



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

André Olean Oliveira

Desenvolvimento de Quimioresistor Baseado em Filme
Polimérico de Bismarck Brown Y para Monitoramento de
Oxigênio Mitocondrial

São José do Rio Preto

2019

André Olean Oliveira

Desenvolvimento de Quimioresistor Baseado em Filme
Polimérico De Bismarck Brown Y Para Monitoramento De
Oxigênio Mitocondrial

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - DS

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim

São José do Rio Preto

2019

O48d Oliveira, André Olean
Desenvolvimento de Quimioresistor Baseado em Filme Polimérico de Bismarck Brown Y para Monitoramento de Oxigênio Mitocondrial / André Olean Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2019
111 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Marcos Fernando de Souza Teixeira
Coorientadora: Patrícia Monteiro Seraphim

1. Eletroquímica. 2. Química analítica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

André Olean Oliveira

Desenvolvimento De Quimioresistor Baseado Em Filme
Polimérico De Bismarck Brown Y Para Monitoramento De
Oxigênio Mitocondrial

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES - DS

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
UNESP – Campus de Presidente Prudente
Orientador

Prof. Dr. Gilberto Augusto de Oliveira Brito
UFU/FACIP – Ituiutaba/MG

Profa. Dra. Patrícia Alexandra Antunes
UNOESTE – Presidente Prudente

São José do Rio Preto
08 de fevereiro de 2019

Dedico este trabalho à Deus, a minha Família e a Gabriela, meu grande amor. Também dedico à memória de meu amigo Filipe Melo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus**, pelo dom da vida e por me manter na fé, para sempre resistir perante os desafios e buscar fazer o meu melhor.

A minha **Mãe Fátima** e ao meu **Pai Manoel**, por serem meus maiores exemplos de coragem, otimismo, fé, trabalho, união e amor. Por me ensinarem a tratar as responsabilidades com compromisso e dedicação. Por sempre estarem ao meu lado me incentivando, acalmado ou encorajando, me dando todo o apoio e suporte necessário para que eu conseguisse lutar pelos meus sonhos.

Ao meu **irmão Tiago**, sou igualmente grato. Por todo o apoio, amizade, pelos momentos de descontração tirando uma “zika” jogando um videogame, e pela incrível oportunidade de desenvolver um trabalho em parceria.

Ao **Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira**, por todos esses anos de amizade e orientação. Pela confiança depositada em minha capacidade e pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho. Também, por todos seus ensinamentos e discussões científicas, seja elas no laboratório, durante uma sessão de *board game* ou em um *happy hour* com boa cerveja, contribuindo imensamente para meu desenvolvimento como pesquisador e futuro cientista.

A **Profa. Dra. Patrícia M. Seraphim**, pela coorientação e imensurável contribuição para este trabalho. Também por todos esses anos de amizade, nunca abalada, nem mesmo por um fatídico episódio envolvendo um cupcake de aniversário.

A **Profa. Dra. Patrícia A. Antunes** e ao **Prof. Dr. Deuber L. S. Agostini** pelos apontamentos e contribuições para enriquecimento do presente trabalho.

Aos amigos da **Trupe Quimiatividade** e do **Grupo de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores (GPES)**, **Caio, Douglas, Heitor, Jéssica, Kaio, Lyandrinara, Mariana e Nayara**, em especial aos amigos de longa data **Diego, Marcos (Tone), Danielle, Camila e Yuri**, e todos que passaram pelos grupos. Pela amizade, ensinamentos e bons momentos compartilhados, sempre regados com muitas doses de café, debates polêmicos, histórias mirabolantes e piadas de alto nível, mas principalmente, por muita parceria e união.

Ao **Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPFis)**, pela grande parceria no desenvolvimento do trabalho, em especial aos integrantes **Tiago e Caroline Moreno**.

Ao **Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF/CEPID/FAPESP)**, através do **Prof. Marcelo O. Orlandi** e a Técnica **Sônia M. Zanetti**, pela realização das análises de Microscopia de Força Atômica.

Ao **Laboratório de Filmes Nanoestruturados e Espectroscopia (NOIX)**, em especial ao **Prof. Carlos José L. Constantino** e ao **M.e Rafael Gonçalves** pela realização das análises de Espectroscopia de Raman.

Aos **docentes e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica da FCT – UNESP**, **Ana Flora, Ana Pires, Beatriz, Eduardo, Gustavo, Homero, Maria de Lurdes, Sérgio,**

Silvânia, Juvanir, Fernanda e Angélica, pelo carinho e ótima convivência durante esses anos de iniciação científica e graduação.

Aos **docentes e funcionários do Departamento de Física**, em especial aos professores **Celso e Deuber**.

Aos técnicos de laboratório, **Sidney, Gabriel, Paulo e Murillo**, sempre dispostos a contribuir.

A técnica **Me. Glenda Gonçalves de Souza**, pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos do **skate e patins**, por todos os momentos de descontração proporcionados ao lado de boa conversa e risadas tomando uma Bavária latão com temperatura ambiente.

Ao amigo **Prof. Leandro Leal** e todos integrantes do **Canal Não Perca a Cabeça**.

Aos amigos do **Ana Jacinta**, em especial aos amigos **Jean Yamada, Jéfferson (Pajé), Felipe Mendes, Renan Schafer, Renan, Lucas (Chicó), Vitor (Chitão), André (Dé), Giovani (Teta), Gleisson (Feio), Rafael, André (Toty), Thiago (Cagão) e Albersson** pela sincera amizade de todos esses anos.

A minha segunda família, **Paulo, Rosimeire e Eduarda**, pelo imenso amor e carinho com o qual eu sempre fui e sou recebido. Sou grato por todo apoio e por fazerem com que eu me sinta como um filho.

A minha **namorada Gabriela**, grande amor da minha vida. Por todos esses anos de companheirismo, estando ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada. Por sempre acreditar em mim e em meus sonhos. Obrigado por todo apoio e incentivo. Eu não teria conseguido sem você ao meu lado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

A todos os meu mais sincero obrigado.

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward.”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

A presente dissertação apresenta os estudos e os esforços dedicados ao desenvolvimento de uma plataforma sensorial eletroquímica para monitoramento em tempo real de oxigênio dissolvido, baseando-se na alteração de resistência elétrica do material nanocompósito de azopolímero e óxido de grafeno, para aplicações em meio biológico. O filme foi construído através de técnica de eletropolimerização sobre eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO), formando um filme fino nanoestruturado com camadas alternadas de óxido de grafeno reduzido e o azopolímero de Bismark Brown Y (poli(azo-BBY)-rGO). A morfologia do filme nanocompósito foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) revelando uma superfície rugosa e uniforme. A caracterização eletroquímica da plataforma sensorial foi realizada por técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), onde foram investigados os fenômenos interfaciais. Através de EIE foi verificado uma diminuição do valor de resistência de transferência de carga do sistema ($\Delta R = 47,05 \text{ k}\Omega$) quando na presença de solução saturada de oxigênio dissolvido. O sensor quimioresistor de poli(azo-BBY)-rGO demonstrou estabilidade nas respostas em uma ampla faixa de pH e apresentou resposta linear na faixa de concentração de $1,17 \times 10^{-5}$ a $1,02 \times 10^{-3}$ com limite de detecção de $3,55 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4. Por fim, a plataforma sensorial foi aplicada no monitoramento do consumo de oxigênio mitocondrial em tecido retirado do músculo esquelético (gastrocnêmico) de ratos submetidos a fumo passivo e exercício resistido, permitindo obter a capacidade respiratória dos complexos que constituem a cadeia transportadora de elétrons.

Palavras-chave: Sensor Quimioresistor. Filme Nanocompósito. Respiração Mitocondrial. Azopolímeros Condutores. Eletroquímica.

ABSTRACT

The present dissertation presents the studies and the efforts dedicated to the development of an electrochemical sensing platform for real time monitoring of dissolved oxygen, based on the alteration of electrical resistance of the azopolymer nanocomposite material and graphene oxide for biological applications. The film was constructed by electropolymerization technique on fluoride-doped tin oxide (FTO), forming a nanostructured thin film with alternating layers of reduced graphene oxide and Bismark Brown Y (poly(azo-BBY)-rGO). The morphology of the nanocomposite film was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) revealing a rough and uniform surface. The electrochemical characterization of the sensory platform was performed by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), where the interfacial phenomena were investigated. A decrease in the load transfer resistance value of the system ($\Delta R = 47.05 \text{ k}\Omega$) was observed in the presence of saturated solution of dissolved oxygen. The poly(azo-BBY)-rGO chemoresistor sensor demonstrated stability in the responses over a wide pH range and showed a linear response in the concentration range of 1.17×10^{-5} to 1.02×10^{-3} with detection limit of $3.55 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ at pH 7.4. Finally, the sensorial platform was applied to the monitoring of the mitochondrial oxygen consumption in tissue removed from the skeletal muscle (gastrocnemius) of passive smoking and resistance exercise, allowing to obtain the respiratory capacity of the complexes that constitute the electron transport chain

Keywords: Chemiresistor Sensor. Nanocomposite Film. Mitochondrial Respiration. Azo polymer. Electrochemical Impedance Spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do funcionamento básico de um quimioresistor.....	23
Figura 2 – Processo de foto-isomerização do azobenzeno.	25
Figura 3 – Aplicação do mecanismo de foto-isomerização de um azocomposto para controle de abertura e fechamento de canal de transporte de íons.	27
Figura 4 – Mecanismo de foto-isomerização para aplicação em um sistema de captura e carregamento de íons.	28
Figura 5 – Estrutura molecular do azo corante Bismark Brown Y.	29
Figura 6 – Estrutura química do grafeno.	30
Figura 7 – Estrutura química do (A) óxido de grafeno (GO) e (B) óxido de grafeno reduzido (rGO).	32
Figura 8 – Representação esquemática da membrana interna da mitocôndria contendo a cadeia respiratória mitocondrial demonstrando o mecanismo de fosforilação oxidativa.	33
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY) (A) e poli(azo-BBY)-rGO (B) sobre eletrodo de FTO, aplicando 100 ciclos de potenciais em velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Linha vermelha = 1° ciclo e linha azul = 100° ciclo. T = 25°C e atmosfera de N ₂	42
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos para a resposta eletroquímica em solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ (pH = 2,0) a 25 mV s ⁻¹ dos filmes de: (a) poli(azo-BBY)-rGO e (b) poli(azo-BBY), sintetizados com 100 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . T = 25°C e atmosfera de N ₂	44
Figura 11 – Respostas voltamétricas em solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ (pH 2,0) e atmosfera de N ₂ para os filmes formados com 10 ciclos de potenciais	

em velocidades de 10 (A), 25 (B), 50 (C) e 100 mV s ⁻¹ (D). $v = 25 \text{ mVs}^{-1}$	45
Figura 12 - Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferentes velocidades de varredura em solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ (pH = 2,00) com potencial aplicado de +0,30 V (A) e -0,30 V (B) vs. ECS. Atmosfera de N ₂ . Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.	47
Figura 13 – Modelos de circuito equivalente propostos para os espectros de Nyquist dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO em potencial de (A) +0,30 V e (B) -0,30 V (vs. ECS).	49
Figura 14 – Dependência da resistência de transferência de carga em potencial aplicado de +0,30 V vs. ECS (eixo Y esquerdo - preta) e concentração de espécies ativas (eixo Y direito - vermelha) em função da velocidade de varredura na formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO.	50
Figura 15 - Dependência da resistência de transferência de carga em potencial aplicado de -0,30 (V vs ECS) em função da velocidade de varredura na formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO. .	51
Figura 16 - Voltamogramas cíclicos para os filmes formados sob diferentes ciclagens de potenciais na etapa de eletropolimerização. Solução aquosa de KCl 0,50 mol L ⁻¹ e atmosfera de N ₂ . $V = 25 \text{ mV s}^{-1}$	53
Figura 17 - Espectro de plano complexo de Nyquist para os filmes formados sob diferentes números de ciclos de potenciais na eletropolimerização. Solução aquosa de KCl 0,50 (pH = 2,00) e atmosfera de N ₂ . Potencial aplicado de (A) +0,30 e (B) -0,30 V (vs. ECS). Frequência aplicada 50 kHz a 0,10 Hz.	55
Figura 18 – Modelo de circuito equivalente para o ajuste matemático do espectro de Nyquist dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO em potencial aplicado de +0,30 V (vs. ECS).	56
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos para os filmes de poli(azo-BBY)-rGO formados sob diferentes concentrações de óxido de grafeno. Solução	

aquosa de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0) e atmosfera de N₂. V = 25 mV s⁻¹.

..... 59

Figura 20 - Espectro de plano complexo de Nyquist para os filmes formados sob diferentes concentrações de óxido de grafeno. Solução aquosa de KCl 0,50 (pH = 2,00) e atmosfera de N₂. Potencial aplicado de +0,30 V (A) e - 0,30 V (B)..... 61

Figura 21 – Valores de impedância real (Z') e impedância imaginária (Z'') em função do tempo para o filme de poli(azo-BBY)-rGO em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ pH = 2,0. Frequência fixa de 0,10 Hz e potencial aplicado de - 0,30 V vs. ECS. T = 25° e atmosfera de N₂. 63

Figura 22 – Representação esquemática para a eletropolimerização do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO sobre eletrodo de FTO. 66

Figura 23 - Plano complexo de Nyquist para os filmes de rGO (a), poli(azo-BBY) (b) e poli(azoBBY-rGO) (c) em um potencial aplicado de -0,30 V (vs ECS) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). T = 25°C e atmosfera de N₂. Os modelos de circuito equivalente para os ajustes matemáticos dos espectros são expressos na Tabela 9. 68

Figura 24 – Representação esquemática dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO e seus respectivos modelos de circuito equivalente em diferentes potenciais aplicados. 70

Figura 25 - Plano complexo de Nyquist para os filmes de rGO (a), poli(azoBBY) (b), e poli(azoBBY-rGO) (c) em um potencial aplicado de +0,30 V (vs ECS) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). T = 25°C e atmosfera de N₂. 71

Figura 26 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO finalizando a eletropolimerização durante a varredura anódica (A) e poli(azo-BBY)-rGO finalizando a eletropolimerização durante a varredura catódica (B). 73

Figura 27 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) do filme de poli(azo-BBY)-rGO finalizando a eletropolimerização na varredura anódica (A), catódica (B) e suas respectivas representações 3D (C e D)..... 75

Figura 28 – Espectros de absorção no UV-Vis para os filmes de poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO sobre eletrodo de FTO.....	77
Figura 29 – Espectros do plano complexo de Nyquist do filme de poli(azo-BBY)-rGO sobre potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) em solução de (A) KCl 0,50 mol L ⁻¹ (pH = 2,0) e (B) STF 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,4), após saturação com N ₂ ([O ₂] ~ 0,0 mmol L ⁻¹), Ar _{atmosférico} ([O ₂] = 0,25 mmol L ⁻¹) e O ₂ ([O ₂] = 1,25 mmol L ⁻¹). T = 25°. C) Modelo de circuito equivalente para o filme de poli(azo-BBY)-rGO em potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS.....	80
Figura 30 - Espectros do plano complexo de BODE do filme de poli(azo-BBY)-rGO sobre potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) em solução de (A) KCl 0,50 mol L ⁻¹ (pH = 2,0) e (B) STF 0,05 mol L ⁻¹ (pH = 7,4), após saturação dos gases N ₂ , Ar _{atmosférico} e O ₂ . T = 25°.....	82
Figura 31 – Espectro do plano complexo de Nyquist para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em solução de STF 0,05 mol L ⁻¹ na ausência (A) e presença (B) de O ₂ (1,25 mmol L ⁻¹). T = 25°C.	83
Figura 32 - Espectro do plano complexo de BODE para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em solução de STF 0,05 mol L ⁻¹ na ausência (A) e na presença (B) de O ₂ (1,25 mmol L ⁻¹). T= 25°C.	85
Figura 33 – Gráfico de BODE para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em solução STF 0,05 mol L ⁻¹ saturada com os gases N ₂ e O ₂ . Potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS. T = 25°C.	86
Figura 34 – Gráficos da dependência das resistências de transferência de carga (R _{sol/rGO} e R _{rGO/pBBY}) (A) e dos elementos de fase constante (CPE _{dc} e CPE _{filme}) (B) em função do valor de pH da solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de oxigênio dissolvido. A Barra de erro é referente ao desvio padrão calculado para 3 medidas realizadas com o mesmo sensor.	89
Figura 35 – Representação esquemática do efeito da variação do pH sobre R _{rGO/pBBY}	90
Figura 36 – Variação do valor de impedância real na frequência aplicada de 0,10 Hz do filme de poli(azo-BBY)-rGO em diferentes valores de pH da	

solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de oxigênio dissolvido.	91
Figura 37 – Espectro do plano complexo de BODE (Z' vs. log(frequência)) para a resposta do filme de poli(azo-BBY)-rGO frente a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em solução de STF 0,05 mol L ⁻¹ aplicando potencial de -0,30 V (vs. ECS).	93
Figura 38 – (A) Curvas analíticas do sensor de poli(azo-BBY)-rGO construídas a partir de diferentes valores de frequência. (B) Gráfico da dependência da sensibilidade do sensor em função da frequência de perturbação senoidal aplicada.	94
Figura 39 – (A) Gráfico da dependência da impedância real (Z') em função do potencial aplicado do sensor quimioresistor de poli(azo-BBY)-rGO em solução de STF 0,05 mol L ⁻¹ na presença dos gases N ₂ e O ₂ ([O ₂] = 1,25 mmol L ⁻¹). (B) Gráfico da dependência da diferença de Z' obtido para as medidas em N ₂ saturado e O ₂ saturado.....	95
Figura 40 – Curvas de calibração para o sensor quimioresistor poli(azo-BBY)-rGO construídas através da aplicação de diferentes potenciais aplicado.	96
Figura 41 - Resposta cronoimpedimétrica do sensor quimioresistor de poli(azo-BBY)-rGO em solução de 0,05 mol L ⁻¹ STF com frequência fixa de 0,10 Hz e potencial aplicado de -0,30 V (vs. SCE) frente a diferentes concentrações de O ₂ dissolvido (A). Curva de calibração para o sensor chemiresistor (B). A barra de erro foi calculada a partir do desvio padrão de 3 medidas utilizando o mesmo sensor. Temp. 25°C.....	97
Figura 42 – A) Resposta cronoimpedimétrica do sensor quimioresistor de poli(azo-BBY)-rGO para a adição de alíquotas de interferentes em solução de respiração mitocondrial contendo 1,0 mmol L ⁻¹ de oxigênio dissolvido com potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) e frequência aplicada de 0,10 Hz. B) Resposta relativa do sensor quimioresistor frente aos interferentes.	99

Figura 43 - Curva do protocolo de titulação para monitoramento do consume de oxigênio mitocondrial (linha vermelha, eixo vermelho y) sobre o tempo (minutos). A concentração de oxigênio foi calculada a partir da curva de calibração para os valores de $[O_2]_{max}$ e $[O_2]_{zero}$. Titulações de substratos mitocondriais e seu tempo de adição são mostrados com setas. Os estados de respiração são demonstrado com cores de fundo: (R) routine = azul; (L) leak = verde and (P) oxphos = amarelo. T = 37°C..... 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações dos reagentes utilizados no desenvolvimento do projeto.....	36
Tabela 2 – Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo voltamétrico em solução aquosa de KCl 0,50 mol L ⁻¹ (pH = 2,0) para os diferentes filmes sintetizados com 10 ciclos de potenciais em diferentes velocidades de varredura aplicado.	46
Tabela 3 - Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectro de Nyquist do filme de poli(azo-BBY)-rGO baseados nos modelos da Figura 13. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.....	49
Tabela 4 - Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo voltamétrico para os diferentes filmes sintetizados com diferentes números de ciclos na etapa de eletropolimerização.	54
Tabela 5 - Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist da Figura 19. Os erros apresentados para os ajustes foram menores de 2%.....	56
Tabela 6 - Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo voltamétrico para os diferentes filmes sintetizados com diferentes concentrações de óxido de grafeno na etapa de eletropolimerização.	60
Tabela 7 - Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist da Figura 15.Os erros apresentados para os ajustes foram abaixo de 4%.	62
Tabela 8 - Parâmetros do ajuste matemático do espectro de espectroscopia de impedância eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-rGO para os espectros obtidos em intervalos de 10 minutos após aplicação de potencial negativo de -0,30 V (vs. ECS). Os erros apresentados para os ajustes foram abaixo de 4%. T = 25°C.	64
Tabela 9 - Parâmetros obtidos através do Ajustes matemáticos dos espectros baseados nos modelos de circuito equivalente para os diferentes	

filmes submetidos a potencial de -0,30 e +0,30 V (vs ECS) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). Todos os erros relativos são menores de 2%.

..... 70

Tabela 10 – Valores de rugosidade e espessura para os eletrodos construídos pela aplicação de 20 ciclos de potenciais em velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. 75

Tabela 11 - Parâmetros do fitting do espectro de espectroscopia de impedância eletroquímica do quimioresistor para as soluções de KCl pH = 2.00 e STF pH = 7.40 sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido para o circuito equivalente da Figura 1.E. Os erros apresentados para o fit foram abaixo de 2%. 81

Tabela 12 - Parâmetros do ajuste matemático para o espectro de Nyquist dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em STF 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,40) na presença dos gases N₂ e O₂ (1,25 mmol L⁻¹) e seus respectivos modelos de circuito equivalentes (MCE). Os erros apresentados para os ajustes foram menores de 2%. 84

Tabela 13 - Parâmetros do ajuste matemático para o espectro de Nyquist para o filme de poli(azo-BBY)-rGO em diferentes valores de pH em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ na presença de oxigênio dissolvido (1,0 mmol L⁻¹). Os erros apresentados para os ajustes foram menores de 2%. 88

Tabela 14 - Consumo de oxigênio mitocondrial. Taxa de consume de oxigênio em diferentes estados da respiração mitocondrial. Valores representam a media para três animais de cada grupo. 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFM	Microscopia de Força Atômica
BBY	Bismarck Brown Y
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
G	Grafeno
GO	Óxido de grafeno
MCE	Modelo de circuito equivalente
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
rGO	Óxido de grafeno reduzido
STF	Solução tampão fosfato
VC	Voltametria cíclica

Sumário

1. Introdução	22
2. Revisão Bibliográfica.....	23
2.1. Quimioresistores	23
2.2. Azo-polímeros	25
2.3. Bismarck Brown Y	29
2.4. Nanocompósitos baseados em Grafeno-Polímeros Conjugados.....	30
2.5. Mitocôndria.....	33
3. Objetivo	36
4. Materiais e Métodos	36
4.1. Reagentes	36
4.1.1. Reagentes utilizados durante os estudos de formação do filme e desenvolvimento do sensor quimioresistor	36
4.2. Soluções	37
4.2.1. Solução de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO.....	37
4.2.2. Solução de Cloreto de Sódio (KCl)	37
4.2.3. Solução Tampão Fosfato (STF).....	37
4.2.4. Solução de Sulfito de Sódio (Na_2SO_3).....	38
4.2.5. Solução de Respiração Mitocondrial	38
4.3. Caracterização Morfológica	38
4.3.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura	38
4.3.2. Caracterização por Microscopia de Força Atômica.....	38
4.4. Caracterização de Espectroscopia de Ultravioleta na Região do Visível	39
4.5. Medidas Eletroquímicas	39
4.5.1. Célula Eletroquímica.....	39
4.5.2. Voltametria Cíclica.....	39

4.5.3.	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	40
4.6.	Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)	41
5.	Resultados e Discussão.....	42
5.2.	Otimização do Filme Nanocompósito de Azo-polímero/Grafeno.....	42
5.2.1.	Estudo da Influência do Óxido de Grafeno	42
5.2.2.	Variação da Velocidade de Varredura na Etapa de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO.....	45
5.2.3.	Estudo do Número de Ciclos na Etapa de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de Poli(azo-BBY)-rGO	53
5.2.4.	Estudo da Influência da Concentração da Suspensão de Óxido de Grafeno na Etapa de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de Poli(azo-BBY)-rGO.....	59
5.2.5.	Influência do Tempo de Redução das Folhas de Óxido de Grafeno Presentes no Filme Nanocompósito	63
5.2.6.	Mecanismo de Formação do Filme Nanocompósito de Poli(azo-BBY)-rGO	65
5.2.7.	Estudo Comparativo da Performances dos Eletrodos Recobertos com Filmes de FTO/rGO, FTO/poli(azo-BBY) e FTO/poli(azo-BBY)-rGO	68
5.3.	Caracterizações Espectroscópicas e morfológicas	73
5.3.1.	Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	73
5.3.2.	Caracterização Morfológica por Microscopia de Força Atômica (AFM)	.75
5.3.3.	Caracterização por Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis).....	77
5.4.	Desenvolvimento do Sensor Quimiorresistor para Oxigênio Dissolvido	79
5.4.1.	Performance do filme Nanocompósito Frente ao Oxigênio Dissolvido ..	79
5.4.2.	Estudo Comparativo do Desempenho dos Filmes de rGO, Poli(azo-BBY) e Poli(azo-BBY)-rGO Frente a Molécula de Oxigênio Dissolvido.....	83
5.4.3.	Efeito do pH sobre a Resposta Eletroquímica do filme de Poli(azo-BBY)-rGO	88

5.5.	Otimização dos parâmetros analíticos da plataforma sensorial	93
5.5.1.	Influência da frequência.....	93
5.5.2.	Influência do Potencial Aplicado.....	95
5.5.3.	Curva Analítica	97
5.5.4.	Estudo dos Interferentes.....	99
5.6.	Aplicação do Sensor Quimiorresistor	100
6.	Conclusão	103
7.	Referências Bibliográficas.....	104

1. Introdução

O avanço na investigação de sistemas biológicos está diretamente relacionado com o desenvolvimento da área de nanobiotecnologia. O uso de materiais molecularmente organizados somada às biomoléculas fazem emergir novas possibilidades para desbravar as interações e reações presentes em biosistema na compreensão das relações e interdependências das propriedades físico-químicas. Além disso, o estudo dessas interfaces permite a geração de dispositivos aplicados ao monitoramento redox em nano-célula.

Dentre os diversos materiais inorgânicos e orgânicos, os polímeros condutores (PC) destacam-se por oferecerem versatilidade e processabilidade na construção de dispositivos nanoestruturados através de diferentes técnicas, incluindo a eletropolimerização e polimerização química. Também, destacam-se por disponibilizar um ambiente propício para a imobilização de entidades biológicas, tais como, enzimas, proteínas, organelas, células, bactérias e DNA.

Tratando-se de polímeros condutores baseados em azobenzenos, há ainda a possibilidade de foto-isomerização e eletro-isomerização *cis-trans* dos grupos azo, conferindo propriedades únicas na eletrocatalise.

Diante da capacidade de polimerização e da potencialidade dos polímeros condutores a base de azobenzenos, torna-se interessante investigar os processos eletroquímicos dos eletrodos modificados com filmes poliméricos π -conjugados de Bismarck Brown Y (4,4'-[1,3-phenylenedi(E)-2,1-diazenediyl]di(1,3-benzenediamine)).

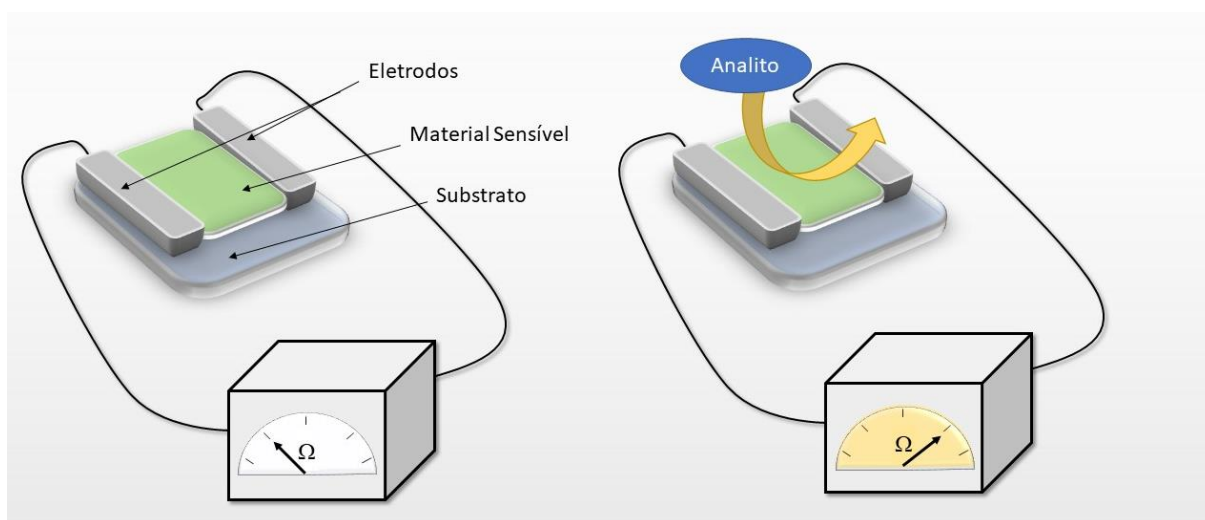
Em nosso grupo de pesquisa temos estudado a formação do poli(azo-Bismarck Y) e acreditamos que o presente projeto de pesquisa seja original e inovador na utilização das propriedades físico-químicas do polímero em estudo envolvendo organelas celulares.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Quimioresistores

Dentre as técnicas mais utilizadas na identificação e quantificação de espécies químicas nos mais diversos sistemas, os sensores eletroquímicos comumente destacam-se pela alta sensibilidade de detecção e relativo baixo custo de construção, em comparação as outras técnicas analíticas empregadas como sensores (WORDOFA et al., 2016). Dentre as classes de sensores eletroquímicos, os sensores baseados em quimioresistores são uma atraente plataforma para detecção química. O mecanismo de resposta destes sensores é baseado na mudança de resistência elétrica do material sensorial em resposta a mudança do ambiente químico (Figura 1) (LANGE; MIRSKY, 2011).

Figura 1 – Representação esquemática do funcionamento básico de um quimioresistor.



Fonte: Adaptado de (FRADEN, 2016).

A resistência característica de um sistema é dependente tanto da geometria quanto da composição do material que o constitui (HAN; VANAMO; BOBACKA, 2016; LAUREYN et al., 2001; LEI et al., 2004). Nesse sentido, os quimioresistores apresentam uma diversidade na forma e na composição dos materiais empregados para a construção dos seus dispositivos. A configuração mais simples e mais comumente utilizada é a apresentada pela Figura 1, onde tem-se o material sensível depositado em meio a dois eletrodos separados por uma distância restrita e de valor determinado (LASIA, 2014; TAN et al., 2017; WEBSTER et al., 2015a). A resistência

é obtida através da aplicação de uma corrente ou voltagem constante (CA ou CD) e medindo-se a voltagem ou corrente resultante.

Outras configurações de quimioresistores incluem a incorporação de eletrodos de referência (LASIA, 2014). Essas formas são comumente denominados de configuração de 3 e 4 terminais. As medidas com 2 terminais são utilizadas para medidas de impedancia geral, quando seus valores de magnitudes são altos o suficiente para a resistência das conexões e a resistência interna não serem significativas.

As medidas realizadas na configuração de 3 terminais são comumente utilizadas para medidas eletroquímicas em geral. Por apresentar controle sobre o potencial aplicado a célula, devido a inserção de um eletrodo de referência em sua configuração.

A configuração de 4 terminais é aplicada a estudos com supercapacitores, ultracapacitores, baterias e células a combustíveis, por ser capaz de corrigir os erros nas leituras de impedância decorrentes da resistência interna do sistema, cabos e conexões.

Quanto aos materiais, diversos estudos empregando as mais variadas classes de materiais foram utilizadas para o desenvolvimento de plataformas sensoriais baseadas no mecanismo de quimioresistor, tais como semicondutores de óxido metálico (JIANG et al., 2015), polímeros condutores (DOS REIS et al., 2010), metalopolímeros (HOLLIDAY; STANFORD; SWAGER, 2006), semicondutores orgânicos (HUANG et al., 2013), nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas (WORDOFA et al., 2016).

Alizadeh e colaboradores desenvolveram um quimioresistor para vapor de formaldeído utilizando grafeno imobilizado em poli(metil metacrilato) (PMMA) (ALIZADEH; SOLTANI, 2013). A construção do sensor se deu através da deposição de uma tinta de PMMA contendo grafeno sobre eletrodo de platina de dois terminais com distância de 0,1 mm. O mecanismo de detecção ocorre através da interação eletrostática dos oxigênios contidos no óxido de grafeno do filme de PMMA/GO com os hidrogênios contidos na molécula de formaldeído. O intervalo linear de resposta do sensor foi de 0,05 a 5 ppm e alcançou um limite de detecção de 0,01 ppm.

Tendo aplicação voltado para sistemas biológicos, Webster e colaboradores desenvolveram um quimioresistor para detecção de bactérias a partir de seus metabólitos (WEBSTER et al., 2015b). O sensor consistia de uma série de eletrodos

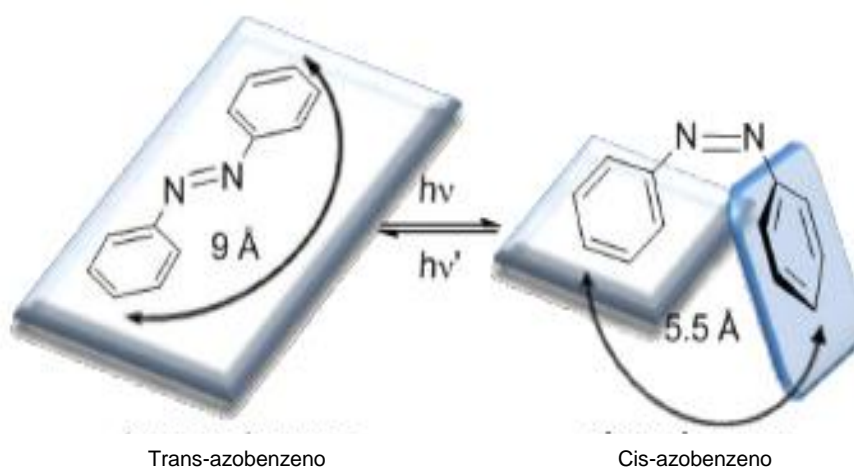
de interdigitado de ouro contendo nanopartículas de ouro funcionalizadas com diferentes espécies de moléculas contendo grupos tióis. Os estudos conduzidos demonstraram que o quimioresistor era capaz de discriminar 5 diferentes espécies bacterianas devido a padrões encontrados nas respostas do quimioresistor.

Grande parte dos sensores quimioresistores reportados na literatura são limitados para detecção de gases (RIGONI et al., 2013). Enquanto pequena parte é dedicada a aplicação em sistemas contidos em solução (COOPER et al., 2014; OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TAN et al., 2016).

2.2. Azo-polímeros

Nas últimas décadas, diversos esforços têm sido concentrados em estudos relacionados à molécula de azobenzeno e seus derivados (LANGE; MIRSKY, 2011). Os azobenzenos são moléculas contendo dois anéis benzênicos ligados por meio de um grupo azo ($N=N$) (Figura 2). Eles são altamente coloridos e compõem o grupo nomeado de corantes FD&C¹, representando a parcela de 60% da produção mundial de corantes (MERINO; RIBAGORDA, 2012).

Figura 2 – Processo de foto-isomerização do azobenzeno.



Fonte: Adaptado da referência (MERINO; RIBAGORDA, 2012).

¹ Do inglês *food, drug and cosmetics*

O grande interesse nos azobenzenos e seus derivados a nível tecnológico dar-se-á principalmente pelas suas propriedades fotocrômicas (HE; WANG; ZHOU, 2002; WANG, 2017), as quais ocorrem devido a possibilidade da geração de isômeros *cis-trans* estáveis baseados no grupo azo (-N=N-) através da incidência de uma fonte de luz. Esse fenômeno, denominado fotoisomerização, foi primeiramente estudado e publicado por G. S. Hartley em 1937 (HARTLEY, 1938).

O isômero *trans* é cerca de 12 kcal mol⁻¹ mais estável que a forma *cis* (DIAS et al., 1992; WANG, 2017), sendo essa a forma predominante em ambientes de baixa luminosidade e temperatura ambiente. Os compostos azobenzênicos são facilmente interconvertíveis em suas formas *cis* e *trans* por incidência de comprimentos de onda mais (UV próximo) e menos energéticos (região do visível), respectivamente. O tempo de fotoconversão de muitos compostos azobenzênicos são extremamente baixos, estando na casa de pico segundos. Mas o tempo de relaxação térmica da forma do isômero *cis* para *trans* pode chegar a escala de dias.

A propriedade de fácil e rápida interconversão entre duas formas isoméricas estáveis faz dos compostos azobenzênicos materiais atrativos para desenvolvimento de interruptores moleculares², os quais compõem máquinas moleculares³ (MERINO; RIBAGORDA, 2012; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). Um exemplo de aplicação de um derivado de azobenzeno como interruptor molecular foi apresentada por Trauner, Kramer e colaboradores para controle de canais de K⁺ em células neurais (BANGHART et al., 2004).

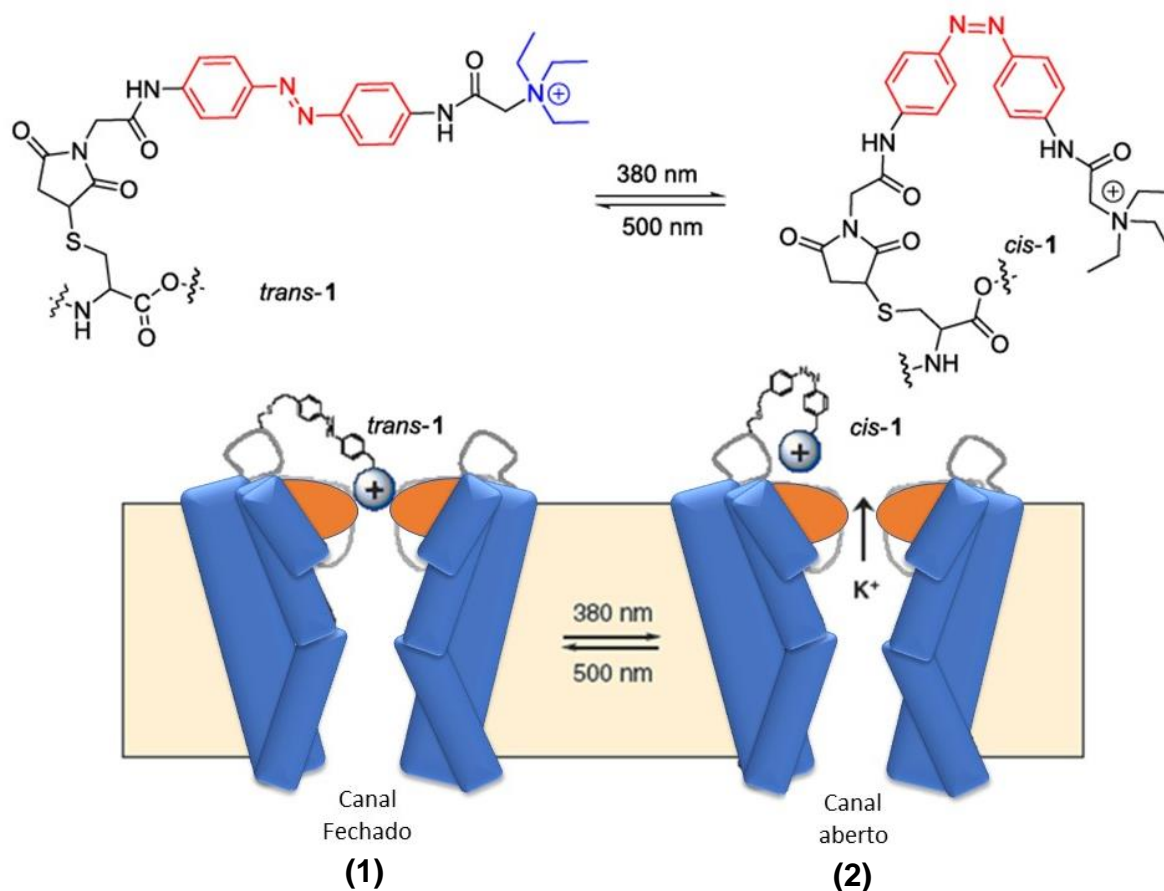
Na Figura 3 tem-se a representação esquemática adaptada do trabalho de Trauner, onde há um composto azobenzênico que contém um grupo terminal de sal de amônio quartenário, localizado ao final do canal. Em sua forma *trans*, a passagem dos íons K⁺ é bloqueada pelo grupo terminal existente no grupo azobenzeno (1). Quando irradiado por luz de comprimento de onda de 380 nm, este assume a forma *cis*, recolhendo o grupo terminal amônio, desobstruindo o canal e permitindo a passagem dos íons K⁺ (2).

Outros trabalhos são encontrados com aplicações semelhantes em sistemas biológicos, incorporando azobenzenos em uma variedade de moléculas com atividades biológicas visando o controle espacial e temporal de seus processos biológicos através da irradiação de luz.

² Do inglês *molecular switches*

³ Do inglês *molecular machine*

Figura 3 – Aplicação do mecanismo de foto-isomerização de um azocomposto para controle de abertura e fechamento de canal de transporte de íons.

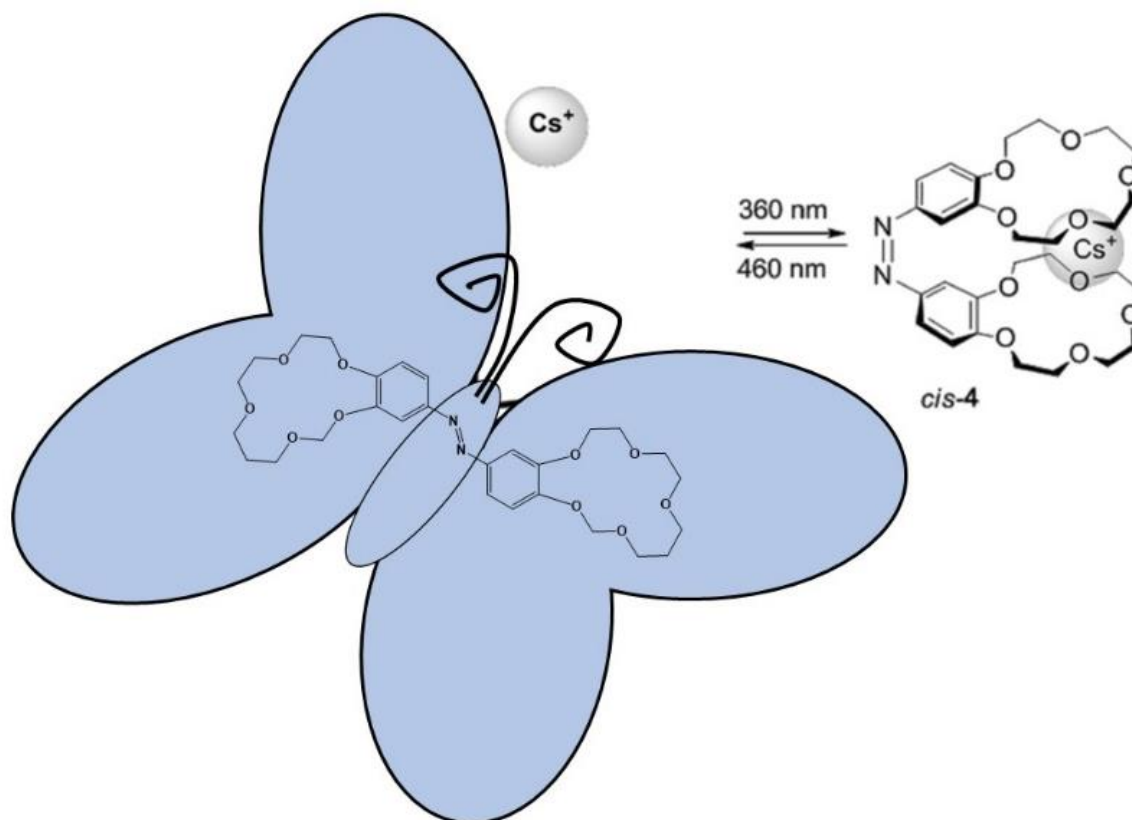


Fonte: Adaptado de (BANGHART et al., 2004).

Suas aplicações não se limitam apenas a sistemas biológicos, sendo também utilizado como dispositivos de captura seletiva de íons. A exemplo, Shinkai e colaboradores construíram um dispositivo baseado em azobenzeno para captura seletiva de íons Rb⁺ e Cs⁺ (SHINKAI et al., 1983). A estrutura molecular foi associada pelos autores como a de uma borboleta (Figura 4), onde com a irradiação de uma fonte de luz de comprimento de onda de 360 nm tem-se o fechamento de suas “asas” capturando o cátion em questão. Segundo os autores, a habilidade do composto de captura decresce com a diminuição do raio iônico do cátion (Na⁺ < K⁺ < Rb⁺ < Cs⁺).

Algumas outras aplicações dos compostos derivados de azobenzenos se estendem para células solares sensibilizadas por corantes (KAKIAGE et al., 2014; MA et al., 2015; ZHANG et al., 2013), dispositivos eletrônicos e ópticos (BANDARA; BURDETTE, 2012; WEI et al., 2015). Seu emprego também se estende para a construção de cadeias poliméricas, compondo a classe dos azo-polímeros e ampliando ainda mais suas possibilidades de aplicações tecnológicas (WANG, 2017).

Figura 4 – Mecanismo de foto-isomerização para aplicação em um sistema de captura e carregamento de íons.



Fonte: Adaptado de (SHINKAI et al., 1983).

Azo-polímero pode ser definido como uma macromolécula construída através de ligação covalente de um grande número de pequenas unidades contendo o grupo azo (N=N). Assim como os derivados de azobenzeno, os azo-polímeros são coloridos devido a capacidade de absorver luz visível do espectro eletromagnético (WANG, 2017). Com o designer adequado, alterando a extensão da cadeia polimérica, adicionando-se grupos doadores ou aceptores de elétrons, pode-se obter uma gama completa de cores espectrais com os azo-polímeros.

O grande interesse em relação aos azo-polímeros se encontra na intersecção das vantagens apresentadas pelos polímeros condutores (PC) e dos compostos azobenzênicos. Uma vez que azo-polímeros contendo cadeias π -conjugadas são os únicos polímeros condutores capazes de apresentar propriedades de fotoresposta. Assim, diversas pesquisas são voltadas para aplicação de azo-polímeros em sistemas fotoanisotrópicos, transporte de massa fotoinduzidos, Elastômeros de cristal líquido fotossensíveis, dentre outras (WANG, 2017).

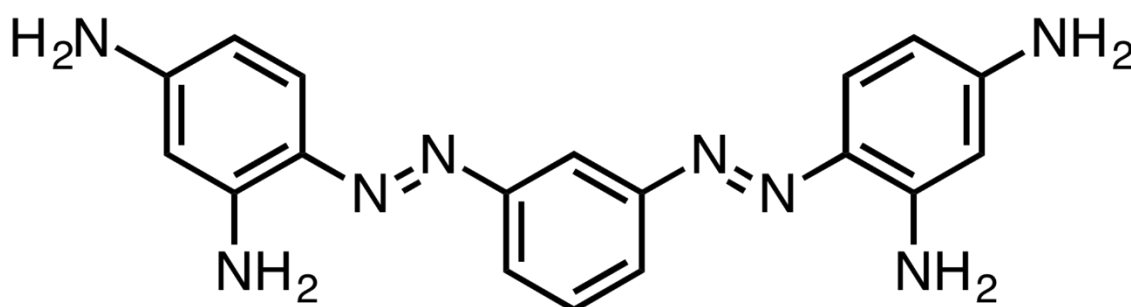
2.3. Bismarck Brown Y

O azo-corante Bismark Brown Y (4,4'-[1,3-Fenilenobis(azo)]-bis[1,3-fenildiamina] segundo a classificação da IUPAC) é um dos primeiros corantes baseados em anilina reportados na literatura, e sua síntese foi descrita pela primeira vez em 1863 por Carl Alexander Von Martius (BYERLY, 1953).

O corante Bismark Brown Y foi principalmente utilizado na coloração de tecidos, cultivo de células, cartilagens e DNA, para fins de estudos histológicos. Ainda como corante, também teve utilização no tingimento de celulose (BYERLY, 1953).

Sua estrutura química simétrica apresenta dois grupos azo (sendo classificado como um diazo) e duas aminas terminais (Figura 5), desempenhando papel fundamental para a formação do filme polimérico poli(azo-Bismark Brown Y) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

Figura 5 – Estrutura molecular do azo corante Bismark Brown Y.



Fonte: Autoria própria.

Além do mais, recentemente, em trabalhos desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores (GPES) do Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira, foram realizadas investigações das propriedades dos azopolímeros, visando sua aplicação como plataformas sensoriais (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

Durante um dos estudos (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a), foi demonstrado que é possível obter a formação do filme polimérico sobre substrato condutor de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) utilizando técnica de eletropolimerização. Através do uso da técnica de eletropolimerização, foram alteradas as características morfológicas, e conseqüentemente físico-químicas, do filme durante sua síntese através da variação do número de ciclos de potencial aplicado. Verificando uma maior incidência de espécies *cis* a partir de 90 ciclos de

potenciais. O filme formado possui extensa cadeia π -conjugada, a qual exibe alta sensibilidade a pequenas perturbações causadas sobre sua estrutura. Tais perturbações refletem nos valores de resistência de transferência eletrônica do material. Foi mostrado também que o grupo azo possui grande afinidade para o oxigênio molecular, reagindo de forma seletiva a este gás oxidante.

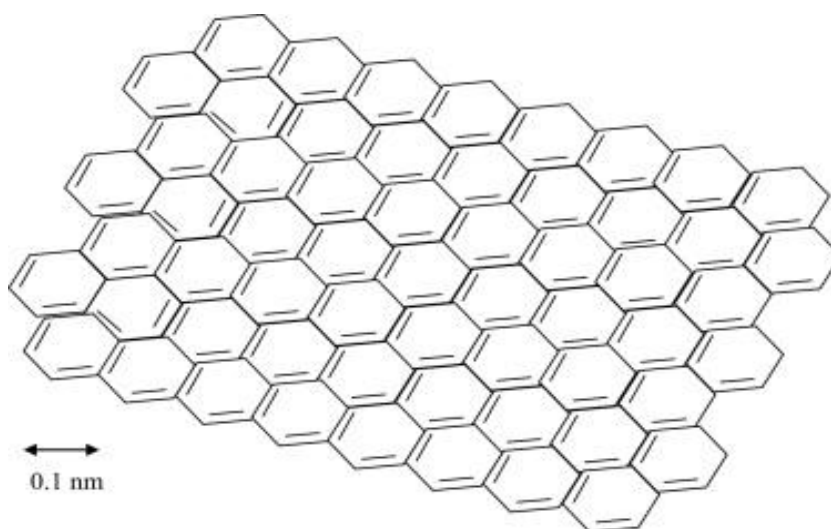
2.4. Nanocompósitos baseados em Grafeno-Polímeros Conjugados

Materiais compósitos são materiais constituídos de dois ou mais materiais visando obter vantagens das melhores propriedades e características de cada um dos seus constituintes (POTTS et al., 2011; ZHANG et al., 2015).

Com o advento das pesquisas em nanotecnologia, o estudo de materiais compósitos em escala nano se intensificou recebendo a classificação de nanocompósitos. Dentre os mais diversos materiais utilizados para formação dos nanocompósitos, aqueles os quais empregam o grafeno e seus derivados estão recebendo especial atenção em pesquisas nas mais diversas áreas devido a suas excelentes propriedades físicas e químicas (JIANG et al., 2012; SANGHAVI et al., 2014; YANG et al., 2015).

O grafeno (G) é constituído de uma única camada de átomos de carbono sp^2 , arranjados em forma hexagonal (Figura 6) (PARK; RUOFF, 2009; ZHU et al., 2010).

Figura 6 – Estrutura química do grafeno.



Fonte: Sigma Aldrich (2018).

O primeiro estudo publicado contendo a síntese e caracterização de uma monocamada de grafeno foi feita por Novoselov e colaboradores, em 2004, sendo o marco inicial do crescimento exponencial das pesquisas baseadas no grafeno (NOVOSELOV et al., 2004).

O desenvolvimento de materiais compósitos baseados em grafeno incluem a utilização de materiais inorgânicos, cristais orgânicos, estruturas organometálicas (MOFs)⁴, biomateriais e polímero (HUANG et al., 2012a) e são intensivamente explorados em aplicações como baterias (PUMERA, 2011), supercapacitores (LIU et al., 2010), células a combustível (ZHOU et al., 2014), dispositivos fotovoltaicos (LIU et al., 2008), plataformas sensoriais (HUANG et al., 2011), dentre outras.

Em especial, o desenvolvimento de compósitos baseados em grafeno-polímeros demonstra grande potencial em diversas aplicações, como eletrocatalise, carregamento de drogas⁵, supercapacitores, biossensores e materiais biomédicos (PUNETHA et al., 2017; WANG et al., 2016).

O desenvolvimento desses materiais frequentemente esbarra em dois desafios, o comportamento de dispersão e a interação interfacial entre o grafeno e o polímero, sendo esses fatores decisivos nas propriedades finais do nanocompósito grafeno-polímero.

A extensa rede π -conjugada apresentada pelo grafeno pode apresentar grande dificuldade de adesão de outras espécies em sua superfície, devido a inércia química que a mesma apresenta. Outro ponto é quanto a restrição das folhas de grafeno formar suspensões uniformes na presença de determinados solventes, levando a agregação de suas folhas. Como forma de solucionar tais problemas, a modificação do grafeno a óxido de grafeno (Figura 7) se apresenta como solução para esse viés (KIM; ABDALA; MACOSKO, 2010).

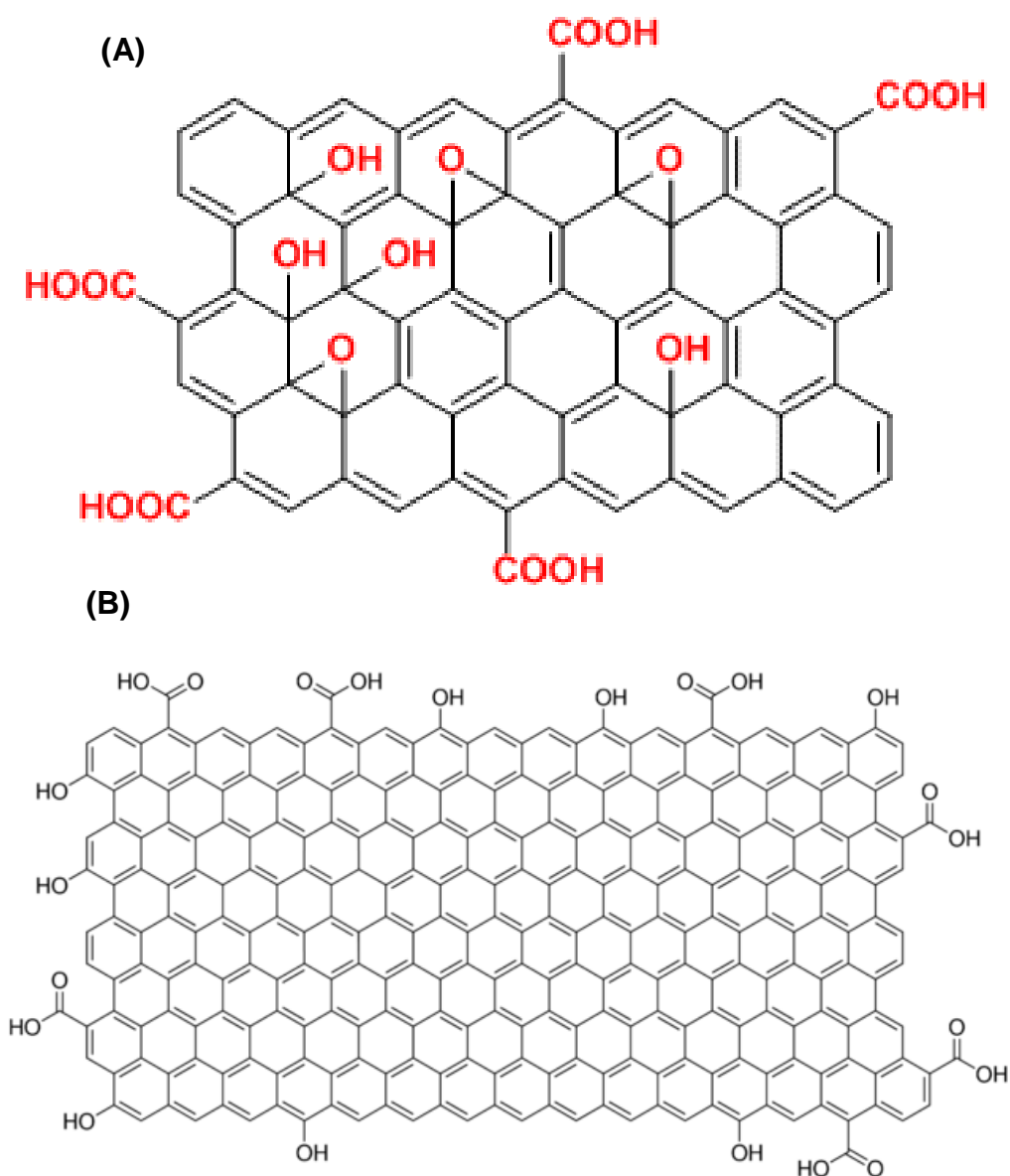
O óxido de grafeno (GO) (Figura 7A), sendo a mais importante espécie derivada do grafeno, possui em sua estrutura diversos grupos funcionais oxigenados, como hidroxila, epóxi, carbonila e carboxila (GAO, 2015). Apresentando maior reatividade e maior estabilidade em solventes polares como água devido a possibilidade de ligações de hidrogênio. A desvantagem do óxido de grafeno é quanto a sua condutividade eletrônica diminuir significativamente comparado ao grafeno.

⁴ Do inglês *Metal Organic framework*.

⁵ Do inglês *Drug Delivery*.

Contudo, o GO pode ser facilmente reduzido através de processos químicos ou eletroquímicos, gerando o óxido de grafeno reduzido (rGO), o qual retoma sua característica de elevada condutividade eletrônica (Figura 7B).

Figura 7 – Estrutura química do (A) óxido de grafeno (GO) e (B) óxido de grafeno reduzido (rGO).

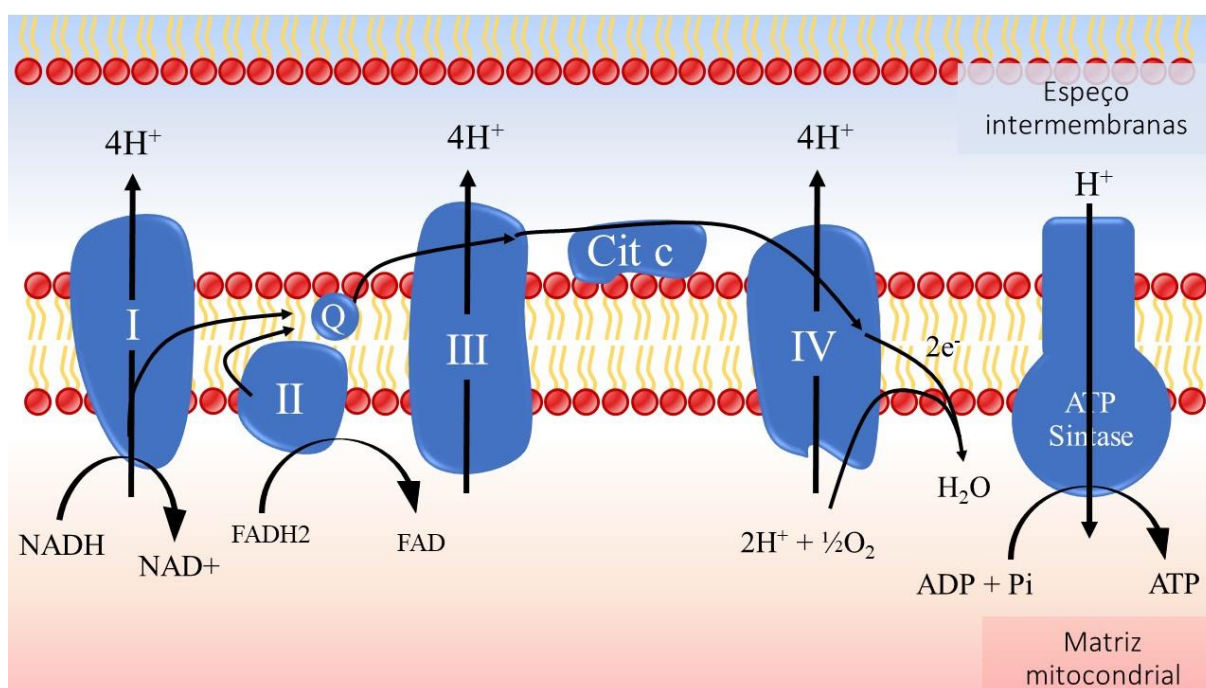


Fonte: Sigma Aldrich (2018).

2.5. Mitocôndria

Mitocôndrias são organelas encontradas em células eucarióticas e seu papel metabólico é crucial para o funcionamento celular. Sua função celular vai além da produção de energia (gerada na forma de Trifosfato de Adenosina - ATP), a mitocôndria também age na termogênese, síntese de esteroides e apoptose (SHAMSIPUR et al., 2017). A regulação do metabolismo energético pela mitocôndria é feita através da produção de ATP pela oxidação de substratos orgânicos através do ciclo de Krebs, e a maior parte da energia produzida pela mitocôndria ocorre na cadeia transportadora de elétrons. A cadeia transportadora de elétrons consiste de um sistema redox contendo quatro complexos proteicos, localizados na membrana interna da mitocôndria (Figura 8) (SCHEFFLER, 2008).

Figura 8 – Representação esquemática da membrana interna da mitocôndria contendo a cadeia respiratória mitocondrial demonstrando o mecanismo de fosforilação oxidativa.



Fonte: Adaptada de (SILVA; OLIVEIRA, 2018).

Os complexos I e II recolhem elétrons através da oxidação de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e succinato produzidos no ciclo de Krebs. Subsequentemente, os complexos transferem os elétrons adquiridos para o complexo III através da molécula de ubiquinona, uma coenzima (coenzima Q) que se locomove dentro da membrana interna. O complexo III transfere os elétrons para o complexo IV

através de uma proteína localizada na parte externa da membrana interna, chamada citocromo c. Na cadeia final, o citocromo c promove a redução do oxigênio molecular a água nesse processo. A eficiência da produção energética da mitocôndria está diretamente relacionada com a presença de oxigênio. A baixa concentração de oxigênio celular, causada por uma alteração em qualquer mecanismo de transporte de oxigênio, gera a redução da produção energética levando ao estado de hipóxia e consequente a morte celular. A insuficiência de oxigênio mitocondrial é indicio de uma alteração estrutural e funcional de células, tecidos e órgãos que estão em condições patológicas (GIROUD et al., 2013; GNAIGER et al., 1995; SONAM et al., 2017).

A imobilização de mitocôndrias em eletrodos sólidos tem se intensificado nos últimos anos (MALTZMAN; MINTEER, 2012). O principal motivo para isto é a relativa facilidade em trabalhar com esta organela, uma vez que, todas as enzimas necessárias se encontram na matriz mitocondrial. Além disso, a mitocôndria apresenta boa estabilidade físico-química comparada a maioria dos materiais biológicos empregados. Parte dos trabalhos são dedicados ao emprego da mitocôndria para o desenvolvimento de biocélulas a combustível (ARECHEDERRA; BOEHM; MINTEER, 2009; ARECHEDERRA; MINTEER, 2008; BHATNAGAR et al., 2011).

As principais vantagens das biocélulas mitocondrial são a realização da oxidação completa dos combustíveis, evitando o desperdício e gerando resíduos não tóxicos; e o tempo de vida útil ser superior em comparação as enzimáticas. Outra vantagem da mitocôndria na construção de biocélula de combustível é a alta densidade energética ($\sim 0,1 \text{ mW/cm}^2$) em relação a uma base enzimática ($\sim 0,001 \text{ mW/cm}^2$) (ARECHEDERRA; MINTEER, 2008; MOEHLENBROCK et al., 2010).

Archendera e Minteer estudaram o desempenho de um eletrodo de carbono modificado com polimetileno em interface a um filme de Nafion® contendo mitocôndrias (ARECHEDERRA; BOEHM; MINTEER, 2009). O eletrodo modificado demonstrou bons resultados de densidade energética para biocélulas, alcançando o valor de $0,203 \text{ mW/cm}^2$. O eletrodo também se mostrou eficiente quanto a completa oxidação do combustível utilizado no estudo (piruvato).

Outra parte dos trabalhos reportados na literatura é dedicada a aplicação das mitocôndrias como biosensores (DE MICHELE; CARIMI; FROMMER, 2014). Suas aplicações se mostram viáveis tanto para monitoramento de biomoléculas quanto para monitoramento ambiental, sendo reportado sensores mitocondriais para ATP

(NAKANO et al., 2011), NADH (ZHAO et al., 2011) e para espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *Reactive oxygen species*) (MARCU et al., 2012).

Em relação aos transdutores eletroquímicos, são poucos os trabalhos que reportam seu emprego. Dentre os estudos, Maltzman (MALTZMAN; MINTEER, 2012) reportou o desenvolvimento de um sensor voltamétrico baseado em eletrodo modificado com mitocôndria como sensor para pesticida, tendo alcançado valores de limite de detecção de 3 ppb. Girouse utilizando um eletrodo de pasta de carbono contendo a organela, estudou sua aplicação como sensor eletroquímico para ácido glutâmico em amostras de frango (GIROUSI et al., 2001).

3. Objetivo

O principal objetivo do presente trabalho de pesquisa é o desenvolvimento de um sensor quimiorresistor para oxigênio baseado em filme nanocompósito de poli(azo-Bismark Brown Y)-rGO e seu emprego no monitoramento do consumo de oxigênio mitocondrial em tecido extraído do músculo esquelético de ratos fumantes passivos após exercício físico e em ratos controles.

4. Materiais e Métodos

4.1. Reagentes

4.1.1. Reagentes utilizados durante os estudos de formação do filme e desenvolvimento do sensor quimiorresistor

Os reagentes utilizados durante os estudos de otimização do filme nanocompósito são reagentes comerciais de alta pureza, discriminados através da Tabela 1.

Tabela 1 - Especificações dos reagentes utilizados no desenvolvimento do projeto.

Reagente	Formula/Sigla	Marca	Pureza
4,4'-[1,3-Fenilenobis(azo)]-bis[1,3-fenildiamina] (Bismarck Brown Y)	BBY	Sigma-Aldrich	99%
Óxido de Grafeno	GO	Sigma-Aldrich	99%
Ácido Clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich	ACS
Cloreto de Potássio	KCl	Synth	99%
Dihidrogenofosfato de Sódio	NaH ₂ PO ₄	Merck	99%
Hidrogenofosfato Dissódico	Na ₂ HPO ₄	Merck	99%
Hidróxido de Potássio	KOH	Vetec	98%
Sulfito de Sódio	Na ₂ SO ₃	Sigma-Aldrich	99%
Gás Oxigênio	O ₂	White Martins	99,9%
Gás Nitrogênio	N ₂	White Martins	99,8%

4.2. Soluções

4.2.1. Solução de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO

A solução para a formação do filme nanocompósito foi preparada baseada no trabalho de Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). Em um balão volumétrico âmbar de 25 mL, foram adicionadas alíquotas de uma suspensão de GO. Após, adicionou-se lentamente água deionizada até seu volume ocupar metade do balão volumétrico. Pesou-se 0,1050 g do monômero BBY e transferiu-se o conteúdo para o balão contendo a suspensão de óxido de grafeno diluída. Completou-se o volume do balão volumétrico e o mesmo foi levado a banho de ultrassom por 10 minutos.

4.2.2. Solução de Cloreto de Sódio (KCl)

Os estudos eletroquímicos foram conduzidos em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ pH 2,0. Esta solução apresenta o valor ideal de pH para verificação dos processos redox envolvendo o filme polimérico de Bismark Brown Y de acordo com Teixeira e colaboradores (2016). O valor de pH da solução foi pH ajustado para 2,0 com adição de HCl concentrado e seu valor sendo monitorado com o auxílio de um pHmetro (781 pH/íon Meter – Metrohm). Antes de realizar as medidas eletroquímicas a solução foi saturada com gás N₂ por um tempo mínimo de 15 minutos para retirada total do O₂ dissolvido devido o filme polimérico de Bismarck Brown Y apresentar resposta seletiva para o gás O₂.

4.2.3. Solução Tampão Fosfato (STF)

A solução STF apresenta condições que mimetizam o ambiente celular, sendo escolhida para os estudos que precederam a aplicação em amostra real. Assim, a solução de STF 0,05 mol L⁻¹ foi preparada através da adição de 10 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄, 40 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl. Seu pH foi ajustado para 7,4 utilizando soluções de HCl e NaOH concentrado com auxílio de um pHmetro (781 pH/íon Meter – Metrohm).

4.2.4. Solução de Sulfito de Sódio (Na_2SO_3)

Para a construção das curvas analítica de oxigênio dissolvido, foi utilizada a adição padrão de alíquotas de sulfito de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O preparo da solução foi realizado no dia da construção da curva analítica, a partir da dissolução de $0,252 \text{ g}$ de sulfito de sódio em 20 ml de solução de $\text{KCl } 0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ou STF $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, desaeradas através do borbulho do gás N_2 por um tempo mínimo de 15 minutos. Após a solução foi devidamente tampada e mantida sob atmosfera de N_2 durante as adições

4.2.5. Solução de Respiração Mitocondrial

A aplicabilidade do sensor foi baseada em protocolos que avaliam o desempenho das atividades mitocondriais (Gnaiger 2005; Kuznetsov et al. 2008; Li e Graham 2012). As medições do consumo de oxigênio foram feitas pela incubação do tecido em tampão de respiração mitocondrial contendo $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de EGTA, $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de MgCl_2 , 60 mmol L^{-1} de ácido lactobiônico, 20 mmol L^{-1} de taurina, 10 mmol L^{-1} de KH_2PO_4 , 20 mmol L^{-1} HEPES, $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ de D-sacarose e 1 g L^{-1} de BSA a 37°C e após, foi realizada a titulação seguindo o protocolo acima citados.

4.3. Caracterização Morfológica

4.3.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens dos eletrodos construídos foram obtidas através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Carl Zeiss modelo EVO LS15 equipado com detector de elétrons secundários (SE) em alto vácuo e temperatura constante.

4.3.2. Caracterização por Microscopia de Força Atômica

As análises topográficas dos eletrodos construídos foram realizadas por um microscópio de força atômica (AFM) da marca Nanoscope modelo IIIa1, operando no modo contato intermitente (*tapping*). A análise das imagens de AFM para obtenção dos parâmetros de rugosidade e espessura foram obtidos pelo software Gwyddion 2.51.

4.4. Caracterização de Espectroscopia de Ultravioleta na Região do Visível

A caracterização via espectroscopia de ultravioleta na região do visível (UV-Vis) foi realizada em um espectrofotômetro PerkinElmer modelo Lambda 25 de feixe duplo. O experimento foi realizado posicionando-se o eletrodo de FTO recoberto com o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO no equipamento e aplicado-se um intervalo espectral na amostra de 300 a 650 nm. O limite de 300 nm aplicado para intervalo espectral foi determinado baseando-se na faixa de absorção do eletrodo de FTO.

4.5. Medidas Eletroquímicas

4.5.1. Célula Eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, utilizando eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência, eletrodo de fio de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) como eletrodo de trabalho. Para as medidas voltamétricas, foi utilizado o potenciostato/galvanostato μ -autolab tipo III (Metrohm/Pensalab) gerenciado pelo software NOVA 2.1. Para as medidas utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica, foi utilizado o equipamento PalmSens3 conectado à célula eletroquímica convencional de três eletrodos gerenciados pelo software PSTrace 5.4.

4.5.2. Voltametria Cíclica

4.5.2.1. Eletropolimerização

Os filmes de poli(azo-BBY)-rGO foram construídos baseando-se no estudo apresentado por Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). A formação do filme nanocompósito foi feita através de técnica de eletropolimerização utilizando janela de potencial de -0,30 a +1,0 V (vs. ECS) em solução contendo o monômero Bismarck Brown Y (BBY) e óxido de grafeno (GO) em atmosfera de N₂. Após a construção dos filmes, os mesmos eram lavados em abundância com água deionizada afim de retirar possíveis monômeros adsorvidos sobre o filme

nanocompósito. Após, foram estocados em recipiente plástico com a face condutora do eletrodo para cima.

4.5.2.2. Avaliação do Desempenho Eletroquímico do Filme de Poli(azo-BBY)-rGO

As caracterizações eletroquímicas por voltametria cíclica foram conduzidas em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ em uma janela de potencial de -0,30 a +1,0 V (vs. ECS), utilizando velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ e 3 ciclos de potenciais. Apenas o terceiro ciclo foi utilizado para o estudo do desempenho eletroquímico, após confirmação da sua estabilização em comparação ao segundo ciclo de potencial.

4.5.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

4.5.3.1. Caracterizações Eletroquímicas em Soluções de KCl e STF

Para as medidas de EIE utilizando varredura de frequência, a célula eletroquímica foi introduzida em uma gaiola de Faraday devidamente aterrada. Após, aplicava-se um sinal de perturbação senoidal de 10 mV de amplitude, potencial aplicado de -0,30 V e +0,30 V (vs. ECS) em uma janela de frequência de 50 kHz a 0,1 Hz, e anotando 10 passos por dec. Os ajustes matemáticos dos modelos de circuito equivalentes utilizados para análise dos espectros foram obtidos através do software ZPlot 2.4. e EIS Spectrum Analyser. Os potenciais aplicados foram definidos através do voltamograma cíclico para avaliar o polímero em sua forma reduzida e oxidada.

4.5.3.2. Construção da Curva Analítica Utilizando Cronoimpedância

As medidas utilizando cronoimpedância foram realizadas em gaiola de Faraday devidamente aterrada aplicando frequência fixa de 0,1 Hz, sinal de perturbação senoidal de 10 mV e potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). A solução de STF 0,05 mol L⁻¹ foi saturada com o gás O₂ e após foi mantida sob atmosfera de N₂. As adições de padrão foram então realizadas com o auxílio de micropipeta Digipet®. O tempo utilizado para as adições foi em função da estabilização do sinal de impedância durante a medida. As medidas foram conduzidas sem agitação mecânica ou

magnética. As concentrações de oxigênio dissolvido foram confrontados com os obtidos através de um aparelho comercial da marca HANNA modelo HI9147.

4.5.3.3. Aplicação do Sensor Quimiorresistor em Amostra Real

As medidas de monitoramento do consumo de oxigênio em tempo real em amostra real foram realizadas em gaiola de Faraday devidamente aterrada aplicando frequência fixa de 0,1 Hz, sinal de perturbação senoidal de 10 mV e potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) em solução de respiração mitocondrial a 37°C. As taxas respiratórias de ROTINA (R), LEAK (L) e OXPHOS (P) foram calculadas pela média das três últimas medições após atingir um estado estacionário. A ROTINA foi obtida após a adição do tecido, LEAK após adição de 5 mmol L⁻¹ de piruvato, e OXPHOS após adição de 5 mmol L⁻¹ de ADP e 10 mmol L⁻¹ de succinato. Todas as medidas foram registradas a 37°C.

4.6. Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UNESP - Campus Presidente Prudente, protocolo nº 12/2017, seguindo as Diretrizes Nacionais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e as Diretrizes Nacionais de Uso Ético de Animais em Pesquisa. Os animais (ratos Wistar machos) foram divididos em 4 grupos: controle (C), exercitado (E), fumante (F) e fumante/exercitado (FE). Todos os animais foram submetidos a jejum de 6h antes da eutanásia por administração intraperitoneal de anestésico tiopental sódico (60 mg/kg de peso corporal) após a remoção do músculo esquelético gastrocnêmico. A análise das mitocôndrias funcionais foi realizada pela saponinação das fibras musculares in situ, sem o isolamento das organelas (Kuznetsov et al. 2008).

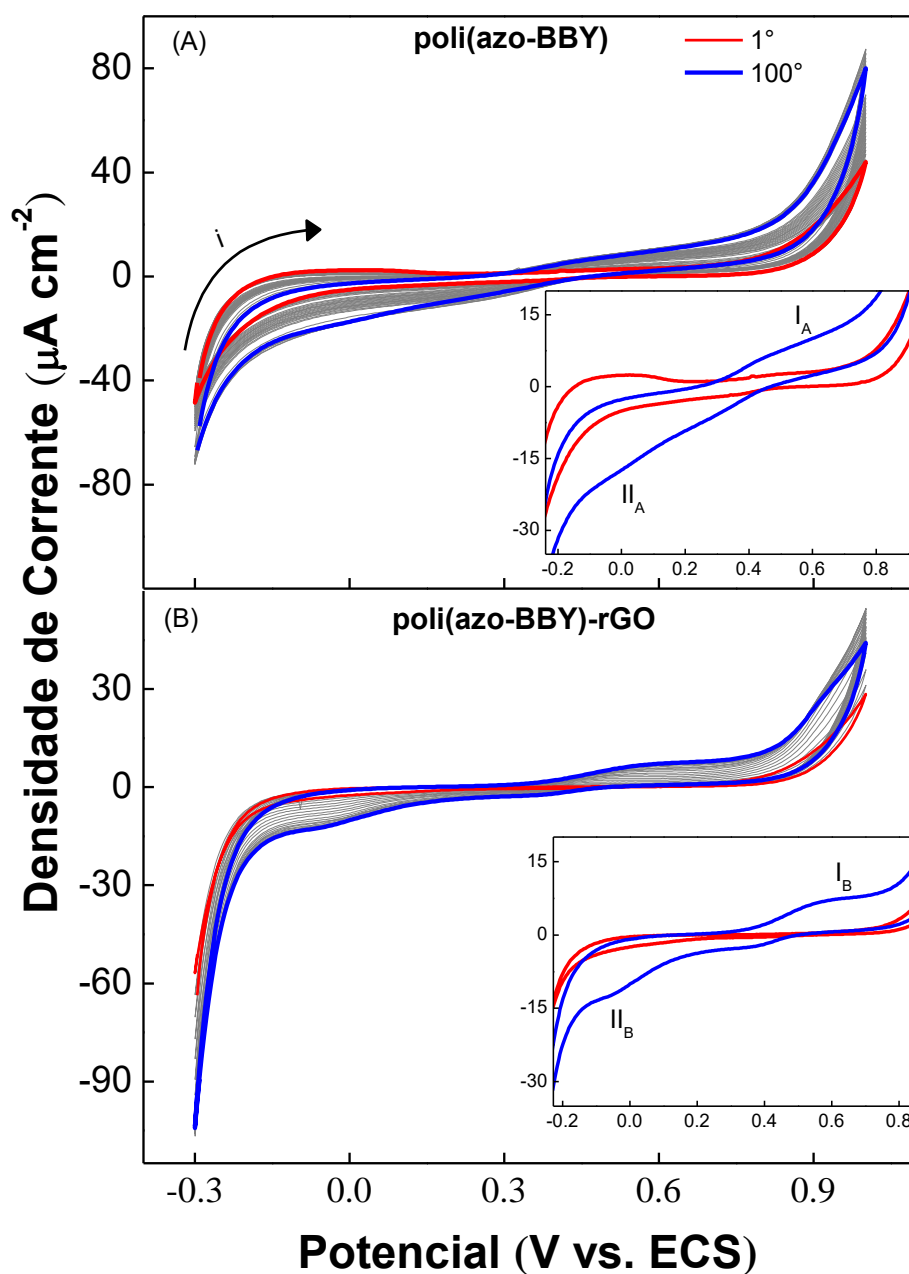
5. Resultados e Discussão

5.2. Otimização do Filme Nanocompósito de Azo-polímero/Grafeno

5.2.1. Estudo da Influência do Óxido de Grafeno

Na Figura 9 são apresentados os voltamogramas cíclicos das eletropolimerizações referentes aos filmes poliméricos formados com e sem óxido de grafeno, denominados de poli(azo-BBY)-rGO e poli(azo-BBY) respectivamente.

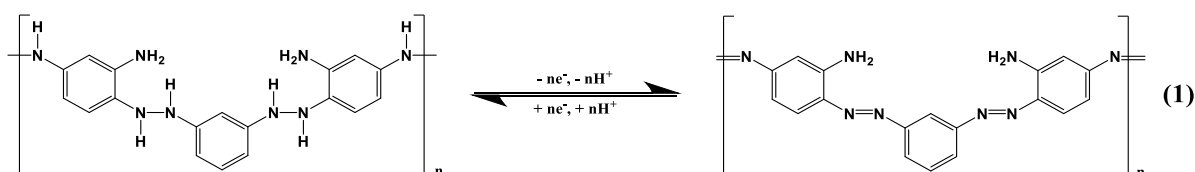
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY) (A) e poli(azo-BBY)-rGO (B) sobre eletrodo de FTO, aplicando 100 ciclos de potenciais em velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Linha vermelha = 1º ciclo e linha azul = 100º ciclo. $T = 25^\circ\text{C}$ e atmosfera de N_2 .



Os filmes foram construídos baseados nos parâmetros apresentados por Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016b), com a finalidade de verificar a influência do óxido de grafeno na etapa de eletropolimerização do filme polimérico de Bismarck Brown Y.

Analisando os voltamogramas cíclicos foi possível verificar a similaridade dos filmes quanto a forma e comportamento eletroquímico durante as sucessivas varreduras de potenciais. Foi verificado com o aumento do número de ciclos de potenciais aplicados que há um incremento da magnitude de corrente em ambos os sistemas. O comportamento de incremento dos valores de corrente é típico indicativo da formação do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo (DUBAL et al., 2012; JANATA; JOSOWICZ, 2003; SANGIORGI; SANSON, 2017; ZHANG et al., 2015). No último ciclo, verificou-se as maiores diferenças entre os dois filmes poliméricos formados. O filme de poli(azo-BBY) (Figura 9A) apresentou um pico de potencial na varredura anódica em 0,57 V vs. ECS (I_A), associado a oxidação do grupo azo presente no polímero, e um pico de potencial na varredura catódica em 0,02 V vs. ECS (II_A), associado a redução dos sítios azo do filme polimérico formado (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). Para o filme de poli(azo-BBY)-rGO (Figura 9B), esses mesmos picos foram observados mas com maior definição.

Após a formação dos filmes poliméricos por eletropolimerização, os mesmos tiveram seu comportamento eletroquímico investigado em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). Na Figura 10 notou-se que ambos os filmes apresentaram o par redox característico do filme polimérico de poli(azo-BBY) ($E_{pa} \approx 0,28$ e $E_{pc} \approx 0,16$ V vs. ECS), os quais são atribuídos para a oxidação e redução dos sítios ativos azo (Equação 1) (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

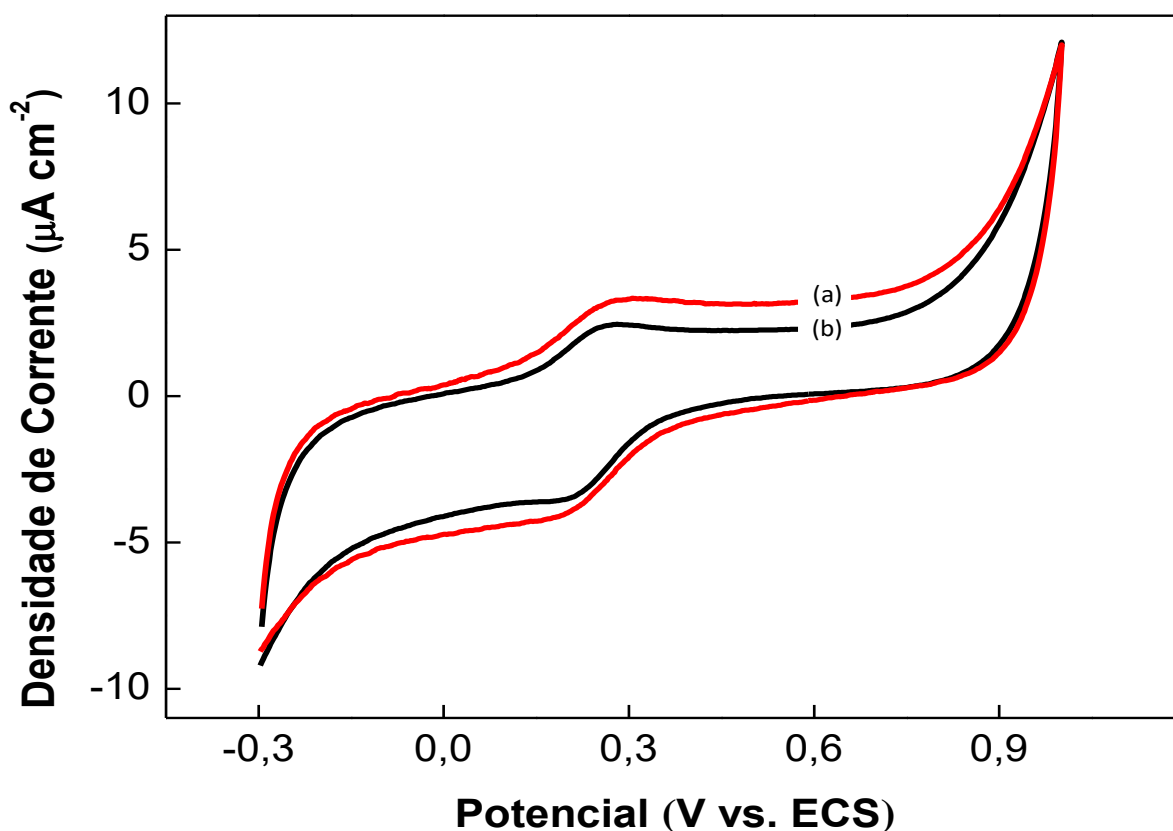


Pelo voltamograma, também foi possível observar um incremento dos valores de corrente anódica e catódica do filme de poli(azo-BBY)-rGO de aproximadamente

34% em comparação ao filme de poli(azo-BBY), revelando uma influência direta da presença do grafeno na resposta eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-rGO.

O aumento dos valores de corrente proporcional durante toda a extensão do voltamograma demonstra um aumento da contribuição da corrente capacitiva, sendo um comportamento típico encontrado em eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido (HUANG; LI; SHI, 2014; SUN; SHI, 2013).

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos para a resposta eletroquímica em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0) a 25 mV s⁻¹ dos filmes de: (a) poli(azo-BBY)-rGO e (b) poli(azo-BBY), sintetizados com 100 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. T = 25°C e atmosfera de N₂.

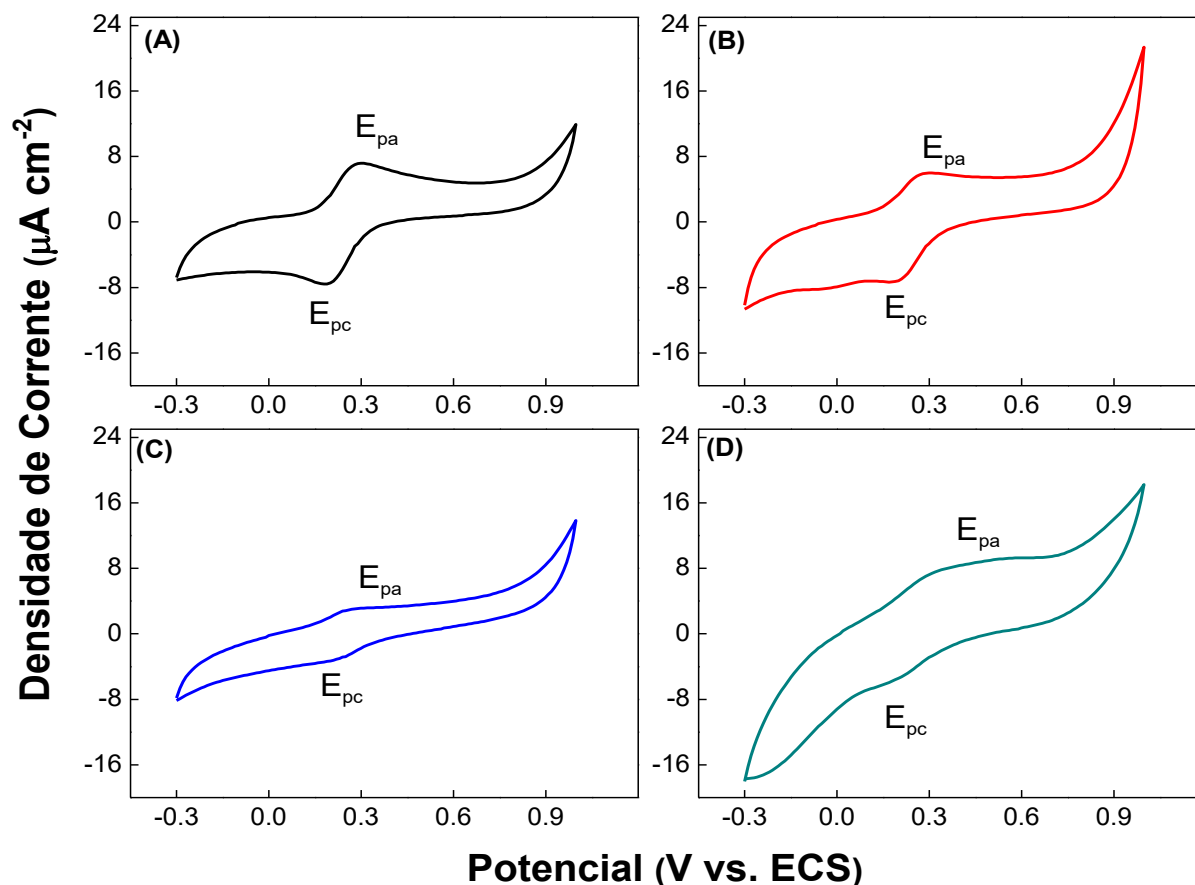


5.2.2. Variação da Velocidade de Varredura na Etapa de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO

A velocidade de varredura desempenha papel fundamental na formação dos filmes poliméricos durante a eletropolimerização. Esse parâmetro exerce influência direta nas características estruturais do filme polimérico e conseqüentemente influenciando em sua resposta eletroquímica (VOROTYNTSEV; ZINOVYEVA; KONEV, 2010).

Nesse estudo, verificou-se a melhor velocidade de varredura na etapa de eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO fabricados pela aplicação de velocidades de varredura que variaram de 10 a 100 mV s^{-1} . A resposta voltamétrica para os diferentes eletrodos sintetizados com diferentes velocidades de varredura durante a eletropolimerização foram avaliadas em solução de KCl 0,50 mol L^{-1} ($\text{pH} = 2,0$) e são apresentados na Figura 11.

Figura 11 – Respostas voltamétricas em solução de KCl 0,50 mol L^{-1} ($\text{pH} 2,0$) e atmosfera de N_2 para os filmes formados com 10 ciclos de potenciais em velocidades de 10 (A), 25 (B), 50 (C) e 100 mV s^{-1} (D). $v = 25 \text{ mVs}^{-1}$.



Verificou-se uma diminuição da definição do par redox para os filmes sintetizados com maiores velocidades de varredura. Para o filme formado com velocidade de varredura aplicada de 10 mV s^{-1} , foi observado um par redox bem definido, com magnitudes de correntes anódica e catódica equivalentes e uma diferença de potencial de pico ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) de $0,10 \text{ V}$, revelando ser um sistema reversível (BARD; FAULKNER, 2010).

Através da Tabela 2, foi verificado para o filme sintetizado a 25 mV s^{-1} , que não houve alteração no valor de variação de potencial de pico (ΔE_p), mas há uma diminuição do valor de corrente anódica. O filme de 50 mV s^{-1} apresenta a maior diminuição nos valores de corrente de pico, mas demonstra uma ligeira diminuição dos valores de ΔE_p .

O filme formado sob aplicação de 100 mV s^{-1} apresentou a maior alteração quanto a forma do voltamograma. O filme exibiu picos de potenciais com baixa resolução e um aumento no valor de diferença de potencial de pico (ΔE_p). Tal comportamento revela a necessidade de quantidades de energias maiores para se obter a oxidação e redução dos sítios ativos azo (BARD et al., 2000).

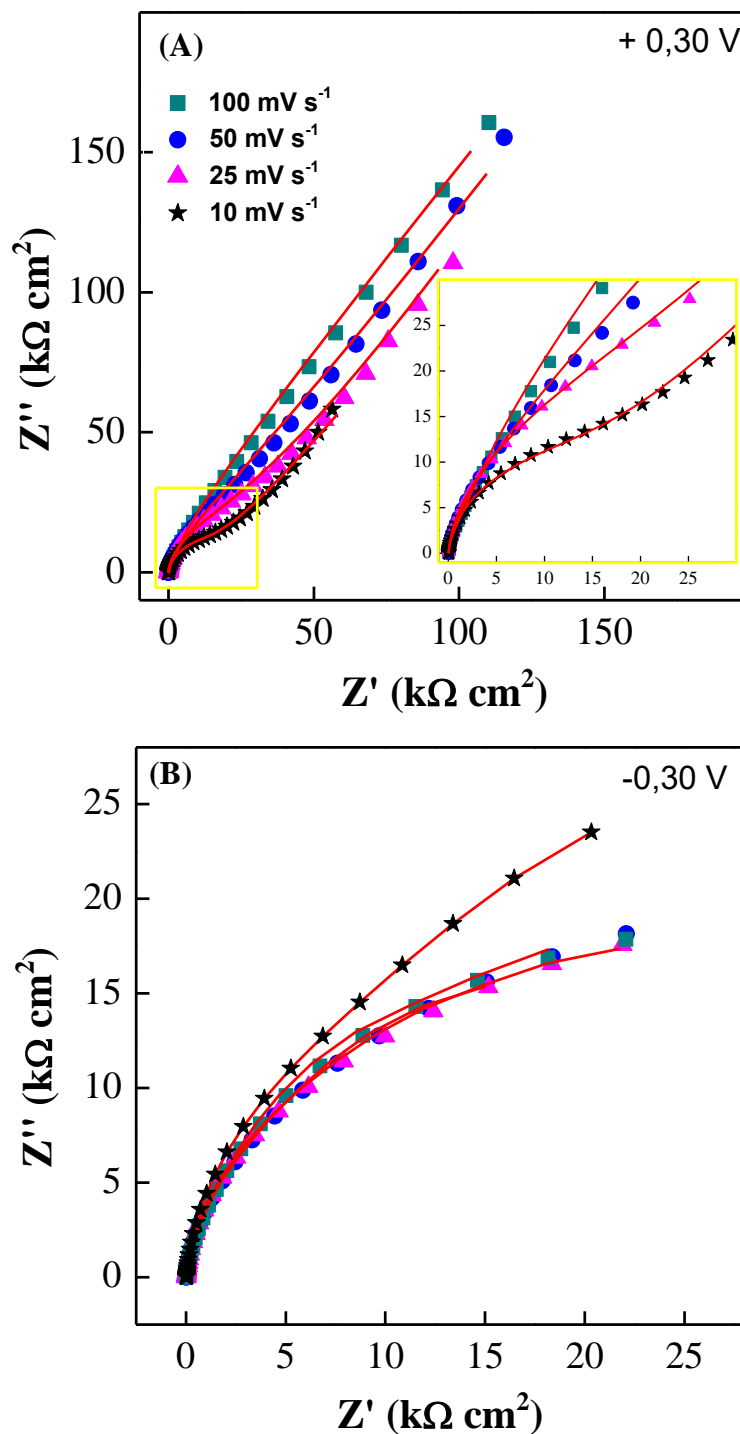
Tabela 2 – Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo voltamétrico em solução aquosa de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 2,0) para os diferentes filmes sintetizados com 10 ciclos de potenciais em diferentes velocidades de varredura aplicado.

Velocidade de Varredura na Eletropolimerização	I_{pa}	I_{pc}	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_p	Γ^6
	μA		mV			nmol cm^{-2}
10	7,36	-7,76	28	18	10	0,565
25	6,04	-7,29	28	18	10	0,099
50	2,98	-3,25	26	19	07	0,009
100	9,22	-5,90	54	17	37	0,004

Os filmes formados em diferentes velocidades de varredura foram investigados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (Figura 12). Para investigação utilizando EIE, foram aplicados potenciais de $-0,30$ e $+0,30 \text{ V}$ (vs. ECS) durante a varredura de frequências em solução aquosa de KCl $0,50 \text{ mol l}^{-1}$ (pH = 2,00).

⁶ O coeficiente de espécie ativa foi calculado baseado na relação $\Gamma = Q/nFA$ (BARD; FAULKNER, 2010). Onde Q é a carga obtida através da integral da área dos valores de corrente anódica em função do tempo de varredura com correção da linha base (C), n o número de elétrons envolvidos ($n = 2e^-$), F a constante de Faraday ($96485,3399 \text{ C mol/e}^-$) e A a área do eletrodo ($1,0 \text{ cm}^2$).

Figura 12 - Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferentes velocidades de varredura em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,00) com potencial aplicado de +0,30 V (A) e -0,30 V (B) vs. ECS. Atmosfera de N₂. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.



Os seguintes potenciais foram determinados a partir da medida de voltametria cíclica do filme nanocompósito em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH 2,0), onde os sítios

ativos azo do filme nanocompósito se encontram em sua forma reduzida (hidrazina/ $\text{NH-NH}_{-(\text{poli})}$) em potencial aplicado de $-0,30 \text{ V vs. ECS}$ e oxidada (azo/ $\text{-N=N}_{-(\text{poli})}$) em potencial aplicado de $+0,30 \text{ V vs. ECS}$.

Na Figura 12A, com potencial aplicado de $+0,30 \text{ V vs. ECS}$, foi possível verificar a presença de um semicírculo para o filme formado em velocidade de 10 mV s^{-1} , na região de controle cinético (DOMINGUEZ-BENETTON et al., 2012), e uma reta com angulação de aproximadamente 40° na região de controle de transporte de massa (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008e). Esse mesmo comportamento foi verificado para o filme construído em 25 mV s^{-1} , mas, não foi verificado para os filmes de 50 e 100 mV s^{-1} . O comportamento observado pode ser relacionado à concentração de espécies ativas apresentadas pelos filmes de poli(azo-BBY)-rGO, sendo os filmes com maiores concentrações aqueles construídos com velocidades de 10 e 25 mV s^{-1} .

Para o potencial aplicado de $-0,30 \text{ V vs. ECS}$, verificou-se similaridade no comportamento dos filmes na forma de arco (Figura 12B). Fazendo uso do modelo de circuito equivalente para melhor análise dos espectros obtidos, foram propostos dois diferentes circuitos para descrever o comportamento dos filmes poliméricos formados sob diferentes velocidades de varredura. Os valores obtidos através dos ajustes matemáticos em função dos circuitos equivalentes da Figura 13 são apresentados na Tabela 3.

Em regime de potencial aplicado de $+0,30 \text{ V (vs. ECS)}$, foi obtido um circuito contendo uma resistência da solução (R_Ω) em série com um paralelo composto por um elemento de fase constante associado a dupla camada elétrica (CPE_{dc}) e uma resistência de transferência de carga (R_{pBBY}) em série a um elemento de Warburg (W) (Figura 14A). Avaliando-se os valores R_{pBBY} , obtidos através dos ajustes matemáticos do circuito elétrico equivalente da Figura 13, verificou-se um aumento proporcional dos valores de resistência com o aumento da quantidade de matéria eletrodepositada sobre o eletrodo de FTO na formação dos filmes nanocompósito (Tabela 2). Menores velocidades de varredura oferecem um maior tempo de organização dos cátions radicais formados para compor o filme polimérico, uma vez que permanecem um tempo relativamente maior sobre a influência de um mesmo potencial, obtendo-se uma maior concentração de espécies eletroativas (Γ) depositadas sobre a superfície do eletrodo (BECK, 1988).

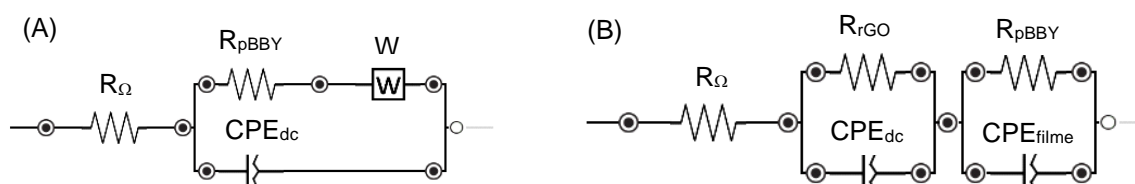
O comportamento da resistência de transferência de carga (R_{pBBY}) obtido no potencial aplicado de $+0,30 \text{ (V vs. ECS)}$ e a concentração de espécies ativas (Γ) em

função da velocidade aplicada na etapa de eletropolimerização são apresentadas através da Figura 14.

Tabela 3 - Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectro de Nyquist do filme de poli(azo-BBY)-rGO baseados nos modelos da Figura 13. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.

Filmes de poli(azo-BBY)-rGO	R_{Ω}	R_{pBBY}	R_{rGO}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{filme}	α_{filme}	Z_w
($mV s^{-1}$)	$(k\Omega cm^2)$		$(\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1})$		$(\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1})$		$(k\Omega s^{-0.5} cm^2)$	
+0,30 V (vs. ECS)								
10	0,025	13,07	--	15,8	0,978	--	--	12,81
25	0,025	18,90	--	14,0	0,939	--	--	24,00
50	0,026	29,31	--	11,1	0,932	--	--	63,51
100	0,025	47,14	--	16,0	0,902	--	--	91,75
-0,30 V (vs. ECS)								
10	0,025	53,12	11,27	55,3	0,982	41,1	0,937	--
25	0,024	30,79	7,357	47,6	0,976	44,2	0,937	--
50	0,025	29,76	4,723	39,5	0,975	49,3	0,932	--
100	0,025	32,28	1,379	33,1	0,963	87,5	0,956	--

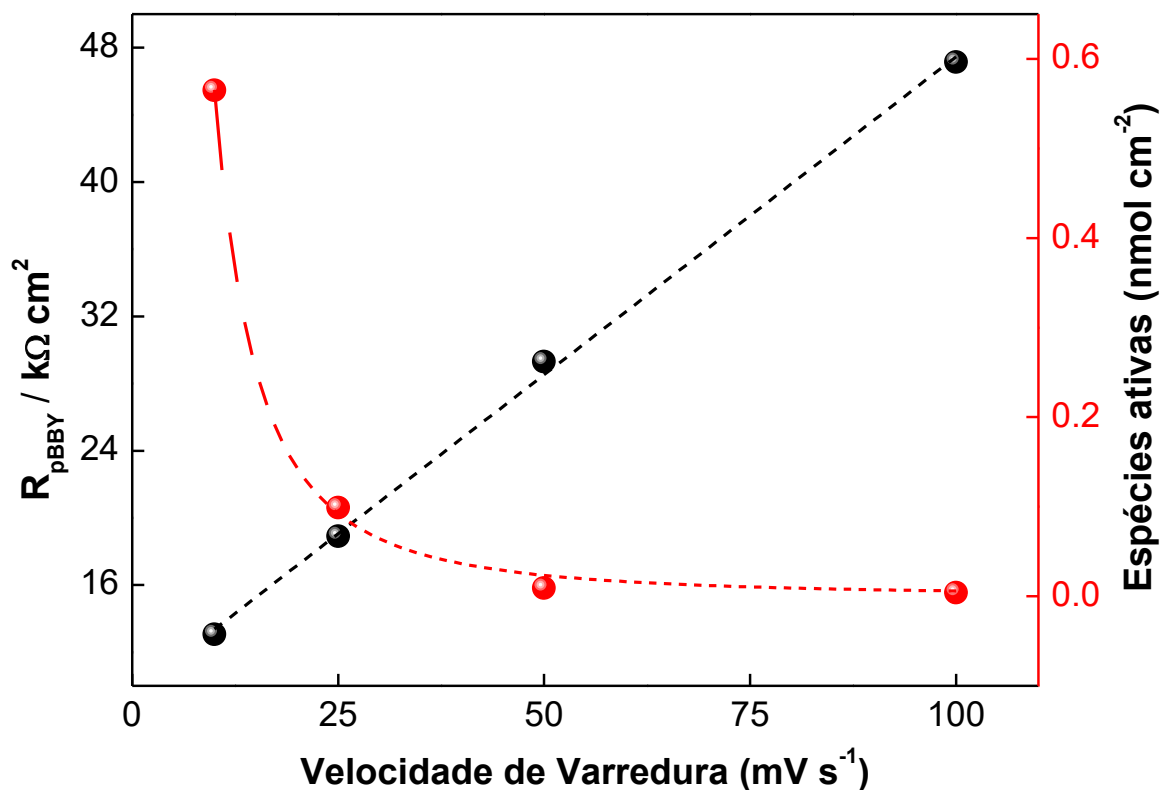
Figura 13 – Modelos de circuito equivalente propostos para os espectros de Nyquist dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO em potencial de (A) +0,30 V e (B) -0,30 V (vs. ECS).



Os valores de α podem ser utilizados como um indicativo da morfologia do filme polimérico que recobre o eletrodo de FTO (GUPTA; PRICE, 2016; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008a; YOO et al., 2014). Uma vez que alterações estruturais no filme deformam a dupla camada elétrica, resultando na diminuição do valor de α (CÖRDOBA-TORRES; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015; GUPTA; PRICE, 2016). Nesse sentido, verificou-se uma diminuição nos valores de α_{dc} a potencial aplicado de +0,30 (V vs. ECS) com o aumento da velocidade de varredura, indicando uma menor organização estrutural da dupla camada elétrica sobre os filmes formados em maiores

velocidades de varredura em comparação aos filmes formados em baixas velocidades de varredura.

Figura 14 – Dependência da resistência de transferência de carga em potencial aplicado de +0,30 V vs. ECS (eixo Y esquerdo - **preta**) e concentração de espécies ativas (eixo Y direito - **vermelha**) em função da velocidade de varredura na formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO.

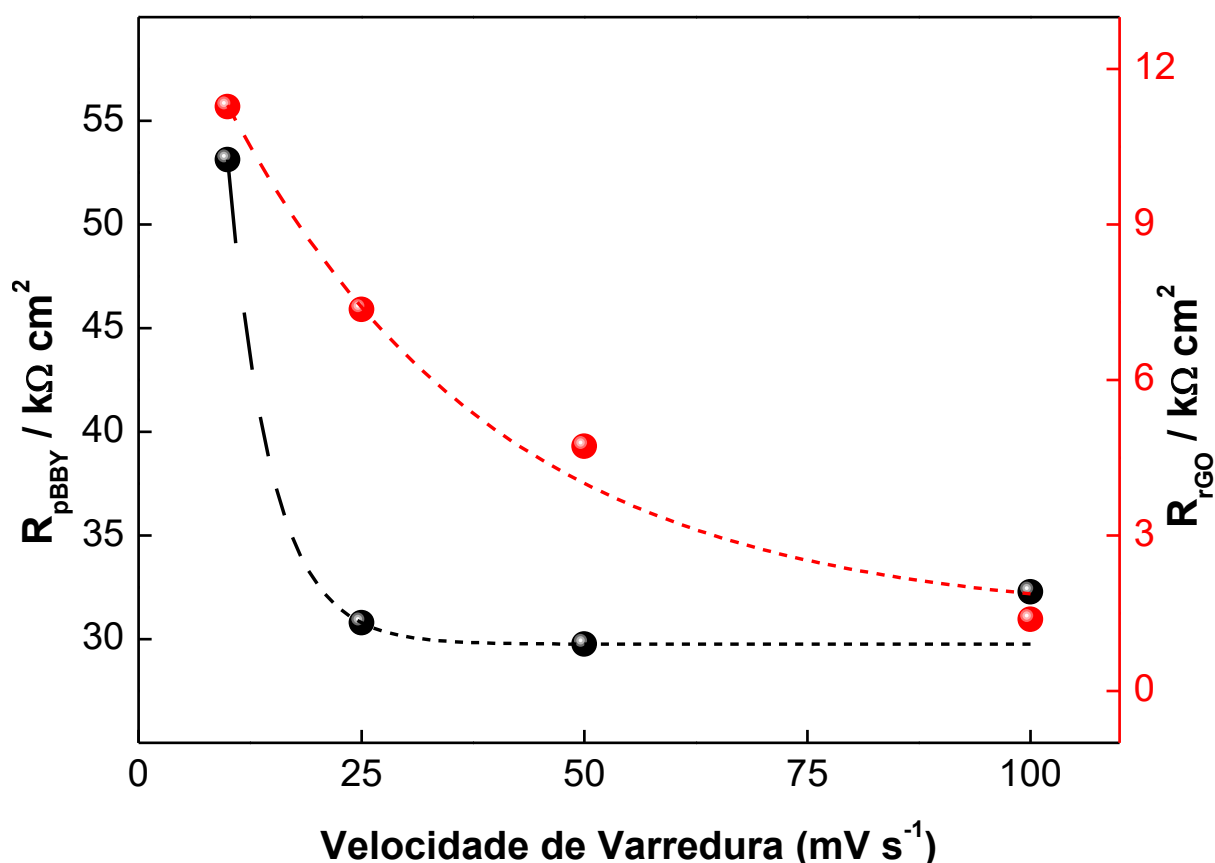


Para as medidas de EIE conduzidas em regime de potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS), foi proposto um circuito equivalente contendo uma R_{Ω} em série com dois paralelos contendo um CPE e um R_{tc} cada (Figura 13B). Sendo R_{rGO} a resistência de transferência de carga para a interface solução/camada de rGO, R_{pBBY} a resistência de transferência de carga para a interface rGO/poli(azo-BBY) e CPE_{filme} o elemento de fase constante para o comportamento capacitivo do filme. Verificou-se um comportamento de diminuição das resistências de transferência de carga, tanto R_{pBBY} quanto R_{rGO} , com o aumento da velocidade de varredura aplicada durante a formação dos filmes nanocompósitos (Figura 15). Estando em potencial aplicado com valor suficiente para provocar a redução dos sítios ativos azo para a forma hidrazina (-NH-NH-), esperou-se um aumento considerável dos valores de R_{pBBY} em comparação aos encontrados para o filme em sua forma oxidada, devido à ausência do sistema

π -conjugado do polímero nesta condição. Portanto, foram verificados maiores valores de resistência de transferência de carga (R_{pBBY}) para filmes contendo maiores concentrações de espécies ativas.

Em relação ao comportamento da R_{rGO} , foi proposto que em altas velocidades de varredura a deposição das folhas de óxido de grafeno é cineticamente desfavorecida, uma vez que com o aumento da velocidade de varredura há a diminuição do tempo em que determinado potencial é aplicado. Dessa forma, não sendo o suficiente para a eletrodeposição efetiva das folhas de óxido de grafeno sobre a superfície do eletrodo. Visto que o aumento da velocidade de varredura resultou em uma diminuição da resolução do processo redox.

Figura 15 - Dependência da resistência de transferência de carga em potencial aplicado de -0,30 (V vs ECS) em função da velocidade de varredura na formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO.



Contudo, esperava-se uma diminuição dos valores de resistência de transferência de carga associada as camadas de rGO com o aumento da quantidade de óxido de grafeno no filme nanocompósito. Mas, no ensaio, o tempo padrão utilizado

para redução das camadas de óxido de grafeno (GO) a óxido de grafeno reduzido (rGO) não foi o suficiente (10 minutos, ao invés de 50 minutos como reportado no estudo de tempo de redução da sessão 4.1.5), resultando em um aumento dos valores de R_{rGO} com o aumento da quantidade de folhas de GO no filme nanocompósito. Em estudos anteriores reportados na literatura para a eletrodeposição de folhas de óxido de grafeno sobre eletrodos utilizando voltametria cíclica, a velocidade média utilizada é aproximadamente 10 mV s^{-1} (CHEN et al., 2011a; CUI; ZHANG, 2013; HILDER et al., 2011; LIU et al., 2011; LUCCA et al., 2015; WANG et al., 2009; YANG et al., 2014).

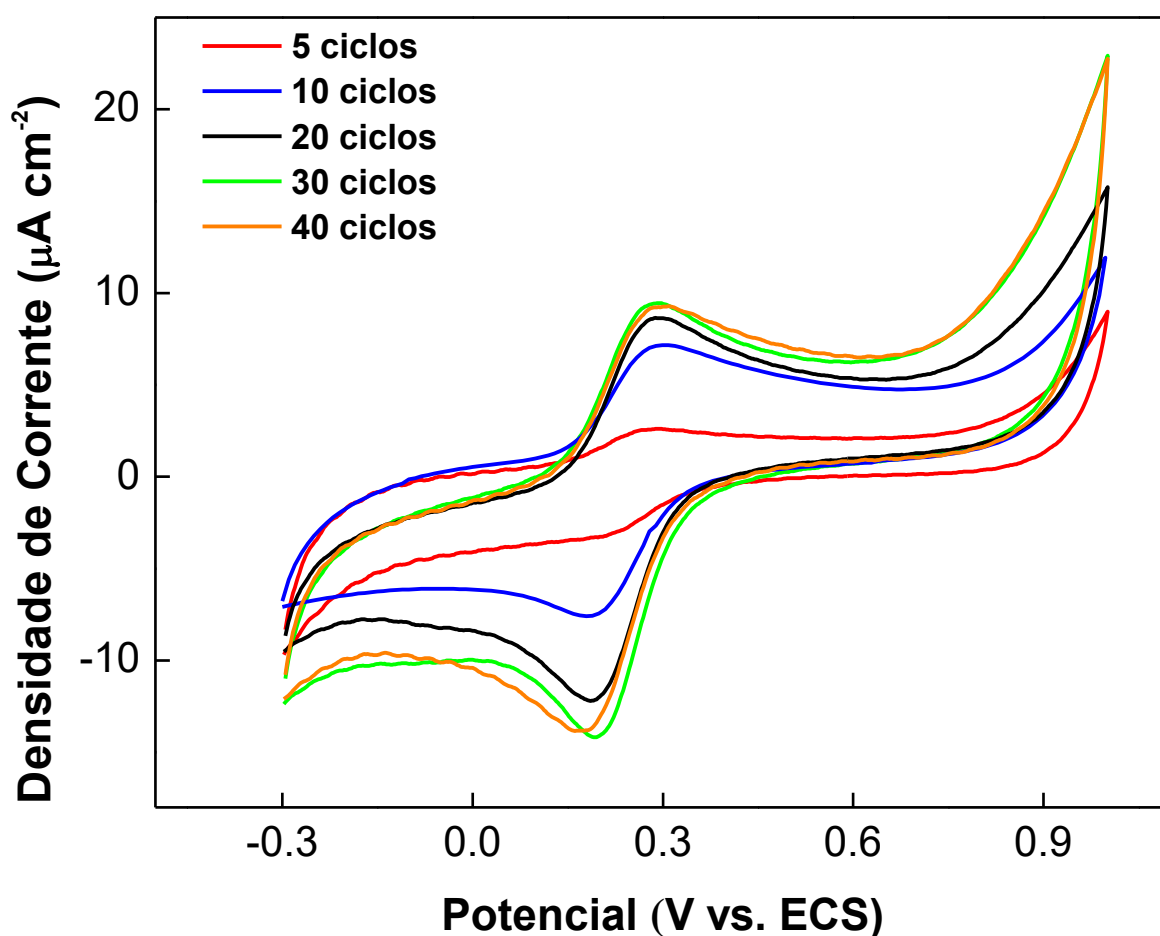
Com isso, tomou-se a velocidade de 10 mV s^{-1} como sendo a melhor velocidade de varredura para construção do filme através da técnica de eletropolimerização, por ter apresentado o melhor desempenho frente aos demais filmes poliméricos construídos.

5.2.3. Estudo do Número de Ciclos na Etapa de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de Poli(azo-BBY)-rGO

A influência do número de ciclos de potenciais aplicados também é um fator de suma importância para o desempenho eletroquímico. O número de ciclos de potenciais aplicados durante a eletropolimerização controla a quantidade de material depositado, influenciando em aspectos físico-químicos e morfológicos (SANGIORGI; SANSON, 2017; VASIL et al., 2003).

Foram investigadas as respostas eletroquímicas para filmes construídos a partir da aplicação de 5, 10, 20, 30 e 40 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} (Figura 16). O estudo se desenvolveu através de investigações dos filmes formados sobre eletrodos de FTO por técnicas de VC e EIE em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 2,0$).

Figura 16 - Voltamogramas cíclicos para os filmes formados sob diferentes ciclagens de potenciais na etapa de eletropolimerização. Solução aquosa de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ e atmosfera de N_2 . $V = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



Foi observado pelos voltamogramas cíclicos um par redox bem definido em todos os filmes preparados, com pequeno deslocamento nos valores de potencial de pico do filme de 5 ciclos para 10 ciclos. Visto também, um incremento dos valores de corrente (I_{pa} e I_{pc}) até o 30° ciclo (Tabela 4).

Observou-se, ao analisar a resposta eletroquímica dos filmes preparados com diferentes números de ciclos e apresentados na Tabela 4, valores semelhantes de potenciais de pico, tendo pequena variação dos valores de ΔE_p entre os diferentes filmes fabricados.

Tabela 4 - Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo voltamétrico para os diferentes filmes sintetizados com diferentes números de ciclos na etapa de eletropolimerização.

N° de ciclos	I_{pa}	I_{pc}	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_p	Γ nmol cm ⁻²
	μA		mV			
5	2,50	-3,30	28	20	08	0,0428
10	7,25	-7,46	29	18	11	0,219
20	8,49	-12,25	29	18	11	0,305
30	9,49	-14,24	29	18	11	0,336
40	9,35	-13,86	29	17	12	0,311

A Figura 17 apresenta os espectros de Nyquist para os filmes sobre potencial aplicado de (A) +0,30 e (B) -0,30 V (vs. ECS). Fazendo uso do modelo de circuito equivalente, foi proposto um modelo semelhante ao do estudo anterior, com alteração quanto ao elemento de Warburg, sendo substituído por um elemento de constante de fase (CPE_{filme}) (Figura 18).

Foi verificado através da análise dos valores de resistência de transferência de carga (R_{pBBY}) para os filmes em potencial aplicado de +0,30 V (vs. ECS), que houve uma diminuição dos valores de R_{pBBY} com o aumento do número de ciclos, alcançando o valor mínimo no 20° ciclo de potencial aplicado (Tabela 5).

Figura 17 - Espectro de plano complexo de Nyquist para os filmes formados sob diferentes números de ciclos de potenciais na eletropolimerização. Solução aquosa de KCl 0,50 (pH = 2,00) e atmosfera de N₂. Potencial aplicado de (A) +0,30 e (B) -0,30 V (vs. ECS). Frequência aplicada 50 kHz a 0,10 Hz.

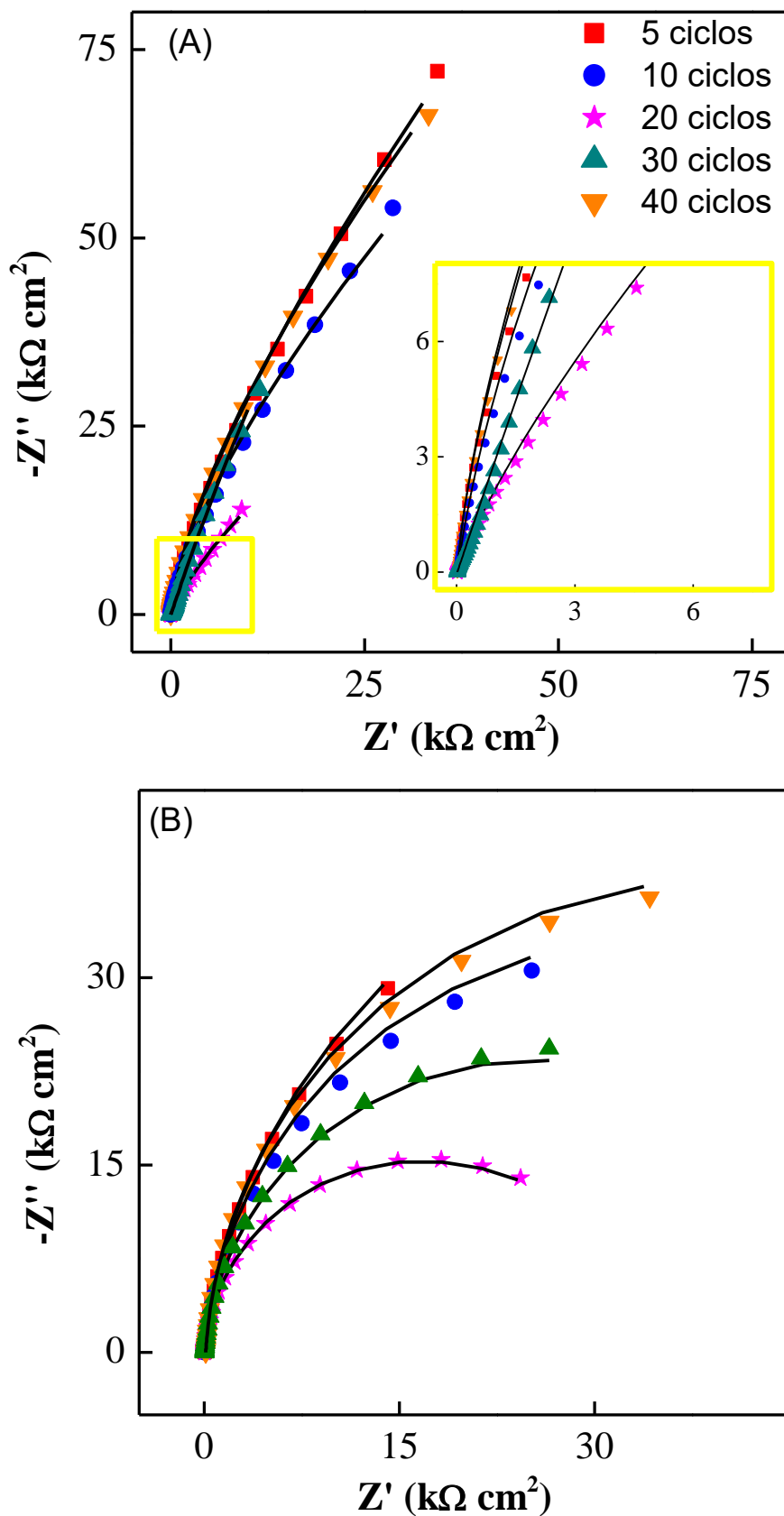


Figura 18 – Modelo de circuito equivalente para o ajuste matemático do espectro de Nyquist dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO em potencial aplicado de +0,30 V (vs. ECS).

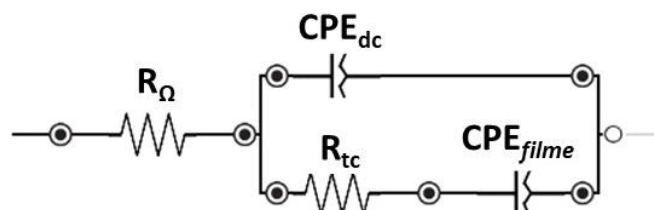


Tabela 5 - Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist da Figura 19. Os erros apresentados para os ajustes foram menores de 2%.

ciclos	R_{Ω}	R_{pBBY}	R_{rGO}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{filme}	α_{filme}
	$(k\Omega\text{ cm}^2)$			$(\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1})$		$(\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1})$	
+0,30 V (vs. ECS)							
5	0,024	6,73	-	10,5	0,978	9,62	0,497
10	0,025	1,01	-	16,8	0,919	12,0	0,423
20	0,024	0,455	-	48,8	0,978	39,9	0,415
30	0,025	0,560	-	12,2	0,972	36,7	0,747
40	0,025	2,06	-	11,0	0,978	35,2	0,470
-0,30 V (vs. ECS)							
5	0,024	88,93	1,10	41,0	0,952	389	0,899
10	0,025	71,02	3,60	30,0	0,975	212	0,771
20	0,024	31,15	8,71	61,1	0,955	500	0,803
30	0,025	50,00	9,52	28,8	0,946	410	0,792
40	0,024	82,64	9,12	22,2	0,970	401	0,797

Após, observou-se uma inversão desse comportamento, onde há um aumento dos valores de R_{pBBY} para os filmes de 30 e 40 ciclos. O aumento de R_{pBBY} para os filmes construídos com 30 e 40 ciclos pode ser relacionado ao aumento da espessura do filme polimérico e a dificuldade cinética de redução e oxidação dos grupos azo localizados nas camadas mais internas do filme nanocompósito (SHAYEH; NOROUZI; GANJALI, 2016).

Ao analisar os valores de capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) e seus respectivos valores de α_{dc} , observou-se um comportamento semelhante ao observado para R_{pBBY} , apresentando valores crescentes até o 20° ciclo, e uma diminuição de seus valores de capacitância para os filmes de 30 e 40 ciclos. Esse efeito foi verificado

por Shayeh e colaboradores (SHAYEH; NOROUZI; GANJALI, 2016) para um filme de polímero condutor baseado em PANI (polianilina), o qual foi atribuído a diminuição dos valores de capacitância em função do aumento da espessura do filme a dificuldade de difusão do contra-íon através dos poros internos do filme polimérico formado. Portanto, os filmes de poli(azo-BBY)-rGO construídos com números de ciclos superiores a 20 ciclos apresentam uma limitação cinética para a difusão dos íons em sua estrutura e conseqüente diminuição dos valores de capacitância da dupla camada (SHAYEH; NOROUZI; GANJALI, 2016; WANG, 2017). O mesmo comportamento foi observado para o elemento de capacitância do filme polimérico (CPE_{filme}).

Os valores de α_{filme} apresentam valores intermediários ($\sim 0,5$) devido a organização dessas cargas no interior do filme nanocompósito não ser uniforme ao ponto de mimetizar um capacitor ideal (CÓRDOBA-TORRES; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015; HUANG et al., 2014; LEVIN et al., 2013). Bem como, essa difusão dos íons encontrarem uma determinada resistência, e a somatória desses dois fenômenos ocorrendo de forma simultânea dão origem ao elemento Warburg (HUANG et al., 2016; LASIA, 2014). Todavia, foi verificado um comportamento intermediário entre um elemento de Warburg e um elemento de constate de fase devido ao valor de α estar abaixo de 0,5.

Os planos complexos de Nyquist, para o potencial de -0,30 V vs. ECS, foram apresentados através da Figura 17B. O comportamento dos diferentes eletrodos formados através do crescimento de filmes submetidos a diferentes ciclagens de potenciais, demonstrou comportamento semelhante aos obtidos para os filmes anteriormente apresentados com diferentes velocidades de varredura.

Utilizando o modelo de circuito equivalente para análise do espectro de plano complexo de Nyquist para os filmes em potencial negativo de -0,30 V (vs. ECS), foi proposto o mesmo modelo apresentado na análise dos filmes variando-se a velocidade de varredura (Figura 13B), contendo um R_{Ω} em série com dois paralelos contendo uma resistência de transferência de carga e um CPE cada, como observado anteriormente.

Analisando os valores de R_{GO} , foi verificado um aumento gradativo em função do aumento do número de ciclos, revelando que o aumento do número de ciclos aumenta a quantidade de camadas de óxido de grafeno no filme nanocompósito, que por sua vez, não estando em sua forma totalmente reduzida, apresenta uma maior resistência elétrica (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

Os valores de R_{pBBY} demonstraram um comportamento de diminuição de sua resistência até o 20º ciclo, seguido de um aumento do mesmo até o 40º ciclo. Contudo, era esperado um aumento gradativo da resistência de transferência referente a interface rGO/poli(azo-BBY) com o aumento do número de ciclos, ao passo que aumentaria o número de espécies hidrazina no filme polimérico.

Esse fenômeno de diminuição dos valores de resistências de transferência de carga com o aumento do número de ciclos pode estar relacionado com a presença de uma maior quantidade de óxido de grafeno. Que mesmo em sua forma oxidada, pode estar favorecendo os demais mecanismos de condução do filme nanocompósito quando em potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS.

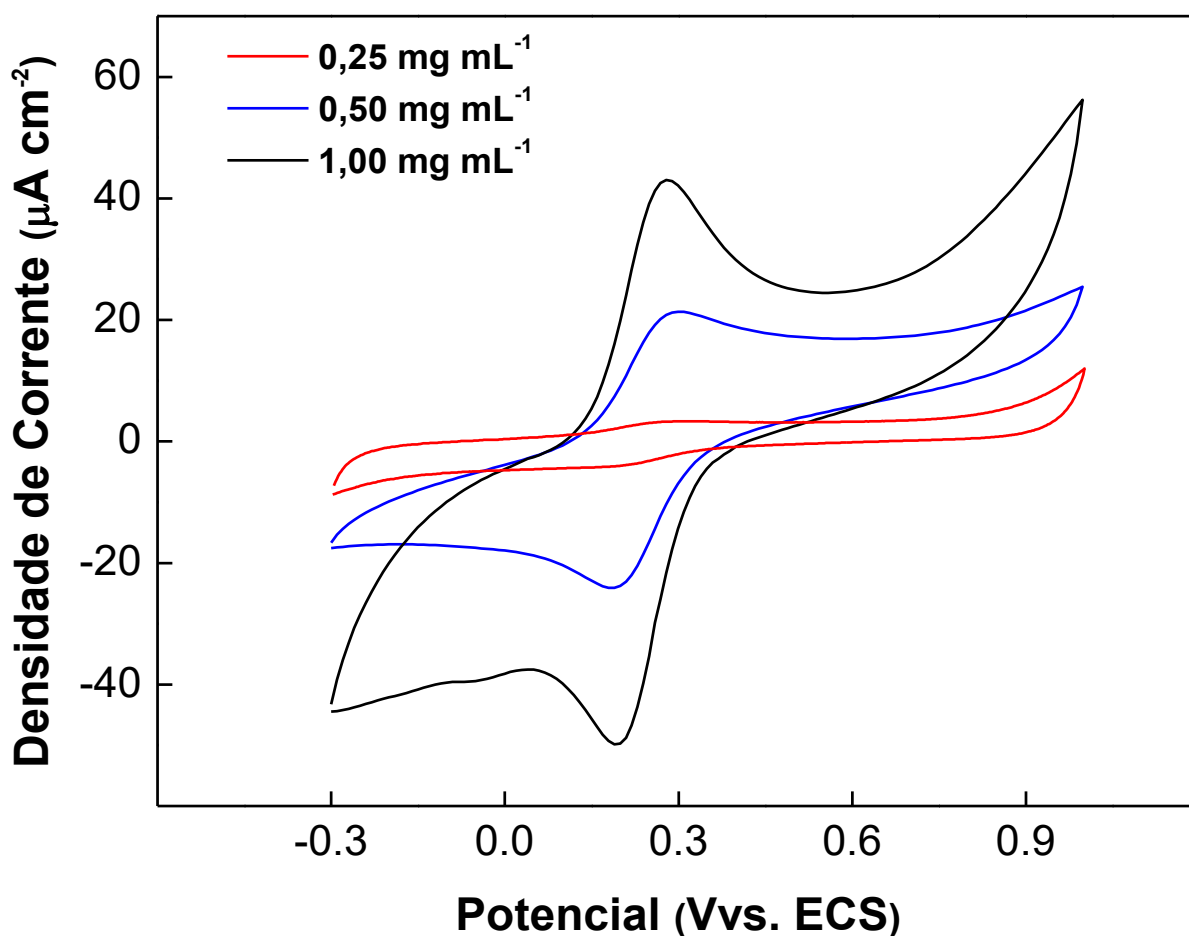
Deste modo, optou-se pelo filme de 20 ciclos para a sequência dos estudos, uma vez que o mesmo oferece respostas eletroquímicas satisfatórias tanto na análise por VC quanto por EIE.

5.2.4. Estudo da Influência da Concentração da Suspensão de Óxido de Grafeno na Etapa de Eletropolimerização do Filme Nanocompósito de Poli(azo-BBY)-rGO

A influência da concentração da suspensão de óxido de grafeno na etapa de eletropolimerização no desempenho eletroquímico do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO foi investigada através de medidas de VC e EIE em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0).

Através do voltamograma cíclico apresentado na Figura 19, foram verificados aumentos significativos nos valores de correntes de pico com o aumento da concentração de óxido de grafeno, como também o aumento na resolução dos picos de potenciais tanto anódico quanto catódico.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos para os filmes de poli(azo-BBY)-rGO formados sob diferentes concentrações de óxido de grafeno. Solução aquosa de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0) e atmosfera de N₂. V = 25 mV s⁻¹.



Os valores de corrente de pico apresentaram um aumento de aproximadamente 14 vezes para o filme formado em solução de concentração 1,0 mg mL⁻¹ de óxido de grafeno em comparação ao filme formado com concentração de 0,25 mg mL⁻¹. Valores obtidos a partir do voltamograma são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo voltamétrico para os diferentes filmes sintetizados com diferentes concentrações de óxido de grafeno na etapa de eletropolimerização.

Concentração da suspensão de GO (mg ml ⁻¹)	I_{pa}	I_{pc}	E_{pa}	E_{pc}	ΔE_p	Γ
	μA		mV			mol cm ⁻²
0,25	3,41	-3,78	26	19	07	0,0148
0,50	21,52	-23,90	29	19	10	0,820
1,00	43,38	-50,07	28	19	09	1,29

Através da investigação por EIE, em potencial aplicado de +0,30 V (vs. ECS), houve um comportamento de diminuição dos valores de impedância com o aumento da concentração de óxido de grafeno (Figura 20A), apresentando um semicírculo na região de alta frequência para as concentrações de 0,50 e 1,0 mg mL⁻¹.

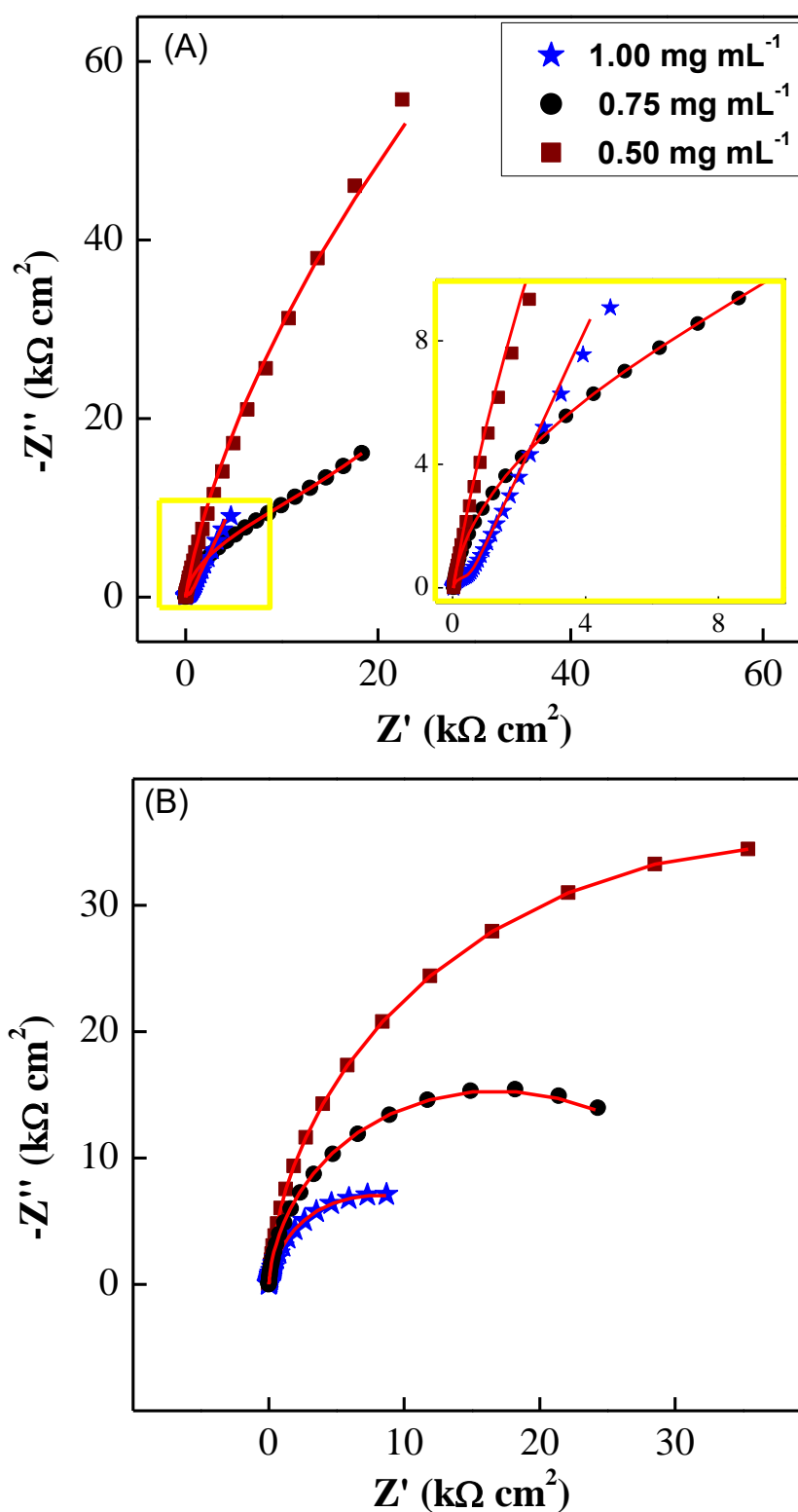
Através da análise do modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 18, em potencial aplicado de +0,30 V, foram obtidos os valores apresentados pela Tabela 7, onde verificou-se uma diminuição dos valores de R_{pBBY} proporcional ao aumento da concentração de óxido de grafeno em solução. Constatando um melhor desempenho de transferência de carga para o filme formado com 1,0 mg mL⁻¹ de óxido de grafeno.

Ainda sobre potencial aplicado de +0,30 V, verificou-se que os valores de CPE_{dc} apresentaram um aumento dos valores de capacitância com o aumento da concentração de óxido de grafeno e uma diminuição nos respectivos valores de α_{dc} , demonstrando que a morfologia do filme sofre ligeira modificação pela variação da concentração de óxido de grafeno em solução durante a etapa de eletropolimerização. Quanto ao CPE_{filme} e seu respectivo α , não foi observada variação significativa.

Para os espectros referente ao potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) (Figura 20B), foi observada uma diminuição dos valores de R_{pBBY} com o aumento da concentração do óxido de grafeno em solução de eletropolimerização. Demonstrando

que o aumento do óxido de grafeno em solução exerce influência no aumento da quantidade de folhas de óxido de grafeno eletrodepositadas no filme nanocompósito.

Figura 20 - Espectro de plano complexo de Nyquist para os filmes formados sob diferentes concentrações de óxido de grafeno. Solução aquosa de KCl 0,50 (pH = 2,00) e atmosfera de N₂. Potencial aplicado de +0,30 V (A) e -0,30 V (B).



Contudo, mesmo o filme de poli(azo-BBY) estando em sua forma reduzida, com maior resistência elétrica, há diminuição de seus valores de resistência de transferência de carga. Esse fenômeno é verificado em função da presença das folhas de óxido de grafeno favorecerem os demais mecanismos de condução eletrônica inter e intra cadeias (LI et al., 2017).

Verificou-se também uma diminuição nos valores de R_{GO} . Tendo o filme de poli(azo-BBY)-rGO construído a partir da solução contendo $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ apresentado valor de R_{GO} cerca de 500 vezes menor em comparação ao filme construído em solução contendo $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$ de óxido de grafeno.

Tabela 7 - Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist da Figura 15. Os erros apresentados para os ajustes foram abaixo de 4%.

GO (mg mL^{-1})	R_{Ω}	R_{pBBY}	R_{rGO}	CPE_{dc}	α_{dl}	CPE_{rGO}	α_{rGO}
	$(\text{k}\Omega \text{ cm}^2)$			$(\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1})$		$(\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1})$	
+0,30 V (vs. ECS)							
0,25	0,024	24,18	-	11,5	0,97	134	0,73
0,50	0,024	8,36	-	13,6	0,95	130	0,70
1,00	0,024	0,55	-	21,3	0,91	139	0,72
-0,30 V (vs. ECS)							
0,25	0,024	63,80	12,90	57,1	0,92	29,7	0,99
0,50	0,025	39,02	5,053	58,0	0,93	115	0,99
1,00	0,024	16,81	0,025	82,4	0,90	217	0,81

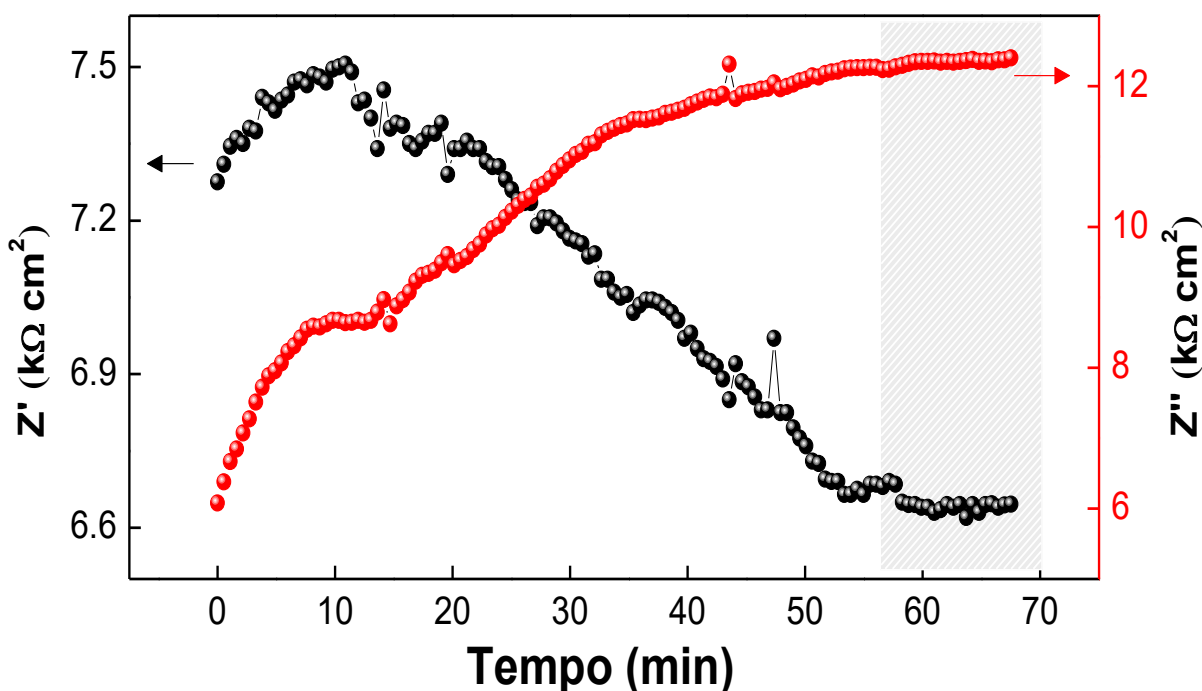
Portanto, tomou-se a concentração de $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ de óxido de grafeno como sendo o padrão para a produção do filme nanocompósito poli(azo-BBY)-rGO em suas condições otimizadas.

5.2.5. Influência do Tempo de Redução das Folhas de Óxido de Grafeno Presentes no Filme Nanocompósito

Após a inserção do óxido de grafeno na matriz polimérica formando o nanocompósito, o filme foi reduzido por processo eletroquímico, pela aplicação de potencial constante, baseado em estudos anteriores reportados na literatura (CHAUHAN et al., 2017; LIU et al., 2011; WEAVER et al., 2014; YANG et al., 2015).

O filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO foi submetido a potencial aplicado de -0,30 V (vs ECS), sendo registrado seus valores de impedância real e imaginária em função do tempo (Figura 21). Pela Figura 21, pode-se observar um aumento dos valores de impedância imaginária (Z'') em função do tempo, e uma diminuição dos valores de impedância real (Z') em função do tempo até sua estabilização, que ocorre em aproximadamente 60 minutos para a impedância real e 50 minutos para a impedância imaginária. Valores de impedância imaginária ($-Z''$) recebem maior contribuição do elemento de capacitância (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008e), demonstrando que ao ser reduzido, o óxido de grafeno intensifica sua capacidade de carregamento de carga.

Figura 21 – Valores de impedância real (Z') e impedância imaginária (Z'') em função do tempo para o filme de poli(azo-BBY)-rGO em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ pH = 2,0. Frequência fixa de 0,10 Hz e potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS. T = 25° e atmosfera de N₂.



Em contrapartida, sua forma reduzida possui maior condutividade eletrônica, o que resulta na diminuição dos valores de impedância real (Z'), uma vez que esse recebe maior contribuição do elemento de resistência (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008b).

O mesmo comportamento foi observado em um segundo estudo realizado no filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO, utilizando o modelo de circuito equivalente para análise dos espectros de Nyquist que foram registrados em intervalos de tempo de 10 minutos durante a aplicação do potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). O modelo de circuito equivalente para análise dos espectros de Nyquist foi o mesmo apresentado nos estudos anteriores em potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS, o qual é constituído por uma resistência da solução em série com dois paralelos contendo um CPE e uma resistência de transferência de carga cada. Os resultados obtidos dos ajustes matemáticos do circuito elétrico equivalente estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros do ajuste matemático do espectro de espectroscopia de impedância eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-rGO para os espectros obtidos em intervalos de 10 minutos após aplicação de potencial negativo de -0,30 V (vs. ECS). Os erros apresentados para os ajustes foram abaixo de 4%. T = 25°C.

Tempo de Redução	R_{Ω}	R_{pBBY}	R_{rGO}	CPE_{dc}	α_{dl}	CPE_{filme}	α_{filme}
min	(k Ω cm ²)			(μ F cm ⁻² s ^{α-1})	(μF cm ⁻² s ^{α-1})		
-0,30 V (vs. ECS)							
0	0,024	35,66	1,60	48,1	0,93	29,7	0,96
10	0,025	43,65	1,33	52,0	0,97	48,0	0,97
20	0,024	51,26	1,24	53,0	0,98	698	0,98
30	0,025	52,36	1,12	54,2	0,98	805	0,94
40	0,025	56,13	0,98	54,0	0,99	105	0,94
50	0,024	58,60	1,01	55,4	0,98	244	0,92
60	0,025	58,55	0,99	56,2	0,98	236	0,93
70	0,025	58,47	1,00	55,8	0,98	239	0,93

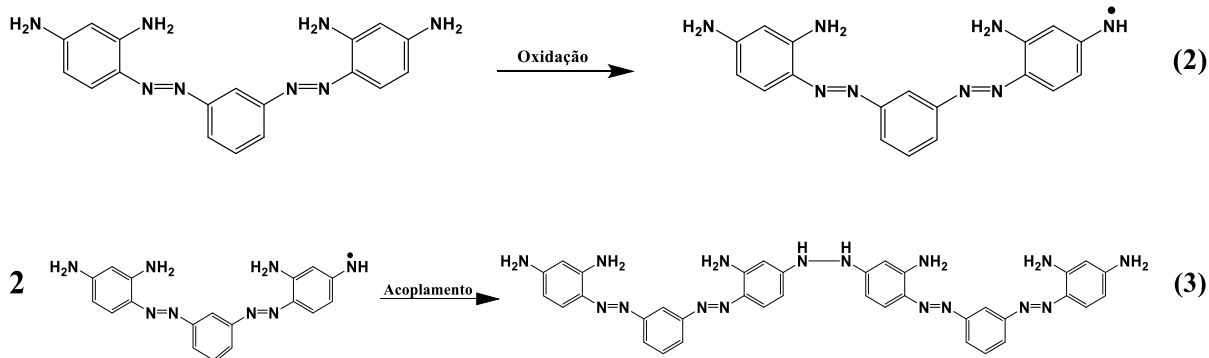
Ambas as resistências de transferência de carga, R_{pBBY} e R_{rGO} , têm seus valores estabilizados em aproximadamente 50 minutos, mas apresentam comportamentos inversos em tempos anteriores a este. Enquanto foi verificado uma

diminuição dos valores de R_{rGO} com o aumento do tempo, tem-se um aumento dos valores de R_{pBBY} no mesmo período. Tal resultado corrobora com a hipótese de redução das camadas de óxido de grafeno presentes no filme nanocompósito aplicando-se potencial negativo de -0,30 V (vs. ECS). A hipótese para o aumento observado para R_{pBBY} pode estar relacionado com a possível redução de sítios ativos azo remanescentes no interior do filme, uma vez que a forma reduzida (hidrazina) apresenta menor comunicação eletrônica devido ao sistema π -conjugado do filme de poli(azo-BBY).

5.2.6. Mecanismo de Formação do Filme Nanocompósito de Poli(azo-BBY)-rGO

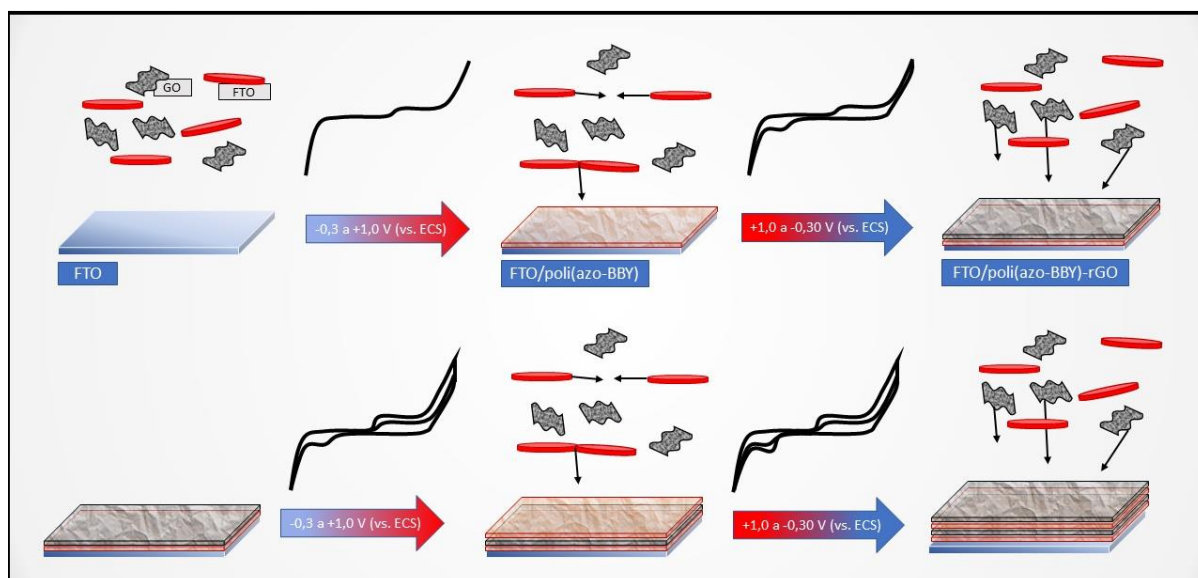
A eletroformação de filmes poliméricos baseados em azo corantes é bem difundida na literatura (BALAMURUGAN; CHEN, 2008; CIHANER; ALGI, 2009; REHAN, 2000; REVIN; JOHN, 2011; SAYYAH; EL-DEEB; ABDEL-REHIM, 2004; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). Elas se baseiam na eletrossíntese de azobenzeno, onde através da aplicação de um potencial limite superior a +1,0 V, tem-se a formação dos cátions radicais dos grupos amina, os quais reagem entre si formando uma hidrazina, que posteriormente é oxidada dando origem a ligação azo (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). A eletropolimerização do poli(azo-BBY) ocorre segundo esse mecanismo. Durante a eletrossíntese, o grupamento amina presente no monômero é oxidado formando um cátion radical e/ou um dicátion em meio ácido e a altos valores de potenciais anódicos (Equação 2). Neste estágio, os radicais formados reagem entre si (acoplamento *head-to-head*) formando uma ligação covalente entre os átomos de nitrogênio (Equação 3) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

Para o caso do monômero Bismarck Brown Y, a presença de grupos terminais amina em ambos os lados da molécula permitem a continuidade desse mecanismo de modo a formação de um filme polimérico. A cada ciclagem de potencial novos cátions radicais são gerados e mais unidades monoméricas são acopladas ao filme polimérico (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).



Para o presente trabalho, tem-se a inserção do óxido de grafeno em meio a solução de BBY durante a fase de eletropolimerização. A formação do filme compósito ocorre através de alternância das camadas poli(azo-BBY)-rGO em concordância com a alternância no sentido da varredura de potencial. Onde durante a varredura anódica tem-se a formação do filme polimérico a partir do monômero BBY por mecanismo anteriormente descrito, e durante a varredura catódica tem-se a deposição das folhas de grafeno sobre o filme de poli(azo-BBY) (Figura 22).

Figura 22 – Representação esquemática para a eletropolimerização do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO sobre eletrodo de FTO.



Fonte: Autoria própria.

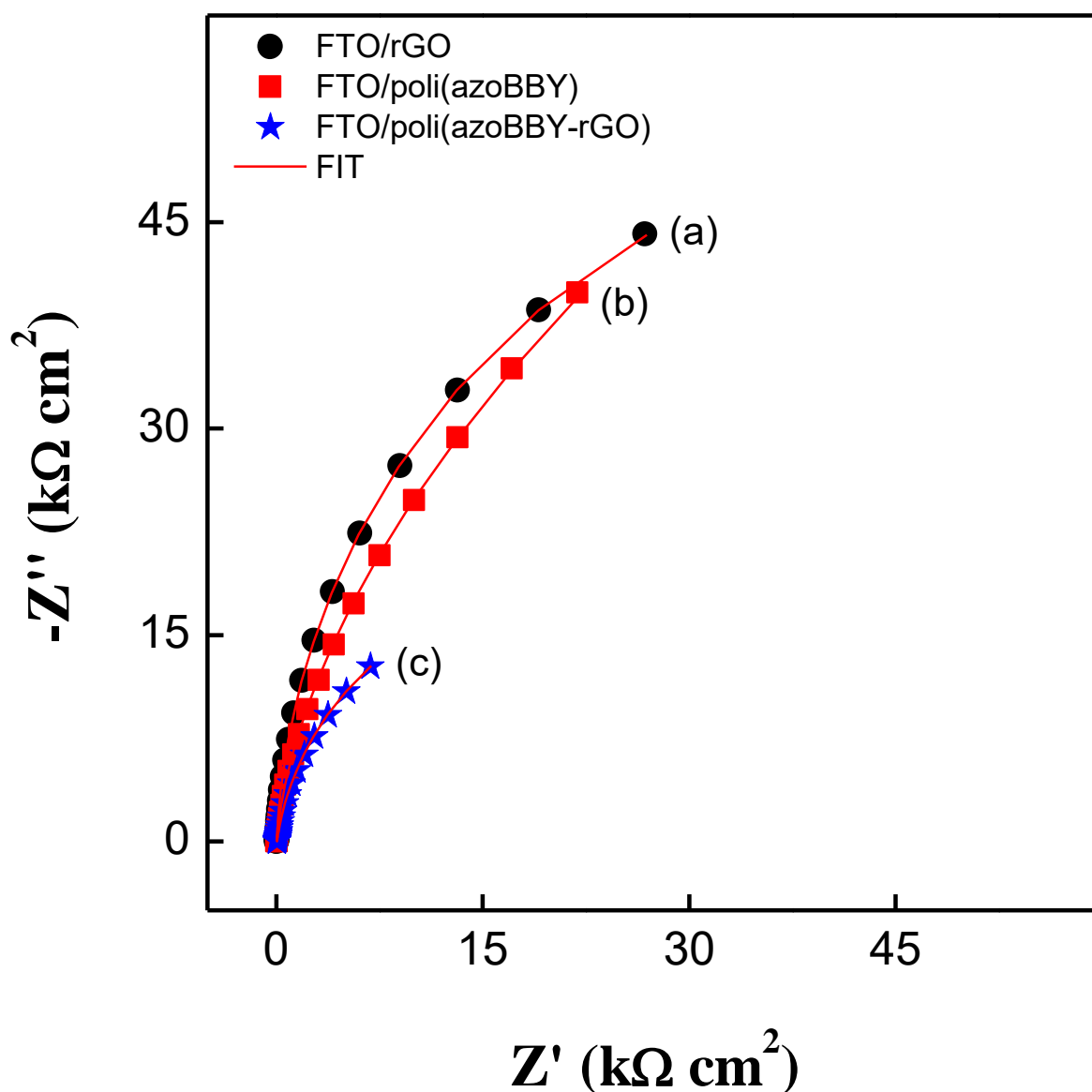
A proposta se baseia em estudos anteriores para a eletrodeposição de óxido de grafeno sobre superfícies eletródicas (CHEN et al., 2011b; CUI; ZHANG, 2013; LUCCA et al., 2015). Segundo os estudos, a deposição das folhas de óxido de grafeno

ocorre durante a varredura catódica, devido a atração eletrostática das folhas de grafeno com a superfície do eletrodo polarizado, seguida da doação de elétrons para a folha de óxido de grafeno depositada, reduzindo-a parcialmente e conseqüentemente tornando-a insolúvel em meio aquoso (CHEN et al., 2011a). Existem relatos na literatura da formação de filmes nanocompósitos utilizando solução mista de monômero e suspensão de óxido de grafeno (ALIZADEH; SOLTANI, 2013; HUANG; LI; SHI, 2014; LIM et al., 2013; SETHURAMAN et al., 2016; SUN; SHI, 2013; WANG et al., 2014; WEAVER et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

5.2.7. Estudo Comparativo da Performances dos Eletrodos Recobertos com Filmes de FTO/rGO, FTO/poli(azo-BBY) e FTO/poli(azo-BBY)-rGO

Foram realizadas as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) dos eletrodos de FTO/poli(azo-BBY)-rGO, FTO/poli(azo-BBY) e FTO/rGO. Os filmes foram submetidos a dois potenciais de polarização, +0,30 e -0,30 V (vs. ECS) (Figura 23 e 25).

Figura 23 - Plano complexo de Nyquist para os filmes de rGO (a), poli(azo-BBY) (b) e poli(azoBBY-rGO) (c) em um potencial aplicado de -0,30 V (vs ECS) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). T = 25°C e atmosfera de N₂. Os modelos de circuito equivalente para os ajustes matemáticos dos espectros são expressos na Tabela 9.



O estudo do potencial aplicado foi realizado com o objetivo de avaliar as resistências de transferência de carga do polímero, tanto para a forma reduzida dos sítios ativos azo (π -conjugação “desligada”) quanto para a forma oxidada (π -conjugação “ligada”), de menor resistência (INZELT, 2012).

Os filmes depositados em eletrodo de FTO, quando submetidos a um potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS), apresentaram três diferentes modelos de circuito elétrico equivalente (Figura 24). Todos eles têm em comum os elementos de resistência da solução (R_{Ω}) e capacitância da dupla camada elétrica (CPE_{dc}). O filme polimérico de poli(azo-BBY) apresenta um segundo elemento de capacitância, intrínseco do filme (CPE_{pBBY}) e característico de filmes de polímeros condutores, devido a difusão de íons H^+ para o interior do filme polimérico (GUPTA; PRICE, 2016).

Sabe-se, devido a inúmeros trabalhos reportados na literatura, que os filmes de óxido de grafeno reduzido podem ser utilizados como supercapacitores, devido a possibilidade de armazenamento de grandes quantidades de carga, e rápida difusão dos íons H^+ na estrutura do filme (A. BASNAYAKA et al., 2013). Para o caso do filme de grafeno, o elemento de capacitância (CPE_{filme}) aparece na interface filme rGO/FTO, revelando a alta diferença de carga gerada entre esses dois materiais.

No caso do filme nanocompósito, como discutido anteriormente, há a presença de dois paralelos contendo um elemento de resistência e um CPE cada. Sendo o elemento de resistência do primeiro paralelo associado a interface solução/rGO (R_{*tc}) em paralelo com a dupla camada elétrica. Na sequência, o elemento de capacitância intrínseco do filme (CPE_{filme}) em paralelo com a resistência de transferência de carga da interface rGO/poli(azo-BBY) (R_{tc}).

Especial atenção para os valores de R_{tc} , que compreendem a resistência da transferência de carga para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO. Pela Tabela 9 foi possível verificar que os filmes de poli(azo-BBY) e rGO apresentam maiores valores de resistência de transferência de carga, mas, essa resistência diminui substancialmente para o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO.

A resposta para esse comportamento, no caso do filme de rGO, pode estar relacionada ao potencial não ser suficientemente alto para provocar distorções na rede π -conjugada do rGO resultando em efetivos mecanismos de condução eletrônica.

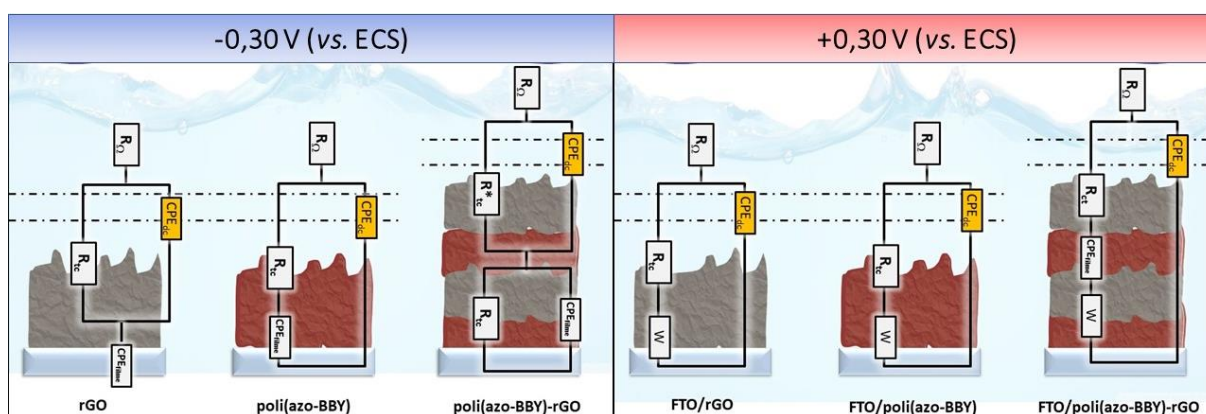
No caso do filme de poli(azoBBY), essa maior resistência era esperada, uma vez que ele se encontrava na sua forma reduzida (-NH-NH-). No caso do nanocompósito de poli(azoBBY-rGO), a estrutura formada pode estar favorecendo os

demais mecanismos de condução inter-cadeias como, *elétron hopping* (INZELT, 2012), resultando em uma comunicação eletrônica mais efetiva comparada aos filmes de poli(azo-BBY) e rGO.

Tabela 9 - Parâmetros obtidos através do Ajustes matemáticos dos espectros baseados nos modelos de circuito equivalente para os diferentes filmes submetidos a potencial de -0,30 e +0,30 V (vs ECS) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). Todos os erros relativos são menores de 2%.

Filme	R ^{*_{tc}}	R _{tc}	CPE _{dc}	α _{dc}	CPE _{filme}	α ₂	W
	(kΩ cm ²)		μF cm ⁻² s ^{α-1}		μF cm ⁻² s ^{α-1}		kΩ s ^{-0.5} cm ²
+0,30 V (vs. ECS)							
rGO	-	372,0	13,10	0,96	-	-	47,18
azoBBY	-	22,56	13,70	0,95	-	-	32,50
azoBBY-rGO	-	0,283	13,69	0,95	177,0	0,81	0,475
-0,30 V (vs. ECS)							
rGO	-	92,40	27,29	0,99	500	0,73	-
azoBBY	-	48,40	23,87	0,95	18,3	0,39	-
azoBBY-rGO	0,02	41,60	93,74	0,90	486	0,69	-

Figura 24 – Representação esquemática dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO e seus respectivos modelos de circuito equivalente em diferentes potenciais aplicados.

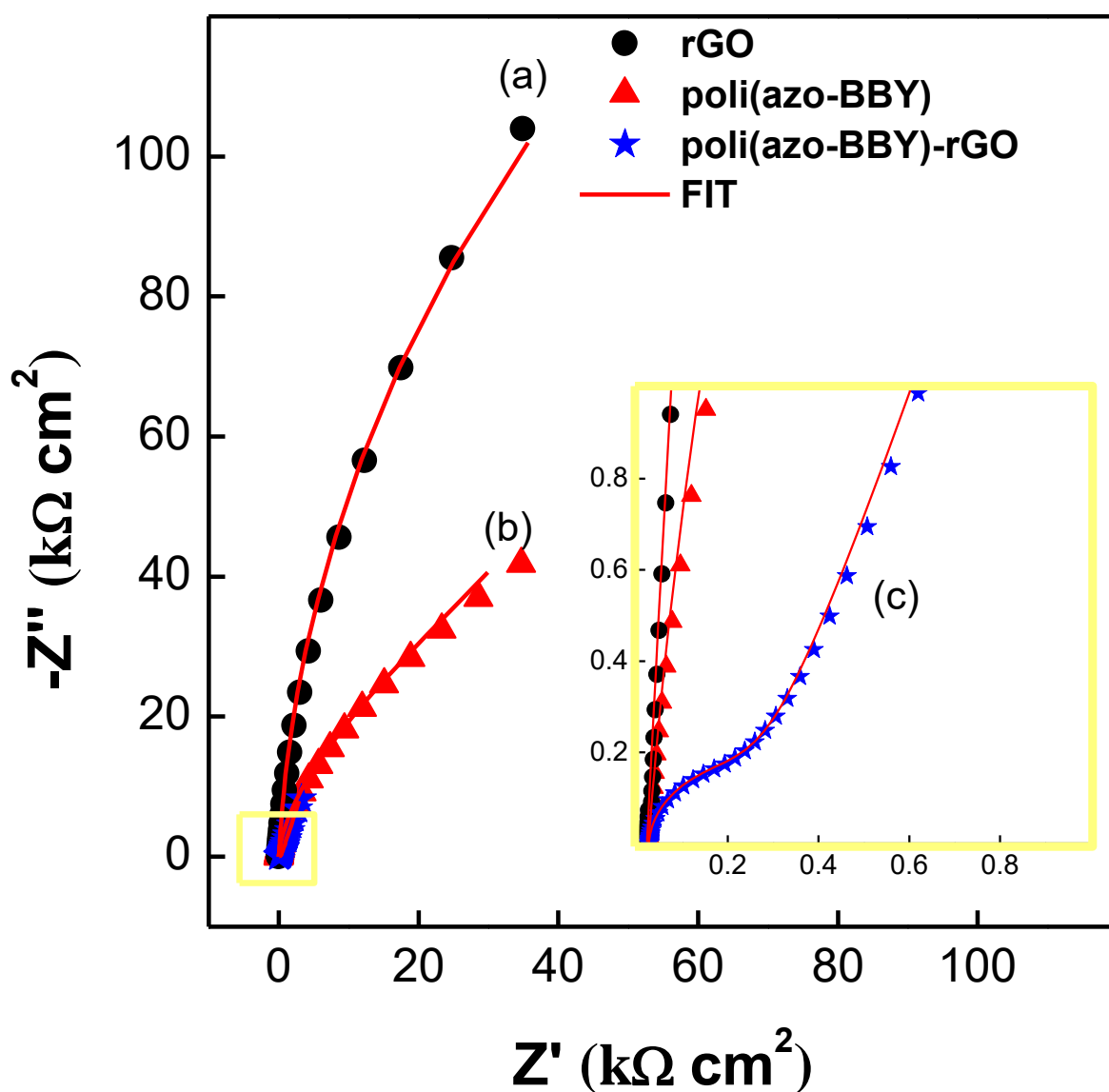


Fonte: autoria própria.

Os resultados para os filmes em potencial aplicado de +0,30 V vs. ECS são apresentados na Figura 25. Foram percebidas algumas pequenas mudanças nos modelos de circuitos equivalentes dos filmes de rGO e poli(azoBBY), e uma mudança significativa no circuito do filme de poli(azoBBY-rGO). Nos dois primeiros casos há a

substituição dos respectivos elementos de capacitância do filme (CPE_{filme}) para o elemento de Warburg (W). Isso ocorre porque no potencial de polarização positivo, o tamanho do contra íon (Cl^-) influencia em sua difusão pelo filme. O Cl^- acumula-se e gera uma região de interface apresentando diferença de carga e uma resistência para a difusão dos outros íons em direção ao filme. Ambos os fenômenos ocorrendo simultaneamente resultam no elemento de Warburg (MACDONALD; BARSOUKOV, 2005).

Figura 25 - Plano complexo de Nyquist para os filmes de rGO (a), poli(azoBBY) (b), e poli(azoBBY-rGO) (c) em um potencial aplicado de +0,30 V (vs ECS) em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0). T = 25°C e atmosfera de N₂.



O elemento de Warburg é percebido também no eletrodo contendo o filme de poli(azoBBY-rGO). Nesse filme, foi observado a alteração mais interessante quanto a forma do modelo de circuito equivalente. Passando de duas, para uma resistência de transferência de carga e passando a ter também um elemento de Warburg. No caso, a resistência de transferência de carga se torna uma devido a forma do filme de poli(azoBBY) estar na sua forma oxidada (condutora). Com isso, há a formação de uma imensa rede π -conjugada formada pelo azopolímero-grafeno.

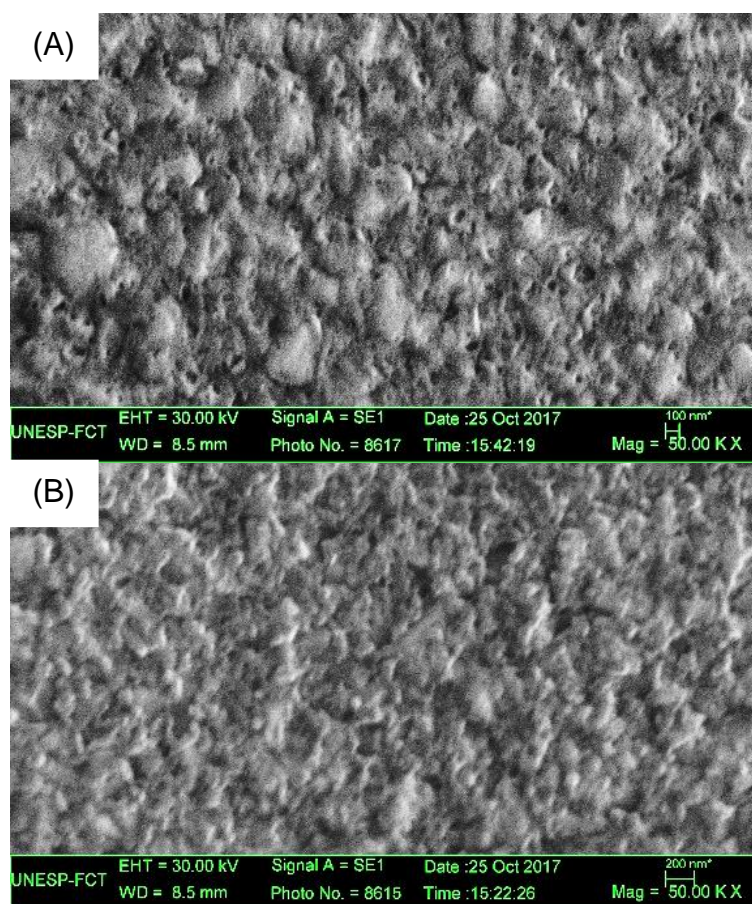
Observando os valores de R_{tc} (Tabela 9), é notável a diminuição dos valores de resistência do filme nanocompósito em comparação aos filmes de poli(azo-BBY) e rGO. Diminuindo em cerca de 1000 vezes o seu valor de R_{tc} da sua forma reduzida para sua forma oxidada.

5.3. Caracterizações Espectroscópicas e morfológicas

5.3.1. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na caracterização morfológica, foram feitas imagens de MEV do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO para dois diferentes filmes: um deles foi construído de maneira convencional, onde a eletropolimerização tem seu fim na varredura anódica (Figura 26A); e outro onde ao final da etapa de eletropolimerização foi feita durante a varredura catódica (Figura 26B). O objetivo da análise morfológica desses dois filmes, era a de levantar indícios que corroborassem para a proposta feita de formação do filme nanocompósito através de eletrodeposição alternada de camadas de poli(azo-BBY) e rGO, nas varreduras anódicas e catódicas respectivamente.

Figura 26 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poli(azo-BBY)-rGO finalizando a eletropolimerização durante a varredura anódica (A) e poli(azo-BBY)-rGO finalizando a eletropolimerização durante a varredura catódica (B).



Pelas imagens de MEV foi possível perceber diferença na morfologia os filmes, onde para o filme finalizado na varredura anódica, foi verificado um filme rugoso e com poros bem definidos, característico dos filmes de poli(Bismarck Brown Y) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a). Contudo, para o filme finalizado na varredura catódica, observou-se aglomerados dispersos de maneira uniforme, e com dimensões menores em relação ao filme de poli(azo-BBY)-rGO finalizado durante a varredura anódica. Sendo semelhantes aos encontrados para filmes eletrodepositados de óxido de grafeno reportados em literatura (CHEN et al., 2011a; LIU et al., 2011).

As imagens de MEV para os filmes corroboram com a proposta de eletroformação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO de maneira alternada, uma vez que o mesmo filme, com diferença apenas no potencial de finalização do processo de eletropolimerização, demonstraram diferenças em suas morfologias.

5.3.2. Caracterização Morfológica por Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de AFM foram obtidas para os filmes sintetizados seguindo o mesmo procedimento empregado para obtenção das imagens de MEV, onde confeccionou-se dois filmes de poli(azo-BBY)-rGO: i) finalizando a eletropolimerização na varredura anódica (BBY-rGO_(an)) (Figura 27A e D) e ii) finalizando a eletropolimerização na varredura catódica (BBY-rGO_(ca)) (Figura 27B e F).

Figura 27 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) do filme de poli(azo-BBY)-rGO finalizando a eletropolimerização na varredura anódica (A), catódica (B) e suas respectivas representações 3D (C e D).

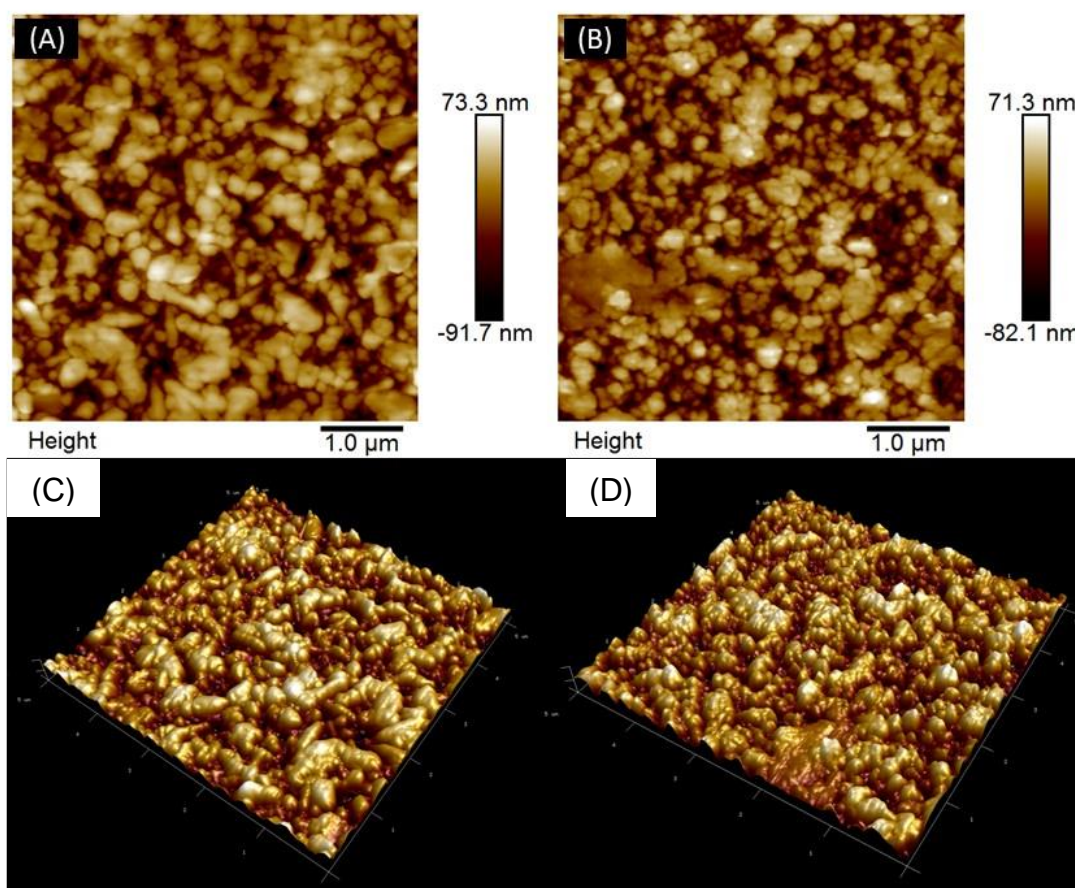


Tabela 10 – Valores de rugosidade e espessura para os eletrodos construídos pela aplicação de 20 ciclos de potenciais em velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

Eletrodo	BBY	rGO	BBY-rGO _(ca)	BBY-rGO _(an)
Rugosidade (nm)	63,95	37,68	73,65	77,62
Espessura (nm)	145,4	106,3	178,8	153,9

Comparando as imagens obtidas para os dois filmes, verifica-se que ambos apresentam aglomerados de semelhantes dimensões. O filme finalizado na varredura anódica, contendo filme de poli(azo-BBY) na superfície apresenta grânulos maiores comparado ao filme de poli(azo-BBY)-rGO finalizado na varredura catódica, o qual contém a camada de rGO sobre a superfície.

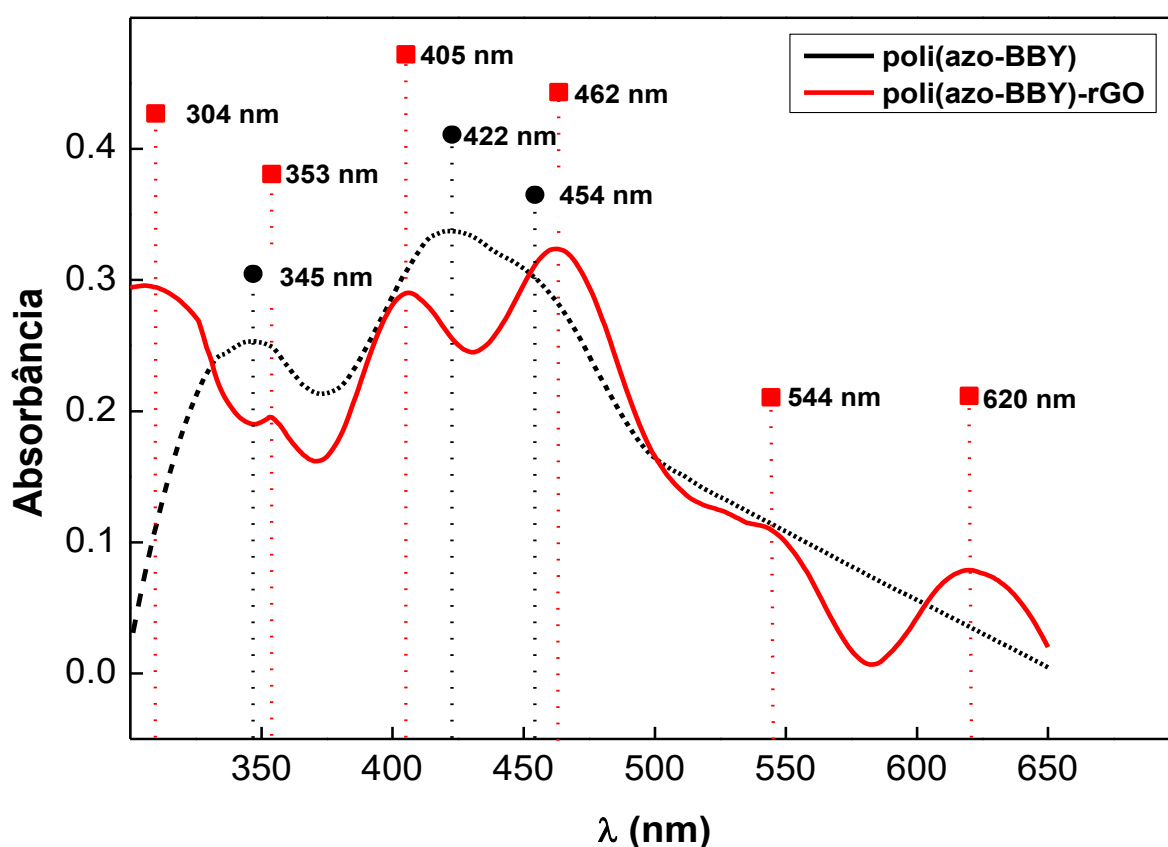
Os valores de rugosidade e espessura dos filmes foram obtidos por meio de software de análise de imagens de AFM são apresentados na Tabela 10. Foi verificado maiores valores de rugosidade e espessura para ambos os filmes nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO em comparação ao filme de poli(azo-BBY). Entre eles, é verificada uma maior rugosidade para o filme nanocompósito finalizado durante o potencial anódico (última camada contendo poli(azo-BBY)) em comparação ao filme nanocompósito finalizado no potencial catódico.

Com isso, foi possível observar diferenças entre os filmes construídos, corroborando com a proposta de formação do filme por intercalação das camadas de poli(azo-BBY) e rGO durante a eletropolimerização.

5.3.3. Caracterização por Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis)

As propriedades óticas do material nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO foi investigado através de espectroscopia de ultravioleta na região do visível (UV-Vis) e os resultados são apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Espectros de absorção no UV-Vis para os filmes de poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO sobre eletrodo de FTO.



O filme polimérico sintetizado apenas com Bismark Brown Y (poli(azo-BBY)) apresentou dois picos de absorção característico de azobenzenos em 345 e 422 nm, atribuídos a transição $\pi-\pi^*$ das formas *cis* e *trans*, respectivamente (HUANG et al., 2012b; TAN et al., 2007; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a; ZHANG et al., 2010), bem como um pico de absorção em 454 nm, referente a transição $\pi-\pi^*$ da cadeia polimérica π -conjugada (ZHANG et al., 2011, 2010).

Para o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO, foram verificados três novos picos de absorção. O primeiro em 304 nm, característico para a transição $\pi-\pi^*$ do óxido de grafeno (SHIN et al., 2014; ZHANG et al., 2011). O segundo e terceiro em 544 e

620 nm, atribuídos para a transição $n-\pi^*$ e ao estado polarônico do polímero, respectivamente (PIRON et al., 2008).

O pico de absorção referente a transição $\pi-\pi^*$ da forma *cis* diminuiu significativamente, demonstrando uma preferência do crescimento do filme polimérico de poli(azo-BBY) na forma *trans* no filme nanocompósito.

Além disso, os picos de absorção característicos do filme de poli(azo-BBY) sofreram deslocamento para: o azul para a transição $\pi-\pi^*$ da conformação *trans*; e para o vermelho para a transição $\pi-\pi^*$ da cadeia polimérica π -conjugada. Demonstrando que a inserção do óxido de grafeno reduzido a matriz polimérica influencia nos valores energéticos de transição eletrônica (ZHANG et al., 2011).

5.4. Desenvolvimento do Sensor Quimiorresistor para Oxigênio Dissolvido

As investigações seguintes se deram somente para o filme finalizado durante a varredura catódica. Para investigar o desempenho do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO, foram realizadas medidas de EIE frente a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em duas diferentes soluções: KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH 2,0) e STF 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4). A segunda solução foi introduzida ao estudo por fornecer um ambiente semelhante ao ambiente fisiológico de uma célula, uma vez que o principal objetivo do estudo é a aplicação da plataforma sensorial em um meio biológico.

5.4.1. Performance do filme Nanocompósito Frente ao Oxigênio Dissolvido

A performance foi avaliada por três diferentes leituras dos dados obtidos através de EIE, a saber: i) Nyquist (Z' vs $-Z''$) com auxílio de modelos de circuito equivalente; ii) logaritmo da Frequência (Hz) vs. ângulo de fase (θ); e iii) logaritmo da frequência (Hz) vs. Z' ($\Omega \text{ cm}^2$). De forma comparativa os valores obtidos para o poli(azo-BBY)-rGO foram confrontados com os obtidos pelos filmes de rGO e poli(azo-BBY).

5.4.1.1. Análise por Plano Complexo de Nyquist

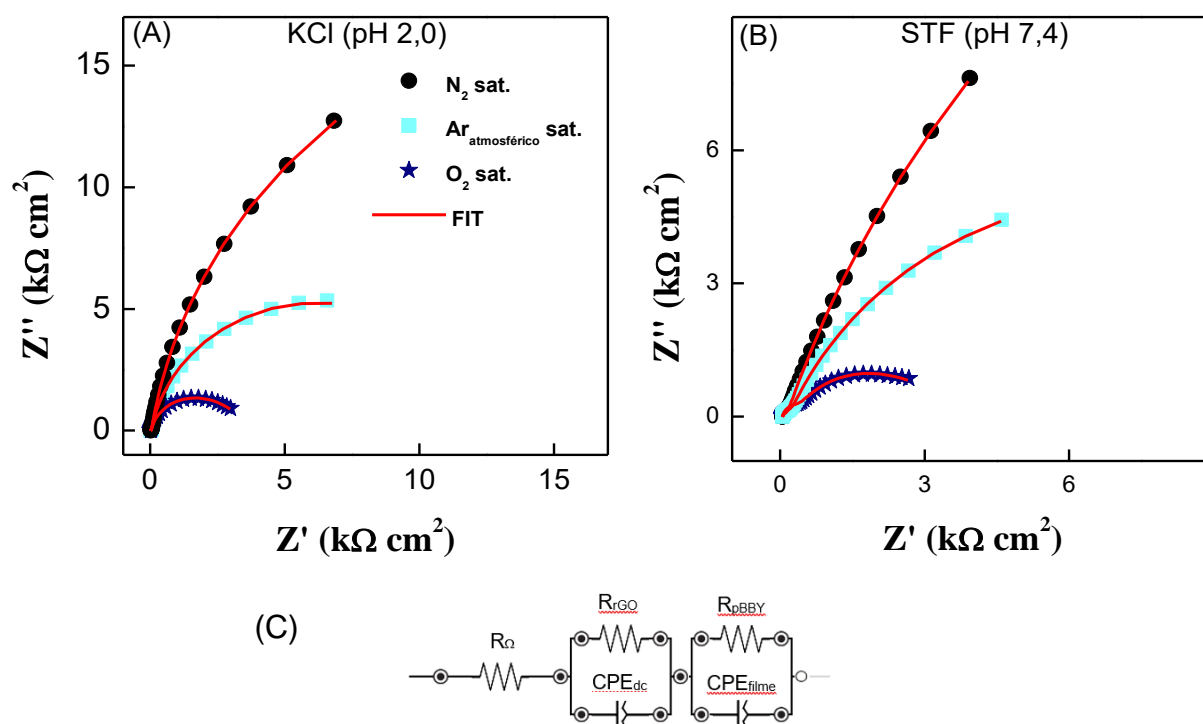
Para análise das características do gráfico de plano complexo de Nyquist obtidos para o filme de poli(azo-BBY)-rGO aplicando potencial de -0,30 V (vs. ECS) sobre diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, o circuito equivalente, anteriormente apresentado, contendo R_{Ω} ($R_{pBBY}CPE_{dc}$) ($R_{rGO}CPE_{filme}$) foi utilizado para realização dos ajustes matemáticos dos espectros. Como discutido nos tópicos anteriormente, o elemento R_{pBBY} é atribuído para a carga de transferência eletrônica da interface rGO/poli(azo-BBY), CPE_{dc} capacitância da dupla camada, R_{rGO} referente interface solução/rGO e CPE_{filme} atribuído para o comportamento capacitivo da camada do filme nanocompósito.

Observando os gráficos de Nyquist (Figura 29) verifica-se a mudança no formato do espectro, para ambas as soluções eletrolíticas. Conforme tem-se um aumento na concentração de O₂ dissolvido verifica-se uma mudança do formato de “arco” (N₂ sat.) para a forma de um semicírculo (1,25 mmol L⁻¹ de O₂), em ambas as

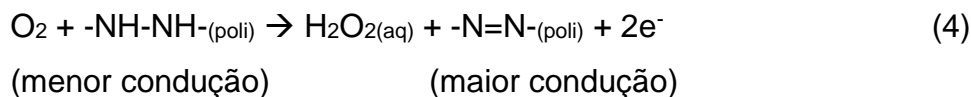
soluções. Esse comportamento revela uma diminuição da impedância diretamente proporcional a concentração de O_2 dissolvido em solução.

A Tabela 11 apresenta os valores de resistência do filme (R_{pBBY}) para ambos os eletrólitos baseado no modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 30C.

Figura 29 – Espectros do plano complexo de Nyquist do filme de poli(azo-BBY)-rGO sobre potencial aplicado de $-0,30$ V (vs. ECS) em solução de (A) KCl $0,50$ mol L^{-1} (pH = 2,0) e (B) STF $0,05$ mol L^{-1} (pH = 7,4), após saturação com N_2 ($[O_2] \sim 0,0$ mmol L^{-1}), $Ar_{atmosférico}$ ($[O_2] = 0,25$ mmol L^{-1}) e O_2 ($[O_2] = 1,25$ mmol L^{-1}). $T = 25^\circ$. C) Modelo de circuito equivalente para o filme de poli(azo-BBY)-rGO em potencial aplicado de $-0,30$ V vs. ECS.



O comportamento de diminuição da resistência do filme nanocompósito pela interação com o oxigênio dissolvido é baseado na interação do O_2 dissolvido com os sítios redox azo. Estando o eletrodo em potencial suficientemente negativo para manter os sítios azo do polímero na forma reduzida ($-NH-NH-$), tem-se um aumento da condutividade eletrônica do filme devido aumento da π -conjugação da cadeia polimérica provocada pela reação entre esses sítios e a molécula de O_2 dissolvida. O O_2 dissolvido reage com os sítios ativos azo sendo reduzido a H_2O_2 (Eq. 4).



Analisando os valores da Tabela 11 é possível perceber um aumento significativo na resistência R_{rGO} apenas para o sistema contendo a solução de STF ($\Delta R_{rGO(STF)} \sim 2965 \Omega$ frente a $\Delta R_{rGO(KCl)} \sim 5,91 \Omega$). Isso pode ser atribuído à micro-oxidação do óxido de grafeno reduzido pelo oxigênio molecular (YU; ZHENG; JIANG, 2008). Padey e colaboradores (WANG; PANDEY; KARNA, 2017) descrevem que o oxigênio molecular poderia adsorver quimicamente no grafeno defeituoso e o processo de oxidação conduzia a formação de poços no grafeno.

Tabela 11 - Parâmetros do fitting do espectro de espectroscopia de impedância eletroquímica do quimioresistor para as soluções de KCl pH = 2,00 e STF pH = 7,40 sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido para o circuito equivalente da Figura 1.E. Os erros apresentados para o fit foram abaixo de 2%.

KCl (pH = 2,00)								
Concentração		R_{Ω}	R_{rGO}	R_{pBBY}	CPE_{filme}	α_{filme}	CPE_{dc}	α_{dl}
(mmol L ⁻¹)		(k Ω cm ²)			(μ F cm ⁻² s ^{α-1})		(μ F cm ⁻² s ^{α-1})	
N ₂ sat.	0,0	0,025	0,021	41,60	486	0,691	93,7	0,901
Ar _{atm} sat.*	0,25	0,025	0,020	12,34	348	0,735	111	0,898
O ₂ sat.	1,25	0,025	0,015	3,296	237	0,780	121	0,879

STF (pH = 7,40)								
Concentração		R_{Ω}	R_{rGO}	R_{pBBY}	CPE_{filme}	α_{filme}	CPE_{dc}	α_{dc}
(mmol L ⁻¹)		(k Ω cm ²)			(μ F cm ⁻² s ^{α-1})		(μ F cm ⁻² s ^{α-1})	
N ₂ sat.	0,0	0,047	0,085	49,65	160	0,800	103	0,790
Ar _{atm} sat.*	0,25	0,046	0,131	14,57	170	0,759	38,4	0,922
O ₂ sat.	1,25	0,045	3,050	0,255	22,9	0,999	180	0,721

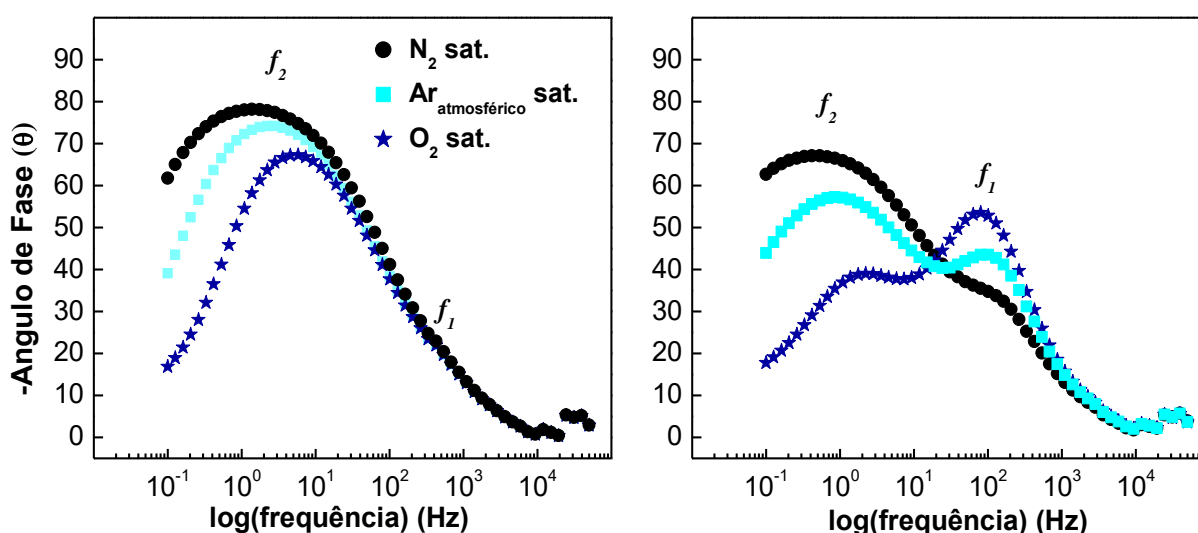
*solução saturada com ar atmosférico.

Esse comportamento pode ser visto acompanhando-se também os valores de α do CPE_{dc} , o qual diminui com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido, revelando uma maior irregularidade na estrutura do filme (CÓRDOBA-TORRES; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015).

5.4.1.2. Análise por Plano Complexo de BODE

As representações de BODE (Figura 30) são poderosas ferramentas para entendimento do comportamento do sistema em estudo (HUANG et al., 2016). Através da análise dos respectivos gráficos de BODE para o filme nanocompósito, é possível verificar a presença de dois elementos de constante de fase (CPE) devido a presença de dois picos de máxima localizados nas regiões de alta-média (f_1) e média-baixa (f_2) frequência, para ambos os eletrólitos (CÖRDOBA-TORRES; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015).

Figura 30 - Espectros do plano complexo de BODE do filme de poli(azo-BBY)-rGO sobre potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS) em solução de (A) KCl 0,50 mol L⁻¹ (pH = 2,0) e (B) STF 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,4), após saturação dos gases N₂, Ar_{atmosférico} e O₂. T = 25°.



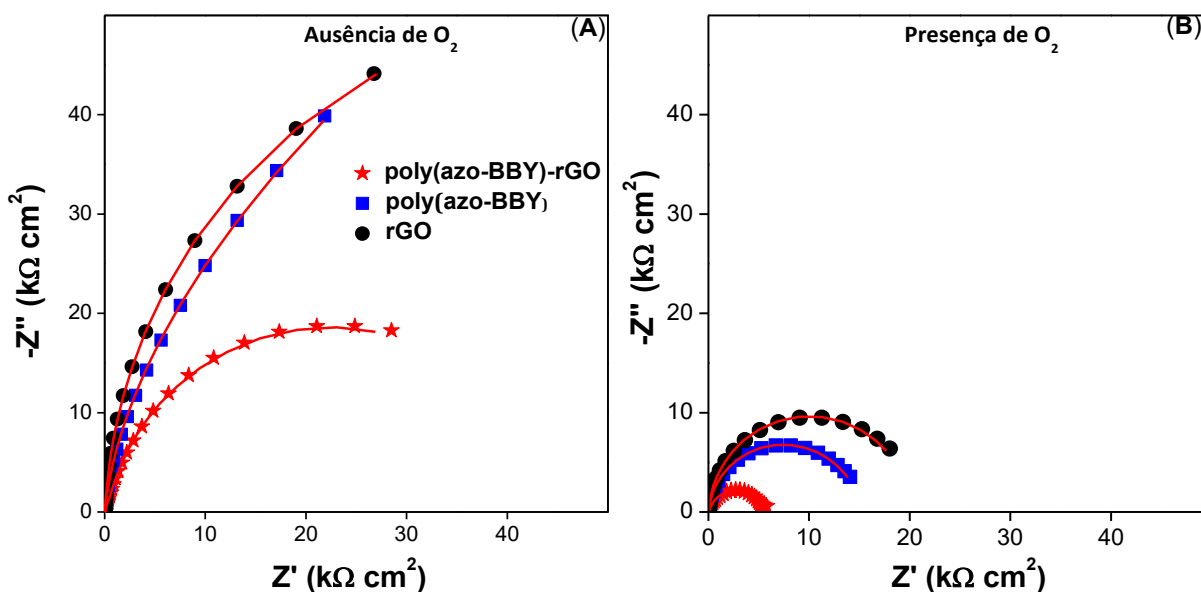
Ainda nas representações de BODE, os valores de ângulo de fase (θ) revelam a tendência da impedância se comportar como impedância capacitiva ou impedância resistiva. Quanto mais próximo de -90° for o ângulo de fase, maior a preferência da corrente em atravessar o elemento de capacitância e quanto mais próximo de 0° maior a preferência pelo sinal de corrente passar através do elemento de resistência (HUANG et al., 2016; MACDONALD, 1990). Assim, é possível verificar, em ambos os casos, que para a região de f_2 há uma diminuição dos valores de ângulo de fase com o aumento da concentração de O₂ dissolvido em solução. Concluindo que com o aumento da concentração de O₂ tem-se a diminuição da resistência do material, e como consequência, a preferência da corrente por atravessar o elemento de resistência (MACDONALD, 1990).

5.4.2. Estudo Comparativo do Desempenho dos Filmes de rGO, Poli(azo-BBY) e Poli(azo-BBY)-rGO Frente a Molécula de Oxigênio Dissolvido

Foram realizadas medidas para o estudo comparativo dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO frente a molécula de oxigênio dissolvido em solução de STF $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 31 apresenta o espectro de plano complexo de Nyquist contendo a resposta dos respectivos filmes na presença de solução saturada com os gases N_2 (concentração de O_2 próxima a zero) e O_2 ($1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de O_2 dissolvido) aplicando potencial de $-0,30 \text{ V}$ (vs. ECS). Verifica-se através do espectro que todos os filmes apresentaram um arco capacitivo, o qual sofrem diminuição em seus valores de impedância na presença de oxigênio dissolvido em concentração saturada.

Figura 31 – Espectro do plano complexo de Nyquist para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em solução de STF $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (A) e presença (B) de O_2 ($1,25 \text{ mmol L}^{-1}$). $T = 25^\circ\text{C}$.



Para melhor análise dos espectros, foram propostos diferentes modelos de circuito equivalente, que estão contidos na Tabela 12. A composição dos circuitos equivalentes dos filmes na presença de N_2 saturado em potencial aplicado de $-0,30 \text{ V}$ (vs. ECS) são os mesmos apresentados durante os estudos anteriores. Na presença de O_2 saturado, apenas o elemento de circuito equivalente referente ao filme de rGO sofre alteração em sua composição, deixando de apresentar o segundo elemento de constante de fase relacionado a interface eletrodo/rGO ($\text{CPE}_{\text{filme}}$).

Tabela 12 - Parâmetros do ajuste matemático para o espectro de Nyquist dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em STF 0,05 mol L⁻¹ (pH = 7,40) na presença dos gases N₂ e O₂ (1,25 mmol L⁻¹) e seus respectivos modelos de circuito equivalentes (MCE). Os erros apresentados para os ajustes foram menores de 2%.

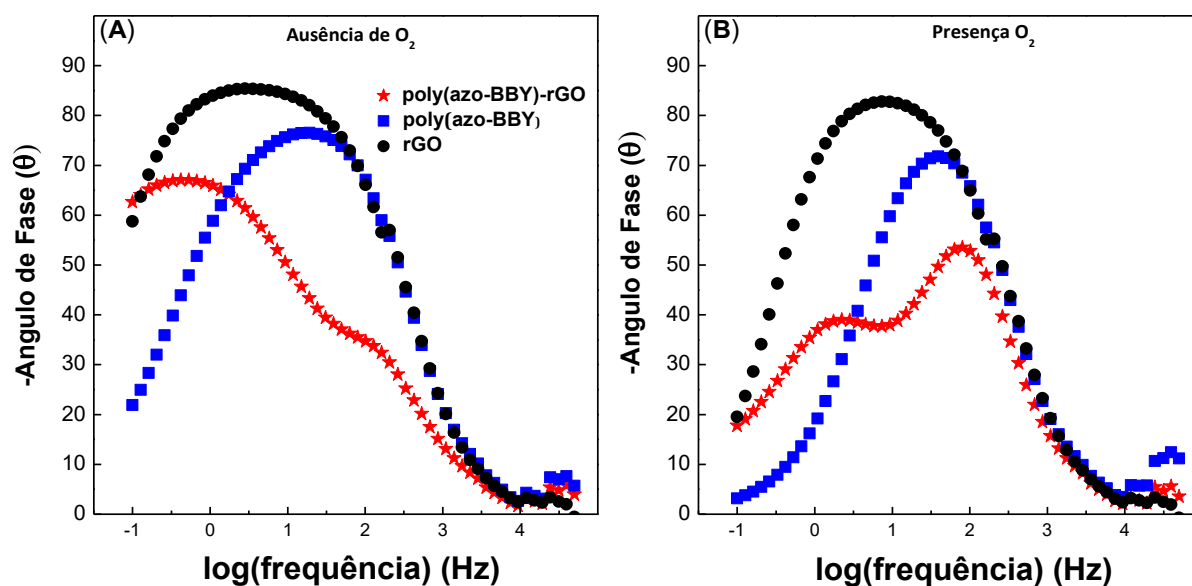
Filme	Gás Sat.	R_{ct}^*	R_{ct}	CPE_{dl}	α_{dl}	CPE_{film}	α_{film}	MCE
		(k Ω cm ²)	(μ F cm ² s ^{α-1})	(μ F cm ² s ^{α-1})	(μ F cm ² s ^{α-1})			
rGO	N ₂ [*]	-	92,4	27,3	0,993	500	0,734	
	O ₂		20,7	28,7	0,957	-	-	
Poly(azo-BBY)	N ₂	-	48,4	23,9	0,953	18,30	0,39	
	O ₂		12,8	23,2	0,957	496	0,35	
poly(Azo-BBY)-rGO	N ₂	0,02	41,6	93,7	0,909	486	0,69	
	O ₂	0,90	4,52	22,8	0,889	312	0,65	

Observando os valores de resistência de transferência de carga (R_{tc}) contidos na Tabela 10, observa-se uma diminuição de seus valores quando na presença do gás O₂ dissolvido para os três filmes estudados. A maior variação de R_{tc} foi anotada para o grafeno, sendo de ≈ 71 k Ω cm² em contraste com ≈ 36 k Ω cm² do filme de poli(azo-BBY) e ≈ 38 k Ω cm² para o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO. Revelando que os três filmes apresentam potencial aplicação como sensor de oxigênio dissolvido. O grande destaque para o filme nanocompósito é quanto a sua faixa de atuação, o qual apresenta valores de resistência suficientemente baixos para poder ser aplicado facilmente em sistemas miniaturizados que demandem baixos valores de diferença de potencial aplicado.

Através dos espectros de BODE (Figura 32) é possível verificar diferentes comportamentos entre os filmes estudados. Novamente, todos apresentaram variações significativas entre os espectros obtidos na presença dos gases N₂ e O₂.

Tanto o filme de rGO quanto o filme de poli(azo-BBY) não apresentaram variação para valores de frequência superiores a 90 Hz. Já no caso do filme de poli(azo-BBY)-rGO percebe-se alteração em sua forma a partir da frequência de 2 kHz.

Figura 32 - Espectro do plano complexo de BODE para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em solução de STF 0,05 mol L⁻¹ na ausência (A) e na presença (B) de O₂ (1,25 mmol L⁻¹). T= 25°C.



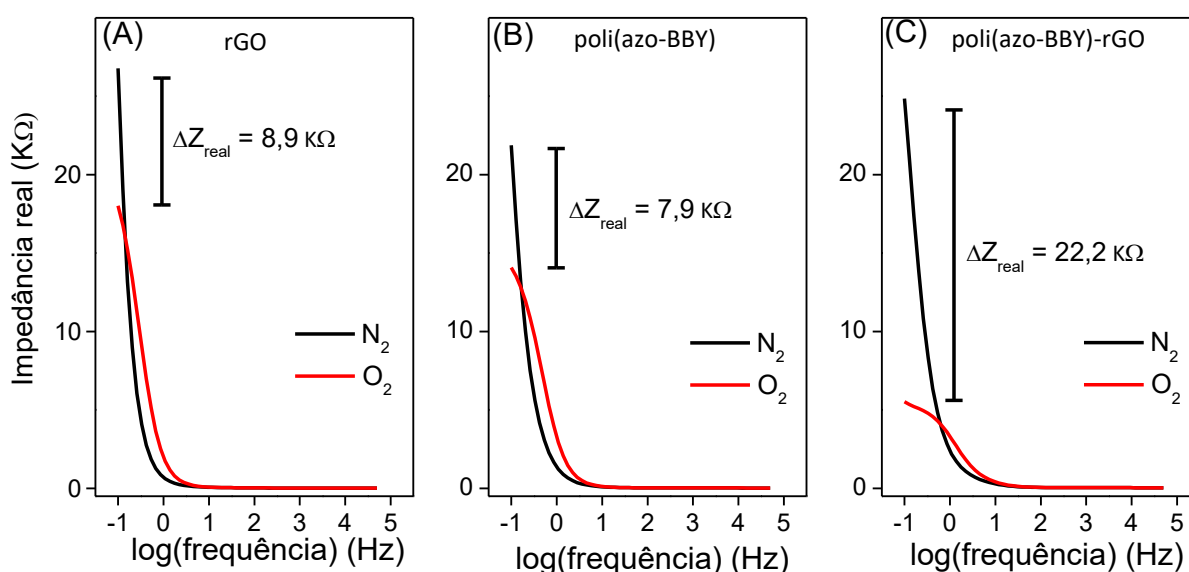
Também se verificou que, tanto o filme de rGO quanto o filme de poli(azo-BBY) apresentam uma banda de alto valor de ângulo de fase na região de baixa-média frequência, revelando que nessa faixa é predominante a preferência pela corrente a atravessar na direção do elemento de CPE (MACDONALD, 1990). O comportamento verificado para o filme de rGO são consistentes com os dados reportados na literatura, os quais exploram o uso de filmes de grafeno como supercapacitores (LIU et al., 2010; SHAO et al., 2015, 2016).

Para a região de baixa frequência, visada como sendo a de interesse para o atual projeto, tem-se que todos os filmes apresentam diminuição dos valores de ângulo de fase para valores inferiores a 20°, revelando a preferência da corrente por atravessar o elemento de resistência. Notável desempenho do filme de poli(azo-BBY), o qual apresenta valor de ângulo de fase de $\approx 2,5^\circ$ na frequência de 0,1 Hz, verificando que apenas uma pequena porção da corrente se destina ao elemento de CPE do filme. Nesse sentido, o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO demonstrou valor

intermediário, apresentando-se pouco abaixo do filme de rGO e acima do filme de poli(azo-BBY).

A Figura 33 apresenta o gráfico de impedância real vs. frequência (BODE) para o comportamento dos filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO na presença de soluções saturadas com os gases N₂ e O₂.

Figura 33 – Gráfico de BODE para os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO em solução STF 0,05 mol L⁻¹ saturada com os gases N₂ e O₂. Potencial aplicado de -0,30 V vs. ECS. T = 25°C.



Foi escolhido a impedância real (Z') devido a essa apresentar uma contribuição mais direta para os valores associada ao elemento de resistência (Eq. 5) comparado a impedância imaginária (Z'') (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008c).

$$Real Z = \frac{R}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad \quad \quad Img Z = \frac{\omega R \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (5)^7$$

ω = frequência (Hz); τ = time constante (s) ($\tau = RC$)

Também porque não foi verificada mudança significativa na faixa de trabalho 0,10 Hz comparada a impedância absoluta ($|Z| = \sqrt{(Z_{real})^2 + (Z_{img})^2}$). Os filmes de rGO, poli(azo-BBY) e poli(azo-BBY)-rGO apresentam diminuição dos valores de Z' quando na presença de O₂ dissolvido, mas a maior diferença na resposta

⁷ Equações referentes a um circuito RC paralelo (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008d).

impedimétrica ($\Delta Z' = 22,2 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$) é anotada para o filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-rGO. Apresentando ampliação de resposta de aproximadamente 60 e 64% frente aos filmes de rGO e poli(azo-BBY) respectivamente.

A diminuição dos valores de Z' se deve principalmente a diminuição do valor resistência de transferência de carga referente as camadas de rGO/poly(azo-BBY) (R_{ct}) com o aumento da concentração de oxigênio (OHSAKA et al., 1991).

5.4.3. Efeito do pH sobre a Resposta Eletroquímica do filme de Poli(azo-BBY)-rGO

O efeito do pH na resposta do sensor quimiorresistor de poli(azo-BBY)-rGO foi investigado devido a reação de redução do oxigênio dissolvido pelo nanocompósito envolver prótons (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

As medidas de EIE foram realizadas em soluções de KCl 0,50 mol L⁻¹ no intervalo de pH entre 1,82 a 8,18 em presença de 1,0 mmol L⁻¹ de oxigênio dissolvido. Os espectros de plano complexo de Nyquist obtidos foram analisados através do modelo de circuito equivalente apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros do ajuste matemático para o espectro de Nyquist para o filme de poli(azo-BBY)-rGO em diferentes valores de pH em solução de KCl 0,50 mol L⁻¹ na presença de oxigênio dissolvido (1,0 mmol L⁻¹). Os erros apresentados para os ajustes foram menores de 2%.

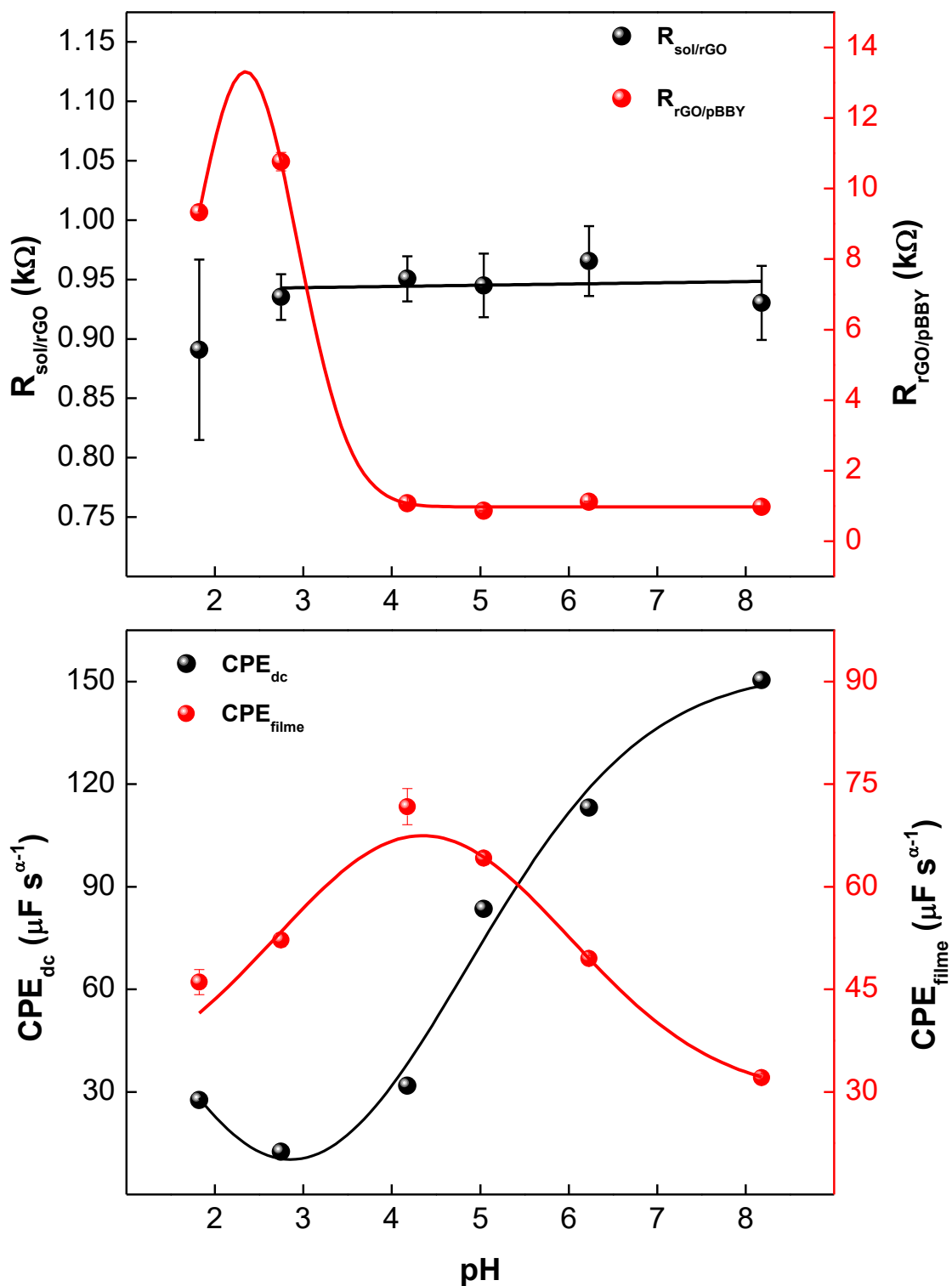
pH	R_{Ω}	R_{pBBY}	R_{rGO}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{rGO}	α_{rGO}
	(k Ω cm ²)			(μ F cm ⁻² s ^{α-1})		(μ F cm ⁻² s ^{α-1})	
+0,30 V (vs. ECS)							
1,82	0,021	9,33	0,880	27,6	0,95	46,0	0,80
2,75	0,024	10,7	0,935	12,5	0,97	52,2	0,89
4,18	0,025	1,08	0,950	31,8	0,94	91,7	0,91
5,04	0,025	0,867	0,961	83,5	0,92	64,2	0,91
6,23	0,025	1,11	0,976	113	0,90	49,5	0,94
8,18	0,025	0,977	0,920	150	0,95	32,1	0,93

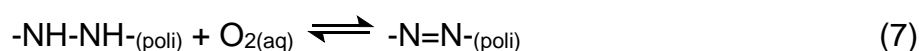
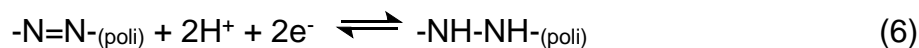
Para melhor análise dos dados obtidos, foram construídos gráficos da dependência dos valores de resistência de transferência de carga e elemento de fase constante em função dos valores de pH (Figura 34). A Figura 34 apresenta a variação de resistência de transferência de carga das interfaces solução/rGO ($R_{sol/rGO}$) e rGO/poli(azo-BBY) ($R_{rGO/pBBY}$) em função do pH estudado.

Para a interface solução/rGO ($R_{sol/rGO}$), os valores se mostraram estáveis, próximos a 1 k Ω , durante o intervalo de pH 1,80 a 8,18. Na análise da interface rGO/poli(azo-BBY), três importantes pontos foram levados em consideração: i) o equilíbrio da redução do grupo azo para hidrazina no polímero (equação 6); ii) a reação

do oxigênio com o grupo hidrazina do polímero (equação 7); iii) dopagem do filme nanocompósito pelo íon H^+ .

Figura 34 – Gráficos da dependência das resistências de transferência de carga ($R_{sol/rGO}$ e $R_{rGO/pBBY}$) (A) e dos elementos de fase constante (CPE_{dc} e CPE_{filme}) (B) em função do valor de pH da solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido. A Barra de erro é referente ao desvio padrão calculado para 3 medidas realizadas com o mesmo sensor.



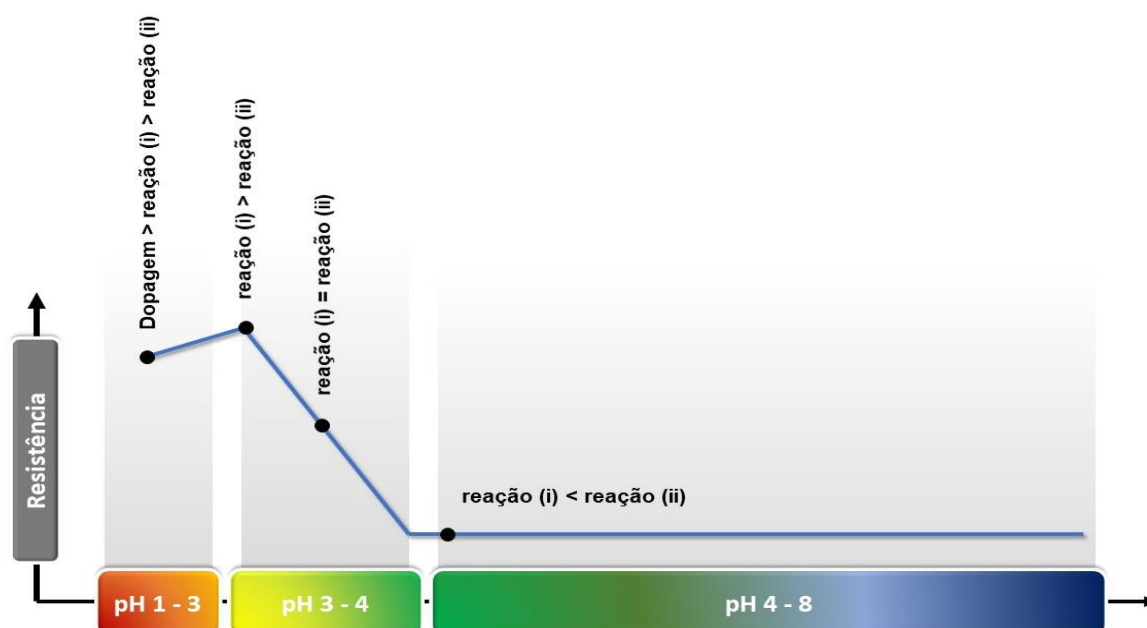


O estudo foi conduzido pela aplicação de um potencial constante de -0,30 V (vs. ECS) e na presença de grande quantidade de O_2 dissolvido. Portanto, pode-se considerar que para ambos os equilíbrios as reações só ocorrem na direção da formação dos produtos.

Cada reação destacada contribui de maneira diferente para aumento ou redução dos valores de resistência de transferência de carga da interface rGO/polí(azo-BBY). Onde (i) contribui para o aumento do valor de $R_{\text{rGO/pBBY}}$ e (ii) e (iii) para a diminuição do valor de $R_{\text{rGO/pBBY}}$ (Figura 35).

Considerando apenas as reações i e ii (Equações 6 e 7), era esperado que o valores de $R_{\text{rGO/pBBY}}$ fossem maiores em valores de pH ácido, em comparação a valores de pH neutro ou básico. Pois, o aumento da concentração de íons H^+ favorece a rápida regeneração dos sítios ativos do polímero oxidados pelo oxigênio dissolvido, prevalecendo no sistema a espécie do polímero em sua forma reduzida.

Figura 35 – Representação esquemática do efeito da variação do pH sobre $R_{\text{rGO/pBBY}}$.



No entanto, a partir do pH 2,76 até o pH 1,82 observou-se uma diminuição dos valores de $R_{\text{rGO/pBBY}}$. Assim, estimou-se que valores de concentração de H^+ superiores

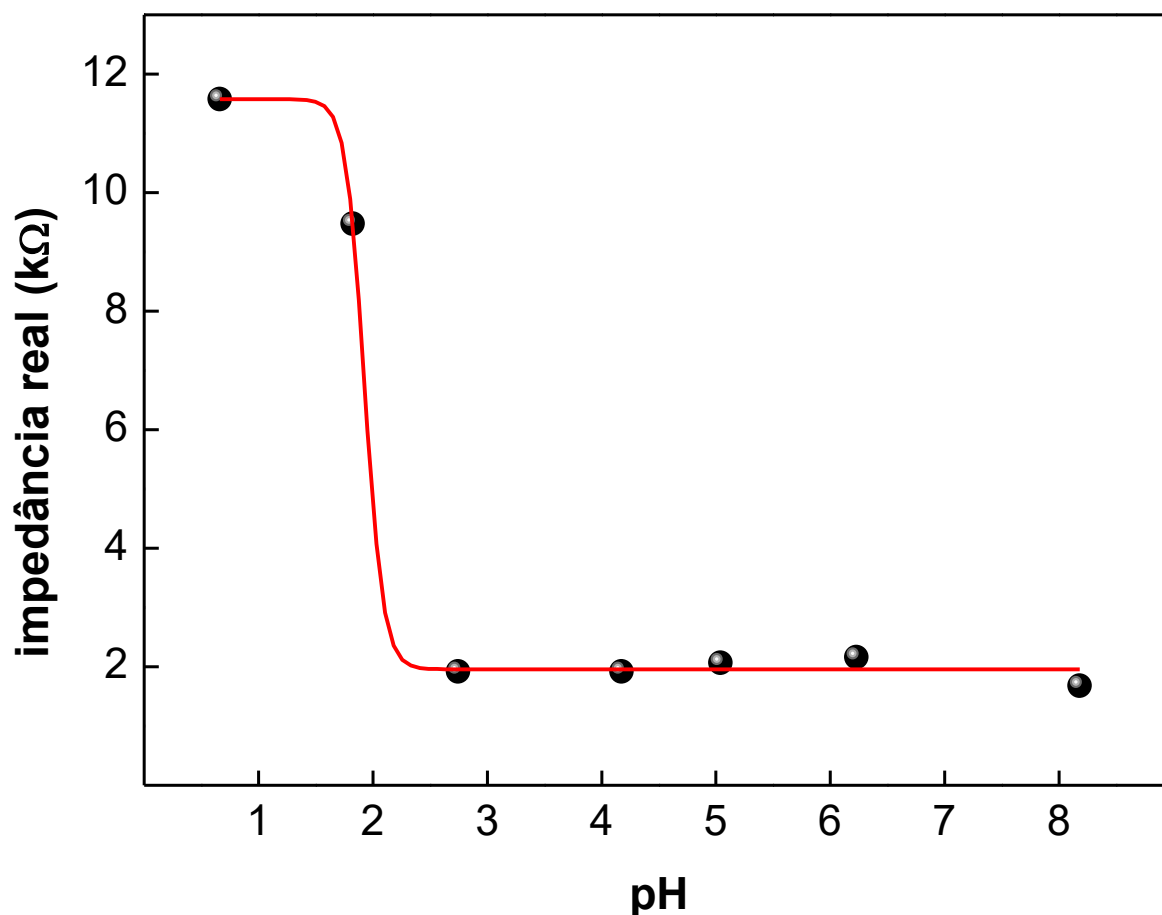
a 10^{-3} dê início a um processo de dopagem do polímero, favorecendo os mecanismos de transferência de carga com consequente diminuição dos valores de $R_{rGO/pBBY}$.

No intervalo de pH 2,76 a 4,16, houve uma faixa intermediária, onde há a diminuição da disponibilidade de íons H^+ para dopagem do polímero, sendo utilizados prioritariamente na regeneração dos sítios ativos azo (Equação 6).

Para os valores de pH superiores a 4,16, verificou-se uma estabilização nos valores de $R_{rGO/pBBY}$, demonstrando a superioridade no número de sítios ativos do polímero em sua forma oxidada, o qual apresenta menor resistência.

A nível de desempenho do sensor, foi verificado, na mesma faixa de pH, a influência das concentrações de íons H^+ nos valores de impedância real (Z') na frequência aplicada de 0,10 Hz. A Figura 36 apresenta o gráfico dos valores de impedância real em função do pH (Z' vs pH) em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido.

Figura 36 – Variação do valor de impedância real na frequência aplicada de 0,10 Hz do filme de poli(azo-BBY)-rGO em diferentes valores de pH da solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido.



O sensor quimiorresistor de poli(azo-BBY)-rGO demonstrou um comportamento estável nos valores de impedância real a partir do pH 2. Assim, o sensor pode ser aplicado para o monitoramento de oxigênio dissolvido em sistemas comuns.

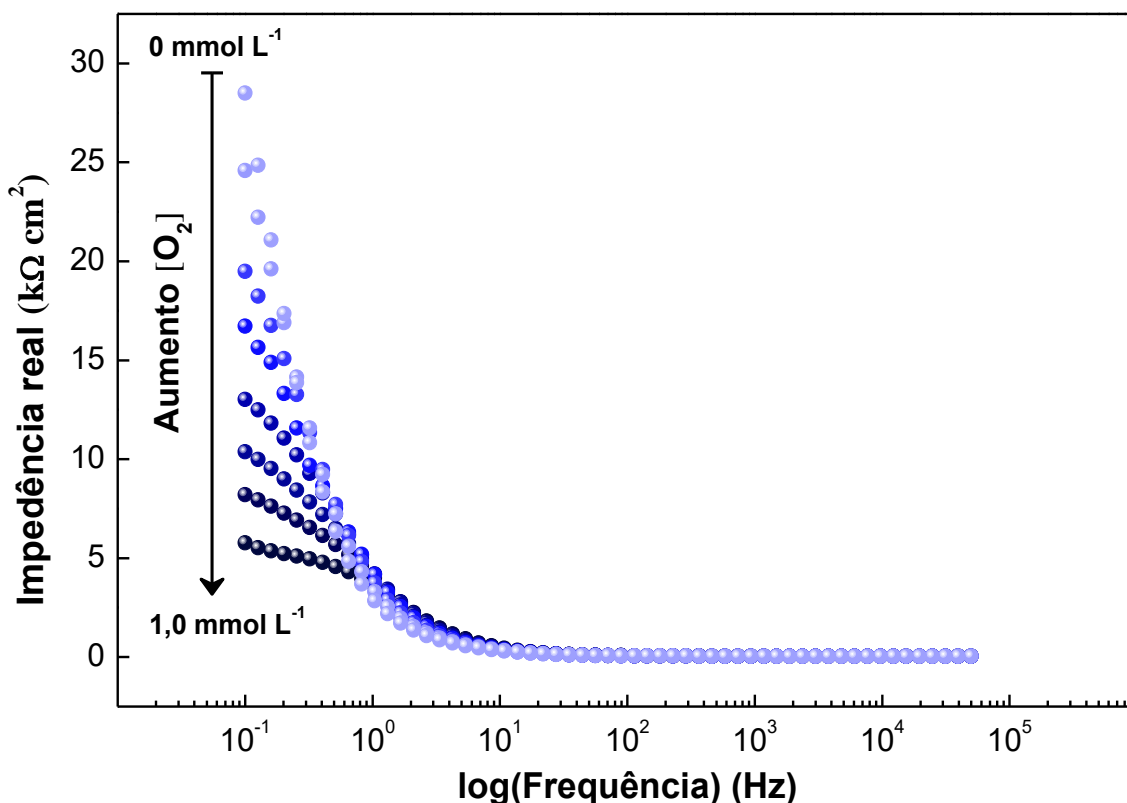
5.5. Otimização dos parâmetros analíticos da plataforma sensorial

5.5.1. Influência da frequência

A frequência desempenha papel importante na construção de um sensor quimiorresistor baseado em cronoimpedância por estar diretamente relacionada ao tempo de resposta do sensor.

Para avaliar a influência da frequência sobre o desempenho do sensor quimiorresistor, foram construídas curvas analíticas para oxigênio dissolvido a partir do consumo do mesmo pela adição de alíquotas da solução padrão de Na_2SO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em solução de STF $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) saturada com o gás O_2 (Figura 37).

Figura 37 – Espectro do plano complexo de BODE (Z' vs. $\log(\text{frequência})$) para a resposta do filme de poli(azo-BBY)-rGO frente a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em solução de STF $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando potencial de $-0,30 \text{ V}$ (vs. ECS).

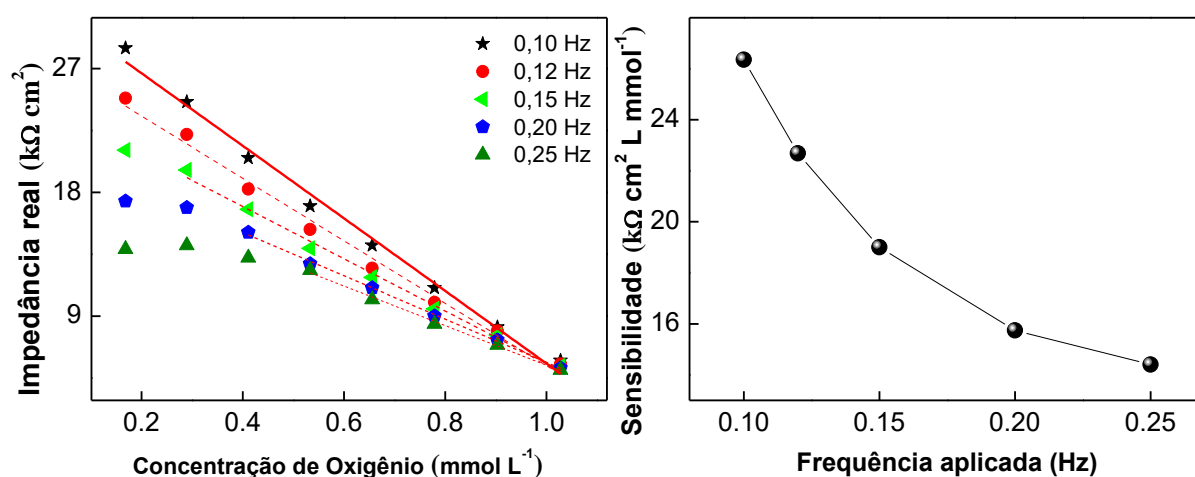


A Figura 38 apresenta o gráfico da dependência da impedância real em função da frequência para as diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Variações significativas dos valores de Z' são vistos na região de baixa frequência partindo de ~ 4

Hz. Nessa faixa de frequência, verifica-se uma diminuição dos valores de Z' com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido.

A partir da Figura 37 foram coletados os dados para construção das curvas analíticas contidas na Figura 38. Todas as frequências verificadas demonstraram regiões de comportamento linear, as quais diminuíram com o aumento dos valores de frequência. O maior intervalo linear de resposta anotado para a frequência de 0,10 Hz.

Figura 38 – (A) Curvas analíticas do sensor de poli(azo-BBY)-rGO construídas a partir de diferentes valores de frequência. (B) Gráfico da dependência da sensibilidade do sensor em função da frequência de perturbação senoidal aplicada.

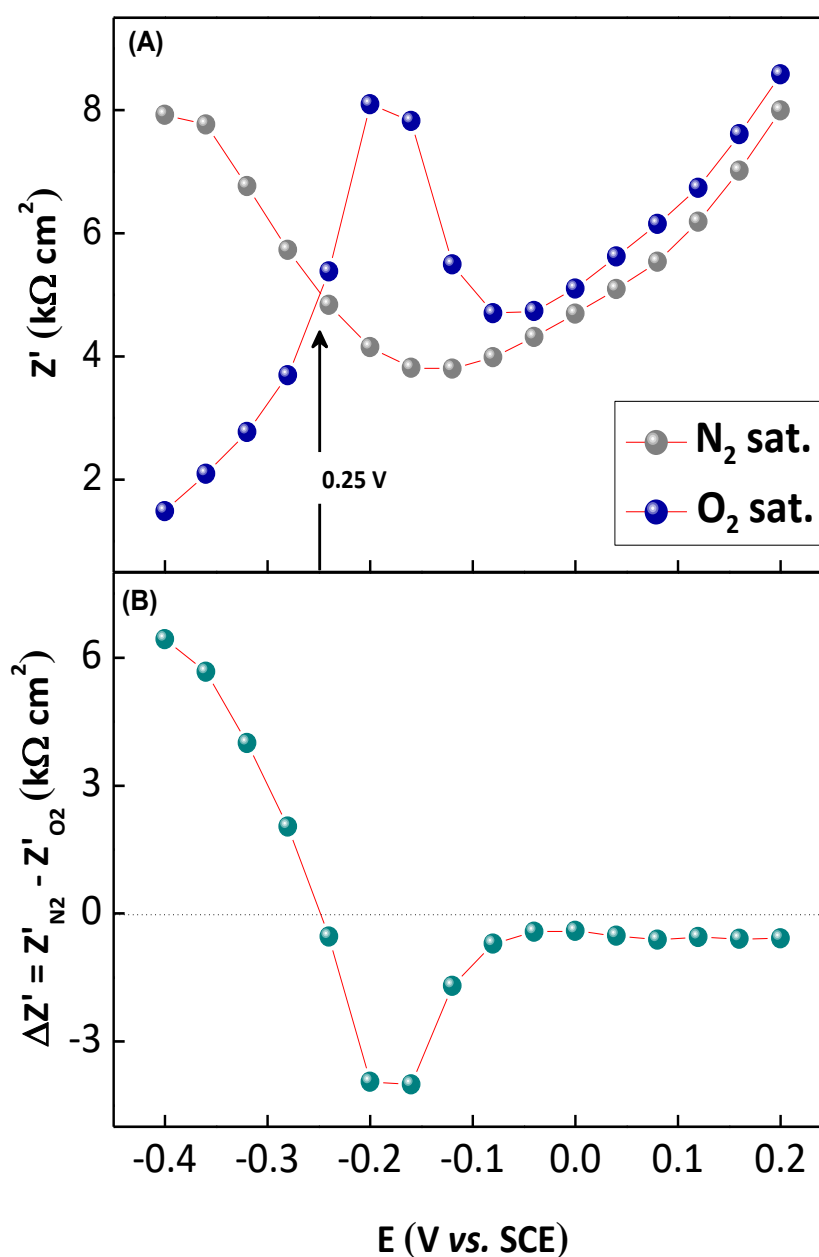


O aumento da frequência também influenciou na sensibilidade das curvas analíticas, tendo uma diminuição o aumento do valor de frequência. O maior valor de sensibilidade foi anotado para a frequência de 0,10 Hz. Apesar dessa frequência apresentar o maior intervalo de coleta de pontos (tempo mínimo de coleta de 12 segundos), optou-se por fixa-la, uma vez que o tempo médio para a coleta de pontos não se mostra um empecilho para aplicação da plataforma sensorial baseada em nanocompósito no monitoramento do consumo de oxigênio em sistema biológico. Uma vez que os protocolos utilizados para averiguação desses sistemas trabalham com tempos médios de medidas na ordem de minutos (GNAIGER, 2014; RYAN et al., 2014; WU et al., 2010).

5.5.2. Influência do Potencial Aplicado

Para determinar a influência do potencial sobre o desempenho do sensor quimioresistor, foram realizadas medidas aplicando-se uma janela de potencial e verificando a variação dos valores de impedância real na presença de soluções de STF 0,05 mol L⁻¹ saturadas com os gases N₂ ([O₂] ~0 mmol L⁻¹) e 1,25 mmol L⁻¹ de O₂ (Figura 39).

Figura 39 – (A) Gráfico da dependência da impedância real (Z') em função do potencial aplicado do sensor quimioresistor de poli(azo-BBY)-rGO em solução de STF 0,05 mol L⁻¹ na presença dos gases N₂ e O₂ ([O₂] = 1,25 mmol L⁻¹). (B) Gráfico da dependência da diferença de Z' obtido para as medidas em N₂ saturado e O₂ saturado.

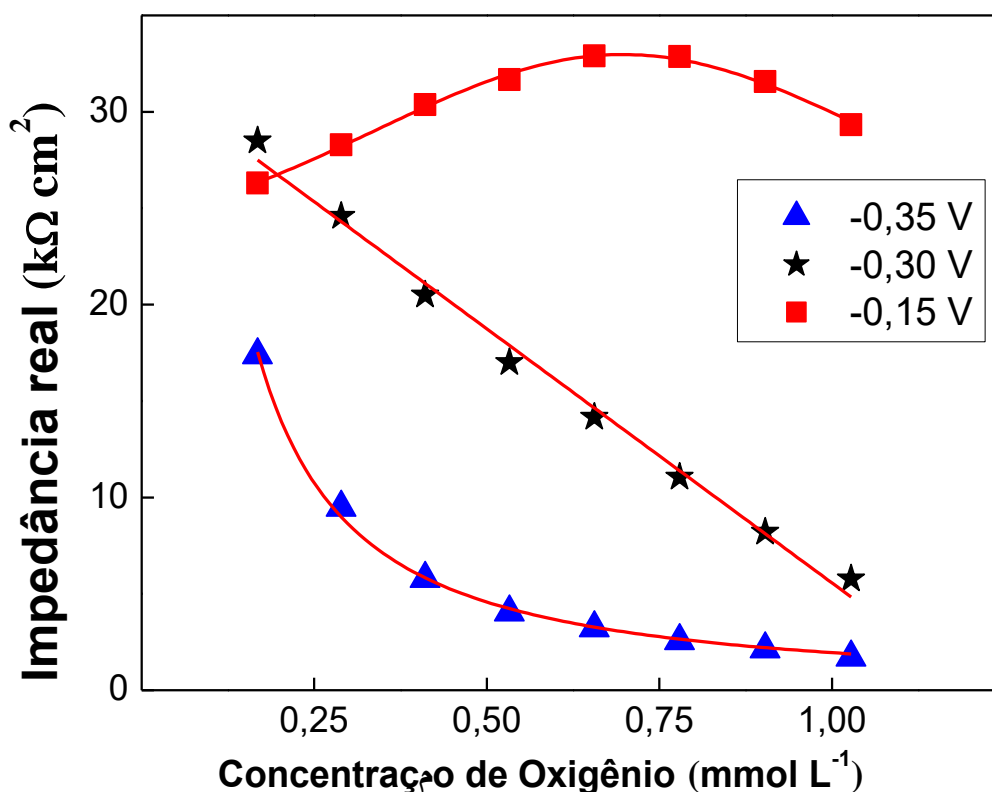


O gráfico obtido demonstrou que valores de impedância real anotados no intervalo de potencial de -0,35 a -0,25 V (vs. ECS) apresentaram o comportamento característico de diminuição dos valores de impedância na presença de oxigênio dissolvido. Comportamento atípico foi anotado no intervalo de -0,25 a -0,10 V (vs. ECS), onde teve-se um aumento dos valores de impedância na presença da solução saturada com oxigênio dissolvido.

Construindo-se um gráfico da diferença ($\Delta Z'$) dos valores de Z' em solução saturada com N_2 e O_2 , verifica-se que para valores de potencial positivos não há variação significativa dos valores de impedância real. Para valores negativos, já discutidos no parágrafo acima, verifica-se que a maior variação negativa foi vista para o potencial de -0,15 V e a maior variação positiva foi vista para o potencial de -0,35 V (vs. ECS).

Com isso, foram escolhidos os potenciais de -0,35; -0,30 e -0,15 para verificar a influência dos mesmos no comportamento da curva de calibração. Na Figura 40, é possível verificar uma não linearidade para as curvas construídas sob potencial aplicado de -0,35 e -0,15 V (vs. ECS).

Figura 40 – Curvas de calibração para o sensor quimiorresistor poli(azo-BBY)-rGO construídas através da aplicação de diferentes potenciais aplicado.



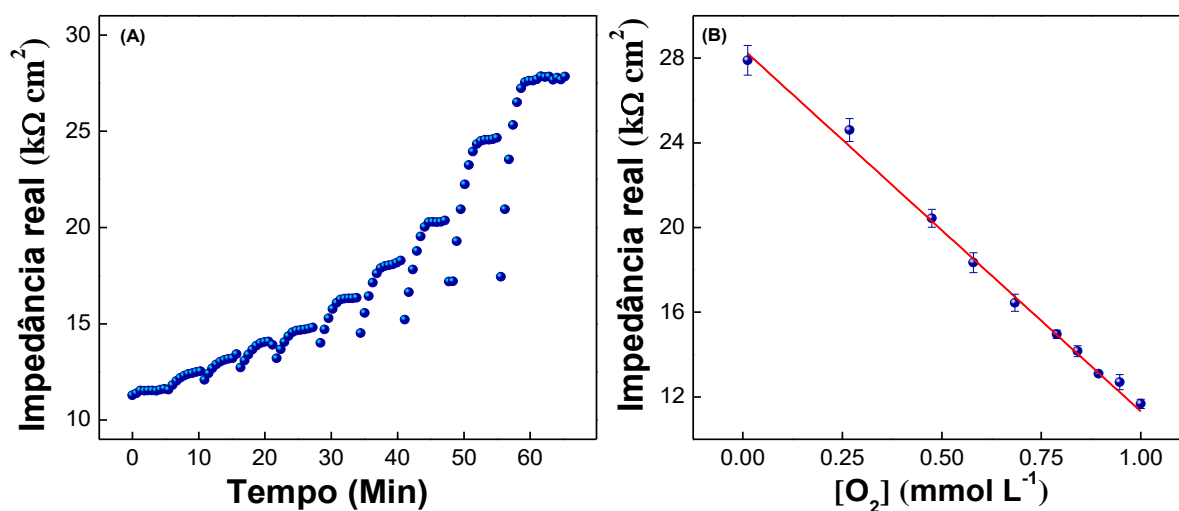
Tendo apresentado comportamento linear na faixa de trabalho pretendida, que compreende a região entre 10^{-6} e 10^{-4} mmol L⁻¹ de oxigênio dissolvido, o potencial de -0,30 V foi escolhido para ser fixado para continuação das investigações.

5.5.3. Curva Analítica

Após determinação dos valores de frequência e potencial de redução, foi possível utilizar a técnica de cronimpedância para monitorar a variação das concentrações de oxigênio dissolvido em tempo real (Figura 41). Após saturação da solução de STF 0,05 mol L⁻¹ com o gás oxigênio, eram realizadas sucessivas adições de padrão de Na₂SO₃ 0,10 mol L⁻¹.

Tem-se uma resposta imediata do sensor quimiorresistor, o qual apresenta aumento dos valores de impedância real após o consumo parcial do oxigênio pelo Na₂SO₃ adicionado. Os valores de impedância real alcançam estabilização do sinal em aproximadamente 60 segundos. Tempo esse suficiente para estar de acordo com a necessidade dos protocolos de análise mitocondrial, onde os mesmos necessitam de intervalos de tempo médio de 5 a 10 minutos para adição de cada substrato.

Figura 41 - Resposta cronimpedimetrica do sensor quimiorresistor de poli(azo-BBY)-rGO em solução de 0,05 mol L⁻¹ STF com frequência fixa de 0,10 Hz e potencial aplicado de -0,30 V (vs. SCE) frente a diferentes concentrações de O₂ dissolvido (A). Curva de calibração para o sensor chemiresistor (B). A barra de erro foi calculada a partir do desvio padrão de 3 medidas utilizando o mesmo sensor. Temp. 25°C.



A Figura 41 demonstra a curva analítica para as medidas de cronoimpedância realizadas. A curva demonstra comportamento linear no intervalo de concentração de $1,17 \times 10^{-5}$ a $1,02 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de oxigênio dissolvido com valor de sensibilidade de $16,9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2 \text{ L mmol}^{-1}$, expressa pela equação 8:

$$Z' (\text{k}\Omega \text{ cm}^2) = 28.40 \pm 0.06 - 16,9 \pm 0.003 [\text{O}_2 (\text{mmol L}^{-1})] \quad (n = 10; R^2 = 0.9989) \quad (8)$$

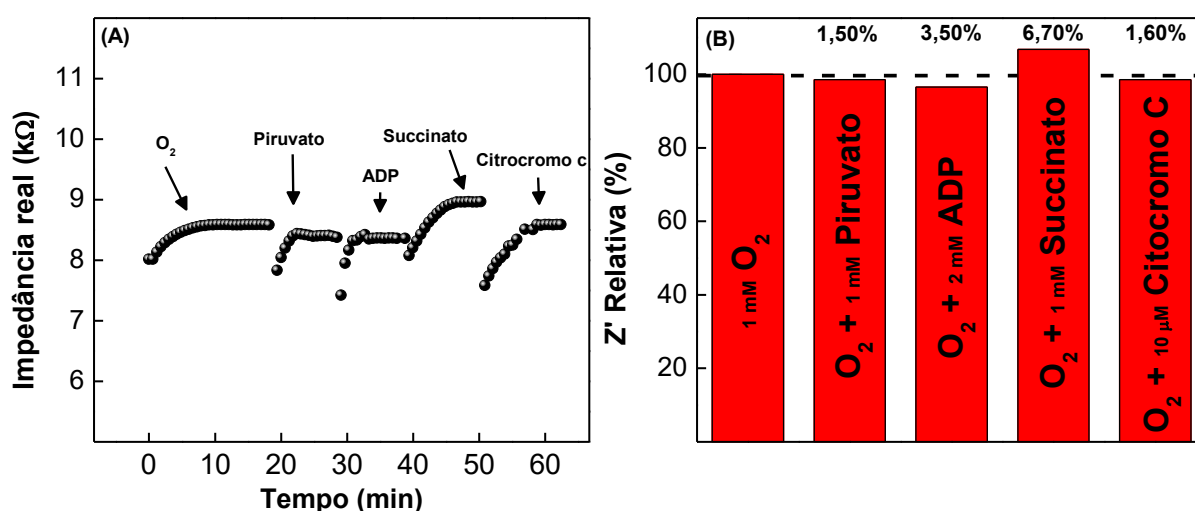
O sensor quimioresistor apresentou limite de detecção (LD) de $3,55 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e limite de quantificação (LQ) de $7,81 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Os valores de limite de detecção e sensibilidade apresentados pelo sensor quimioresistor o fazem um potencial sensor para oxigênio dissolvido, não restringindo seu uso na aplicação de quantificação de oxigênio dissolvido em sistemas biológicos.

5.5.4. Estudo dos Interferentes

As análises protocoladas para o estudo da respiração mitocondrial contam com a adição de diversos substratos e inibidores, com o objetivo de estimular a resposta de cada um dos complexos constituintes da cadeia transportadora de elétrons (KUZNETSOV et al., 2008; MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015).

Para avaliar o sensor quimiorresistor quanto a seletividade, foram realizadas medidas de cronoimpedância frente a substratos utilizados em protocolos para as medidas de oximetria na avaliação da respiração mitocondrial (Figura 42).

Figura 42 – A) Resposta cronoimpedimétrica do sensor quimiorresistor de poli(azo-BBY)-rGO para a adição de alíquotas de interferentes em solução de respiração mitocondrial contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido com potencial aplicado de $-0,30 \text{ V}$ (vs. ECS) e frequência aplicada de $0,10 \text{ Hz}$. B) Resposta relativa do sensor quimiorresistor frente aos interferentes.



Para o estudo, os substratos (Figura 42) foram adicionados em solução de respiração mitocondrial contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de O_2 dissolvido, seguindo a ordem de adição e as concentrações estipuladas nos protocolos descritos por (KUZNETSOV et al., 2008; MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015).

Em média, todas as substâncias testadas apresentaram valores de variação de sinal baixo (Variação $< 6\%$), sendo a maior interferência anotada para o succinato.

Esse resultado revela a seletividade do sensor quimiorresistor poli(azo-BBY)-rGO para a reação com o oxigênio dissolvido. Assim, foi possível a utilização do sensor chemiresistor em contato direto com o meio de análise sem a necessidade de uma membrana permeadora de oxigênio.

5.6. Aplicação do Sensor Quimioresistor

Para abordar a aplicação do sensor na respiração mitocondrial, o consumo de O_2 mitocondrial correspondente à resposta de cada complexo da cadeia de transporte de elétrons foi medido durante um protocolo sequencial de adição de substrato (KUZNETSOV et al., 2008; MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015). A competição por esses substratos (piruvato, ADP, succinato e citocromo c) foi determinada pela resposta direta do sensor, como mostrado pelas medidas de impedância do O_2 dissolvido ($1,00 \text{ mmol L}^{-1}$).

O desempenho do sensor no monitoramento em tempo real do consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado em amostras de tecido coletadas do músculo esquelético de quatro diferentes grupos de ratos: controle (C), fumantes (F), fumantes exercitados (FE) e exercitados (E).

A respiração mitocondrial pode ser avaliada, em geral, de acordo com o tipo de respiração. Existem três tipos principais de respiração (MAKRECKA-KUKA; KRUMSCHNABEL; GNAIGER, 2015): 1) o estado de respiração ROUTINE (R), que é a demanda de oxigênio celular no estado estacionário, sem quaisquer adições de substratos em excesso ao meio celular; 2) o estado de respiração LEAK (L), o qual é um acrônimo para o fluxo de oxigênio em repouso que compensa vazamento de prótons, deslizamento de prótons e ciclo de cátions, e está relacionado à geração de espécies reativas oxidativas (ROS); 3) o estado respiratório OXPHOS (P) é a capacidade respiratória mitocondrial para produzir ATP.

A Figura 43 apresenta medições em tempo real do consumo de oxigênio celular pelo tecido estudado em tampão respiratório usando o sensor proposto. A diminuição da concentração de oxigênio (linha vermelha) foi detectada pelo sensor para cada adição de tecido (R) e piruvato (L). A adição de ADP (P) e succinato (P) aumentou substancialmente o consumo de oxigênio, devido a ativação do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial. O citocromo c foi adicionado no final das medições para verificar a integridade mitocondrial, e nenhum efeito significativo foi detectado em todas as amostras.

As taxas de consumo de oxigênio (Tabela 14) foram calculadas para cada substrato adicionado no sistema nos quatro grupos de teste, de acordo com as descrições da literatura (KUEH; NIETHAMMER; MITCHISON, 2013; LI; GRAHAM, 2012).

Figura 43 - Curva do protocolo de titulação para monitoramento do consume de oxigênio mitocondrial (linha vermelha, eixo vermelho y) sobre o tempo (minutos). A concentração de oxigênio foi calculada a partir da curva de calibração para os valores de $[O_2]_{max}$ e $[O_2]_{zero}$. Titulações de substratos mitocondriais e seu tempo de adição são mostrados com setas. Os estados de respiração são demonstrado com cores de fundo: (R) routine = azul; (L) leak = verde and (P) oxphos = amarelo. T = 37°C.

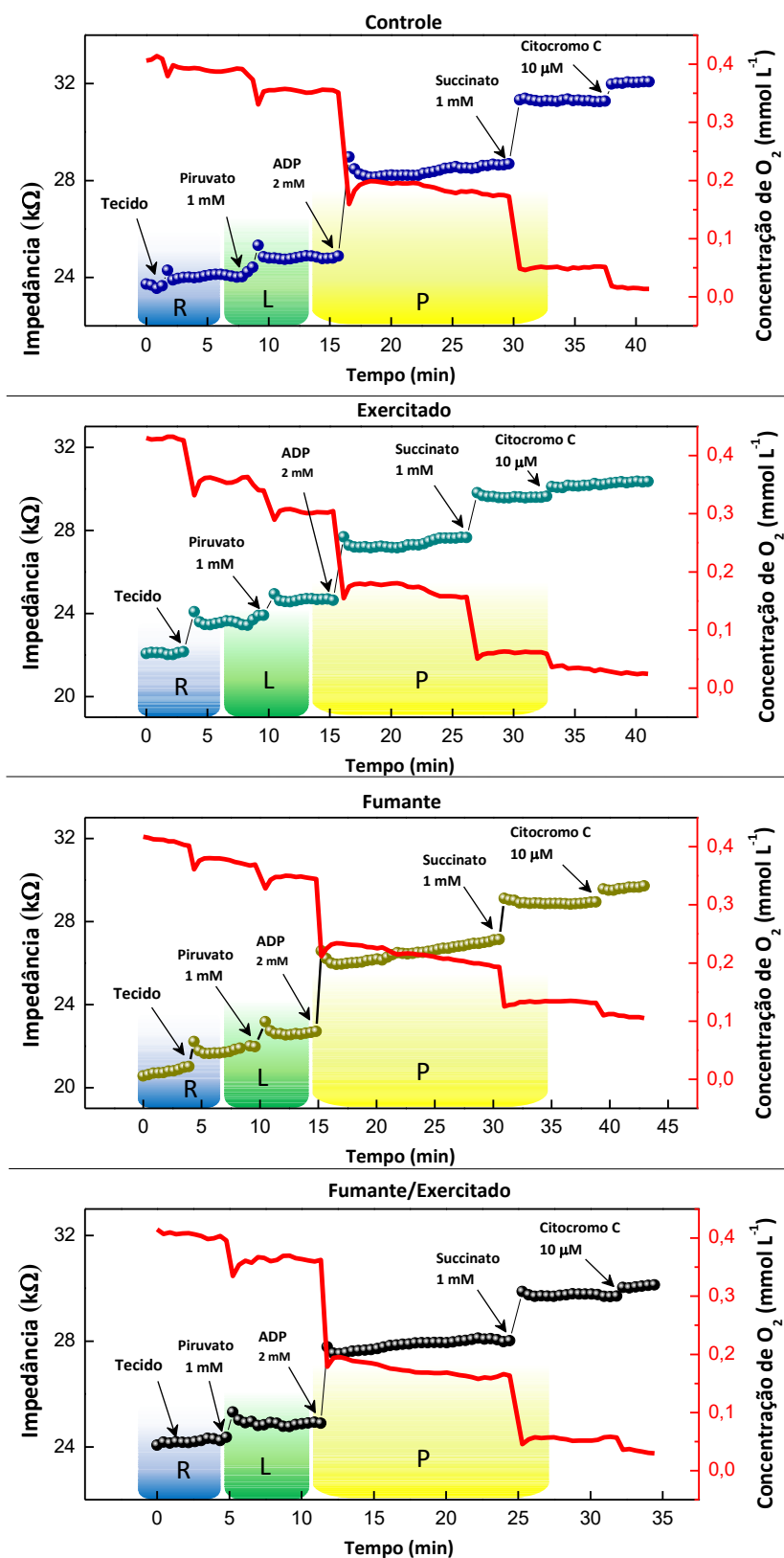


Tabela 14 - Consumo de oxigênio mitocondrial. Taxa de consumo de oxigênio em diferentes estados da respiração mitocondrial. Valores representam a média para três animais de cada grupo.

Grupo testado	Fluxo de consumo de oxigênio ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{L}^{-1} \text{s}^{-1}$)		
	ROUTINE	LEAK	OXPHOS
Controle	17,2 \pm 2,1	25,4 \pm 1,0	132,2 \pm 3,9
Exercício	74,2 \pm 5,7	25,7 \pm 2,1	165,3 \pm 4,1
Fumante	10,0 \pm 2,3	28,3 \pm 1,9	143,0 \pm 4,4
Fumante/Exercício	19,3 \pm 3,1	27,8 \pm 1,8	104,0 \pm 6,2

Os resultados obtidos demonstram uma clara diferença nos valores de respiração mitocondrial ROUTINE e OXPHOS entre os grupos de animais avaliados, mas não sendo tão expressiva em relação a respiração LEAK.

Foi possível a verificação de um aumento significativo dos valores de respiração mitocondrial, tanto R quanto P, para o grupo submetido a exercício resistido em comparação ao grupo controle. Assim como foi possível verificar uma diminuição do valor de capacidade respiratória mitocondrial R e P para o grupo fumante, também em comparação ao grupo controle. Tais resultados vão de acordo com o estudo realizado por Porter et al (2015), onde, após o protocolo de treinamento resistido, foi observado a melhora da capacidade oxidativa mitocondrial em biopsias de músculo esquelético, de indivíduos saudáveis, atribuído para o aumento da quantidade de mitocôndria no tecido analisado após o treinamento resistido (PORTER et al., 2015).

E quando associado o treinamento a exposição à fumaça de cigarro foi observado a diminuição da capacidade respiratória através de mecanismos ainda não totalmente compreendidos como: o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pela exposição à fumaça de cigarro e ao treinamento, promovendo possíveis danos às mitocôndrias (DEGENS; GAYAN-RAMIREZ; VAN HEES, 2015; KAMOGASHIRA; FUJIMOTO; YAMASOBA, 2015).

Estes resultados mostram claramente a capacidade do sensor proposto para monitorar o consumo de oxigênio com substratos da cadeia respiratória, confirmando a manutenção de uma cadeia respiratória intacta e funcional quando os tecidos estão suspensos no tampão respiratório.

6. Conclusão

Por técnica de eletropolimerização, foi possível obter a formação de um filme polimérico nanocompósito baseado no monômero Bismarck Brown Y e óxido de grafeno.

Ao realizar as investigações comparativas entre o filme nanocompósito e o filme de poli(azo-BBY), foi verificada uma melhora no desempenho eletroquímico do filme de poli(azo-BBY) com a incorporação do óxido de grafeno reduzido em sua matriz polimérica. Demonstrando aumento dos valores de corrente, maior definição dos picos de potenciais do par redox e diminuição dos valores de resistência de transferência de carga do filme.

Pelos estudos eletroquímicos e caracterizações morfológicas foi proposto que a formação do filme nanocompósito ocorre por alternância das camadas de poli(azo-BBY) – rGO durante a eletropolimerização. Onde durante a varredura anódica tem-se a formação do filme polimérico de Bismarck Brown Y e na varredura catódica tem-se a eletrodeposição das folhas de óxido de grafeno. Maiores estudos serão conduzidos para maiores esclarecimentos.

O filme nanocompósito demonstrou satisfatória resposta frente a molécula de oxigênio dissolvido. Através das investigações conduzidas por EIE, foi verificado que há a diminuição dos valores de resistência de transferência de carga quando o filme nanocompósito reage com a molécula de oxigênio dissolvido.

Dessa maneira, foi possível realizar a otimização do sensor quimiorresistor, e através de cronoimpedância, foi construída uma curva de calibração com valores de janela linear de resposta, limite de detecção e quantificação adequados para a aplicação no monitoramento de oxigênio dissolvido de sistemas biológicos.

Por fim, a plataforma sensorial foi aplicada no monitoramento em tempo real do consumo de oxigênio mitocondrial de tecido retirado do músculo gastrocnêmico de ratos submetidos a fumo passivo e a exercício resistido. Demonstrando ser uma ferramenta eficaz no estudo da capacidade respiratória dos complexos constituintes da cadeia transportadora de elétrons.

7. Referências Bibliográficas

- A. BASNAYAKA, P. et al. Graphene/Polypyrrole Nanocomposite as Electrochemical Supercapacitor Electrode: Electrochemical Impedance Studies. **Graphene**, v. 02, n. 02, p. 81–87, 2013.
- ALIZADEH, T.; SOLTANI, L. H. Graphene/poly(methyl methacrylate) chemiresistor sensor for formaldehyde odor sensing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, n. 1, p. 401–406, 2013.
- ARECHEDERRA, R. L.; BOEHM, K.; MINTEER, S. D. Mitochondrial bioelectrocatalysis for biofuel cell applications. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 28, p. 7268–7273, 2009.
- ARECHEDERRA, R.; MINTEER, S. D. Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 23, p. 6698–6703, 2008.
- BALAMURUGAN, A.; CHEN, S. M. Voltammetric oxidation of NADH at phenyl azo aniline/PEDOT modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 129, n. 2, p. 850–858, 2008.
- BANDARA, H. M. D.; BURDETTE, S. C. Photoisomerization in different classes of azobenzene. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 5, p. 1809–1825, 2012.
- BANGHART, M. et al. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 1381–1386, 2004.
- BARD, A. J. et al. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. 2ed. ed. New York: [s.n.].
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 2
- BECK, F. **Electrodeposition of polymer coatings** **Electrochimica Acta**, 1988.
- BHATNAGAR, D. et al. Mitochondrial biofuel cells: expanding fuel diversity to amino acids. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, n. 1, p. 86–92, 2011.
- BYERLY, T. C. **Handbook of Biological Data**. [s.l: s.n.]. v. 118
- CHAUHAN, N. et al. An electrochemical sensor for detection of neurotransmitter-acetylcholine using metal nanoparticles, 2D material and conducting polymer modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 377–383, 2017.
- CHEN, L. et al. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 2, p. 133–137, 2011a.
- CHEN, L. et al. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 2, p. 133–137, 2011b.
- CIHANER, A.; ALGI, F. Electrochemical and optical properties of new soluble dithienylpyrroles based on azo dyes. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 6, p. 1702–1709, 2009.
- COOPER, J. S. et al. Performance of graphene, carbon nanotube, and gold nanoparticle chemiresistor sensors for the detection of petroleum hydrocarbons in water. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 1, 2014.

- CÖRDOBA-TORRES, P.; MESQUITA, T. J.; NOGUEIRA, R. P. Relationship between the origin of constant-phase element behavior in electrochemical impedance spectroscopy and electrode surface structure. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 8, p. 4136–4147, 2015.
- CUI, F.; ZHANG, X. A method based on electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode for sensitive detection of theophylline. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, n. 1, p. 167–173, 2013.
- DE MICHELE, R.; CARIMI, F.; FROMMER, W. B. Mitochondrial biosensors. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 48, n. 1, p. 39–44, 2014.
- DEGENS, H.; GAYAN-RAMIREZ, G.; VAN HEES, H. W. H. Smoking-induced Skeletal Muscle Dysfunction. From Evidence to Mechanisms. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 6, p. 620–625, 2015.
- DIAS, A. R. et al. Enthalpies of formation of cis-azobenzene and trans-azobenzene. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 24, n. 4, p. 439–447, 1992.
- DOMINGUEZ-BENETTON, X. et al. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7228, 2012.
- DOS REIS, M. A. L. et al. Development of a chemiresistor sensor based on polymers-dye blend for detection of ethanol vapor. **Sensors**, v. 10, n. 4, p. 2812–2820, 2010.
- DUBAL, D. P. et al. Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 3044, 2012.
- GAO, W. The chemistry of graphene oxide. **Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications**, p. 61–95, 2015.
- GIROUD, F. et al. Understanding the mechanism of direct electrochemistry of mitochondria-modified electrodes from yeast, potato and bovine sources at carbon paper electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 110, p. 112–119, 2013.
- GIROUSI, S. T. et al. Mitochondria-Based Amperometric Biosensor for the Determination of L-Succinic Acid. **Analytical Letters**, v. 34, n. 7, p. 1079–1086, 2001.
- GNAIGER, E. et al. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 27, n. 6, p. 583–596, 1995.
- GUPTA, S.; PRICE, C. Investigating graphene/conducting polymer hybrid layered composites as pseudocapacitors: Interplay of heterogeneous electron transfer, electric double layers and mechanical stability. **Composites Part B: Engineering**, v. 105, p. 46–59, 2016.
- HAN, T.; VANAMO, U.; BOBACKA, J. Influence of Electrode Geometry on the Response of Solid-Contact Ion-Selective Electrodes when Utilizing a New Coulometric Signal Readout Method. **ChemElectroChem**, v. 3, n. 12, p. 2071–2077, 2016.
- HARTLEY, G. S. 113. The cis-form of azobenzene and the velocity of the thermal cis→trans-conversion of azobenzene and some derivatives. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, n. 0, p. 633–642, 1938.
- HE, Y.; WANG, X.; ZHOU, Q. Epoxy-based azo polymers: Synthesis, characterization and photoinduced surface-relief-gratings. **Polymer**, v. 43, n. 26, p. 7325–7333, 2002.
- HILDER, M. et al. Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions.

Physical Chemistry Chemical Physics, v. 13, p. 9187–9193, 2011.

HOLLIDAY, B. J.; STANFORD, T. B.; SWAGER, T. M. Chemoresistive gas-phase nitric oxide sensing with cobalt-containing conducting metallopolymer. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 24, p. 5649–5651, 2006.

HU, Y. et al. Graphene-gold nanostructure composites fabricated by electrodeposition and their electrocatalytic activity toward the oxygen reduction and glucose oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 1, p. 491–500, 2010.

HUANG, B. et al. Electrochemical impedance spectroscopy study on polymerization of l-lysine on electrode surface and its application for immobilization and detection of suspension cells. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 6940–6947, 2014.

HUANG, H. et al. One-step surface doping of organic nanofibers to achieve high dark conductivity and chemiresistor sensing of amines. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 16, p. 7704–7708, 2013.

HUANG, J. et al. Graphical analysis of electrochemical impedance spectroscopy data in Bode and Nyquist representations. **Journal of Power Sources**, v. 309, p. 82–98, 2016.

HUANG, L.; LI, C.; SHI, G. High-performance and flexible electrochemical capacitors based on graphene/polymer composite films. **J. Mater. Chem. A**, v. 2, n. 4, p. 968–974, 2014.

HUANG, X. et al. Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties, and applications. **Small**, v. 7, p. 1876–1902, 2011.

HUANG, X. et al. Graphene-based composites. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 666–686, 2012a.

HUANG, X. et al. Reduced graphene oxide-polyaniline hybrid: Preparation, characterization and its applications for ammonia gas sensing. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 42, p. 22488–22495, 2012b.

INZELT, G. **Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry**. 2. ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.

JANATA, J.; JOSOWICZ, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. **Nature materials**, v. 2, n. 1, p. 19–24, 2003.

JIANG, B. et al. Highly sensitive electrochemical detection of cocaine on graphene/AuNP modified electrode via catalytic redox-recycling amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 305–308, 2012.

JIANG, Y. et al. Functionalization of graphene with electrodeposited Prussian blue towards amperometric sensing application. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 76–81, 2011.

JIANG, Z. et al. Ethanol chemiresistor with enhanced discriminative ability from acetone based on Sr-doped SnO₂ nanofibers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 437, p. 252–258, 2015.

KAKIAGE, K. et al. A Novel Alkoxysilyl Azobenzene Dye Photosensitizer with Alkylamino Group for Dye-Sensitized Solar Cells. **Silicon**, v. 6, n. 2, p. 123–127, 2014.

KAMOGASHIRA, T.; FUJIMOTO, C.; YAMASOBA, T. Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

KIM, H.; ABDALA, A. A.; MACOSKO, C. W. Graphene/polymer nanocomposites.

Macromolecules, v. 43, n. 16, p. 6515–6530, 2010.

KONICKI, W. et al. Adsorption of anionic azo-dyes from aqueous solutions onto graphene oxide: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 496, p. 188–200, 2017.

KUEH, H. Y.; NIETHAMMER, P.; MITCHISON, T. J. Maintenance of Mitochondrial Oxygen Homeostasis by Cosubstrate Compensation. **Biophys. J.**, v. 104, n. 6, p. 1338, 2013.

KUZNETSOV, A. V et al. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 965–976, 2008.

LANGE, U.; MIRSKY, V. M. Chemiresistors based on conducting polymers: A review on measurement techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 2, p. 105–113, 2011.

LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**. 1. ed. New York: Springer-Verlag New York, 2014.

LAUREYN, W. et al. Characterization of nanoscaled interdigitated palladium electrodes of various dimensions in KCl solutions. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 204–211, 2001.

LEI, H. et al. Resistivity measurements of carbon-polymer composites in chemical sensors: Impact of carbon concentration and geometry. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 101, n. 1–2, p. 122–132, 2004.

LEVIN, O. V. et al. Charge transfer processes on electrodes modified by polymer films of metal complexes with Schiff bases. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 153–161, 2013.

LI, S. et al. The light-switching conductance of an anisotropic azobenzene-based polymer close-packed on horizontally aligned carbon nanotubes. **J. Mater. Chem. C**, v. 5, n. 21, p. 5068–5075, 2017.

LI, Z. H.; GRAHAM, B. H. Measurement of Mitochondrial Oxygen Consumption Using a Clark Electrode. **Methods Mol. Biol.**, v. 837, p. 63, 2012.

LIM, Y. S. et al. Polypyrrole/graphene composite films synthesized via potentiostatic deposition. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 1, p. 224–229, 2013.

LIU, C. et al. Graphene-based supercapacitor with an ultrahigh energy density. **Nano Letters**, v. 10, n. 12, p. 4863–4868, 2010.

LIU, C. et al. Direct electrodeposition of graphene enabling the one-step synthesis of graphene-metal nanocomposite films. **Small**, v. 7, n. 9, p. 1203–1206, 2011.

LIU, Z. et al. Organic photovoltaic devices based on a novel acceptor material: Graphene. **Advanced Materials**, v. 20, n. 20, p. 3924–3930, 2008.

LUCCA, B. G. et al. Electrodeposition of reduced graphene oxide on a Pt electrode and its use as amperometric sensor in microchip electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 36, n. 16, p. 1886–1893, 2015.

MA, S. et al. Reversible photoinduced bi-state polymer solar cells based on fullerene derivatives with azobenzene groups. **Organic Electronics: physics, materials, applications**, v. 23, p. 1–4, 2015.

MACDONALD, D. D. Review of mechanistic analysis by electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 35, n. 10, p. 1509–1525, 1990.

MACDONALD, J. K.; BARSOUKOV, E. **Impedance Spectroscopy**. 2nd. ed. New York: Wiley-Interscience, 2005.

- MAKRECKA-KUKA, M.; KRUMSCHNABEL, G.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1319–1338, 2015.
- MALTZMAN, S. L.; MINTEER, S. D. Mitochondrial-based voltammetric sensor for pesticides. **Analytical Methods**, v. 4, n. 5, p. 1202, 2012.
- MARCU, R. et al. Electrochemical study of hydrogen peroxide formation in isolated mitochondria. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 21–28, 2012.
- MERINO, E.; RIBAGORDA, M. Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 1071–1090, 2012.
- MOEHLNBROCK, M. J. et al. Metabolon catalyzed pyruvate/air biofuel cell. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 18, p. 6288–6289, 2010.
- NAKANO, M. et al. Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 7, p. 709–15, 2011.
- NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666–669, 2004.
- OHSAKA, T. et al. Electrocatalysis of O₂ reduction at poly(o-phenylenediamine)- and poly(o-aminophenol)-coated glassy carbon electrodes. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 1072, 1991.
- OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on π-conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 271, n. March, p. 353–357, 2018.
- ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. Preliminary Graphical Methods. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, p. 333–351, 2008a.
- ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. An Integrated Approach to Impedance Spectroscopy. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, p. 447–459, 2008b.
- ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. Methods for Representing Impedance. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, p. 307–331, 2008c.
- ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. Process Models Chapter 9 Equivalent Circuit Analogs. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, p. 154–162, 2008d.
- ORAZEM, M.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical impedance spectroscopy**. 1. ed. New York: Wiley-Interscience, 2008e.
- PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 217–224, 2009.
- PIRON, F. et al. Electropolymerization of three-dimensional π-conjugated system based on 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT). **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 10, p. 1427–1430, 2008.
- PORTER, C. et al. Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 47, n. 9, p. 1922–1931, 2015.
- PUMERA, M. Graphene-based nanomaterials for energy storage. **Energy and Environmental Science**, 2011.

- PUNETHA, V. D. et al. Functionalization of carbon nanomaterials for advanced polymer nanocomposites: A comparison study between CNT and graphene. **Progress in Polymer Science**, v. 67, p. 1–47, 2017.
- REHAN, H. H. Electrosynthesis of conducting polymer films from the azo dye methoxy red. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 30, n. 8, p. 945–951, 2000.
- REVIN, S. B.; JOHN, S. A. Electropolymerization of 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole on glassy carbon electrode and its electrocatalytic activity towards uric acid. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 24, p. 8934–8940, 2011.
- RIGONI, F. et al. Enhancing the sensitivity of chemiresistor gas sensors based on pristine carbon nanotubes to detect low-ppb ammonia concentrations in the environment. **The Analyst**, v. 138, n. 24, p. 7392, 2013.
- RYAN, T. E. et al. Assessment of *in vivo* skeletal muscle mitochondrial respiratory capacity in humans by near-infrared spectroscopy: a comparison with *in situ* measurements. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 15, p. 3231–3241, 2014.
- SANGHAVI, B. J. et al. Voltammetric determination of sumatriptan based on a graphene/gold nanoparticles/Nafion composite modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 120, p. 1–9, 2014.
- SANGIORGI, N.; SANSON, A. Influence of electropolymerized polypyrrole optical properties on bifacial Dye-Sensitized Solar Cells. **Polymer (United Kingdom)**, v. 125, p. 208–216, 2017.
- SAYYAH, S. M.; EL-DEEB, M. M.; ABDEL-REHIM, S. S. Electropolymerization of 2-amino-4-phenylthiazole and characterization of the obtained polymer films. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 53, n. 11, p. 941–958, 2004.
- SCHEFFLER, I. E. **Mitochondria**. [s.l: s.n.].
- SETHURAMAN, V. et al. A highly sensitive electrochemical biosensor for catechol using conducting polymer reduced graphene oxide–metal oxide enzyme modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 84, p. 112–119, 2016.
- SHAMSIPUR, M. et al. Impedimetric monitoring of apoptosis using cytochrome-aptamer bioconjugated silver nanocluster. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 195–202, 2017.
- SHAO, Y. et al. Graphene-based materials for flexible supercapacitors. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 11, p. 3639–3665, 2015.
- SHAO, Y. L. et al. 3D Freeze-Casting of Cellular Graphene Films for Ultrahigh-Power-Density Supercapacitors. **Adv. Mater.**, v. 28, n. 31, p. 6719, 2016.
- SHAYEH, J. S.; NOROUZI, P.; GANJALI, M. R. Effect of thickness on the capacitive behavior and stability of ultrathin polyaniline for high speed super capacitors. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 52, n. 10, p. 933–937, 2016.
- SHIN, D. et al. Graphene oxide catalyzed cis-trans isomerization of azobenzene. **APL Materials**, v. 2, n. 9, p. 2–7, 2014.
- SHINKAI, S. et al. Photoresponsive Crown Ethers. 8. Azobenzophane-Type “Switched-On” Crown Ethers Which Exhibit an All-or-Nothing Change in Ion-Binding Ability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 7, p. 1851–1856, 1983.
- SILVA, A. M.; OLIVEIRA, P. J. Evaluation of respiration with clark-type electrode in

isolated mitochondria and permeabilized animal cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 810, p. 7–24, 2018.

SONAM, K. et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders in children: Phenotypic, genotypic and biochemical correlations in 85 patients from South India. **Mitochondrion**, v. 32, p. 42–49, 2017.

SUN, Y.; SHI, G. Graphene/polymer composites for energy applications. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 51, n. 4, p. 231–253, 2013.

TAN, F. et al. An electrochemically reduced graphene oxide chemiresistive sensor for sensitive detection of Hg²⁺ ion in water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 226–233, 2016.

TAN, F. et al. Highly sensitive detection of Cr(VI) by reduced graphene oxide chemiresistor and 1,4-dithiothreitol functionalized Au nanoparticles. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 2017.

TAN, J. et al. Effects of processing on all-optical poling characteristics of guest-host azo-dye polymer thin films. **Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science**, v. 204, n. 4, p. 1114–1122, 2007.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. **RSC Adv.**, v. 6, n. 103, p. 101318–101322, 2016a.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. **RSC Adv.**, v. 6, n. 103, p. 101318, 2016b.

VASIL, S. V et al. Electropolymerization of Palladium and Nickel Complexes with Schiff 's Bases. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 39, n. 3, p. 314–317, 2003.

VOROTYNTSEV, M. A.; ZINOVYEVA, V. A.; KONEV, D. V. Mechanisms of Electropolymerization and Redox Activity: Fundamental Aspects. In: **Electropolymerization**. Wiley Online Books. [s.l: s.n.]. p. 27–50.

WANG, G.; PANDEY, R.; KARNA, S. P. Physics and chemistry of oxidation of two-dimensional nanomaterials by molecular oxygen. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 7, n. 1, 2017.

WANG, M. et al. Functional Three-Dimensional Graphene/Polymer Composites. **ACS Nano**, v. 10, n. 8, p. 7231–7247, 2016.

WANG, W. et al. Enhanced catalytic and dopamine sensing properties of electrochemically reduced conducting polymer nanocomposite doped with pure graphene oxide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 153–156, 2014.

WANG, X. **Azo Polymers: Synthesis, Functions and Applications**. 1. ed. Berlin: Springer, 2017.

WANG, Y. et al. Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 4, p. 889–892, 2009.

WEAVER, C. L. et al. A graphene oxide/conducting polymer nanocomposite for electrochemical dopamine detection: origin of improved sensitivity and specificity. **J. Mater. Chem. B**, v. 2, n. 32, p. 5209–5219, 2014.

WEBSTER, M. S. et al. Detection of bacterial metabolites for the discrimination of bacteria utilizing gold nanoparticle chemiresistor sensors. **Sensors and Actuators B:**

Chemical, v. 220, n. 1, p. 895–902, 2015a.

WEBSTER, M. S. et al. Detection of bacterial metabolites for the discrimination of bacteria utilizing gold nanoparticle chemiresistor sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 220, n. 1, p. 895–902, 2015b.

WEI, Y. et al. Review of the recent progress in photoresponsive molecularly imprinted polymers containing azobenzene chromophores. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, n. 5, p. 10–20, 2015.

WORDOFA, D. N. et al. An oligonucleotide-functionalized carbon nanotube chemiresistor for sensitive detection of mercury in saliva. **The Analyst**, v. 141, n. 9, p. 2756–2760, 2016.

WU, C. C. et al. A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 228–234, 2010.

YANG, L. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 193, p. 166–172, 2014.

YANG, W. et al. Flexible conducting polymer/reduced graphene oxide films: synthesis, characterization, and electrochemical performance. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 222, 2015.

YOO, H. D. et al. Impedance analysis of porous carbon electrodes to predict rate capability of electric double-layer capacitors. **Journal of Power Sources**, v. 267, p. 411–420, 2014.

YU, S. S.; ZHENG, W. T.; JIANG, Q. Oxidation of graphene nanoribbon by molecular oxygen. **IEEE Transactions on Nanotechnology**, v. 7, n. 5, p. 628–635, 2008.

ZHANG, B. et al. Conjugated polymer-grafted reduced graphene oxide for nonvolatile rewritable memory. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 49, p. 13646–13652, 2011.

ZHANG, L. et al. Relating Electron Donor and Carboxylic Acid Anchoring Substitution Effects in Azo Dyes to Dye-Sensitized Solar Cell Performance. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, n. 11, p. 1440–1452, 2013.

ZHANG, M. et al. Recent advances in the synthesis and applications of graphene–polymer nanocomposites. **Polym. Chem.**, v. 6, n. 34, p. 6107–6124, 2015.

ZHANG, X. et al. Investigation of optical modulated conductance effects based on a graphene oxide-azobenzene hybrid. **Carbon**, v. 48, n. 11, p. 3236–3241, 2010.

ZHAO, Y. et al. Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 555–566, 2011.

ZHOU, X. et al. A review of graphene-based nanostructural materials for both catalyst supports and metal-free catalysts in PEM fuel cell oxygen reduction reactions. **Advanced Energy Materials**, v. 4, n. 8, p. 1301523, 2014.

ZHU, Y. et al. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 35, p. 3906–3924, 2010.