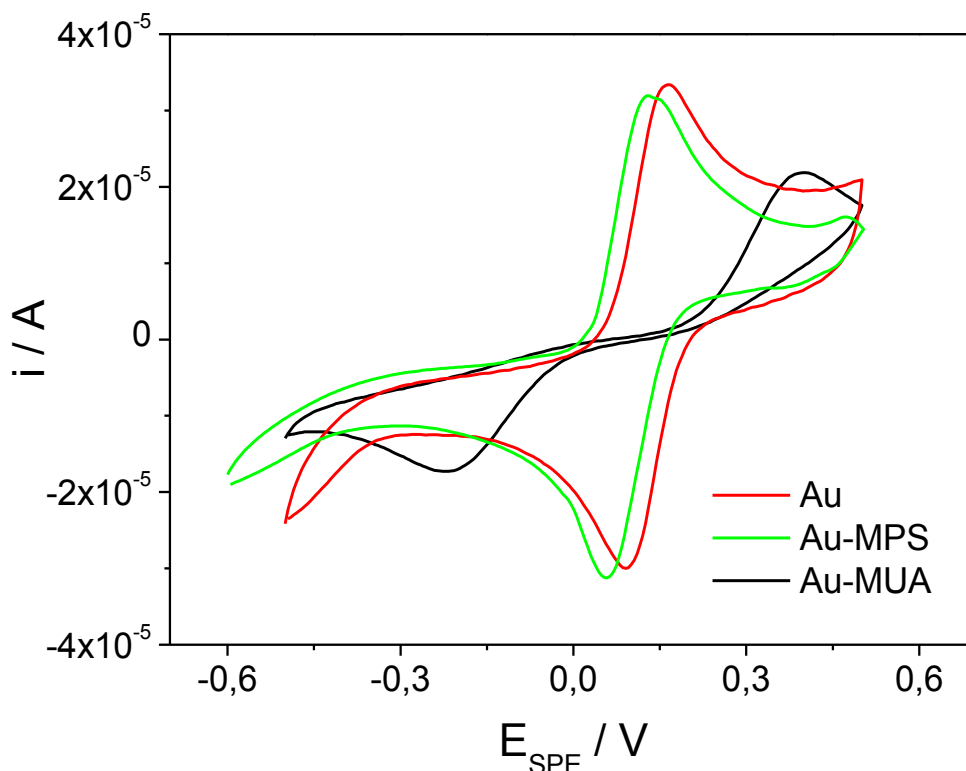


Figura 34: Voltamogramas de eletrodos de ouro pre-tratada e com dois diferentes tióis em uma solução eletrolítica de KNO_3 1 mol L^{-1} contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$.

No entanto, a formação da monocamada não foi 100% eficiente, uma vez que, ainda observam-se os picos correspondentes à sonda redox empregada (Figura 34). E isto pode ser explicado devido ao fator de rugosidade do Au, o qual é um parâmetro muito importante que tem sido problema de discussão no estudo cinético da formação de monocamadas.

Alguns autores [63-64] mencionam que para a formação de monocamadas é preciso que o FR seja próximo à unidade. No entanto, existem trabalhos [58] que mostram que valores para o FR muito maiores (por exemplo, 60) permitem obter resultados analíticos satisfatórios com limites de detecção menores. Desta forma, pode-se concluir que o FR é um parâmetro importante na formação de monocamadas, e que dependerá do sistema eletroquímico, e da característica da monocamada, uma vez que mesmo que o FR seja 1 para moléculas com uma cadeia de hidrocarbonetos curta, o empacotamento da monocamada não é de tudo compacta.

Como mencionado anteriormente, o esquema da Figura 35 mostra que se a monocamada formada não é homogênea formam-se espaços pelos quais pode-se transferir elétrons da solução à superfície.

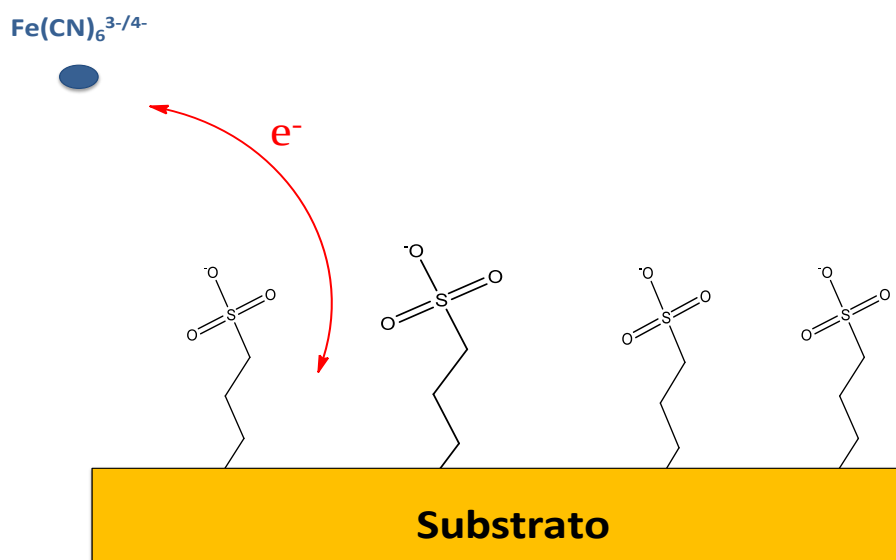


Figura 35: Esquema da transferência eletrônica em uma solução de ferri-ferro com monocamadas não compactas.

Outros parâmetros para otimização da formação das monocamadas de tiol sobre a superfície do ouro nano-estruturado foram estudados com a finalidade de se obter superfícies estáveis e reprodutíveis. Para tal, foram selecionados dois tióis que apresentam terminações diferentes, grupo amino e grupo sulfonato e cuja estrutura é dependente do pH. A seleção ocorreu principalmente, visando avaliar a influência do tamanho da cadeia orgânica do tiol, bem como a capacidade de interagir com os polieletrólitos escolhidos para serem usados na preparação do sensor.

O solvente utilizado para a preparação da solução da SAM foi água devido ao fato de dissolver com eficiência os tióis utilizados. O tempo de formação das monocamadas foi baseado na literatura [53], a qual sugere, através de estudos de impedância, que um período de 3 horas melhora o empacotamento das monocamadas auto-arranjadas [65].

Para ter uma ideia da grandeza do recobrimento da superfície, aproveitou-se a propriedade que possuem os tiolatos em desorver do ouro em potenciais negativos [66-67]. O potencial de desorção depende do tamanho da cadeia carbônica do tiol, da cristalinidade da superfície, e dos grupos funcionais terminais do tiol.

Assim, nas Figuras 36 e 37, observa-se que ambas apresentam mais de um pico de redução, os quais podem ser atribuídos à desorção do tiol. Uma vez que segundo a teoria da redução desorptiva, representada pela reação 7, este fenômeno é realizado via um processo mono-eletrônico, ou seja, não explica o aparecimento de mais de um pico de redução [68]. O aparecimento dos picos pode ser provavelmente explicado devido à cristalinidade do ouro (Au policristalino que possui diferentes planos cristalográficos) e defeitos da superfície metálica do ouro. Na Figura 36A se apresentam os picos de redução a um potencial mais negativo, enquanto que em superfícies com maior rugosidade (Figura 36B) observa-se um leve desvio para potenciais menos negativos, isso pode ser atribuído às propriedades eletrocatalíticas inserida no Au pelas nanoestruturas [69,70], no entanto isso terá que ser confirmada pela densidade de corrente.

Para comprovar se aqueles picos de desorção correspondiam ao tiol em diferentes planos cristalográficos como relata na literatura [71], é necessário realizar os experimentos em Au com orientação preferencial. No entanto, a orientação preferencial para certos planos é instável, uma vez que ao realizar a varredura eles mudam para outro plano mais estável, e assim não foi possível evidenciar o relatado. Entretanto, com os resultados mostrados nas Figuras 36 e 37, fica evidente que os picos de redução correspondem aos bem relatados tióis.

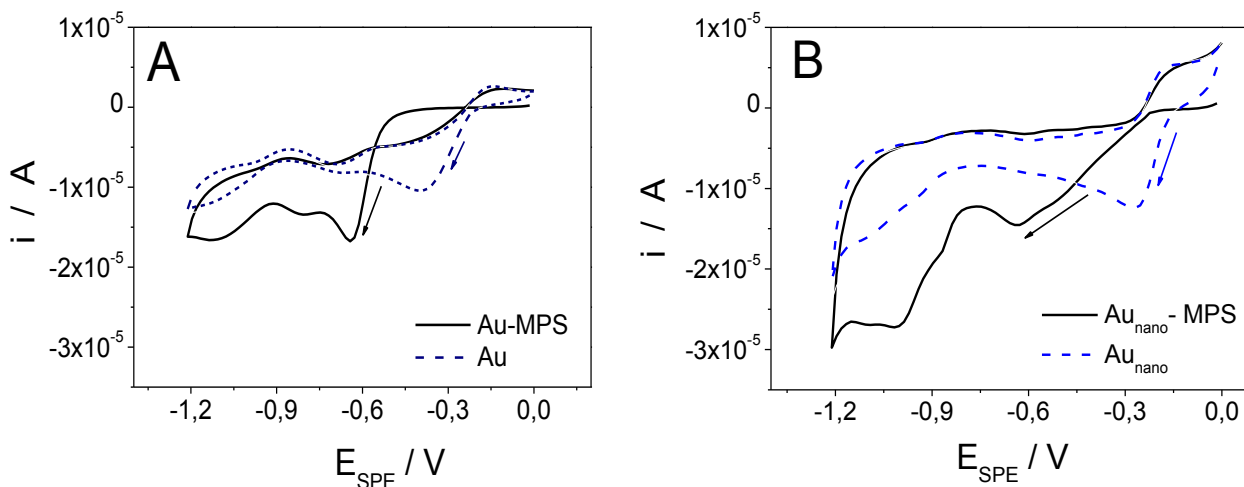


Figura 36: Voltamograma das monocamadas auto-arranjadas de 3-mercaptopropil-sulfonato de sódio (MPS) suportadas em superfície de ouro sólido (A) e de ouro nano-estruturado (B) realizadas em KOH 0,5 mol L⁻¹ a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Adicionalmente, visando avaliar a influência da rugosidade na formação das monocamadas de MPS no Au sólido (Figura 36A) e no Au_{nano-estruturado} (Figura 36B) pode-se observar que a nano-estruturação do ouro praticamente não afeta seu perfil voltamétrico, assim como na dessorção do tiol. Contudo, pode-se observar um ganho em relação à transferência eletrônica, a qual é muito mais favorecida no Au_{nano-estruturado}.

Adicionalmente ao analisar os eletrodos com SAM de CISTE (Figura 37A e 37B), pode-se observar que na presença do tiol há uma mudança acentuada entre ambas as superfícies, indicando que no caso da monocamada de CISTE, a superfície nano-estruturada afeta nas propriedades eletroquímicas do sistema. Assim, na Figura 37B percebem-se o desdobramento do pico largo da Figura 37A (1, em -500 mV), que na superfície nano-estruturada aparecem em -400 (1') e -600 (2') mV, respectivamente. Evidenciando a melhora na transferência eletrônica da superfície nano-estruturada.

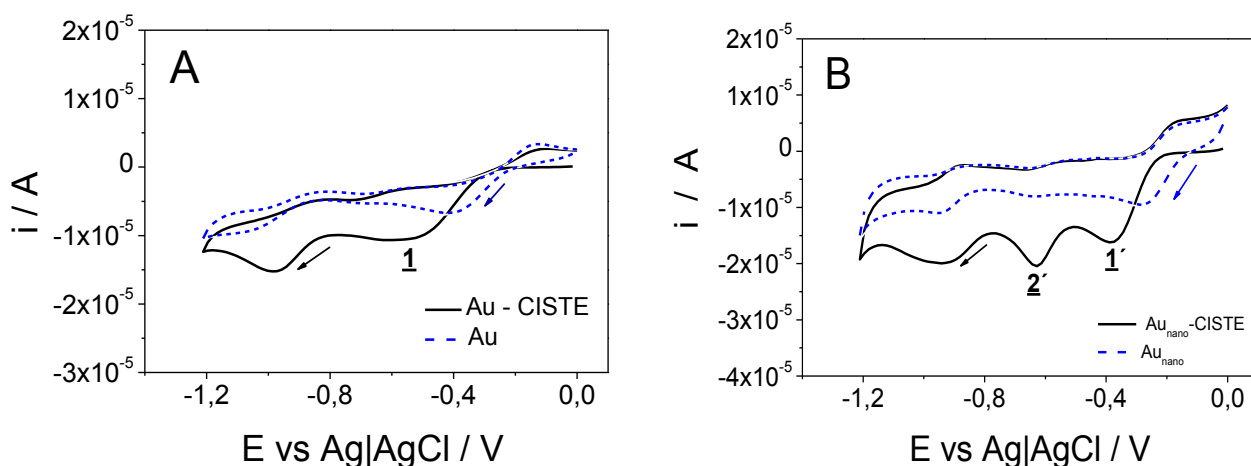


Figura 37: Voltamograma das monocamadas auto-arranjadas de cisteamina em ouro sólido (A) e ouro nano-estruturado (B). Em solução KOH 0,5 mol L⁻¹ com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

A diferença observada nos perfis voltamétricos das Figuras 36B e 37B, dentre eles quantidade e magnitude dos picos, pode ser atribuída as diferenças na estrutura da cadeia carbônica ou os grupos terminais dos tióis (cisteamina e MPS) formando diferentes empacotamentos sobre a superfície do ouro.

4.3 Estudo das multicamadas layer-by-layer

O método de modificação de eletrodos pela técnica *layer-by-layer* (camada por camada) usado para a formação de filmes sobre superfícies sensoras baseia-se na adsorção alternada de macromoléculas com carga oposta.

A Figura 38 esquematiza o princípio para a construção de estruturas que utilizam adsorção eletrostática na formação das LBL. Através deste método, é possível a modificação de eletrodos com polímeros e substâncias eletroativas, com controle da espessura, composição interna e carga superficial do filme formado.

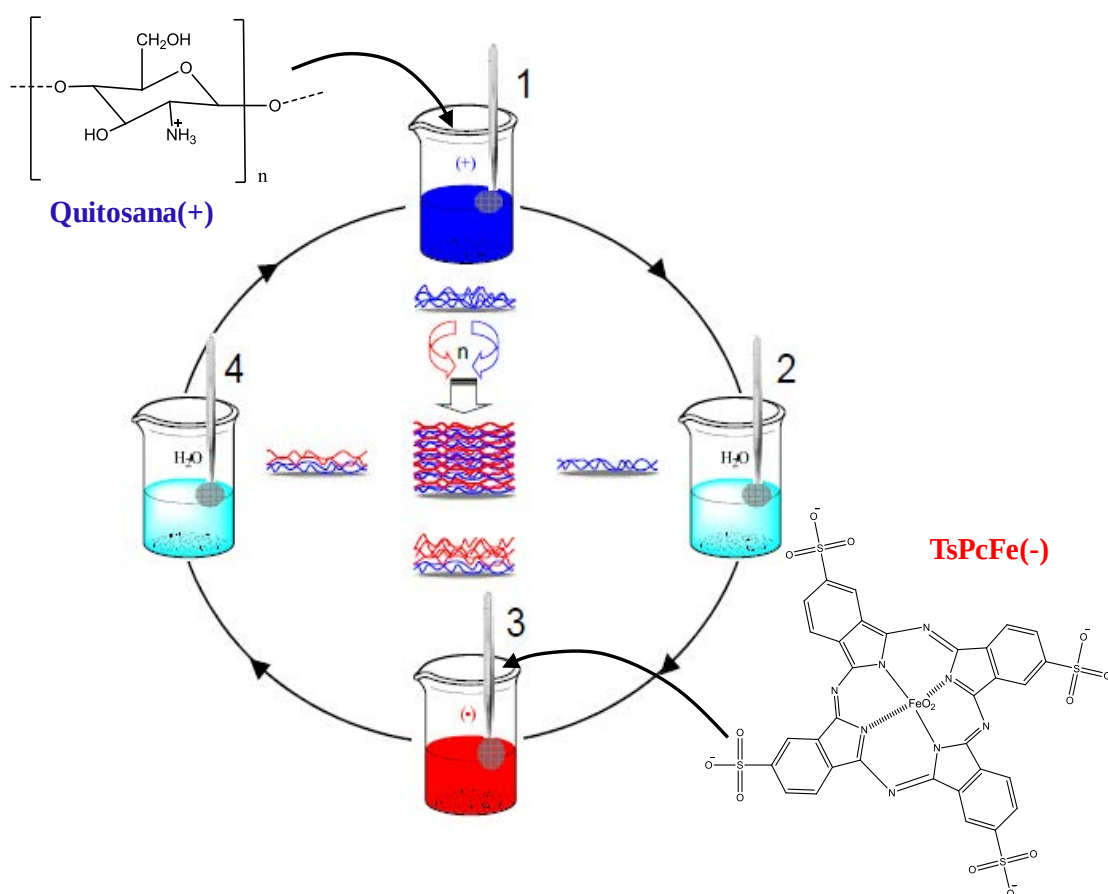


Figura 38: Esquema de formação de auto-arranjo eletrostático camada por camada. Os procedimentos 1 e 3 representam a adsorção de polieletrólitos de carga oposta. Os procedimentos 2 e 4 representam a lavagem.

Devido à grande vantagem que a técnica proporciona, procurou-se estabelecer metodologias para a formação de filmes obtidos em LBL com o principal objetivo de determinar os analitos de interesse em questão (os corantes de cabelo semi-permanentes). A seguir, são apresentados os estudos realizados com esta finalidade.

4.3.1 Estudo do eletrodo SAM-MPS-(Quitosana-TsFePc)*n*

Para a formação das bicamadas, aproveitou-se o grupo terminal negativamente carregado da SAM de MPS (grupo sulfonato, SO_3^-), que permitiu agregar uma espécie carregada positivamente, neste caso a quitosana, que é um biopolímero muito utilizado pelas características que ela apresenta em pH 3,8; e a seguir (após lavagem em água) agregar uma macromolécula negativamente carregada, ftalocianina tetrassulfonada de

ferro(III) em pH 7, a qual é um catalisador biomimético em potencial do sítio ativo da enzima P450. Assim foram feitos estudos de parâmetros, tais como o número de bicamadas ($n=15$) e o pH no qual se tem uma melhor resposta (pH 3,5).

Assim feitos os estudos de otimização, se apresentam na Figura 39 os voltamogramas de resposta do sensor na presença de 2-nitro-*p*-fenilenodiamina $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes superfícies eletródicas, obtendo-se as melhores propriedades eletrocatalíticas para o sensor à base de Au-MPS-(Quitosana-TsFePc)₁₅. O voltamograma foi registrado nas mesmas condições de solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,5.

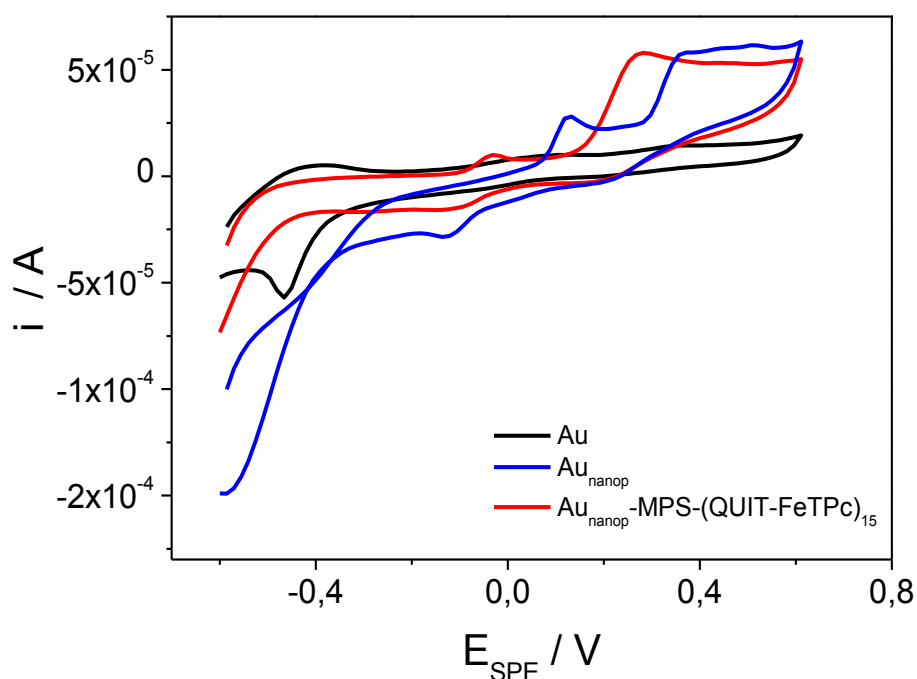


Figura 39: Resposta eletroquímica dos sistemas Au sólido, Au nano-estruturado, e sensor (Au_{nano}-MPS-(Quitosana-TsFePc)₁₅) em solução de 2-nitro-*p*-fenilenodiamina $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em H₂SO₄ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas em solução tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,5 e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

O voltamograma do sensor (linha em vermelho) mostra a diminuição da intensidade do pico de redução a -500 mV, assim como observa-se um deslocamento do potencial de pico anódico para menores valores, quando comparados com o ouro nano-estruturado (linha em azul).

Adicionalmente, visando aplicação do sensor em análises de amostras contendo o 2-nitro-*p*-fenilenodiamina foi realizada a otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada para a quantificação analítica do corante (Tabelas 4 e 5).

Tabela N° 4: Otimização da frequência (*f*, Hz) usada na Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) para a resposta do sistema Au-MPS-(Quitosana-TsFePc)₁₅ para o 2-nitro-*p*-fenilenodiamina.

Parâmetros da VOQ		Pico de oxidação O1				Pico de oxidação O2			
<i>E_p</i>	<i>f</i> (Hz)	a	b	R	LOD	a	b	R	LOD
100	100	-2,11x10 ⁻⁶	0,0358	0,968	1,65x10 ⁻⁴	-1,22x10 ⁻⁵	0,066	0,999	5,14x10 ⁻⁵
	90	-1,80x10 ⁻⁹	0,0350	0,994	5,47x10 ⁻⁵	3,89x10 ⁻⁶	0,065	0,985	1,29x10 ⁻⁴
	80	-1,334x10 ⁻⁶	0,0285	0,970	1,71x10 ⁻⁴	8,49x10 ⁻⁷	0,070	0,997	3,32x10 ⁻⁵
	70	-4,911x10 ⁻⁶	0,0292	0,857	3,73x10 ⁻⁴	2,02x10 ⁻⁶	0,070	0,998	6,62x10 ⁻⁵
	60	-3,772x10 ⁻⁶	0,0242	0,854	3,64x10 ⁻⁴	-1,07x10 ⁻⁶	0,052	0,997	5,08x10 ⁻⁵
	50	-	-	-	-	4,26x10 ⁻⁶	0,045	0,950	2,04x10 ⁻⁴

a: Coeficiente linear da reta em Ampere; b: Coeficiente angular em Ampere mol⁻¹ L; R: Coeficiente de correlação linear; LOD: limite de detecção em mol L⁻¹.

Tabela N° 5: Otimização da amplitude de pulso (*E_p*) da onda quadrada para a resposta do sistema Au-MPS-(Quitosana-TsFePc)₁₅ para o 2-nitro-*p*-fenilenodiamina.

Parâmetros da VOQ		Pico de oxidação O1				Pico de oxidação O2			
Amp	<i>f</i> (Hz)	a	b	R	LOD	a	b	R	LOD
90	80	-1,71x10 ⁻⁶	0,037	0,977	1,47x10 ⁻⁴	-1,20x10 ⁻⁹	0,049	0,999	9,02x10 ⁻⁵
80		-1,81x10 ⁻⁶	0,034	0,985	1,17x10 ⁻⁴	-8,76x10 ⁻⁶	0,046	0,996	6,43x10 ⁻⁵
70		-2,66x10 ⁻⁶	0,030	0,953	1,89x10 ⁻⁴	-5,93x10 ⁻⁶	0,042	0,998	3,68x10 ⁻⁵
60		-1,68x10 ⁻⁶	0,024	0,969	1,80x10 ⁻³	-1,34x10 ⁻⁶	0,033	0,972	1,34x10 ⁻⁴

a: Coeficiente linear da reta em Ampere; b: Coeficiente angular em Ampere mol⁻¹ L; R: Coeficiente de correlação linear; LOD: limite de detecção em mol L⁻¹.

Observando-se que as melhores respostas foram obtidas a uma frequência de 80 Hz e uma amplitude de 70 mV. Na Figura 40 mostra-se o perfil voltamétrico da resposta do sensor construído para o analito 2-nitro-*p*-fenilenodiamina, nas condições otimizadas.

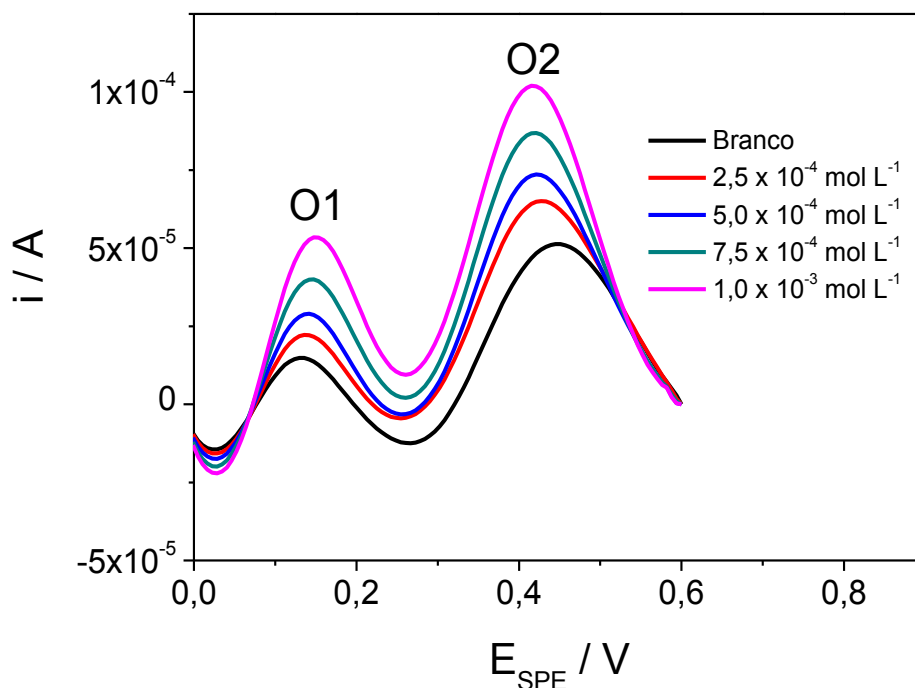


Figura 40: Voltamogramas de onda quadrada da resposta do sensor Au-MPS-(Quitosana-TsFePc)₁₅ para o analito 2-nitro-*p*-fenilenodiamina em solução tampão BR de 0,1 mol L⁻¹ a pH 3,5, *f* de 80 Hz e *E*_p de 70 mV.

Na Figura 40 observa-se a presença de dois picos de oxidação em potenciais de 150 mV (O1) e 420 mV (O2) referentes à oxidação dos grupos aminados do analito. É importante ressaltar que o branco apresenta uma corrente residual relativamente alta, o que limita a obtenção de LOD menores. Desta forma, visando obter sensores mais sensíveis foram avaliadas outras arquiteturas das multicamadas.

4.3.2 Estudo do eletrodo SAM-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc)*n*

Outro sistema que foi preparado com o eletrodo nano-estruturado de ouro, foi usando as monocamadas de cisteamina (Au-CISTE) que apresenta uma carga parcialmente positiva a pH 7, devido ao par $\text{-NH}_2/\text{-NH}_3^+$, o qual foi imerso previamente em uma solução de HCl $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para obter uma superfície carregada positivamente -NH_3^+ , e a seguir poder imobilizar por interação eletrostática as espécies negativamente carregadas (TsFePc) e posteriormente a quitosana (carregada positivamente), nessa ordem respectivamente, para a formação das correspondentes bicamadas. Este sistema foi avaliado na detecção do corante 4-nitro-*o*-fenilenodiamina.

Assim, a reação pela qual este composto catalisa a reação da 4-nitro-o-fenilenodiamina, permite o aparecimento dos picos observados na Figura 41, correspondentes à oxidação dos grupos -NH_2 (O1 e O2). Já o pico R3 pode ser atribuído à redução do grupo -NO_2 da molécula de analito.

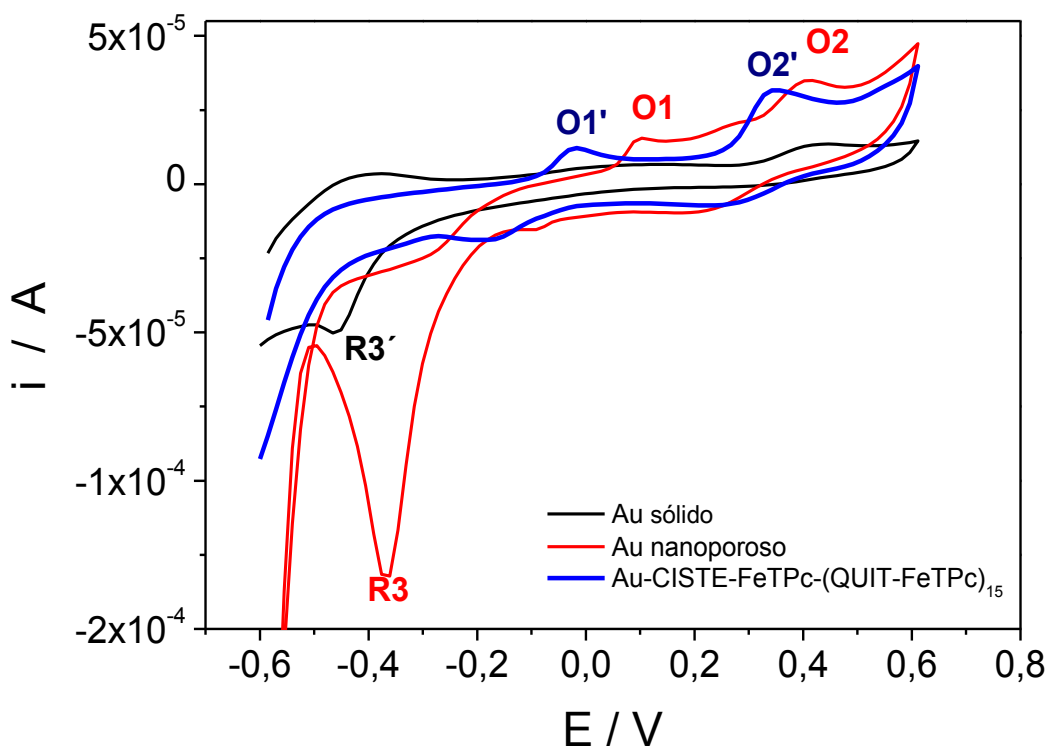


Figura 41: Resposta eletroquímica dos sistemas Au sólido, Au nano-estruturado, Au-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc)₁₅ em solução de 4-nitro-o-fenilenodiamina $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas em tampão de Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3 e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Foram realizadas análises das monocamadas nas diferentes superfícies de Au, Au-nano-estruturado e sensor (Au-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc)₁₅) observando que o sensor apresentaram picos de oxidação a menores potenciais (1' = -17 mV e 2' = 342 mV) do que em Au nano-estruturado (1 = 103 mV e 2 = 417 mV) e Au sólido (Figura 41). Por outro lado, o fato dos potenciais de pico anódico correspondentes à oxidação dos grupos -NH_2 da molécula do analito aparecerem em potenciais menores evidenciam o ganho em relação à seletividade do sensor.

Neste caso, também foram otimizados os parâmetros da construção do sensor, em relação ao número de bicamadas ($n = 15$), e das condições de análises. Obtendo-se os melhores resultados (Figura 42) em solução tampão Britton-Robinson (BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3, usando voltametria de onda quadrada a frequência de 80 Hz e amplitude de 70 mV. Sob estas condições obteve-se o perfil voltamétrico a seguir, que permitiu um limite de detecção de $4,27 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

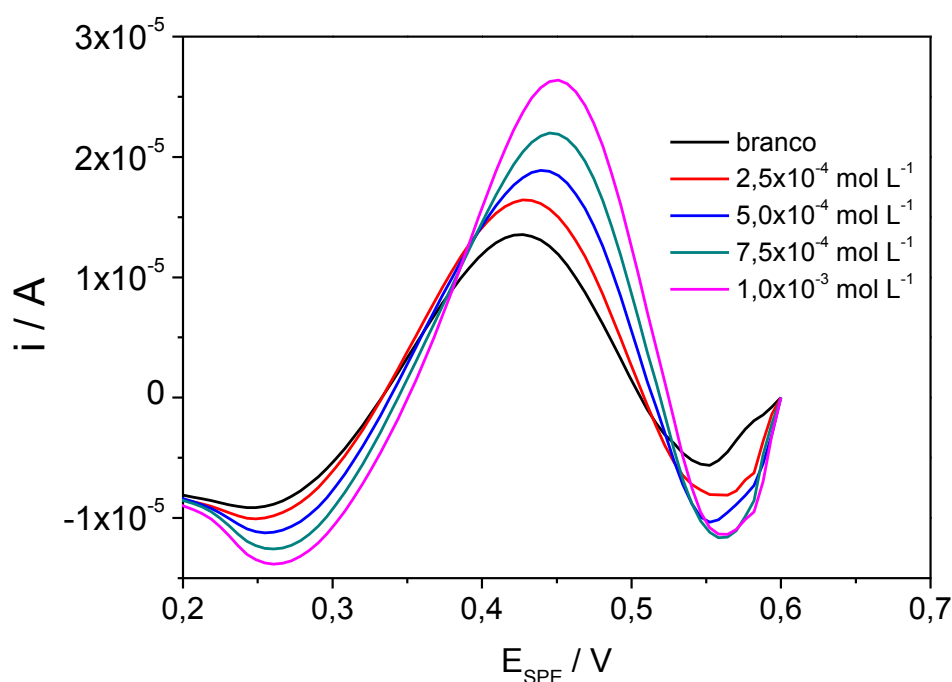


Figura 42: Voltamogramas de onda quadrada da resposta do sensor Au-CISTE-TsFePc-(Quitosana-TsFePc)₁₅ para o 4-nitro-*o*-fenilenodiamina em solução tampão BR de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3, amplitude de pulso de 70 mV e frequência de 80 Hz.

Neste caso, observa-se também um alto valor da corrente residual para o branco e um potencial de oxidação equivalente àquele do Au nano-estruturado sem modificar (Figura 42, linha vermelha), desta forma outras alternativas para a preparação do sensor foram avaliadas.

4.3.3 Avaliação da Influência do surfactante na preparação de filmes sensores de Au-SAM-Quitosana-TsMxPc

Com o intuito de melhorar a detectabilidade do sensor, diminuindo seu LOD, e assim diminuindo ao máximo a corrente residual do branco, uma alternativa que permitiria conseguir isto seria obter superfícies mais compactas entre as multicamadas, de forma tal que a transferência eletrônica possa se potencializar. Tem sido reportado que, a quitosana, um biopolímero muito estudado na atualidade na construção de sensores, interage com o surfactante SDS, possibilitando a formação de multicamadas estáveis e compactas. Desta forma, este composto anfifílico foi avaliado na construção dos sensores. Na Figura 43 mostram-se os voltamogramas do eletrodo de ouro nanoestruturado modificado com multicamadas de Au-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)₁₀ e modificado com multicamadas de Au-MPS-(Quitosana-TsNiPc)₁₀ para a determinação de 2-nitro-*p*-fenilenodiamina, apresentando que a variação de corrente do pico aumenta quando se há surfactante SDS no filme, mostrando assim, uma melhora na resposta do sensor.

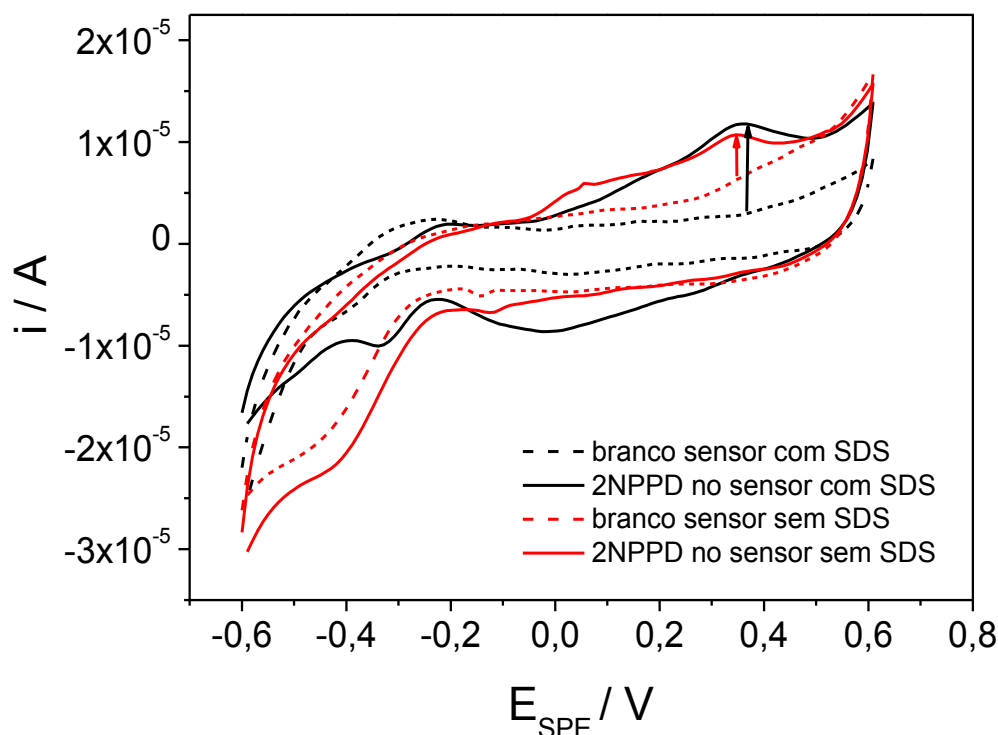


Figura 43: Resposta dos eletrodos modificados com multicamadas em uma solução $2,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-nitro-p-fenilenodiamina em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,5 e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. No gráfico sensor com SDS corresponde ao sensor de multicamadas de Au-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)₁₀ e sensor sem SDS corresponde ao sensor modificados com multicamadas de Au-MPS-(Quitosana-TsNiPc)₁₀.

Diversos estudos têm reportado a interação favorável entre o surfactante SDS e a quitosana. Por exemplo, nos estudos realizados por Sunintaboon *et al.* [72] encontrou-se que existe uma concentração ideal de surfactante na qual se forma um complexo com a quitosana, o qual foi evidenciado através de medidas de turbidez. Para soluções na faixa de concentração de quitosana entre (50 e 150 mg L^{-1}) a formação do complexo é máxima numa concentração de SDS de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após a concentração de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de SDS, a turbidez desaparece, devido a que complexo não é mais formado, tornando-se solúvel. Por este motivo, um parâmetro importante na construção do sistema proposto foi a escolha da concentração inicial destes reagentes.

Por outro lado, estudos reportados por Chatterjee *et al.* [73] mostraram grande mudança no potencial z ao longo das camadas de micro-cápsulas recobertas com filmes de SDS-quitosana, significando que ocorre grande interação entre esse par de compostos.

Assim, embora outros trabalhos relatem um amplo estudo termodinâmico e cinético entre os surfactantes e os polieletrólitos [74], ainda a formação e estrutura do filme de surfactante/polímero é objeto de discussão.

Desta forma, uma concentração de SDS de 1% (m/v) e de 1 mg mL⁻¹ de quitosana foram as mais adequadas para obter os melhores resultados e garantir a formação do complexo, uma concentração acima da CCM (concentração crítica micelar) [75], e poder obter superfícies carregadas, princípio fundamental na formação de filmes LBL.

Na Figura 44 mostra-se a influência do aumento na área superficial na detecção do analito 2-nitro-*p*-fenilenodiamina, para sensores à base de filme de Au_{nanoestruturado}-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)₁₀ e à base de Au-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)₁₀ sob as mesmas condições de pH e número de camadas.

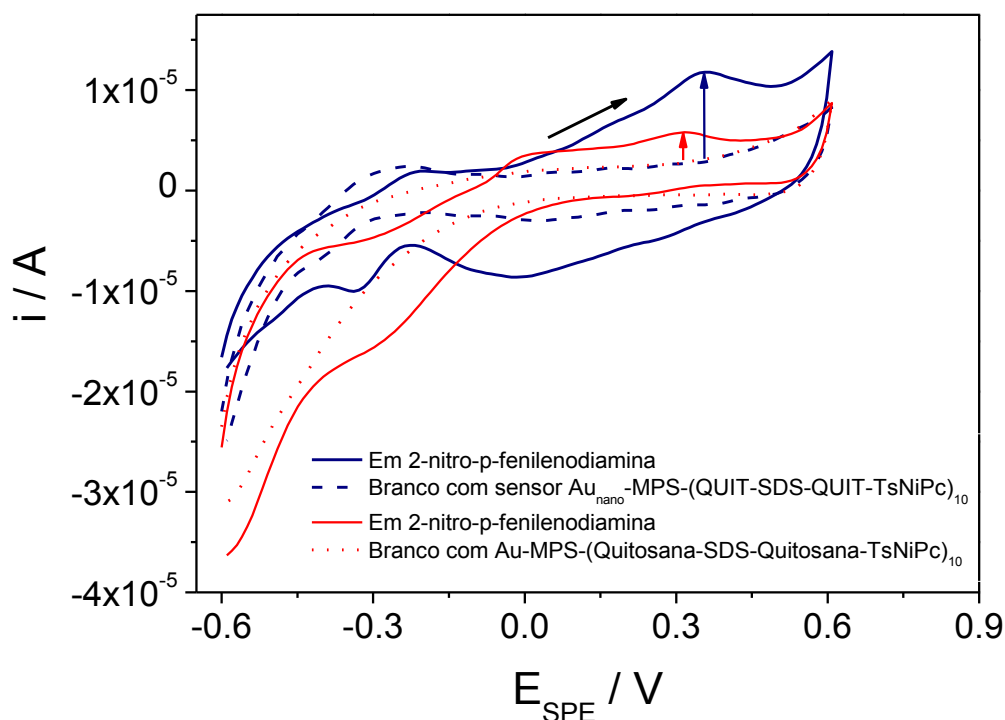


Figura 44: Voltamogramas cíclicos para os sensores à base de $\text{Au}_{\text{nano}}\text{-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)}_{10}$ e à base de $\text{Au-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)}_{10}$ em uma solução de $2,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de 2-nitro-*p*-fenilenodiamina em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,5 e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Claramente observa-se da Figura 44 uma menor influência da corrente residual do branco para o sensor à base de ouro nano-estruturado e multicamada contendo SDS deixando evidente a melhora na resposta do sensor quando usado surfactante.

Uma vez, encontrado o sensor que permitiu obter melhores resultados, a seguir as condições de análise foram otimizadas visando obter os menores LOD possíveis.

4.3.4. Estudo da influência do pH na resposta do sensor para 2NPPD

A resposta do sensor baseado em $\text{Au}_{\text{nano}}\text{-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)}_n$ foi avaliada em diferentes soluções ácidas devido a que o analito 2-nitro-*p*-fenilenodiamina é solúvel apenas em meio ácido. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 45.

Observa-se que entre pH 2 e 3,5, os potenciais de pico tendem a aumentar quanto menor é o valor do pH, obtendo-se a pH 2,0 o potencial de 370 mV, e que os mesmos tornam a aumentar após o pH 4,0, obtendo-se um potencial mínimo em 3,5. Isto provavelmente ocorre devido a que a medida que o pH aumenta a cor da solução começa a mudar para mais escura, indicando que há uma desprotonação da estrutura química do analito de acordo com o valor do pKa (4,17 : p-fenilenodiamina) , não sendo mais coerente avaliar soluções tampão com valores maiores a 4,0. Adicionalmente, que a partir de pH 3,0 não houve mudança significativa na corrente de pico. Assim para os estudos posteriores foi escolhido o pH de 3,5 por ser o pH que apresentou menor potencial, visando aplicação em amostras complexas, permitindo garantir a seletividade das análises.

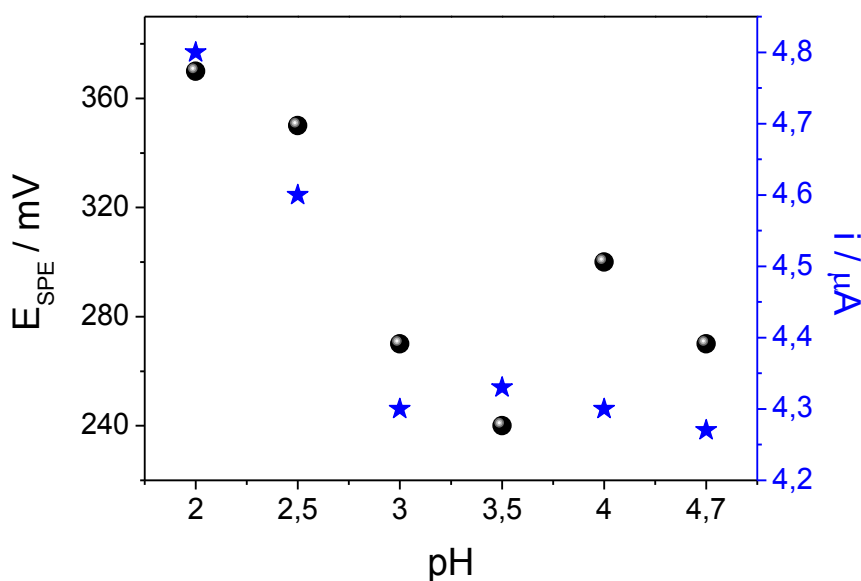


Figura 45: Perfil de resposta do sensor para o 2-nitro-*p*-fenilenodiamina em soluções tampão de BR com diferentes valores de pH a 25°C.

4.3.5 Estudo da influência do tampão na determinação de 2NPPD

O estudo do tampão foi realizado em pH 3,5, e para tal foram selecionados os tampões fosfato, citrato, Britton-Robinson (BR) e Acetato, todos nas mesmas condições de concentração e pH (0,1 mol L⁻¹ e 3,5, respectivamente). A Figura 46 mostra o resultado obtido.

Observa-se que o tipo de tampão não influencia no potencial de pico, e que o tampão Britton-Robinson fornece as maiores correntes, seguido pelo tampão acetato, fosfato e citrato. Este último tampão, apresentou uma resposta voltamétrica diferente das dos outros tampões, provavelmente devido à uma influência maior do ânion orgânico presente no tampão.

Assim, foi escolhido o tampão de Britton-Robinson. Uma possível explicação da maior corrente obtida usando este tampão pode ser atribuída ao grande número de íons usados na preparação deste tampão, fornecendo uma maior força iônica à solução e que favorece ao filme sensor formado por polieletrólito e surfactante.

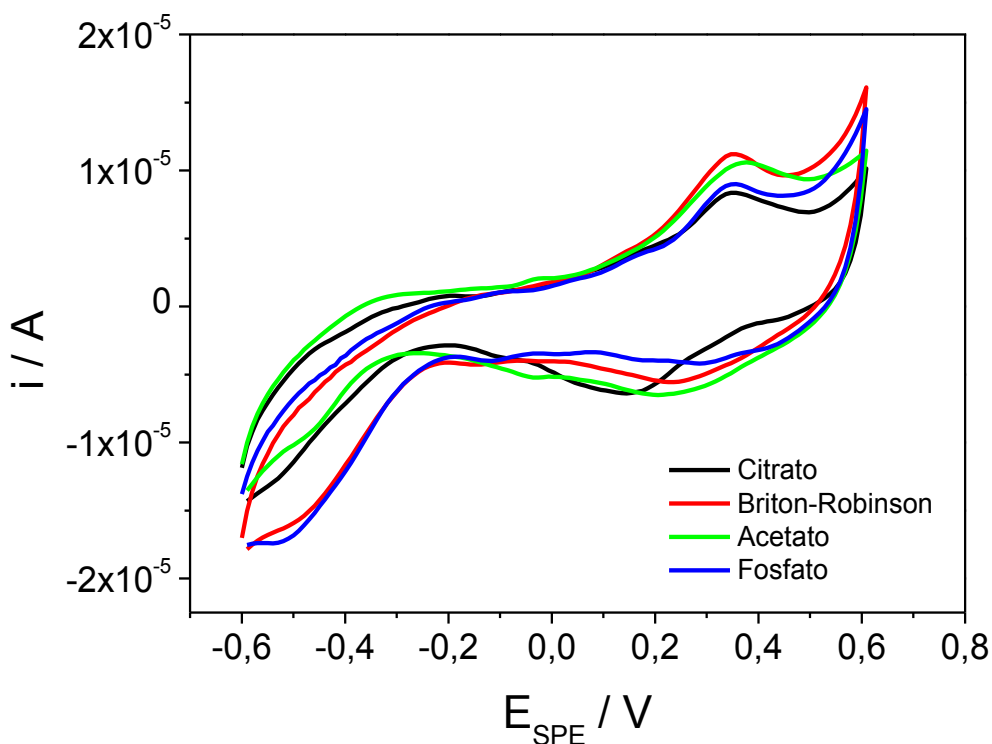


Figura 46: Perfil da influência do tampão na resposta do sensor proposto para o 2NPPD.

4.3.6 Otimização do número de camadas no filme LBL

Foi realizado um estudo da influência do número de multicamadas no filme sensor Au_{nano} -MPS-(Quitosano-SDS-Quitosana-TsNiPc)_n e os resultados obtidos são mostrados na Figura 47.

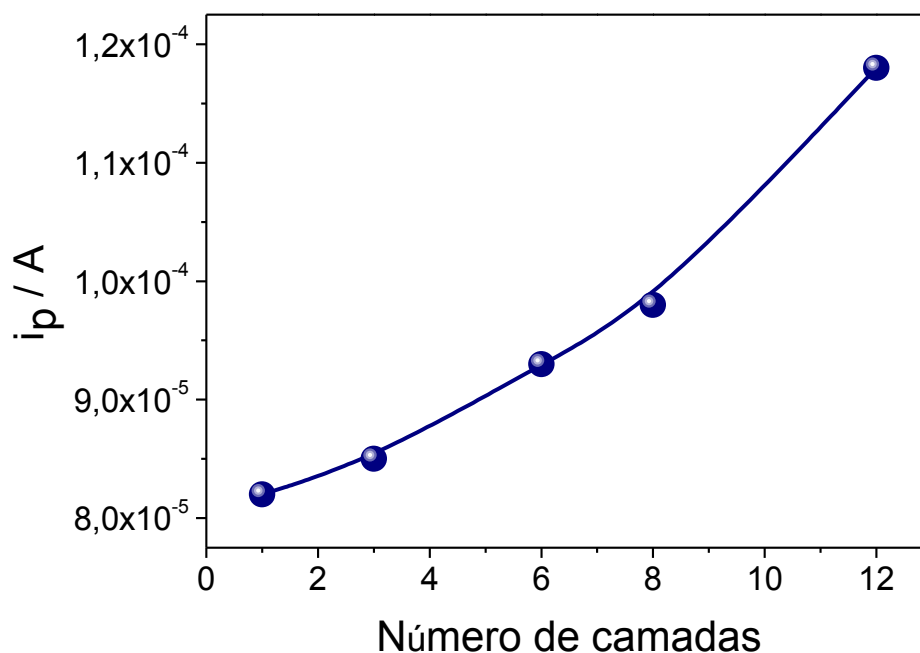


Figura 47: Mudanças do pico anódico com o número de camadas do filme sensor para uma solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ em pH 3,5 contendo 2NPPD $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $v = 50$ mV s⁻¹.

Nesse trabalho foram escolhidas 10 camadas por motivo de tempo, uma vez que as bicamadas foram imobilizadas manualmente. Entretanto, se o processo for automatizado poder-se-ia trabalhar com número maior de camadas, uma vez que a literatura têm reportado outros trabalhos com até 45 camadas, em sistemas automatizados controlando o tempo de imersão e obtendo-se um crescimento mais homogêneo e mais sensível [76].

Desta forma, uma vez otimizada a resposta do sensor, a seguir foi avaliada a seletividade do mesmo.

4.4 Estudo de seletividade

Com o intuito de avaliar a seletividade do sensor proposto, sua resposta foi avaliada na presença de metronidazol, histidina, ciprofloxacina, biotina, diclofenaco sódico, catequina, glutathione reduzida, nas mesmas condições de pH, temperatura e concentração ($4,45 \mu\text{mol L}^{-1}$) que para 2NPPD. Para tal, as medidas foram realizadas em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ em pH 3,5. Na Figura 48 apresentam-se os dados obtidos neste estudo.

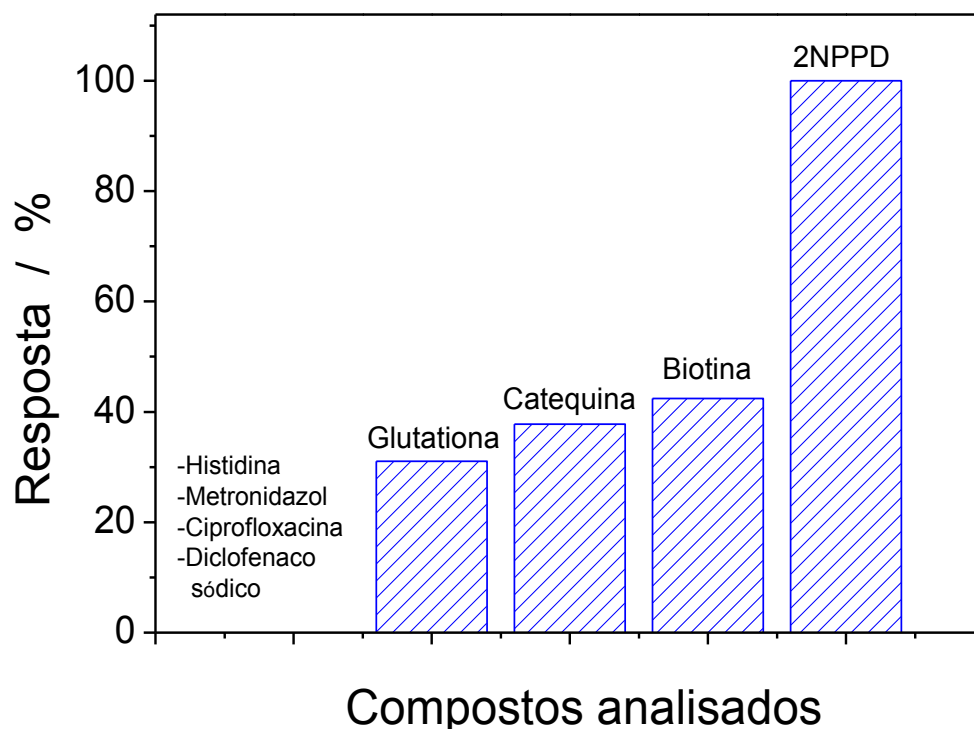


Figura 48 Porcentagem de resposta do sensor proposto para vários compostos avaliados. Medidas realizadas em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ pH 3,5.

Pode ser observado que para o metronidazol, a ciprofloxacina, o diclofenaco sódico e a histidina não se obteve registro de nenhum sinal, enquanto que para os analitos biotina, catequina e glutathiona reduzida, observaram-se sinais na ordem de 40% da resposta obtida para o analito 2NPPD. Este resultado pode ser explicado com base no mecanismo de resposta do sensor que envolve a oxidação das aminas aromáticas. Assim, este mecanismo pode ser demonstrado ao analisar as substâncias antes mencionadas.

O diclofenaco, a ciprofloxacina e o metronidazol, não possuem aminas aromáticas e não apresentaram sinal. A histidina contém apenas amina alifática e também não apresenta sinal. Já a biotina que apresenta grupo enxofre na estrutura e a catequina, um polifenol, apresentaram dois picos de oxidação, um deles no potencial redox da 2NPPD (**O2**) e outro a um potencial menor (**O1**) (Figura 48).

Já a glutathiona reduzida, que pode estar formando a forma oxidada (Figura 49) também apresentou 2 picos de oxidação similares à biotina e à catequina, mas com a diferença significativa (à diferença dos outros compostos, incluindo o analito) de que os voltamogramas apresentaram duplas redox reversíveis (Figura 50), provavelmente

correspondentes à redução da ponte dissulfeto e à oxidação da amina presente na molécula.

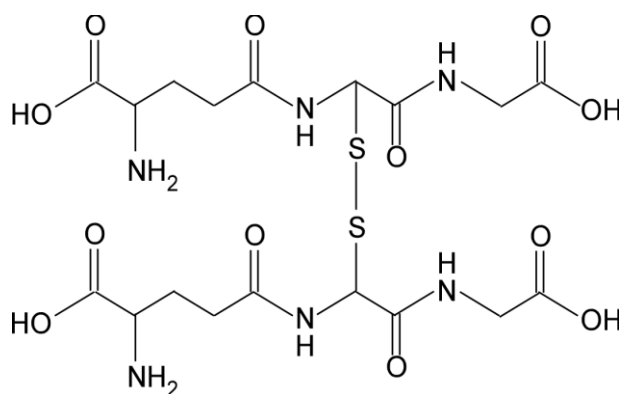


Figura 49: Estrutura química da glutathiona oxidada.

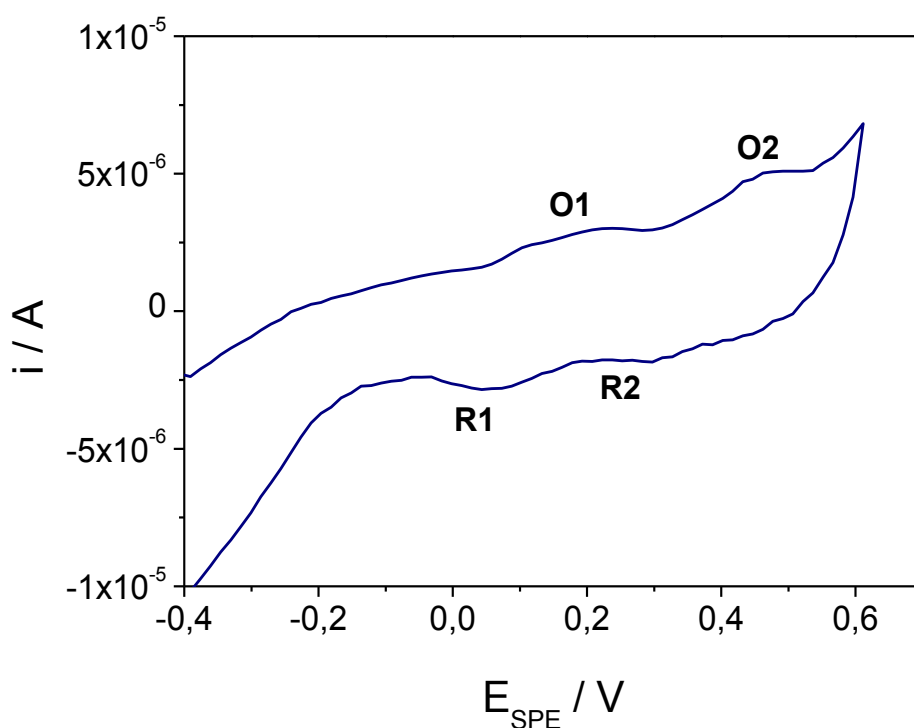


Figura 50: Voltamograma cíclico do sensor proposto na presença de glutathiona reduzida.

Assim, deste estudo pode-se concluir que o sensor proposto será preferencialmente seletivo à moléculas contendo aminas aromáticas, porém também responderá em menor grau para polifenóis e dissulfetos.

4.5 Características analíticas do sensor proposto para 2NPPD

Uma vez otimizadas as condições de preparação e análises do sensor proposto, foram avaliadas diversas técnicas eletroanalíticas para a quantificação do 2NPPD.

Na voltametria de onda quadrada, apresentada na Figura 51, mostra-se que o branco ainda apresenta uma corrente residual inicial, embora menor que aquele da Figura 40. Este pico inicial corresponde ao centro metálico da TsNiPc usada na construção do sensor, visando introduzir um centro catalítico na superfície sensora.

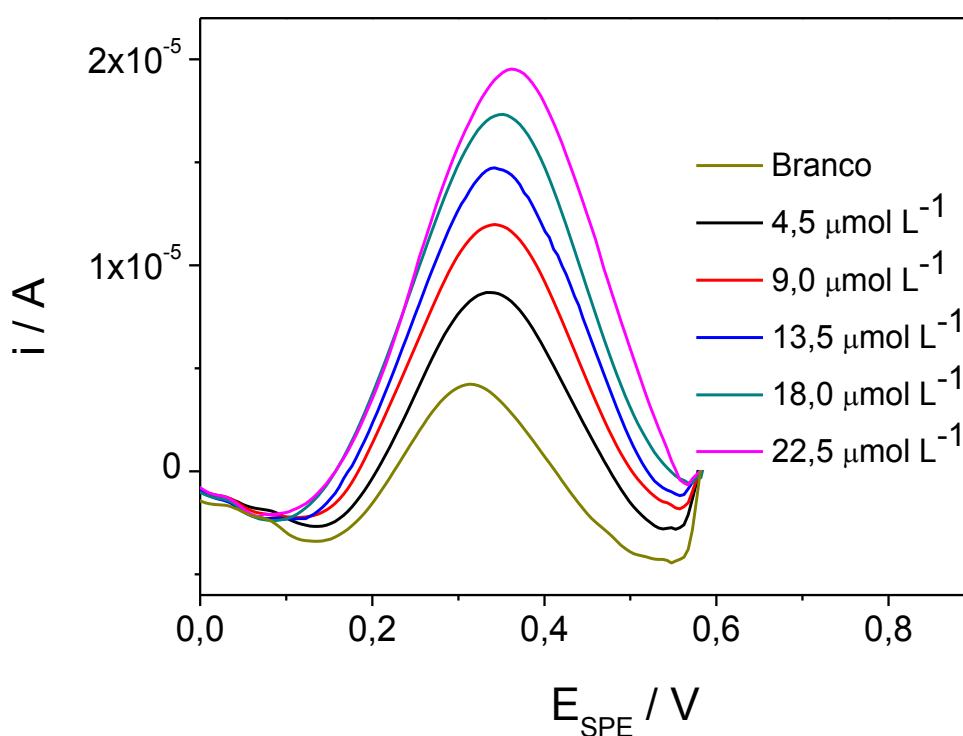


Figura 51: Voltametria de onda quadra para o sensor proposto na presença de 2NPPD, nas condições otimizadas de preparação e análise.

Na Figura 52 mostra-se a curva de calibração correspondente à Figura 51. Os dados se ajustaram à equação da reta (equação 7) com um coeficiente de correlação linear de 0,996, e o LOD e o LOQ estimados para o sensor foram de 1,2 e 4,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

$$\Delta i = 1,827 \times 10^{-6} (\pm 2,68 \times 10^{-7}) + 6,2 \times 10^{-1} (\pm 1,8 \times 10^{-2}) [\text{PPD}] \quad (\text{equação 7})$$

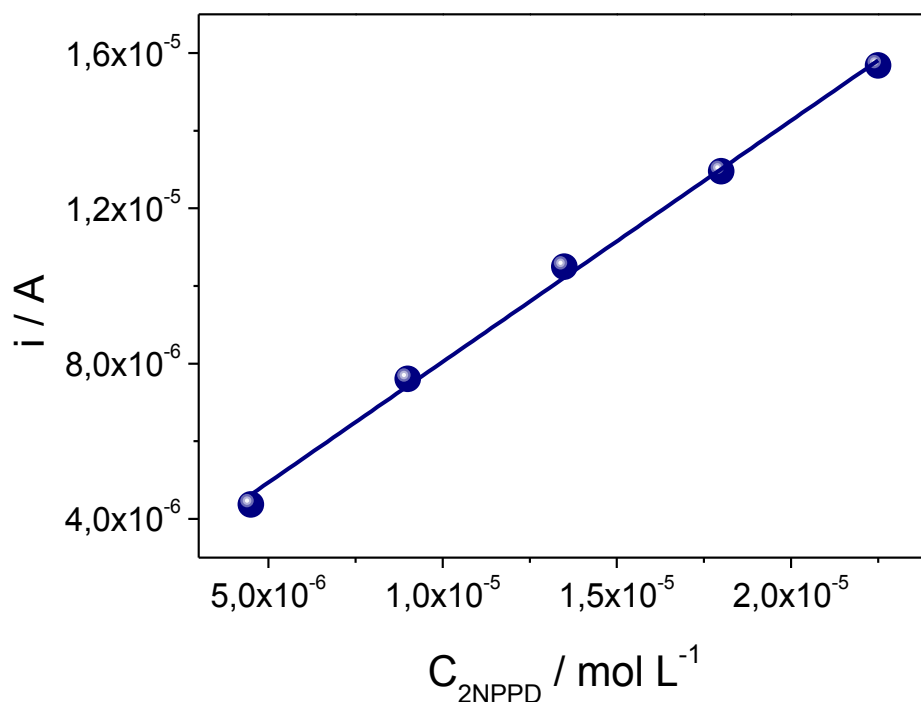


Figura 52: Curva de calibração obtida dos dados de VOQ da Figura 53.

Como foi mencionado no item 4.1.3.2, que descreve o pré-tratamento do Au por aplicação de pulsos de potencial (700 pulsos) para obter orientação preferencial dos planos do ouro policristalino (tal como os usados neste trabalho) que fora descrito por Rezai e Damiri [61] para obter eletrodos com elevada área ativa e, assim observar o comportamento desse eletrodo pré-tratado com o sistema aqui proposto, realizaram-se as imobilizações da SAM de MPS e das multicamadas LBL pelos procedimentos desenvolvidos e já otimizados e avaliou-se sua resposta em VOQ frente ao analito 2NPPD, nas condições de análise até aqui otimizadas. A Figura 53 mostra o perfil de resposta deste sensor.

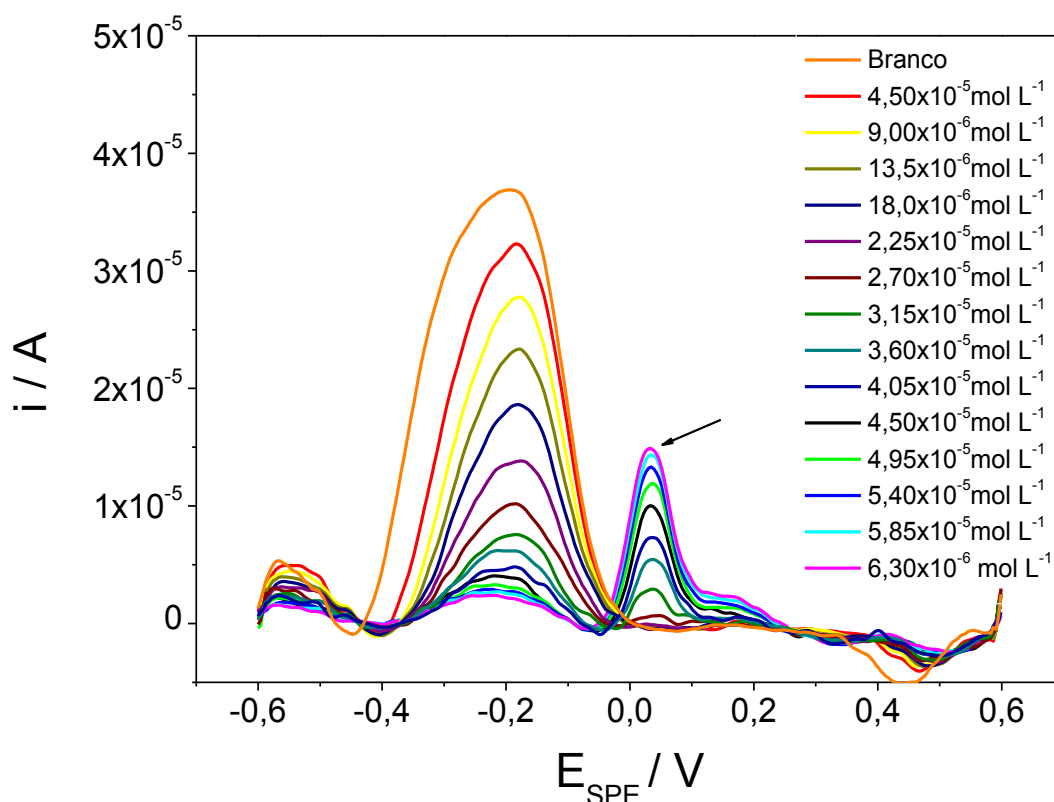


Figura 53: Voltamogramas de onda quadra do eletrodo de ouro nanoestruturado pré-tratado com pulsos (orientação preferencial) e modificado por SAM de MPS e multicamadas de QUIT-SDS-QUIT-TsNiPc, em soluções padrão de 2NPPD.

Observou-se um comportamento similar ao sensor proposto neste trabalho. Entretanto, o sensor apresenta um potencial de pico em valores negativos, e um outro, em aproximadamente zero mV, no qual o analito é quantificado.

Embora este sistema permita quantificar o 2NPPD em potencial menor daquele apresentado pelo sensor proposto neste trabalho. O aparecimento do pico em potencial negativo interfere na medida de corrente de concentrações abaixo de $27 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O aparecimento do primeiro pico da Figura 53, pode ser explicado pela oxidação de algum composto desconhecido ou mesmo pela instabilidade das superfícies do ouro (planos cristalográficos), já que o pré tratamento foi realizado aplicando pulsos diferenciais e as medidas foram feitas diretamente sem fazer uma varredura, e como foi mencionado anteriormente, os planos cristalográficos ao fazer a varredura tendem a mudar a um plano mais estável.

Na Figura 54, é mostrada a curva analítica correspondente ao sensor da Figura 54, e os dados foram ajustados conforme a reta da equação 8 ($R = 0,99$).

$$\Delta i = -1,2 \times 10^{-5} (\pm 4,3 \times 10^{-7}) + 0,50 (\pm 0,01) [2\text{NPPD}] \quad (\text{equação 8})$$

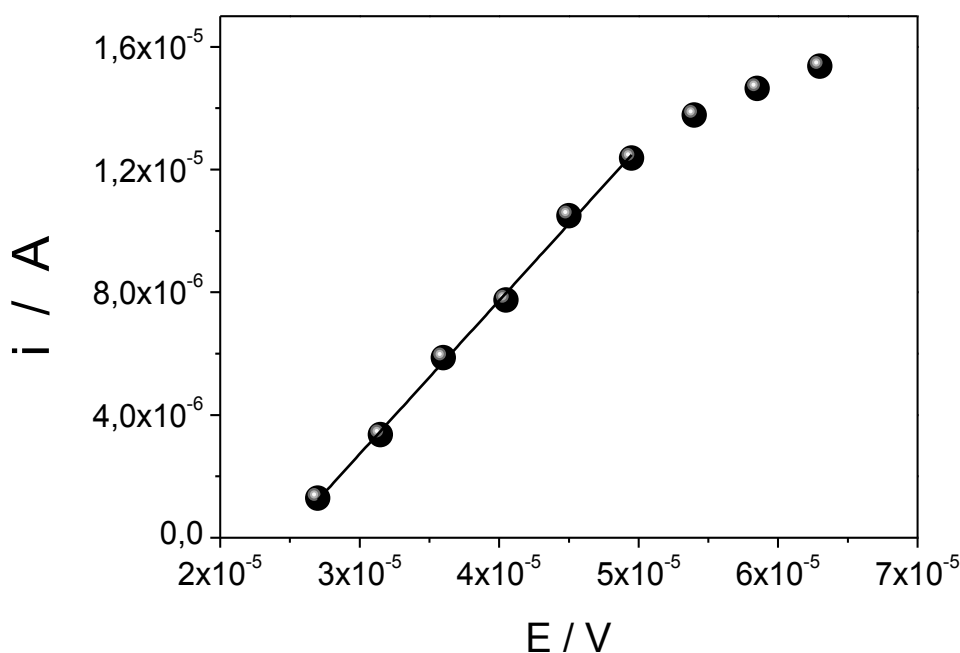


Figura 54: Curva de calibração do sensor à base de eletrodo de ouro com orientação preferencial obtida com os dados da Figura 55.

Embora aparentemente a faixa de resposta deste sensor pudesse parecer mais ampla que a do sensor proposto, este sensor é menos sensível, apresentando um LOD e LOQ de 2,5 e 8,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra os valores de 1,2 e 4,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtidos para o sensor proposto. Mostrando que o pré-tratamento do eletrodo de ouro para obter nanoestruturas tal como descrito neste trabalho além de ser satisfatório é muito mais simples que aquele relatado na literatura.

Uma vez verificado o bom desempenho em batelada do sensor à base de $\text{Au}_{\text{nano}}\text{-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)}_{10}$, visando realizar análises automatizadas, diminuir ainda mais o LOQ, usar pequenos volumes de amostra e miniaturizar o sistema, o sensor foi acoplado a sistema de análise por injeção em fluxo.

4.6 Acoplamento do sensor a sistema em fluxo

A seguir, se apresenta a quantificação do analito 2NPPD em um sistema em fluxo (FIA: *Flow Injection Analysis*), o qual foi realizado usando um volume injetado de amostra de 50 μL a uma vazão de $1,12 \text{ mL min}^{-1}$, os quais foram previamente otimizados. O diagrama obtido a 400 mV de potencial usando amperometria é mostrado na Figura 55.

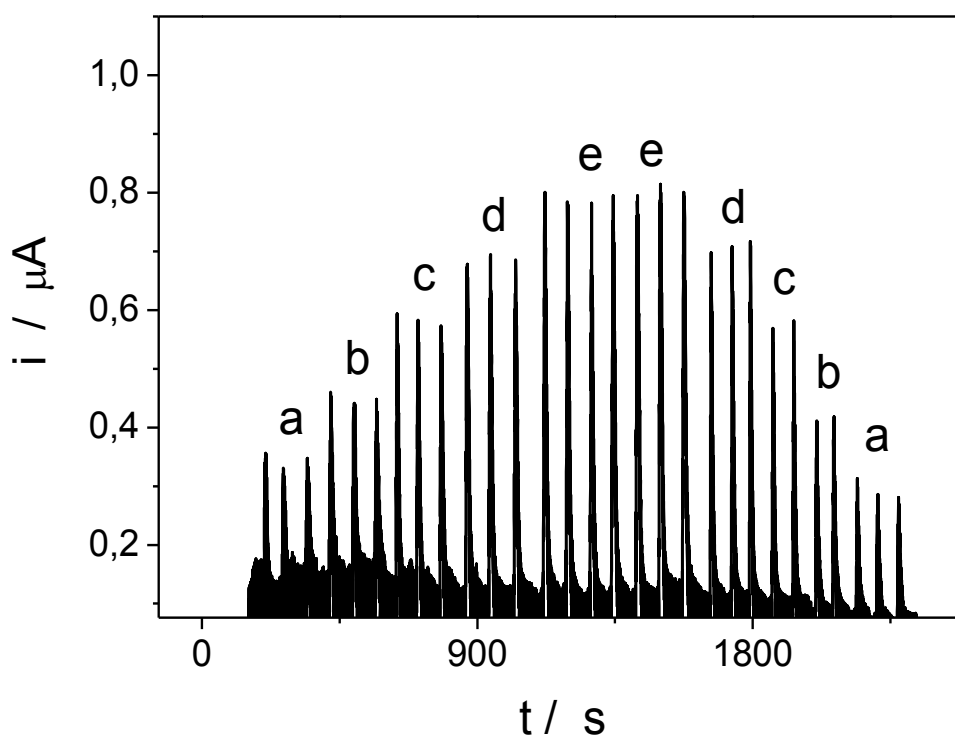


Figura 55: Diagrama obtido com o sensor proposto para soluções de 2-NPPD em (a) $4,5 \times 10^{-6}$; (b) $9,0 \times 10^{-6}$; (c) $1,4 \times 10^{-5}$; (d) $1,8 \times 10^{-5}$ (e) $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

As curvas analíticas na direção crescente de concentração e na direção inversa (Figura 56) mostram que o sensor construído não apresentou efeito de memória. Estas retas foram ajustadas segundo as equações das retas mostradas em 9 e 10, com um coeficiente de correlação linear de $R = 0,996$ e $R=0,993$.

$$i(A) = 2,32 \times 10^{-8} (\pm 1,42 \times 10^{-8}) + 3,16 \times 10^{-2} (\pm 8,08 \times 10^{-4}) [NPPD] \quad (\text{equação 9})$$

$$i(A) = 2,85 \times 10^{-8} (\pm 1,12 \times 10^{-8}) + 3,01 \times 10^{-2} (\pm 5,75 \times 10^{-4}) [NPPD] \quad (\text{equação 10})$$

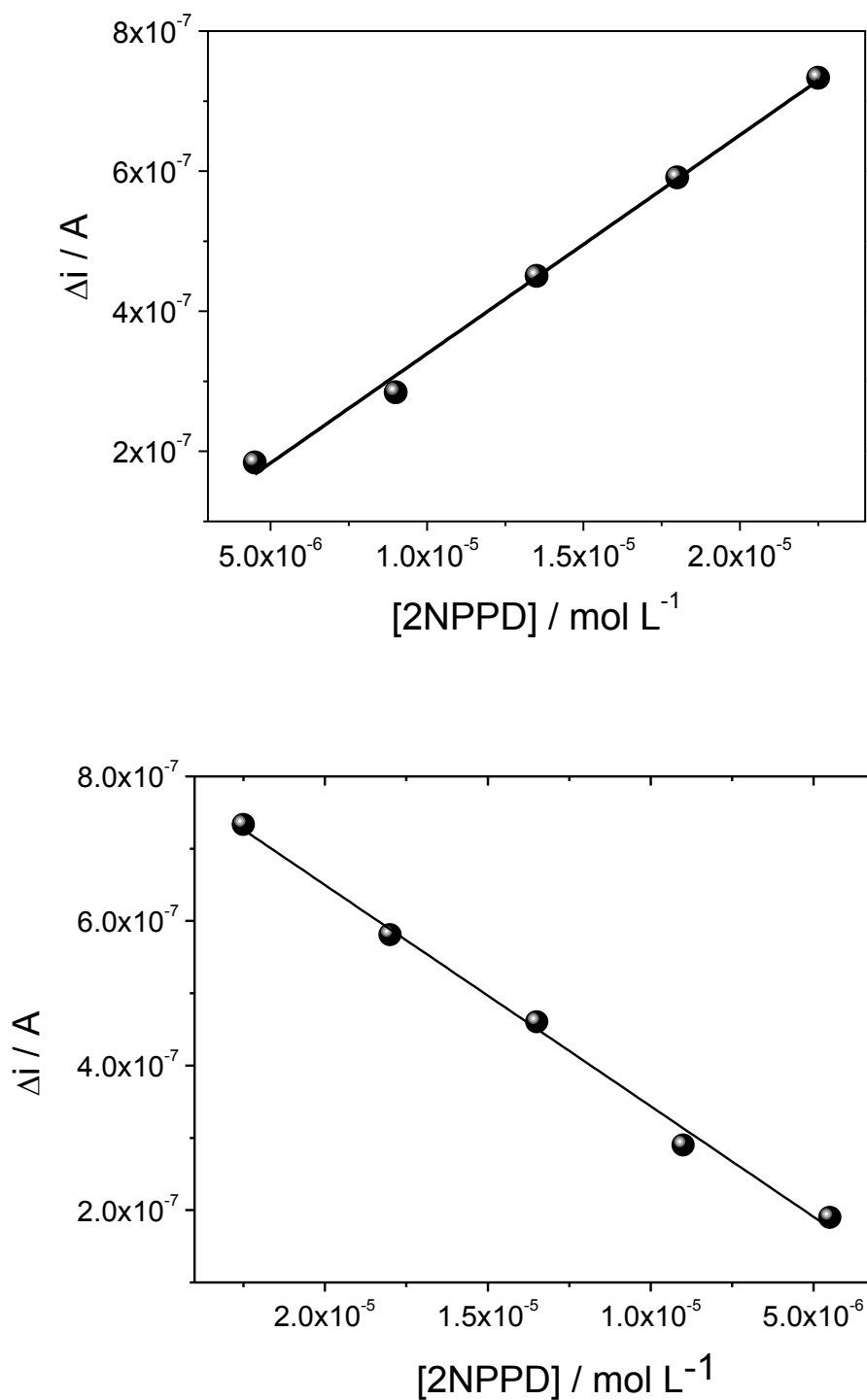


Figura 56: Curvas analíticas na região de aumento de concentrações e inversa, obtidas a partir dos dados da Figura 57.

O sensor em fluxo mostrou um LOD de $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOQ de $4,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ próximos dos de $1,2$ e $4,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtidos para o sensor em batelada. Entretanto, a vantagem do sistema em fluxo baseia-se nos menores volumes de amostra, e na maior rapidez das análises, tendo uma frequência de amostragem de 36 injeções por hora.

A repetibilidade do sensor foi avaliada e é apresentada na Figura 57, onde claramente pode-se observar que o sensor é altamente estável e reproduzível, com um valor para a repetibilidade das medidas em termos do desvio padrão médio relativo de (RSD) de 1,42% ($n = 20$).

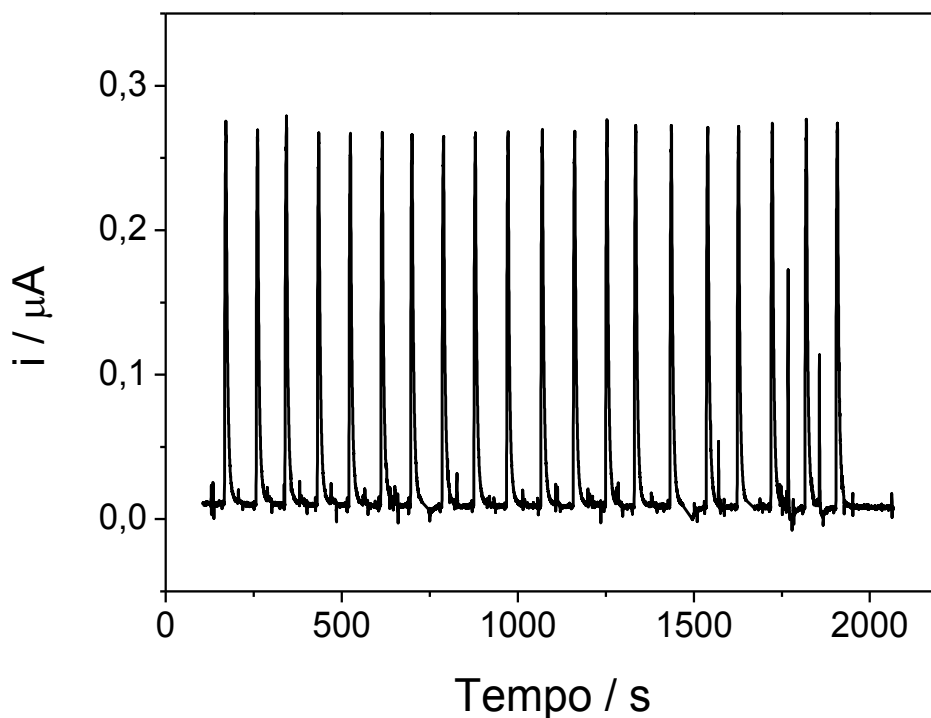


Figura 57: Perfil da repetibilidade das medidas do sensor proposto em FIA, para uma solução injetada de 2NPPD de $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em carregador de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3,5.

4.7 Determinação de 2NPPD em amostra reais

Foi realizada a determinação deste analito em amostras de água de torneira, a qual foi fortificada com uma concentração conhecida de 2NPPD e, também em corante capilar comercial para homens.

4.7.1 Análise de tintura de cabelo masculina

A análise desta amostra foi realizada pelo método da adição de padrão (Figura 58) usando o sistema em batelada desenvolvido.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6. Cabe ressaltar que os resultados foram obtidos em termos de PPD (*p*-fenilenodiamina), que é um composto

que pode ser quantificado neste sistema através da oxidação da amina aromática, tal qual o 2NPPD, uma vez que apresenta estrutura análoga.

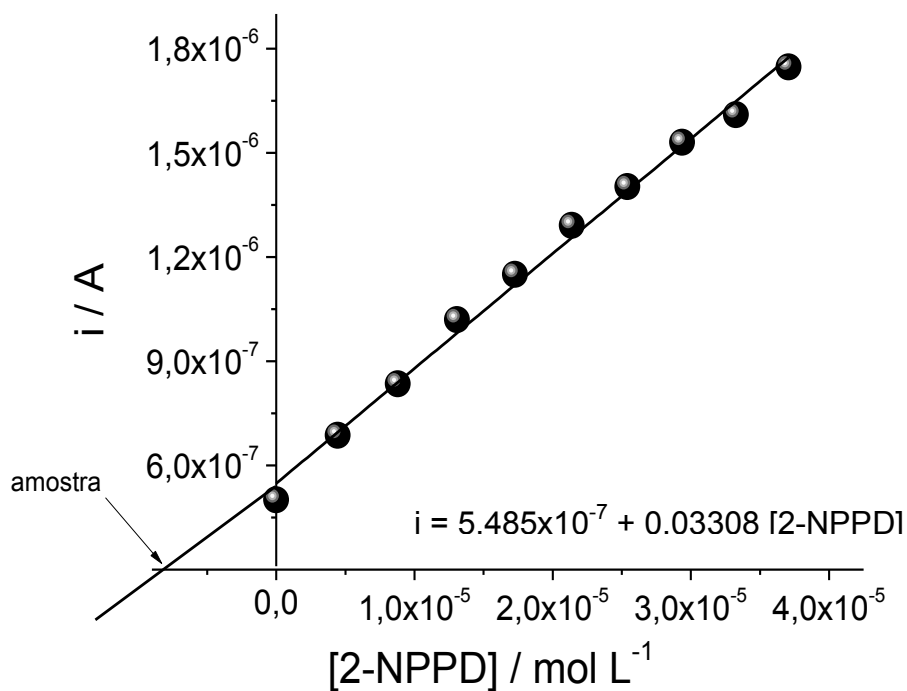


Figura 58: Curva de adição de padrão usada na análise de tintura de cabelo masculina comercial.

Tabela N° 6: Determinação de PPD em uma amostra de tintura de cabelo usando o sensor proposto.

Analito (mg g ⁻¹ corante)	Valor encontrado	REF.
PPD	22,68 ± 0,58*	Este sensor
PPD	24,10 ± 0,88*	[77]
Erro (%)	5,89%	----
<i>t-experimental</i>	3,93	

*n = 3, valor teórico de t = 4,303 para 95% de nível de confiança.

Os dados apresentados foram comparados com aquele desenvolvido por Fantinato *et al.* [77], que analisou a mesma marca do produto. Mostrando que os valores são estatisticamente similares a um nível de confiança de 95% para 2 graus de liberdade. Mostrando a eficiência do sensor na análise de amostras de tinturas comerciais.

4.7.2 Análise de água de torneira enriquecida com 2NPDD

Para aplicação do sensor na análise de água de torneira foi usado o sistema em fluxo e, a calibração externa para estimar o valor da recuperação.

Na Figura 59 são apresentados os resultados obtidos nas análises das águas de torneira e na Tabela 7 são mostrados os valores de recuperação estimados. Evidenciando o ótimo desempenho do sensor proposto nesta dissertação.

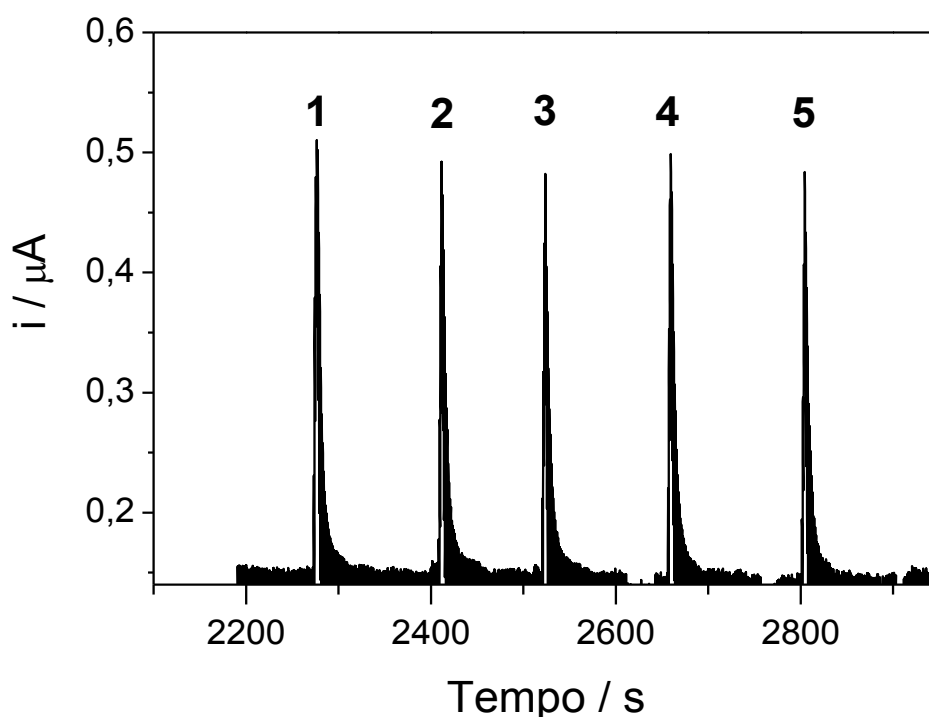


Figura 59: Perfil das 5 amostras de água de torneira contendo cada uma $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 2NPDD. Medidas realizadas usando solução carregadora de tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3,5.

Tabela N° 7: Dados da recuperação de 2NPPD em amostras de água de torneira fortificada.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	15,33 $\pm$ 0,55	15,01 $\pm$ 0,25	14,53 $\pm$ 0,10	15,07 $\pm$ 0,12	14,66 $\pm$ 0,70
Recuperação (%)	102,0	100,1	96,9	100,5	97,73

Desvio padrão de 3 replicatas.

Capítulo 5

5 CONCLUSÕES

Foi proposto um método simples para obtenção de ouro nanoestruturado que posteriormente permitiu a construção de sensores para determinação dos compostos 2-nitro-p-fenilenodiamina (2NPPD) e 4-nitro-o-fenilenodiamina (4NOPD) com limites de detecção de $3,68 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,27 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

O sensor Au-MPS-(Quitosana-SDS-Quitosana-TsNiPc)₁₀ construído para quantificação de 2NPPD apresentou resultados promissores. O sensor foi construído modificando um eletrodo impresso de Au_{nano} com monocamadas de MPS e um sistema de multicamadas LBL de Quitosana, SDS, Quitosana e TsNiPc obtendo limites de detecção em análise de injeção em fluxo e Voltametria de onda quadrada de $1,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

O sensor apresentou boas características analíticas tanto em batelada como em fluxo, mostrando boa repetibilidade e excelente aplicabilidade em amostras reais com porcentagens de recuperação entre 97-102%.

Capítulo 6

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar a resposta do sensor formando as multicamadas em um sistema automatizado (braço mecânico) no qual não se tenha restrição de tempo, e que permitirá avaliar maior número de multicamadas.

Explorar outras alternativas para melhora do desempenho do sensor para 4NOPD.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS

- 1 GOMES, A. L. **Tecnologia cosmética no trabalho do profissional cabelereiro**. 3. ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2009, p. 105-106.
- 2 YADAV, N.; YADAV, R.; KHARYA, M. D. Preparation and evaluation of natural hair colorant. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 1314-1319, 2014.
- 3 PRAGST, F.; BALIKOVA, M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. **Clinica Chimica Acta**, v. 370, p. 17-49, 2006.
- 4 PECORARO, V.; ASTORE, I. P. L. Measument of hair growth under physiological conditions. In: ORFANOS, C. E.; HAPPLE, R. **Hair and hair diseases**. Berlin, Heildeberg: Springer Verlag, 1990. Chap. 10, p. 237-254.
- 5 FASHION BUBBLES. **Ciclo do crescimento do cabelo**. Disponível em: <<http://www.fashionbubbles.com/beleza/dossie-queda-de-cabelo-parte-13/>>. Acesso em: 7 de jul. 2014.
- 6 U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Listing of color additives subject to certification**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ColorAdditiveListingRegulations/ListingofColorAdditivesSubjecttoCertification/default.htm>>. Acesso em: 03 de jun. 2014.
- 7 AGENCE FRANÇAISE DE SECURITÉ SANITAIRE DES PRODUITS DE SANITÉ. **Article L5131-9 Loi nº 2004-806 du 9 août 2004**: relative à la politique de santé publique. 12 août 2011. Disponível em: <<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000787078>>. Acesso em: 2 de jun. 2014.
- 8 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 332 de 01 de dezembro de 2005**. As empresas fabricantes e/ou importadoras de produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes, instaladas no território nacional deverão implementar um sistema de cosmetovigilância, a partir de 31 de dezembro de 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1d4e5e004aee4b10b7bcbfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+332,+de+01+de+dezembro+de+2005.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 6 de jun. de 2014.
- 9 BEHRENS, I.; CHOCIAI, J. G. A. Cosmetovigilância como instrumento para a garantia da qualidade na indústria de produtos cosméticos. **Visão Acadêmica**, n. 8, p. 1518-5192, 2007.
- 10 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf>. Acesso em: 6 de jun. 2014.
- 11 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Generalidades. In _____ **Farmacopeia Brasileira**. Brasília, DF, v. 1, 2010, p. 41-42.

- 12 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL PERFUMARIA E COSMÉTICA. **Panorama do setor 2014**. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-21-08.pdf>>. Acesso em: 6 de jun. de 2014.
- 13 NOHYNEK, G. J. et al. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 517-543, 2004.
- 14 ROBBINS, C. R. Morphological and macromolecular structure. In: _____ **Chemical and physical behavior of human hair**. 3rd ed. New York; London: Springer-Verlag 1994, p. 1-58.
- 15 REZNIK, G.; WARD, J. M. Carcinogenicity of the hair-dye component 2-nitro-p-phenylenediamine: induction of eosinophilic hepatocellular neoplasms in female B6C3F1 mice. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, p. 493-500, 1979.
- 16 KIRKLAN, D. J.; VENITT, S. Cytotoxicity of hair colorant constituents: chromosome damage induced by two nitrophenylenediamines in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 40, p. 47-56, 1976.
- 17 AMES, B. N.; KAMMEN, H. O.; YAMASAKI, E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v. 72, p. 2423-2427, 1975.
- 18 SEARLE, C. E. et al. Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents. **Nature**, v. 255, p. 506-507, 1975.
- 19 YOURICK, J. J.; BRONAUGH, R. L. Percutaneous penetration and metabolism of 2-nitro-p-phenylenediamine in human and fuzzy rat skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 166, n. 1, p. 13-23, 2000.
- 20 WOLFRAM, L. J.; MAIBACH, H. I. Percutaneous penetration of hair dyes. **Archives of dermatological Research**, v. 277, p. 235-241, 1985.
- 21 EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) N° 1223/2009, de 30 de noviembre de 2009. Sobre los productos cosméticos. **Diário Oficial de la Union Europea**, Buxelas, 22 de dez. 2012. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:es:PDF>>. Acesso em: 6 de jul. 2014.
- 22 WONG, A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Biomimetic sensor based on 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)-21H,23H-porphyrin iron (III) chloride and MWCNT for selective detection of 2,4-D. **Sensors and Actuators B**, v. 181, p. 332-339, 2013.
- 23 SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.) **The encyclopedia of sensors**. Steven Ranch: American Scientific Publishers, 2006. v. 1, p. 195-210.

- 24 SONO, M. et al. Heme-containing oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2841-2888, 1996.
- 24 MURRAY, R. W. Chemically modified electrodes. **Accounts of Chemical Research**, v. 13, n. 5, p. 135-141, 1980.
- 26 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- 27 ZHOU, X. C.; HUANG, L. Q.; LI, S. F. Y. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1/2, p. 85-95, 2001.
- 28 BORNSIDE, D.; MACOSKO, C.; SCRIVEN, L. On the modelling of spin coating. **Journal of Imaging Technology**, v. 13, p. 122-123, 1987.
- 29 PETTY, M. C. Film depositions. In: _____ **Langmuir-blodgett films: an introduction**. New York: Cambridge University Press, 1996. Chap. 3, p. 39-63.
- 30 LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1103-1170, 2005.
- 31 VERICAT, C. et al. Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111). **Journal of Physics: a Condensed Matters**, v. 18, p. R867-R900, 2006.
- 32 RAMIREZ DEL AMO, P. **Transferencia y almacenamiento de carga en monocapas autoensambladas de tioles**. 2007. 127 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Química, Universidade do Sevilla, Sevilla, 2007.
- 33 GARCIA RAYA, D. **Monocapas autoensambladas y nanoparticulas metalicas como elementos en la arquitectura de interfaces funcionales**. 2009. 291 f. Tesis (Doctor en Química) - Departamento de Quimica Fisica y Termodinâmica Aplicada, Faculdade de Ciências Químicas, Universidad de Córdoba, Córdoba, 2009.
- 34 ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, n. 6, p. 569-594, 1966.
- 35 DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210/211, p. 831-835, 1992.
- 36 DUBAS, S. T.; SCHLENOFF, J. B. Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. **Macromolecules**, v. 32, p. 8153-8160, 1999.
- 37 DECHER, G. et al. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-Layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, n. 9/10 p. 677-684, 1994.

- 38 LVOV, Y.; DECHER, G.; SUKHORUKOV, G. Assembly of thin-films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine). **Macromolecules**, v. 26, p. 5396-5399, 1993.
- 39 CHEN, M.-X. et al. Layer-by-layer assembly of chitosan stabilized multilayered. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 298-304, 2014.
- 40 OSTROWSKI, N. et al. Corrosion protection and improved cytocompatibility of biodegradable polymeric layer-by-layer coatings on AZ31 magnesium alloys. **Acta Biomateriales**, v. 9, p. 8704-8713, 2013.
- 41 ZHANG, D.; TONG, J.; XIA, B. Humidity-sensing properties of chemically reduced grapheme oxide/polymer nanocomposite film sensor based on layer-by-layer nano self-assembly. **Sensors and Actuators B**, v. 197, p. 66-72, 2014.
- 42 GHOSTINE, R. A.; MARKARIAN, M. Z.; SCHLENOFF, J. B. Asymmetric growth in polyelectrolyte multilayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 20, p. 7636-7646, 2013.
- 43 CAROSIO, F. et al. Green DNA-based flame retardant coatings assembled through layer. **Polymer**, v. 54, p. 5148-5153, 2013.
- 44 SAYDJARI, A. et al. Optical interference effect corrections for absorbance spectra of layer-by-layer thin films bearing covalently bound dye. **Chemical Physics Letters**, v. 608, p. 328-333, 2014.
- 45 JENKINS, A. D. et al. Glossary of basic terms in polymer science. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 2287-2311, 1996.
- 46 SCHLENOFF, J. B.; DUBAS, S. T. Mechanism of polyelectrolyte multilayer growth: charge overcompensation and distribution. **Macromolecules**, v. 34, p. 592-598, 2001.
- 47 DUBAS, S. T.; SCHLENOFF, J. B. Polyelectrolyte multilayers containing a weak polyacid. **Macromolecules**, v. 34, p. 3736-3740, 2001.
- 48 LOSCHE, M. et al. Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutrón reflectometry. **Macromolecules**, v. 31, p. 8893-8906, 1998.
- 49 PICART, C. et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, v. 99, p. 12531-12535, 2002.
- 50 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Potential sweep methods. In: **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 226-304.

- 51 RETTER, U. et al. On the impedance of potassium nickel(II) hexacyanoferrate(II) composite electrodes—the generalization of the randles model referring to inhomogeneous electrode materials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 546, p. 87-96, 2003.
- 52 SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- 53 SRISOMBAT, L.; JAMISIN, A. C.; LEE, T. R. Stability: a key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectans. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, p. 1-19, 2011.
- 54 HUAYHUAS-CHIPANA, B. C.; GOMERO, J. C. M.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Nanostructured screen-printed electrodes modified with self-assembled monolayers for determination of metronidazole in different matrices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, p. 1-9, 2014.
- 55 CORTI, C.; HOLLIDAY, R. (Ed.). Electrochemistry of gold. In:_____ **Gold: science and application**. Boca Raton: CRC Press, 2009. Chap. 4, p. 54-55.
- 56 MICHRI, A. A.; PSHENICHNIKOV, A. G.; BURSHTAIN, R. K. Determination of the true surface of smooth gold electrodes. **Elektrokhimiya**, v. 8, p. 364-366, 1972.
- 57 TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. **Pure & Applied Chemistry**, v. 63, p. 711-734, 1991.
- 58 GAMERO, M. et al. Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2038-2044, 2010.
- 59 SCHMIDT, V. M.; PASTOR, E. Electro-oxidation of propene on gold in acid solution studied by DEMS and FTIRS. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 401, p. 155-161, 1996.
- 60 MÖLLER, H.; PISTORIUS, P. C. The electrochemistry of gold-platinum alloys. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 570, p. 243-255, 2004.
- 61 REZAEI, B.; DAMIRI, S. Fabrication of a nanostructure thin film on the gold electrode using continuous pulsed-potential technique and its application for the electrocatalytic determination of metronidazole. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 1801-1808, 2010.
- 62 PERDRIEL, C. L.; ARVIA, A. J. Electrochemical faceting of polycrystalline gold in 1M H₂SO₄. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 215, p. 317-329, 1986.
- 63 SUBRAMANIAN, R.; LAKSHMINARAYANAN, V. Effect of surface roughness on the self-assembly of octadecanethiol monolayer onto polycrystalline noble metal surfaces. **Current Science**, v. 76, n. 5, p. 665-669, 1999.
- 64 HOOGLIET, J. C. et al. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2016-2021, 2000.

- 65 ZHANG, S. et al. Impedance spectroscopy of the potential response of MUO and AUT self-assembled monolayers on polycrystalline thin gold films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 629, p. 138-146, 2009.
- 66 IMABAYASHI, S. et al. Reductive desorption of carboxylic-acid-terminated alkanethiol monolayers from Au(111) surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 428 n. 1/2, p. 33-38, 1997.
- 67 IMABAYASHI, S. C. et al. Selective replacement of adsorbed alkanethiols in phase-separated binary self-assembled monolayers by electrochemical partial desorption. **Langmuir**, v. 13, p. 4502-4504, 1997.
- 68 WIDRIC, C. A.; CHUNG, C.; PORTESR, M. C. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemical**, v. 310, p. 335-339, 1991.
- 69 PHUONG QUYNH, B. T.; BYUN, J. Y.; KIM, S. H. Nanoporous gold for amperometric detection of amino-containing compounds. **Sensors and Actuators B**, v. 193, p. 1-9, 2014.
- 70 KASHEFI-KHEYRABADI, L.; MEHRGARDI, M. A. Aptamer-based electrochemical biosensor for detection of adenosine triphosphate using a nanoporous gold platform **Bioelectrochemistry**, v. 94 , p. 47-52, 2013.
- 71 ARIHARA, K. et al. Multiple voltammetric waves for reductive desorption of cysteine and 4-mercaptobenzoic acid monolayers self-assembled on gold substrates. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 5, p. 3758-3761, 2003.
- 72 SUNINTABOON, P. et al. One-step preparation of chitosan/sodium dodecyl sulfate-stabilized oil-in-water emulsion of Zingiber cassumunar Roxb. oil extract. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 414, p. 151-159, 2012.
- 73 CHATTERJEE, S. et al. Preparation of microcapsules with multi-layers structure stabilized by chitosan and sodium dodecyl sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 967-975, 2012.
- 74 BAI, G. et al. Thermodynamics of the interaction between a hydrophobically modified polyelectrolyte and sodium dodecyl sulfate in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p. 405-413, 2004.
- 75 ONESIPPE, C.; LAGERGE, S. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 317, p. 100-108, 2008.
- 76 KITAWA, I. L. **Caracterização por espectroscopia vibracional de filmes “layer-by-layer” contendo ftalocianina, polímeros condutores e gomas naturais**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.

77 FANTINATO, H. F. et al. Voltammetric sensor for simultaneous determination of p-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 261-268, 2014.