



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Felipe Fantinato Hudari

Eletrodos impressos descartáveis e de carbono vítreo
modificados com grafeno e compósito de nanotubos de
carbono-quitosana aplicados na determinação de corantes
de cabelo

Felipe Fantinato Hudari

Eletrodos impressos descartáveis e de carbono vítreo
modificados com grafeno e compósito de nanotubos de
carbono-quitosana aplicados na determinação de corantes de
cabelo

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista (Campus de Araraquara)
para obtenção do Título de Mestre em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni
Co-orientador: Dr. Lucio César de Almeida

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

H883e	Hudari, Felipe Fantinato Eletrodos impressos descartáveis e de carbono vítreo modificados com grafeno e compósito de nanotubos de carbono-quitosana aplicados na determinação de corantes de cabelo / Felipe Fantinato Hudari. – Araraquara : [s.n], 2014 113 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maria Valnice Boldrin Zanoni Coorientador: Lucio César de Almeida 1. Química analítica. 2. Eletrodo de carbono. 3. Corantes. 4. Nanotubos de carbono. 5. Grafeno. I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FELIPE FANTINATO HUDARI

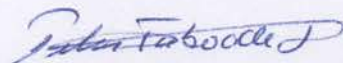
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 04 de agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI (Orientadora)
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Prof^a Dr^a MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Instituto de Química, UNESP – Araraquara.



Prof. Dr. MAGNO APARECIDO GONÇALVES TRINDADE
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UFGD – Dourados.

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Felipe Fantinato Hudari

Nacionalidade: Brasileiro

Data de Nascimento: 08/05/1990

Naturalidade: São José do Rio Preto

Email: felipe_fhudari@hotmail.com

2. ENDEREÇO PROFISSIONAL

Logradouro: Rua Professor Francisco Degni, nº55

CEP: 14801-970

UNESP - Instituto de Química de Araraquara

Departamento de Analítica - Grupo de Eletroanalítica

Araraquara - São Paulo - Brasil

3. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2013 – 2014

Mestrado em Química Analítica.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP – Araraquara/SP.

Título: Eletrodos impressos descartáveis e de carbono vítreo modificados com grafeno e compósito de nanotubos de carbono-quitosana aplicados na determinação de corantes de cabelo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni.

Co-orientador: Dr. Lucio César de Almeida.

2009 – 2012

Graduação em Química Bacharel.

Universidade Estadual de Londrina, UEL – Londrina/PR

Título: Determinação voltamétrica de ácido úrico e n-acetil-p-aminofenol na presença de surfactante catiônico utilizando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley.

4. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013 – Métodos eletroquímicos de análises.

2013 – Espectroscopia de impedância eletroquímica.

2012 – RMN Aplicado e materiais.

2011 – Cromatografia.

5. PRODUÇÕES

5.1. Artigos completos publicados em periódicos

1. Eduardo Henrique Duarte; William Pereira dos Santos; Felipe Fantinato Hudari; José Luiz Bott Neto; Elen Romão Sartori; Luiz Henrique Dall'antonia; Arnaldo César Pereira; César Ricardo Teixeira Tarley. A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid. **Talanta** (Oxford), v. 127, p. 26-32, 2014.

2. Felipe Fantinato Hudari; Lucio César de Almeida; Bianca Ferreira da Silva, Maria Valnice Boldrin Zanoni. Voltammetric sensor for simultaneous determination of p-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 261-268, 2014.

3. Felipe Fantinato Hudari; Eduardo Henrique Duarte; Arnaldo César Pereira, Luiz Henrique Dall'antonia; Lauro Tatsuo Kubota; César Ricardo Teixeira Tarley. Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 696, p. 52-58, 2013.

5.2. Resumos publicados em anais de congressos

1. FELIPE FANTINATO HUDARI; LUCIO CÉSAR DE ALMEIDA; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. SENSOR VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE p-FENILENODIAMINA E RESORCINOL EM CORANTES DE CABELO. In: XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica, 2014, La Serena-Chile. Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica (SIBAE), 2014.

2. FELIPE FANTINATO HUDARI; BESSEGATO, G. G.; LUCIO CÉSAR DE ALMEIDA; FERREIRA, S. L. C.; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. Utilização de planejamento fatorial para determinação voltamétrica do corante basic blue 41 adotando eletrodo impresso de carbono modificado com grafeno. In: V Workshop de Quimiometria, 2014, Camaçari-BA. V Workshop de Quimiometria. Salvador-BA: Editora e Gráfica Vento Leste, 2014.

3. SANTOS, W. P. WILLIAM PEREIRA DOS SANTOS; FELIPE FANTINATO HUDARI; EDUARDO HENRIQUE DUARTE; LUIZ HENRIQUE DALL'ANTONIA; BRAZ, E. J. R. S.; ARNALDO CÉSAR PEREIRA; TARLEY, C. R. T. AVALIAÇÃO DE ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE AMITRIPTILINA USANDO VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL. In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte-MG. ENQA, 2013.

4. FELIPE FANTINATO HUDARI; LUCIO CÉSAR DE ALMEIDA; MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE P-FENILENODIAMINA E RESORCINOL EM TINTURA PERMANENTE DE CABELO UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO DE QUITOSANA/NANOTUBO DE CARBONO. In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013, Belo Horizonte-MG. ENQA, 2013.

5. HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; DUARTE, R. R.; PEREIRA, A. C.; DALL'ANTONIA, L. H.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Voltammetric Method Optimized by Multi-response Assays for the Simultaneous Measures of Uric

Acid and Acetaminophen in Urine in the Presence of Surfactant Using MWCNT Paste Electrode. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão-SP. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013.

6. HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; TARLEY, C. R. T. Sensor Based on Multiwalled Carbon Nanotubes Pasta for Simultaneous Voltammetric Determination of Uric Acid and Paracetamol in Micellar Media. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2012, Florianópolis-SC. Anais da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), 2012.

7. DUARTE, E. H.; HUDARI, F. F.; CLAUSEN, D. N.; TARLEY, C. R. T. Estudo eletroquímico usando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono em meio micelar para determinação de ácido ascórbico e paracetamol. In: Sociedade Ibero-Americana de Eletroquímica, 2012, Fortaleza-CE. Anais da Sociedade Ibero-Americana de Eletroquímica, 2012.

8. HUDARI, F. F.; DUARTE, E. H.; TARLEY, C. R. T. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO E PARACETAMOL UTILIZANDO ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO EM MEIO MICELAR. In: XXVIII Semana da Química e V Jornada de Pós-Graduação em Química, 2012, Londrina-PR. Anais da XXVIII Semana da Química e V Jornada de Pós-Graduação em Química, 2012.

9. DUARTE, E. H.; HUDARI, F. F.; TARLEY, C. R. T. Determinação simultânea de N-acetil-p-aminofenol e ácido ascórbico em meio micelar usando eletrodo de NTC. In: XXVII Semana da Química e IV Jornada de Pós-Graduação em Química, 2011, Londrina-PR. Anais do XXVII Semana da Química e IV Jornada de Pós-Graduação em Química, 2011.

10. DUARTE, E. H.; HUDARI, F. F.; TARLEY, C. R. T. DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA SIMULTÂNEA DE N-ACETIL-P-AMINOFENOL E ÁCIDO ASCÓRBICO EM MEIO MICELAR USANDO ELETRODO DE PASTA DE NANOTUBO DE CARBONO. In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica,

2011, Campos do Jordão-SP. Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 2011

5.3 Iniciação científica

2011-2013: aluno de iniciação científica na Universidade Estadual de Londrina (UEL), orientado pelo Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (Departamento de Química), atuando no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para determinação de fármacos.

2010-2011: estagiário no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), orientado pelo pesquisador Dr. Mário Miyazawa (Departamento de solos), atuando no desenvolvimento de métodos para determinação de nitrogênio.

6. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS

1. XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica. La Serena/Chile. 2014
2. 17º Encontro Nacional de Química Analítica. Belo Horizonte/MG. 2013.
3. SOCIEDADE BRASILEIRA DE POLÍMEROS E MATERIAIS (SBPMat). Florianópolis/SC. 2012.
4. XXVIII SEMANA DA QUÍMICA E V JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL. Londrina/PR. 2012.
5. CONTRIBUIÇÕES HISTÓRICAS DA QUÍMICA À CARACTERIZAÇÃO E USO DE NANOPARTÍCULAS NA SOCIEDADE MODERNA. Londrina/PR. 2011.
6. 16º Encontro Nacional de Química Analítica. Campos do Jordão/SP. 2011.
7. XXVII SEMANA DA QUÍMICA E IV JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL. Londrina/PR. 2011.
8. XXVI SEMANA DA QUÍMICA E III JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UEL. Londrina/PR. 2010.
9. 1º CONGRESSO PARANAENSE DE EDUCAÇÃO EM QUÍMICA (CPEQUI). Londrina/PR. 2009.

Agradecimentos

- A Deus por me dar saúde e poder concretizar mais uma etapa de minha vida;
- À Prof^a. Dr^a. Maria Valnice não apenas pela orientação, mas também pela ajuda, força, crescimento científico e intelectual e pela amizade. Além de orientadora, a senhora é como uma mãe para seus alunos, sempre ajudando o possível para o melhor de nós;
- Meus pais que financiaram e incentivaram minha graduação e que me deram a oportunidade de crescimento e hoje poder concluir mais uma etapa do início da minha caminhada profissional;
- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo amparo e aos professores que, durante o curso, proporcionaram crescimento intelectual, profissional e pessoal;
- Ao grupo de eletroanalítica de Araraquara (GEAr) pelo aprendizado e pelas colaborações;
- Aos piás (Lúcio e Guilherme), catita (Acelino), Harry (Marcos) e Thais, que foram mais do que colegas de trabalho, mas sim amigos;
- À Livia que muito me apoiou e me ajudou nos bons, mas, principalmente, nos piores momentos. Por estar do meu lado me fazendo feliz e, principalmente, pelas tardes depois do almoço na pracinha;
- Aos colegas que sempre ajudaram em dificuldades e que fizeram deste curso muito especial.

RESUMO

Em virtude do alto consumo de corantes de cabelo e sua alta diluição em efluentes e estações de tratamento de água após tratamento incompleto, a demanda por métodos analíticos cada vez mais sensíveis e robustos para sua quantificação é altamente pertinente. Diante disso, o presente trabalho descreve a construção de dois sensores eletroquímicos para quantificação de corantes de cabelo. O primeiro consiste no desenvolvimento de um eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de MWCNTs-CHT para determinação simultânea de PPD e RSN em amostras comerciais de tintura permanente de cabelo e em amostras de água de torneira. A I_{pa} obtida para PPD e RSN são 60% e 100% maiores, respectivamente, quando são comparadas ao eletrodo sem modificação. A reação entre ambos foi monitorada pelas técnicas de espectrofotometria na região UV-Vis, espectrometria de massas e oxidação eletroquímica, onde foi possível diagnosticar a formação da Base de Bandrowski e outros produtos correspondentes à coloração do cabelo. Uma curva analítica foi construída para PPD e RSN com relação linear entre 0,55 a 21,20 mg L⁻¹ e limites de detecção de 0,79 e 0,58 mg L⁻¹, respectivamente. O método foi aplicado em amostras de água de torneira com recuperações em torno de 100% e em amostra da tintura de cabelo comercial (EMBELLEZE MAXTON® (2.0 preto natural)), encontrando-se 24,10 e 10,34 mg g⁻¹ de tintura para PPD e RSN, respectivamente. O método foi validado por espectrofotometria. Outro método eletroanalítico foi desenvolvido usando eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno para determinação do corante temporário BA-41 em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R pH 6,90. A corrente de pico é 1.300% maior quando comparada aos eletrodos de carbono impresso e carbono vítreo, ambos sem modificação. Utilizando-se a técnica de onda quadrada, os parâmetros foram otimizados através de planejamento fatorial 2⁴ e matriz de Doehlert. Sob condições otimizadas de f (67 Hz), pH (6,90), ΔE (128 mV) e E_{sw} (6 mV), construiu-se uma curva analítica com faixa linear entre 7,24 a 48,70 x 10⁻⁵ g L⁻¹ para BA-41 com L.D. e L.Q. de 0,239 e 0,798 µg L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Eletrodo modificado, corantes de cabelo, *p*-fenilenodiamina, resorcinol, básico azul 41, grafeno, MWCNT, métodos eletroanalíticos.

ABSTRACT

Due to the use of dyes hair and the your high dilution in wastewater and water treatment plants after incomplete treatment, the demand for increasingly sensitive and robust analytical methods for its quantification is highly relevant. Thus, the present work describes the construction of two sensors for quantification of hair dyes. The first was the development of a glassy carbon electrode modified with composite MWCNTs-CHT for simultaneous determination of PPD and RSN in samples of commercial hair dye and in samples of tap water. The I_{pa} of RSN and PPD presented 60% and 100% increase, respectively, in modified electrode compared to the electrode without modification. The reaction between both was monitored by spectrophotometry in the region UV-Vis, mass spectrometry and electrochemical oxidation where it was possible to diagnose the formation of the Bandrowski base and other related products the hair coloring. An analytical curve for PPD and RSN was constructed and finding a linear range in the interval of 0.55 to 21.2 mg L⁻¹ with detection limit of 0.79 and 0.58 mg L⁻¹, respectively. The method was applied to samples of tap water with recovery around 100% and in sample of commercial hair dye (EMBELLEZE MAXTON® (2.0 preto natural)), finding 24.10 and 10.34 mg g⁻¹ of dye for PPD and RSN, respectively. The method was valeted by spectrophotometry. Other electroanalytical method was developed using screen printed electrode modified with grapheme for determining of the temporary dye BA-41 in 0,1 mol L⁻¹ of B-R buffer pH 6,90. The peak current is 1,300% greater when compared with screen printed and glassy carbon electrodes, both unmodified. Through the technique of square wave voltammetry, the method was optimized of multivariate form using factorial design 2⁴ and Doehlert matrix. Under optimized conditions of f (67 Hz), pH (6,90), ΔE (128 mV) and E_{sw} (6 mV), we constructed a calibration curve with a linear range between 7.24 to 48.70 x 10⁻⁵ g L⁻¹ for BA-41 with D.L. and Q.L. of 0.239 and 0.798 μ g L⁻¹, respectively.

Keywords: Modified electrode, hair dyes, *p*-phenylenediamine, resorcinol, basic blue 41, graphene, MWCNT, electroanalytical methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos nanotubos de carbono na forma de camada simples (SWCNT) e na forma de multicamadas (MWCNT).....	29
Figura 2 – Ilustração de um modelo de eletrodo impresso em cerâmica “screen-printed”. R = eletrodo de pseudo-referência (Ag/AgCl), A = eletrodo auxiliar (tinta de carbono ou ouro), W = eletrodo de trabalho (tinta de carbono) e C = contato elétrico.....	32
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura para eletrodo de carbono vítreo sem modificação para aplicações de 500 (A) e para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs-CHT para aproximações de 500 (B), 1.000 (C) e 5.000 vezes (D).....	42
Figura 4 – Espectros de energia dispersiva de raios X para eletrodo de carbono vítreo sem (I) e com (II) modificação pelo composto MWCNTs-CHT.....	43
Figura 5 – Voltamogramas cíclicos para 11,00 mg L ⁻¹ de PPD (I) e RSN (II) em 0,10 mol L ⁻¹ de tampão B-R (pH 7,00) em MWCNT-CHT/GCE. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	44
Figura 6 – Voltamogramas cíclicos para 11,00 mg L ⁻¹ de PPD e RSN em 0,10 mol L ⁻¹ de tampão B-R (pH 7,00) em GCE (a) e MWCNT-CHT/GCE (b). Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	45
Figura 7 – Voltamogramas de varredura linear para determinação simultânea de 11,00 mg L ⁻¹ de PPD e RSN em 0,10 mol L ⁻¹ de tampão B-R em pH de 5 (a), 6 (b), 7 (c), 8 (d) e 9 (e) (I). Relação entre E_{pa} vs pH (curvas a e b) e I_{pa} vs pH (curvas c e d). Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	49

Figura 8 – Voltamogramas de varredura linear para 11,00 mg L⁻¹ de PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (a), tampão B-R (b), tampão fosfato (c) e cloreto de sódio (d) todos em pH 8,00 (I). Relação entre I_{pa} vs eletrólito suporte (II). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.....51

Figura 9 – Espectros de UV-Vis para solução contendo 2 mg mL⁻¹ de PPD em tampão fosfato salino (pH 7,20) (a) em meio de O₂ (I) e em meio de 2% (m/v) de H₂O₂ (II) nos tempos de 0 (b), 6 (c), 16 (d) e 24 h (e).....52

Figura 10 – Espectros de UV-Vis para de 11,00 mg L⁻¹ de PPD em 0,10 mol L⁻¹ de solução amoniacal (a) (pH 8,00) na ausência (I) e na presença (II) de 1% de peróxido de hidrogênio nos tempos 0 (b), 20 (c), 40 (d), 60 (e), 80 (f), 100 (g) e 120 min (h).56

Figura 11 – Espectros de UV-Vis para de 11,00 mg L⁻¹ de RSN em 0,10 mol L⁻¹ de solução amoniacal (a) (pH 8,00) na ausência (I) e na presença (II) de 1% de peróxido de hidrogênio nos tempos 0 (b), 20 (c), 40 (d), 60 (e), 80 (f), 100 (g) e 120 min (h).....57

Figura 12 – Espectros para soluções de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (a) (pH 8,00) variando-se a concentração de RSN em 21,60 (b), 55,00 (c), 75,70 (d) e 108,00 mg L⁻¹ (e), fixando PPD em 11, 00 mg L⁻¹ (I) e variando-se a concentração de PPD de 21,60 (b), 55,00 (c), 75,70 (d) e 108,00 mg L⁻¹ (e), fixando RSN em 11,00 mg L⁻¹.....58

Figura 13 – Figura 13 – LC-MS/MS para 75,70 mg L⁻¹ de PPD e 11,00 mg L⁻¹ de RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) com 1% de H₂O₂.....59

Figura 14 – Voltametria de varredura linear para o monitoramento da reação entre PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) em meio de 1% de peróxido de hidrogênio (I) na presença de 75,70 mg L⁻¹ de PPD (II) e na presença de 75,70 mg L⁻¹ de PPD e 11,00 mg L⁻¹ de RSN (III). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.....62

Figura 15 – Voltamogramas de varredura linear em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) para PPD e RSN nas seguintes concentrações: a (a), 0,55 (b), 1,10 (c), 2,20 (d), 3,30 (e), 4,40 (f), 6,00 (g), 7,60 (h), 9,20 (i), 10,80 (j), 12,90 (k), 15,00 (l), 17,10 (m) e 21,20 mg L⁻¹ (n). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹63

Figura 16 – Relação linear entre I_{pa} vs [PPD] e I_{pa} vs [RSN] no intervalo de 0,55 a 21,2 mg L⁻¹ em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00).....64

Figura 17 – Voltamogramas de varredura linear em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (a) fixando RSN em 2,16 mg L⁻¹ e variando PPD em 0,55 (b), 1,10 (c), 2,20 (d), 3,30 (e), 4,40 (f), 6,05 (g), 7,70 (h), 9,40 (i), 10,81 (j), 12,95 (k), 15,08 (l) e 17,20 mg L⁻¹ (m) (I) e relação linear entre I_{pa} vs [PPD] (II). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹65

Figura 18 - Voltamogramas de varredura linear em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (a) fixando PPD em 2,16 mg L⁻¹ e variando RSN em 0,55 (b), 1,10 (c), 2,20 (d), 3,30 (e), 4,40 (f), 6,05 (g), 7,70 (h) e 9,40 mg L⁻¹ (i) (I) e relação linear entre I_{pa} vs [RSN] (II). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹65

Figura 19 – Voltamogramas de varredura linear para MWCNTs-CHT/GCE em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) (a), adição de 100 µL da amostra (b) e sucessivas adições de solução padrão de PPD e RSN nas concentrações 2,20 (c), 3,36 (d), 4,35 (e), 5,50 (f), 7,10 (g), 8,60 (h) e 10,90 mg L⁻¹ (i) (I). Relação linear entre I_{pa} vs [PPD] e I_{pa} vs [RSN] (II). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹67

Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura para eletrodo de carbono impresso para ampliações de 5.000 (A), 20.000 (B), 50.000 (C) e 100.000 vezes (D).....68

Figura 21 – Microscopia eletrônica de varredura para eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno para ampliações de 5.000 (A), 20.000 (B), 50.000 (C) e 100.000 vezes (D).....69

Figura 22 – Voltamogramas cíclicos registrados para 48,25 mg L⁻¹ de BA-41 em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 7,30) sobre GCE (a), ECI (b) e ECIMG (c). Velocidade de varredura de 75 mV s⁻¹.....70

Figura 23 – Voltamogramas cíclicos em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,30) (a) para 48,26 mg L⁻¹ de BA-41 fazendo-se replicas com BA-41 na célula eletroquímica (I) e replicas deixando o eletrodo em béquer com BA-41 por 45 s e analisando na célula eletroquímica apenas com eletrólito suporte (II) no ECIMG. Velocidade de varredura de 75 mV s⁻¹.....71

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos para 24,13 mg L⁻¹ de BA-41 em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,30) nas velocidades de varredura de 2 (a), 5 (b), 7 (c), 10 (d), 20 (e), 30 (f), 40 (g), 50 (h), 75 (i), 100 (j), 150 (k), 200 (l), 300 (m), 400 (n), 500 (o) e 600 mV s⁻¹ (p) (I) e relação linear entre I_{pa} vs v e I_{pc} vs v (II). t_{ac}: 45 s.....72

Figura 25 – Voltametria cíclica para solução de 1 mmol L⁻¹ de Fe²⁺/Fe³⁺ em meio de 0,10 mol L⁻¹ de KCl em velocidade de varredura de 2 (a), 5 (b), 7 (c), 10 (d), 20 (e), 30 (f), 40 (g), 50 (h), 75 (i), 100 (j), 150 (k), 200 (l), 300 (m) e 400 mV s⁻¹ (n) (I) e relação linear entre I_{pa} vs v e I_{pc} vs v (II).....73

Figura 26 – Voltametria de varredura linear (I), pulso diferencial (II) e onda quadrada (III) em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,30) para 4,82 mg L⁻¹ de BA-41 em ECIMG. t_{ac}: 45 s.....74

Figura 27 – Voltamogramas de onda quadrada para os experimentos 1 (f= 100 Hz, E_{sw}= 10 mV, pH= 8 e ΔE= 100 mV) (a), 2 (f= 100 Hz, E_{sw}= 10 mV, pH= 3 e ΔE= 100 mV) (b) e 17 (f= 16,5 Hz, E_{sw}= 6 mV, pH= 5,5 e ΔE= 55 mV) (c) do planejamento fatorial 2⁴.....75

Figura 28 – Diagrama de Pareto das respostas obtidas no planejamento.....77

Figura 29 – Superfícies de resposta fixando o pH em 6 (a), f em 60 Hz (b) e ΔE em 80 mV (c).....79

Figura 30 – Voltamogramas de onda quadrada em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 6,90) para BA-41 nas concentrações de 0 (a), 7,24 (b), 14,47 (c), 19,78 (d), 24,61 (e), 29,43 (f), 39,10 (g) e $48,70 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ (h). f : 67 Hz, ΔE : 128 mV, E_{sw} : 6 mV, t_{ac} : 45 s.....80

Figura 31 – Relação linear entre I_{pa} vs [BA-41] no intervalo de 7,24 a $48,70 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 6,90).....81

Figura 32 – Voltamogramas de onda quadrada para ECIMG em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 6,90) (a), adição de 50 μL da amostra (b) e sucessivas adições de solução padrão de BA-41 nas concentrações 8,50 (c), 13,75 (d), 23,80 (e), 33,80 (f), 44,90 (g) e $54,40 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ (h) (I). Relação linear entre I_{pa} vs [BA-41] (II).....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Corantes utilizados em tinturas temporárias de cabelo.....	25
Tabela 2 – Produtos encontrados através da oxidação de PPD exposto ao ar atmosférico e em meio de peróxido de hidrogênio.....	54
Tabela 3 – Substâncias encontradas para reação entre PPD e RSN antes e depois da adição de 1% de H ₂ O ₂ analisadas por LC-MS/MS.....	60
Tabela 4 – Recuperação de PPD e RSN em água de torneira fortificada com 2,74 mg L ⁻¹	66
Tabela 5 – Determinação de PPD e RSN em amostra de corante de cabelo utilizando o método proposto e técnica de espectrofotometria UV-Vis.....	67
Tabela 6 – Parâmetros e níveis estudados no planejamento fatorial 2 ⁴	74
Tabela 7 – Resultados do planejamento fatorial 2 ⁴ expressos em termos de desejabilidade.....	76
Tabela 8 – Matriz de Doehlert utilizada para otimização do ΔE, <i>f</i> e pH.....	78
Tabela 9 – Recuperações de BA-41 em água de torneira fortificada com 5,50 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	82

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	46
Equação 2.....	46
Equação 3.....	47
Equação 4.....	47
Equação 5.....	48
Equação 6.....	48
Equação 7.....	75
Equação 8.....	76
Equação 9.....	76
Equação 10.....	77
Equação 11.....	79
Equação 12.....	79
Equação 13.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

PPD: p-fenilenodiamnina

RSN: Resorcinol

BB: Base Bandrowski

BA-41: Básico azul 41

CNT: nanotubo de carbono

SWNTs: nanotubo de carbono camada simples

MWNTs: nanotubo de carbono multicamada

MWNTs-CHT/GCE: Eletrodo de carbon vítreo modificado com nanotubo de carbono multicamadas-Quitosana

GCE: Eletrodo de carbon vítreo

LC-MS/MS: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas

t_r: tempo de retenção

EDS: Energia dispersiva de raios X

ECI: Eletrodo de carbono impresso

ECIMG: Eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno

t_{ac}: tempo de acúmulo

PQD: p-quinonadiimina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Análise de corantes de cabelo no ambiente.....	22
1.1.1. Corantes de cabelo permanentes.....	23
1.1.2. Corantes de cabelo temporários.....	24
1.2. Métodos para determinação de corantes.....	26
1.3. Técnicas voltamétricas.....	28
1.4. Sensores eletroquímicos.....	28
1.4.1. Eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono.....	29
1.4.2. Eletrodos de carbono impresso modificados com grafeno.....	31
1.5. Otimização multivariada em métodos eletroanalíticos.....	33
2. OBJETIVO.....	36
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
3.1. Reagentes.....	37
3.2. Equipamentos.....	37
3.3. Preparação do eletrodo de MWCNTs-CHT/GCE.....	38
3.4. Medidas eletroquímicas.....	38
3.4.1. Determinação simultânea de PPD e RSN.....	38
3.4.2. Determinação do corante BA-41.....	39
3.5 Aplicação do método.....	39
3.5.1. Monitoramento da reação entre PPD e RSN.....	39
3.5.2. Análise de PPD e RSN em água de torneira.....	40
3.5.3. Análise de PPD e RSN em amostra comercial de tintura de cabelo.....	40
3.5.4. Análise do corante BA-41 em água de torneira.....	41
3.6. Otimização do método para determinação de BA-41 por voltametria de onda quadrada.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-CHT para determinação simultânea de PPD e RSN.....	42
4.1.1. Caracterização morfológica dos eletrodos de carbono vítreo sem e com modificação por compósito de MWCNT-CHT.....	42

4.1.2. Oxidação voltamétrica de PPD e RSN sobre GCE e MWCNTs-CHT/GCE.....	43
4.1.3. A influência da velocidade de varredura na oxidação de PPD e RSN.....	45
4.1.4. O efeito do pH na oxidação de PPD e RSN.....	47
4.1.5. Efeito do eletrólito suporte na determinação de PPD e RSN.....	50
4.1.6. Monitoramento da reação de PPD na presença de agente oxidante.....	52
4.1.7. Influência do peróxido de hidrogênio na reação entre PPD e RSN.....	55
4.1.8. Aplicação do sensor voltamétrico na determinação dos produtos da reação entre PPD e RSN em meio de H ₂ O ₂	61
4.1.9. Desempenho analítico.....	62
4.1.10. Aplicação analítica do método proposto.....	66
4.2. Análise do corante básico azul 41 sobre eletrodo de carbono impresso.....	68
4.2.1. Caracterização morfológica dos eletrodos impressos.....	68
4.2.2. Redução voltamétrica do corante BA-41.....	69
4.2.3. O efeito da velocidade de varredura no processo redox do BA-41.....	71
4.2.4. Otimização do método.....	73
4.2.5. Desempenho analítico.....	80
4.2.6. Aplicação analítica do método.....	81
5.CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE I: Cromatograma de íons totais para reação de PPD em meio de O₂ (a) e H₂O₂ (b) após 24 h.....	94
APÊNDICE II: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 107.....	95
APÊNDICE III: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 109.....	96
APÊNDICE IV: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 302.....	97

APÊNDICE V: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 318.....	98
APÊNDICE VI: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 319.....	99
APÊNDICE VII: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 527.....	100
APÊNDICE VIII: Cromatograma de íons totais para reação entre PPD e RSN em meio de H ₂ O ₂ após 30 min.....	101
APÊNDICE IX: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 111.....	102
APÊNDICE X: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 215.....	103
APÊNDICE XI: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 321.....	104
ANEXO I.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Análise de corantes de cabelo no ambiente

A mudança da coloração do cabelo é uma prática muito utilizada entre homens e mulheres. Como exemplo, pesquisas recentes mostram que 8-25% dos homens e 75% das mulheres no mundo usam tintura para o cabelo. Estes números são ainda maiores no Japão, cuja coloração do cabelo chega a 41% entre meninas adolescentes, 85 % das mulheres na faixa de 20 anos e 33 % para os homens na faixa de 20 anos^{1; 2}.

De modo geral, os processos de tintura de cabelo são classificados pelo modo de fixação em: permanente, semi-permanente ou por período temporário³. Os corantes permanentes são aqueles com características oxidantes e necessitam da abertura do córtex pela ação de peróxido de hidrogênio em meio amoniacal, conferindo-lhe alta duração. Os corantes temporários e semi-permanentes são depositados no fio de cabelo através de interações e são removidos nas primeiras lavagens. Ainda são encontrados os sais metálicos que são usualmente utilizados para tintura de cabelos grisalhos, onde geralmente são baseados em acetato de chumbo e, por fim, os corantes naturais, que são extraídos de plantas, sendo que a maioria utiliza o corante henna^{4; 5}.

Com o desenvolvimento tecnológico deste mercado que procura produtos com baixo preço e alta fixação, grande atenção tem sido despertada quanto aos aspectos toxicológicos, genotóxicos e carcinogenese em virtude da alta exposição humana⁶. Muitas formulações de tinturas capilares podem conter em sua composição ou até mesmo, formar após reações no córtex grupos azo, nitro, aminas e outros derivados que podem causar reações alérgicas, dermatites de contato, asma e outros processos oriundos do contato direto do trabalhador e do usuário com o produto^{4; 7; 8; 9}. Os problemas toxicológicos e mutagênicos dos produtos usados nas tinturas de cabelo requerem avaliações não apenas dos agentes precursores da tintura nos processos permanentes ou corantes diretos básicos e ácidos nos processos temporários e semipermanentes, mas também, com os outros ingredientes usados na formulação comercial. Por exemplo, AMES et al.¹⁰ foram pioneiros

nos estudos relacionados a mutagênese dos corantes de cabelo. Em outro trabalho, estudos mostram a possível mutagenicidade em leveduras e insetos destes produtos desde 1980¹⁰.

Alguns estudos tem demonstrado que os corantes de cabelo permanentes são os mais perigosos quando utilizado *p*-fenilenodiamina (PPD), como precursor, e resorcinol (RSN) como agente acoplador. A reação entre eles ocorre no córtex, em meio de amônia e H₂O₂. No entanto, diversos autores tem demonstrado que alguns dos produtos formados apresentam grandes efeitos mutagênicos e carcinogênicos^{4; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17}.

Estudos epidemiológicos têm examinado profissionais que são comumente expostos a esses produtos, como barbeiros, cabeleireiros e usuários de tintas capilares e isto tem correlacionado com o aumento da incidência de câncer de bexiga, mama e outras neoplasias^{18; 19; 20}. Nos últimos anos, há uma grande demanda por testes preditivos para potenciais riscos carcinogênicos e riscos mutagênicos destes produtos, bem como métodos analíticos capazes de monitorar estes compostos e seus derivados em diversas matrizes ambientais.

Dados fornecidos pela associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), revelam um aumento na produção de tinturas capilares no período compreendido entre 2000-2004 de 979.202 para 1.116.115 toneladas de corante de cabelo²¹. Com a crescente utilização destes produtos, um problema ambiental e social é a grande geração de resíduos provenientes dos salões de cabeleireiro e uso doméstico que são descartados sem o devido tratamento em redes de esgoto municipais.

1.1.1. Corantes de cabelo permanentes

Dentre todos os tipos de tinturas de cabelo, os corantes permanentes é o grupo mais importante, representando cerca de 80% dos corantes usados no mercado mundial devido principalmente à sua durabilidade, versatilidade e facilidade de aplicação^{4; 5}. Este tipo de corante é fornecido na forma de kits constituídos basicamente por três componentes: um agente precursor, sendo usualmente aminas aromáticas, tais como *p*-fenilenodiamina (PPD) e *p*-aminofenol; um agente acoplador que consiste em compostos aromáticos com

grupos doadores de elétrons tais como resorcinol (RSN) e naftol e o último componente consiste em um agente oxidante (H_2O_2) em meio alcalino, usualmente meio amoniacal^{22; 23}. Estas substâncias reagem entre si formando compostos coloridos sob condições oxidantes após penetração no córtex. É uma reação complexa capaz de resistir a várias lavagens de cabelo sem alteração da cor^{4; 5; 6; 24; 25}.

Usualmente, os corantes capilares do tipo permanentes utilizam a PPD e RSN como agentes precursor e acoplador, respectivamente. Alguns autores mostram que uma reação paralela consta na oxidação da PPD e formação do dímero denominado Base Bandrowski (BB). Muitos autores tem chamado a atenção para as composições capazes de formar estes produtos secundários, principalmente os produtos de dimerização que estão associados a diversas reações alérgicas e possíveis propriedades carcinogênicas^{11; 26; 27; 28; 29; 30}.

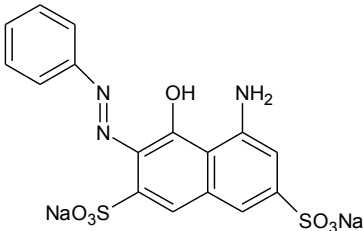
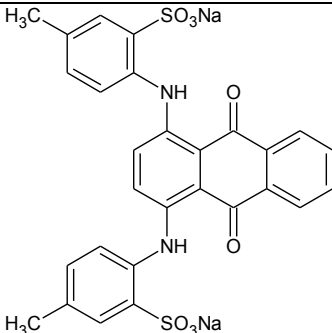
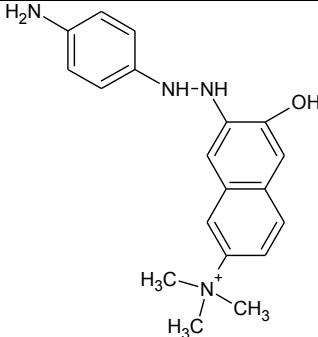
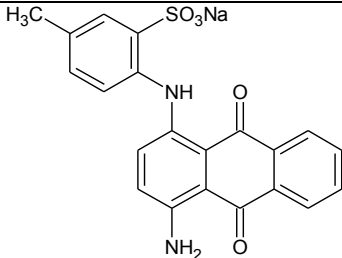
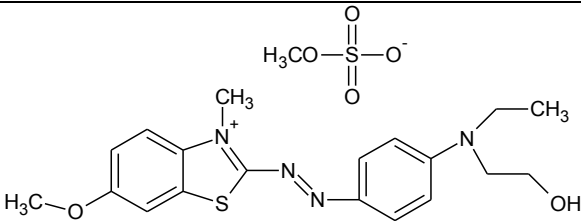
1.1.2. Corantes de cabelo temporários

Os corantes temporários são utilizados com o intuito de proporcionar uma mudança rápida na coloração do cabelo e são comercializados na forma de loções, xampus, sprays, dentre outros. Estes corantes usados na tintura temporária usualmente envolvem corantes do tipo básicos e ácidos de alto peso molecular com alta solubilidade em meio aquoso, sendo menos tóxicos que as tinturas permanentes e semi-permanentes^{6; 31}. Diferentemente dos corantes permanentes, as tinturas temporárias são facilmente removidas³², uma vez que os corantes são depositados no fio de cabelo através de interações de Van der Waals ou simples adsorção, não sendo necessária etapa de abertura do fio de cabelo (córtex) por agentes oxidantes em meio alcalino. Os corantes utilizados neste tipo de tintura interagem preferencialmente com proteínas presentes na cutícula do fio de cabelo²³. Na Tabela 1 são mostrados alguns corantes que são utilizados nas formulações comerciais de tinturas de cabelo do tipo temporárias.

Dentre as substâncias apresentadas na Tabela 1, o corante Básico azul 41 (BA-41) é amplamente utilizado em formulações de corantes sintéticos. Além disso, este corante pode ser utilizado com indicador eletroquímico em reações com DNA, como descrito no trabalho de YOLA e co-autores³³. Assim,

devido a sua grande utilização e ausência de métodos para sua determinação em meio aquoso, seria importante desenvolver novos métodos para sua quantificação.

Tabela 1 – Corantes utilizados em tinturas temporárias de cabelo.

Nome	Estrutura
Vermelho ácido 33	
Verde ácido 25	
Marrom básico 16	
Violeta ácido 43	
Básico azul 41	

1.2. Métodos para determinação de corantes

Em virtude da alta diluição destes corantes e seus derivados em efluentes e estações de tratamento de água e a grande utilização desses produtos, além de controvérsias quanto à sua toxicidade e mutagenicidade, os corantes de cabelo passaram a ser monitorados e regulados por diversas agências reguladoras⁵. Com isso, métodos analíticos cada vez mais sensíveis e robustos são procurados para sua quantificação em matrizes ambientais.

No trabalho de ÁVILA et al., os pesquisadores desenvolveram um método baseado na combinação da extração por fluído supercrítico seguido por análises por cromatografia líquida com detecção de arranjos de diodo (DAD) para determinação dos diferentes tipos do corante sudan (sudan I, sudan II, sudan III e sudan IV), usado como adulterante em alimentos. A faixa linear das curvas de calibração e os limites de detecção encontrados para os diferentes tipo do corante sudan ficaram na faixa de 50 a 1000 ng mL⁻¹ e 23,2 a 42,0 ng mL⁻¹, respectivamente³⁴. Para esse mesmo corante, YAN e co-autores propuseram um método através de medidas por cromatografia líquida acoplada a extração em fase sólida utilizando microesferas molecularmente impressas. Sob as melhores condições experimentais, o limite de detecção para os diferentes tipos do corante sudan ficaram na faixa de 5 a 9 ng g⁻¹ com faixa linear no intervalo de 0,031 a 4,0 µg g⁻¹³⁵.

Para a determinação simultânea dos isômeros *o*, *m* e *p*-fenilenodiamina e dos isômeros *o* e *m*-dihidroxibenzeno, DONG e colaboradores utilizaram eletroforese capilar acoplada com detecção amperométrica para análises em corantes de cabelo. A separação dos cinco componentes foram realizadas em meio de soluções tampão borato (0,30 mol L⁻¹) e fosfato (0,40 mol L⁻¹) em pH 5,80. Com isso, uma faixa linear foi encontrada no intervalo de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limites de detecção menores que 10^{-7} mol L⁻¹³⁶.

Em outro trabalho, NARITA et al. desenvolveram um método para determinação simultânea de sete aminofenóis, resorcinol e *p*-fenilenodiamina em produtos de tintura capilar analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica. A separação foi realizada em coluna fase reversa C18 em modo isocrático com fase móvel contendo mistura de 0,1 mol L⁻¹ de tampão acetato (pH 4,50) e metanol (90:10%, v/v) com vazão de 0,8

mL min⁻¹. Sob estas condições, a faixa linear e os limites de detecção para os sete aminofenóis, resorcinol e *p*-fenilenodiamina ficaram no intervalo de 0,03 a 3 µg L⁻¹ e 1,5 a 4,0 µg L⁻¹, respectivamente³⁷.

No entanto, embora sejam métodos altamente eficientes na separação dos analitos de interesse, requerem muito tempo de análise, são pouco econômicos, geram muitos resíduos (principalmente solventes orgânicos) e não alcançam níveis de detecção compatíveis com o requerido em matrizes diluídas como águas superficiais e efluentes de estações de tratamento de água.

De acordo com a literatura, alguns trabalhos são encontrados para determinação de corantes através de técnicas eletroquímicas. No trabalho de RADI et al., os autores desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação do corante têxtil preto reativo 5 utilizando eletrodo de carbono vítreo. Através de medidas por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em solução de 0,2 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 4,20), o limite de detecção encontrado foi de 4×10^{-7} mol L⁻¹³⁸.

Em outro trabalho, MEIJU e co-autores quantificaram o corante Sudan I, utilizado como adulterante em alimentos, pela técnica de voltametria cíclica utilizando eletrodo de carbono vítreo ativado por ciclagens no intervalo de 0 a 1,2 V em 0,25 mol L⁻¹ de tampão Britton-Robinson. Através da pré-concentração do analito por 3 min, foi possível encontrar limite de detecção de $7,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹³⁹.

A modificação do eletrodo de carbono vítreo com poli-L-lisina foi descrito por VIANA e colaboradores para a determinação do corante têxtil Cibracon Blue F3GA. As análises foram realizadas em tampão Britton-Robinson (pH 2,00) utilizando a técnica de voltametria cíclica. Com a pré-concentração da amostra por 10 minutos, o valor encontrado para o limite de quantificação foi de $4,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹⁴⁰.

Em outro trabalho, OLIVEIRA e ZANONI propuseram um eletrodo de nanotubos de Ti/TiO₂ para redução do corante de cabelo marrom básico 17 através da técnica de voltametria linear. Assim, em meio de 0,04 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 6,00), o limite de detecção encontrado foi de $1,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com faixa linear no intervalo de $1,0 \times 10^{-6}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹⁴¹.

Deste modo, considerando que os métodos eletroanalíticos usualmente oferecem alta sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio, novos métodos voltamétricos seriam de grande importância para análise de corantes em matrizes complexas.

1.3. Técnicas voltamétricas

A voltametria compreende um ramo das técnicas eletroquímicas, nas quais os fenômenos ocorrem na dupla camada elétrica entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução adjacente⁴². Sua utilização pode ser de grande utilidade na química analítica, pois permite reações de oxidação e/ou redução, transferência eletrônica, cinética e etc, de uma determinada substância, quando submetida a uma diferença de potencial. Além disso, os métodos eletroanalíticos se destacam principalmente por serem sensíveis, seletivos, alta praticidade, possibilidade de monitorar especiação das espécies, baixo uso de reagentes e são metodologias ambientalmente amigáveis^{42; 43}. Diante destas características intrínsecas das técnicas, muitos trabalhos eletroanalíticos são encontrados na literatura para determinação de diversos analitos como fármacos^{44; 45; 46; 47}, herbicidas^{48; 49}, metais^{50; 51; 52}, corantes^{38; 39; 40; 41}, dentre outros.

Nos últimos anos, aliados às propriedades das técnicas voltamétricas, a modificação da superfície de eletrodos de trabalho tem ganhado notoriedade para-se buscar métodos analíticos ainda mais sensíveis.

1.4. Sensores eletroquímicos

A eletroanalítica é um dos ramos da química analítica com alta diversidade de técnicas disponíveis, permitindo a determinação de compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos nas mais variadas matrizes, com possibilidade de monitoramento do analito em solventes aquosos e não aquosos^{53; 54}.

Diante disso, nas últimas décadas, tem mostrado grande evolução no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Estes são dispositivos capazes de oferecer características analíticas importantes, tais como sensibilidade,

estabilidade de resposta, precisão, resposta rápida, praticidade de uso e baixo custo, sendo possível a utilização de eletrodos modificados por grupos específicos em sua superfície⁵³. Estes sensores poderiam ser de grande valia para monitoramento de corantes de tintura de cabelo, por exemplo, em matrizes ambientais e formulação comercial.

Com isso, no presente trabalho, pretende-se explorar a modificação de eletrodos com nanotubos de carbono e grafeno.

1.4.1. Eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono

Desde a sua descoberta em 1991 pelo pesquisador Iijima⁵⁵, os nanotubos de carbono (CNT) tem chamado atenção pelas características intrínsecas do material tais como excelentes propriedades eletrônicas, térmica, mecânica e efeito catalítico⁵⁶, com ampla aplicabilidade como modelo em nanociência e nanotecnologia. Este material pode ser apresentado em duas formas: na forma de camada simples ("single-wall carbon nanotubes - SWNTs") ou na forma de nanotubos multicamadas ("multi-wall carbon nanotubes - MWCNTs") (Figura 1)⁵⁷.

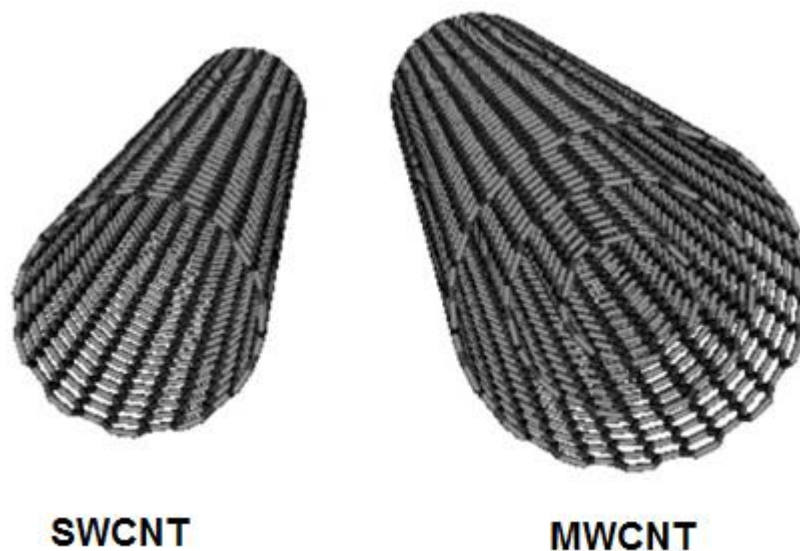


Figura 1 – Representação dos nanotubos de carbono na forma de camada simples (SWCNT) e na forma de multicamadas (MWCNT).

Devido a sua grande habilidade para promover reações de transferências eletrônicas, grande intervalo de potencial e aumento da área ativa do eletrodo, os CNT são boas alternativas para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados na mudança da superfície dos eletrodos pelo seu recobrimento com CNT⁵⁸.

Os eletrodos modificados com CNT podem ser confeccionados de diversas maneiras incluindo dispersão em solvente ("Casting"), pasta, compósitos, dentre outros. No trabalho de BABAEI e colaboradores, um método baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de MWCNT e quitosana foi desenvolvido para determinação simultânea de paracetamol e ácido úrico. Para isso, utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial em meio de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,00). Com isso, foi possível obter limites de detecção de 0,40 e 0,22 µmol L⁻¹ para ácido úrico e paracetamol, respectivamente, além de resultados satisfatórios na aplicação em amostras de soro e urina humana⁵⁹.

Em outro trabalho, GUO et al. propuseram um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT/Nafion para a determinação de 8-hidroxiquinolina em cosméticos. A determinação foi realizada em 0,2 mol L⁻¹ de tampão acetado (pH 3,60) utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Nestas condições, encontrou-se faixa linear no intervalo de 2×10^{-8} a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de 9 nmol L⁻¹ ⁶⁰. No trabalho de DUARTE et al., os pesquisadores confeccionaram um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono utilizando óleo mineral (Nujol) como aglutinante, na proporção 22:78%, respectivamente, para determinação simultânea de acetaminofenol e ácido ascórbico. Medidas em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,00) + 0,3 mmol L⁻¹ do surfactante catiônico brometo de cetilpiridínio permitiram a determinação por voltametria de pulso diferencial e limites de detecção de 2,1 e 7,1 µmol L⁻¹, respectivamente⁶¹.

Porém, devido a sua grande natureza hidrofóbica, em algumas aplicações eletroanalíticas, é necessária a funcionalização dos nanotubos de carbono⁶², podendo ser realizada de diversas maneiras^{63; 64; 65; 66}. A introdução de grupos funcionais como carboxila ou amina, pode não somente aumentar a solubilidade deste material em meio polar, mas também facilitar a interação com diversas substâncias, melhorando a sensibilidade do método⁶⁷. No

trabalho de WANG et al., os pesquisadores desenvolveram um método eletroanalítico para determinação de bisfenol F utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT funcionalizado com grupos -COOH . Utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial e meio de tampão fosfato (pH 6,00), a faixa linear e o limite de detecção encontrados foram 0,12 a 6,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente⁶⁸.

Em outro trabalho, NIGOVIĆ e co-autores propuseram um sensor baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de Nafion/MWCNT-funcionalizado com grupos -COOH para determinação simultânea de ondansetrona e morfina. Através de medidas em 0,1 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico por voltametria de redissolução adsortiva por onda quadrada, os limites de detecção para ondansetrona e morfina foram $3,1 \times 10^{-8}$ e $3,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente⁶⁹.

Deste modo, considerando a alta versatilidade dos materiais baseados em MWCNT para modificação de eletrodos, sua aplicação seria relevante para o desenvolvimento de sensores para quantificação de corantes de cabelo.

1.4.2. Eletrodos de carbono impresso modificados com grafeno

A crescente demanda por métodos analíticos mais práticos e simples tem impulsionado o desenvolvimento de diversos tipos de sensores eletroquímicos e dispositivos eletródicos miniaturizados. A versatilidade desses dispositivos baseia-se na busca por métodos de análise robustos, alto desempenho e facilidade de regeneração da superfície após o uso, uma vez que a regeneração da superfície tem sido o maior entrave no uso de eletrodos sólidos convencionais.

Os eletrodos impressos (screen-printed electrodes) se adequam satisfatoriamente para análises e se mostram uma alternativa viável para medidas rápidas usando eletrodos descartáveis^{70; 71}. A Figura 2 representa um eletrodo impresso comercial, onde pequenas placas de cerâmica ou PVC são recobertas por camadas de tinta de carbono e material isolante. Estes eletrodos apresentam um arranjo de eletrodos planares composto por: W, que representa um eletrodo circular de tinta de carbono como eletrodo de trabalho;

A, um eletrodo de tinta de carbono usado como eletrodo auxiliar; e R, um eletrodo Ag/AgCl como eletrodo de pseudo-referência (Figura 2).

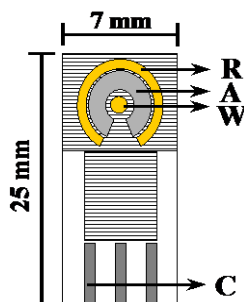


Figura 2 – Ilustração de um modelo de eletrodo impresso em cerâmica “screen-printed”. R = eletrodo de pseudo-referência (Ag/AgCl), A = eletrodo auxiliar (tinta de carbono ou ouro), W = eletrodo de trabalho (tinta de carbono) e C = contato elétrico.

Um dos principais atrativos destes tipos de eletrodos é a facilidade de utilização com apresentação de um sistema completo, contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência impressos no mesmo suporte em área bastante reduzida. Adicionalmente, por apresentar uma superfície rugosa, estes eletrodos possibilitam a modificação da superfície com maior facilidade para filmes finos, de modo que diferentes substratos possam ser testados para atender os requisitos básicos anteriormente citados.

Na literatura, muitos trabalhos são encontrados utilizando-se este dispositivo. No trabalho de CARAMIT e co-autores, os pesquisadores desenvolveram um método eletroanalítico para determinação simultânea de tert-butilhidroquinona (TBHQ) e butilhidroxianisole (BHA) em biodiesel utilizando eletrodo de carbono impresso modificado com MWCNT. Para isso, as análises foram feitas pela técnica de voltametria de varredura linear em meio de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão Britton-Robinson (pH 2,00) contendo 2% de metanol e $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB). Nestas condições, os pesquisadores encontraram $3,40 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,76 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o limite de detecção para TBHQ e BHA, respectivamente⁷².

Em outro trabalho, RADI et al. utilizaram eletrodo de carbono impresso sem modificação para a determinação de gemifloxacina utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial em meio de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão Tris-HCl (pH

7,00). Dessa forma, os autores encontraram limites de detecção e quantificação de 0,15 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente⁷³.

O grafeno é uma folha plana de átomos de carbono com ligações sp^2 densamente compactadas e com espessura extremamente fina, reunidos em uma estrutura cristalina hexagonal. Devido às suas extraordinárias propriedades estruturais, elétricas, químicas, ópticas, mecânicas e grande área superficial, o grafeno e seus derivados têm despertado grande interesse em suas aplicações na construção de sensores eletroquímicos, sensores ópticos e sensores para detecção de material químico^{74; 75}.

Desta forma, a modificação de eletrodos impressos de carbono modificados com grafeno é de grande interesse, pois, tem-se a combinação da praticidade de modificação da superfície e as excelentes características intrínsecas do grafeno. Na literatura, alguns métodos eletroanalíticos são encontrados utilizando este tipo de sensor.

No trabalho de WANG e colaboradores, os autores utilizaram eletrodo de carbono impresso modificado com compósito de líquido iônico/grafeno reduzido eletroquimicamente/filme de bismuto para a determinação de traços de chumbo e cádmio utilizando voltametria de redissolução anódica por onda quadrada. Em meio de 0,1 mol L^{-1} de tampão acetato (pH 4,50), o limite de detecção encontrado foi de 0,08 e 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cádmio e chumbo, respectivamente⁷⁶.

Em outro trabalho, EISSA e co-autores propuseram um eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno para a determinação de β -lactoglobulina. Através da técnica de voltametria de pulso diferencial em 10 mmol L^{-1} de solução salina de tampão fosfato (pH 7,40), o limite de detecção encontrado foi de 0,85 pg mL^{-1} ⁷⁷.

Deste modo, os eletrodos modificados com grafeno tem mostrado alta sensibilidade para diversos analitos em matrizes diferenciadas e seria de grande relevância a exploração destes materiais na determinação de corantes de cabelo.

1.5. Otimização multivariada em métodos eletroanalíticos

Uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de uma metodologia é a sua otimização, pois a partir deste estudo são encontradas as

melhores condições para o método. Na maioria das vezes, a otimização é feita de forma univariada, ou seja, todas as variáveis se mantem fixas enquanto apenas uma é alterada, levando a uma grande quantidade de experimentos. Porém, por negligenciar as interações entre as variáveis, os resultados podem não ser os ótimos, pois, como se sabe, as variáveis em sistemas químicos podem se correlacionar fortemente⁷⁸.

A quimiometria pode ser definida como uma ferramenta que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados de tal forma que se obtenha a maior quantidade de informações do sistema⁷⁹. Essa ferramenta é muito utilizada em diversas áreas, tais como química, engenharia química, Biotecnologia, além de diversas indústrias⁸⁰. As ferramentas quimiométricas são muito utilizadas para otimização de métodos analíticos, pois reduz a quantidade de experimentos e de reagentes, permitindo estudar diversos parâmetros simultaneamente levando em consideração às interações entre eles⁸¹. Uma das técnicas quimiométricas mais utilizada é o planejamento fatorial, podendo ser completo ou fracionário. Nesta técnica, diversos parâmetros podem ser estudados, sendo que para cada um, dois níveis são adotados, sendo um nível de máximo (+) e ou outro de mínimo (-). Através dos dados do planejamento, outras técnicas são aplicadas (Por exemplo, Diagrama de Pareto) para identificar se os parâmetros estudados e as interações entre eles foram significativas⁸². Para os parâmetros que se mostraram significativos, as melhores condições são encontradas utilizando outros planejamentos mais complexos como, por exemplo, matriz de Doehlert⁸³.

Na literatura, muitos trabalhos são encontrados utilizando ferramentas quimiométricas para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos. No trabalho de YILDIZ et al., os pesquisadores desenvolveram um método eletroanalítico para determinação de nitrito utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com polivinilimidazole. O método foi otimizado utilizando planejamento fatorial 2^4 e Box-Behnken, sendo pH (4,00), potencial de deposição (-1,2 V), tempo de deposição (5,18 min) e porcentagem de polivinilimidazole (10,24%) os parâmetros estudados, tendo como resposta analítica a corrente de pico. Assim, utilizando-se voltametria de pulso diferencial em meio de tampão fosfato, sob condições otimizadas, os valores para os limites de detecção e quantificação foram 9×10^{-8} e $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$,

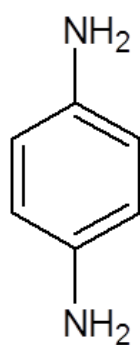
respectivamente⁸⁴. Em outro trabalho, HUDARI e co-autores desenvolveram um eletrodo de pasta de nanotubo de carbono para a determinação simultânea de ácido úrico (AU) e acetaminofeno (AC). Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} e matriz de Doehlert foram utilizados para otimização do pH (7,70), amplitude de pulso (123 mV), tempo de modulação (5 ms), velocidade de varredura (100 mV s^{-1}) e concentração do eletrólito suporte ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). As respostas analíticas utilizadas foram: variação de corrente de pico, variação entre os picos de AC e AU e linha de base, onde todas as respostas analíticas foram convertidas em termos de desejabilidade. Com isso, através de medidas em tampão fosfato por voltametria de pulso diferencial, sob as condições otimizadas, os limites de detecção para AC e AU foram $0,57$ e $0,25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente⁸⁵.

Com isso, considerando o grande número de parâmetros inerentes às técnicas voltamétricas e aos parâmetros químicos, seria relevante utilizar as técnicas quimiomimétricas para otimização de métodos eletroanalíticos para determinação de corantes de cabelo.

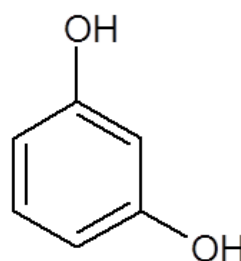
2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver novos métodos eletroanalíticos para monitoramento de *p*-fenilenodiamina (PPD) e resorcinol (RSN) usados como agentes precursor e acoplador, respectivamente, em tinturas de cabelo permanente bem como monitorar os corantes temporários, onde escolheu-se como modelo o corante básico azul 41 (BA-41). Para isso, pretende-se:

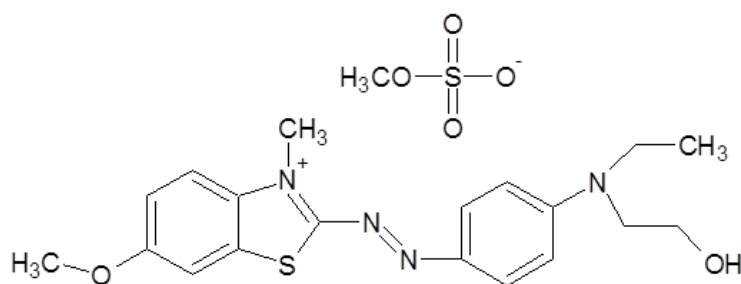
- Desenvolver um sensor voltamétrico baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de MWCNT-CHT para determinação simultânea de *p*-fenilenodiamina e resorcinol em amostra de corante comercial permanente de cabelo;
- Desenvolver um método eletroanalítico baseado em eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno (ECIMG) para determinação do corante básico azul 41 em efluentes de salões de beleza e em formulações comerciais de tintura de cabelo.



PPD



RSN



BA-41

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas utilizando água ultra pura (sistema Milli-Q®, Millipore). Resorcinol (RSN), *p*-fenilenodiamina (PPD), Básico Azul 41 (BA-41) e quitosana (CHT) foram obtidas da Sigma-Aldrich. Os Ácidos bórico, fosfórico e acético, cloreto de amônio e cloreto de potássio foram obtidos da Merck. Nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs), eletrodos de carbono impresso e eletrodos de carbono impresso modificado com grafeno foram obtidos da DROPSSENS. Hidróxido de sódio, etanol e peróxido de hidrogênio foram utilizados da Synth. Soluções padrão de 11,00 mg L⁻¹ de PPD foram preparadas em solução de água e etanol 1:1 (v/v) usadas no mesmo instante, sendo que o etanol não apresentou interferência nas medidas. Amostras de RSN e BA-41 foram dissolvidas em meio aquoso. Tampão Britton-Robinson (B-R) 0,10 mol L⁻¹ foi preparado pela mistura dos ácidos ortofosfórico, acético e bórico (0,10 mol L⁻¹ de cada). A extração das amostras para injeção no cromatógrafo foram feitas em um cartucho em fase sólida utilizando um Manifold (Vacuum Manifold Processing Station) e cartucho Strata-X 33u fase reversa polimérica com dimensão de 200 mg / 3 mL, obtidos da Phenomenex, USA.

3.2. Equipamentos

Medidas de pH foram feitas em um TECNOPON mPA 210 pH-meter. Medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 UV-Vis utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm. As medidas eletroquímicas foram realizadas no galvanostato/potenciostato µAutolab tipo III controlado pelo software GPS. Análises no LC-MS/MS foram feitas no cromatógrafo líquido de alta eficiência da 1200 Agilent Technologies acoplado com um espectrômetro de massas 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC-ESI-MS/MS). As caracterizações morfológicas da superfície dos eletrodos foram feitas pelo aparelho de microscopia eletrônica de varredura

da FEI COMPANY-MAGELLAN 400L. Espectros de energia dispersiva de raios X foram feitos por EDAX AMETEC modelo APOLLO X.

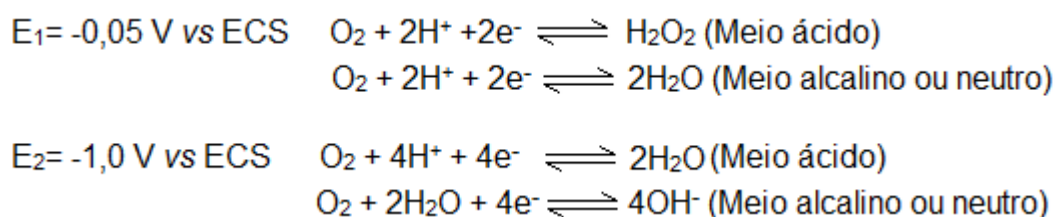
3.3. Preparação do eletrodo de MWCNTs-CHT/GCE

Eletrodo de carbono vítreo (GCE) de 3 mm foi polido manualmente com alumina com diferentes tamanhos de partículas (0,5; 0,3 e 0,05 μm) por 5 min e lavado com água ultra pura. O compósito foi preparado utilizando uma solução estoque de 0,5% (m/m). 1 mL de solução de ácido acético 1% (v/v) foi ajustada para pH 5,00 utilizando solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. Em seguida, 5 mg de quitosana e 2 mg de MWCNTs foram adicionados na solução ácida, sendo submetida, em seguida, ao banho de ultrassom por 30 min, formando uma solução negra homogênea de MWCNTs-CHT⁵⁹. Finalmente, 20 μL da suspensão foram adicionados na superfície do GCE deixando secar em temperatura ambiente.

3.4. Medidas eletroquímicas

3.4.1. Determinação simultânea de PPD e RSN

Todos os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em uma cela eletroquímica de 10 mL e um sistema convencional de três eletrodos sendo o eletrodo de trabalho os eletrodos de carbono vítreo sem e com modificação, eletrodo com fio de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl, 3 mol L⁻¹). Antes de cada experimento, gás nitrogênio foi borbulhado por 10 min na solução para remover o oxigênio para evitar possíveis interferências dos picos de redução do oxigênio, como demonstrado nas seguintes reações:



3.4.2. Determinação do corante BA-41

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma cela eletroquímica de 10 mL. Os eletrodos de carbono impresso consistem de eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência contidos na mesma plataforma, onde foram conectados através de um conector próprio para medidas em eletrodos impressos. Antes de cada experimento, gás nitrogênio foi borbulhado por 10 min na solução para remover o oxigênio.

3.5. Aplicação do método

3.5.1. Monitoramento da reação entre PPD e RSN

As análises por espectrofotometria UV-Vis foram realizadas para soluções de PPD e RSN de forma individual e em mistura de ambos os reagentes. As soluções de PPD e RSN nas concentrações de 11,00; 21,60; 55,00; 75,70 e 108,00 mg L⁻¹ foram preparadas diluindo-se soluções estoque de PPD e RSN, em meio de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) na ausência e na presença de 1% de peróxido de hidrogênio. Para as análises individuais, as amostras na ausência e na presença de agente oxidante foram monitoradas durante 120 min, com análises durante 30 min de reação. Para a reação entre PPD e RSN na presença de 1% H₂O₂, as amostras foram analisadas após 30 min. Todos os espectros foram registrados entre 200 a 800 nm.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas para amostras individuais de 75,70 mg L⁻¹ de PPD e 11,00 mg L⁻¹ de RSN e para mistura de ambos, em meio de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) na presença de 1% de H₂O₂ após 30 min de reação. A extração da amostra foi feita em um cartucho de extração em fase sólida STRATA-X, previamente ambientalizado por 6 mL de metanol e 6 mL de água. Em seguida, 3 mL da amostra foram transferidas para o cartucho. Por fim, as substâncias retidas no cartucho foram eluídas com 3 mL de metanol. As medidas foram feitas sob as seguintes condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:metanol em gradiente (0 -1

min 5% de metanol, 1 – 10 min aumento de 5-100% de metanol, 10 – 13 min 100% de metanol, 13 – 13,5 min 5% de metanol e condicionamento até 17 min); A vazão foi de 1 mL min⁻¹ em coluna C 18 com volume de injeção de 10 µL de amostra.

A detecção no espectrômetro de massas foi realizado utilizando-se as seguintes condições: Ion spray em 5.500V, temperatura de 550 °C, potencial de 30 V no modo positivo. Os experimentos de varredura de íons foram feitos na faixa de 100 – 900 Da.

A reação entre 75,70 mg L⁻¹ de PPD e 11,00 mg L⁻¹ de RSN utilizando o método proposto foi analisada em meio de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacoal (pH 8,00) na presença de 1% de peróxido de hidrogênio no intervalo de -0,35 a 0,80 V em 100 mV s⁻¹.

3.5.2. Análise de PPD e RSN em água de torneira

Análises de PPD e RSN em amostras de água de torneira foram realizadas fortificando-se água de torneira com 1,10 g L⁻¹ de PPD e RSN. Alíquotas de 25 µL das soluções foram transferidas diretamente para uma célula eletroquímica de 10 mL contendo 9,95 mL de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amônia (pH 8,00), resultando em uma concentração de 2,74 mg L⁻¹ de PPD e RSN na célula. As análises eletroanalíticas foram feitas no intervalo de potencial de -0,10 a 0,70 V em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

3.5.3. Análise de PPD e RSN em amostra comercial de tintura de cabelo

As análises de PPD e RSN em amostra comercial de tintura de cabelo foram realizadas utilizando amostras de corante capilar comercial da marca EMBELLEZE MAXTON® (2.0 preto natural). 1,00 g da formulação foi dissolvida em 30 mL de água ultra-pura mantida sob agitação magnética por 30 min. Em seguida, 100 µL da solução, sem prévio tratamento, foram transferidas diretamente para cela eletroquímica contendo 10 mL de tampão amoniacoal 0,10 mol L⁻¹ (pH 8,00). Para determinação da concentração de PPD e RSN na amostra, utilizou-se o método de adição de padrão. As medidas foram feitas no

intervalo de potencial de -0,10 a 0,70 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

A mesma amostra preparada previamente para a tintura de cabelo foi também submetida à análise via técnica de espectrofotometria na região UV-Vis. As análises foram feitas pelo registro de espectros UV-Vis no intervalo de comprimento de onda de 200 a 500 nm.

3.5.4. Análise do corante BA-41 em água de torneira

Amostras de água de torneira contaminada com BA-41 foram registradas no intervalo de -0,45 a -0,14 V através de varreduras pela técnica de onda quadrada sob condições otimizadas. Alíquotas de 50 µL de solução estoque de 1×10^{-4} mol L⁻¹ de BA-41 foram transferidas para um béquer contendo 10 mL de água de torneira, resultando em uma concentração de $2,65 \times 10^{-4}$ g L⁻¹ do corante. Em seguida, o eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno foi introduzido na amostra, mantendo-o por 45 s amostra sob agitação. Após este período, lavava-se a superfície e colocava o ECIMG na célula eletroquímica contendo apenas 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 6,90).

3.6. Otimização do método para determinação de BA-41 por voltametria de onda quadrada

A otimização do método por voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno foi feita por meio de planejamento fatorial completo 2⁴, onde as respostas foram convertidas em termos de desejabilidade. O tratamento estatístico foi feito por meio do programa STATISTICA 6.0 para obter o diagrama de Pareto e as superfícies de resposta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-CHT para determinação simultânea de PPD e RSN

4.1.1. Caracterização morfológica dos eletrodos de carbono vítreo sem e com modificação por composto de MWCNT-CHT

A caracterização da superfície dos eletrodos de carbono vítreo sem e com modificação foram feitas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e comparadas na Figura 3. A imagem para o carbono vítreo sem modificação mostra uma superfície lisa sem nenhum tipo de rugosidade e poros (Figura 3.A), como é esperado para este tipo de material.

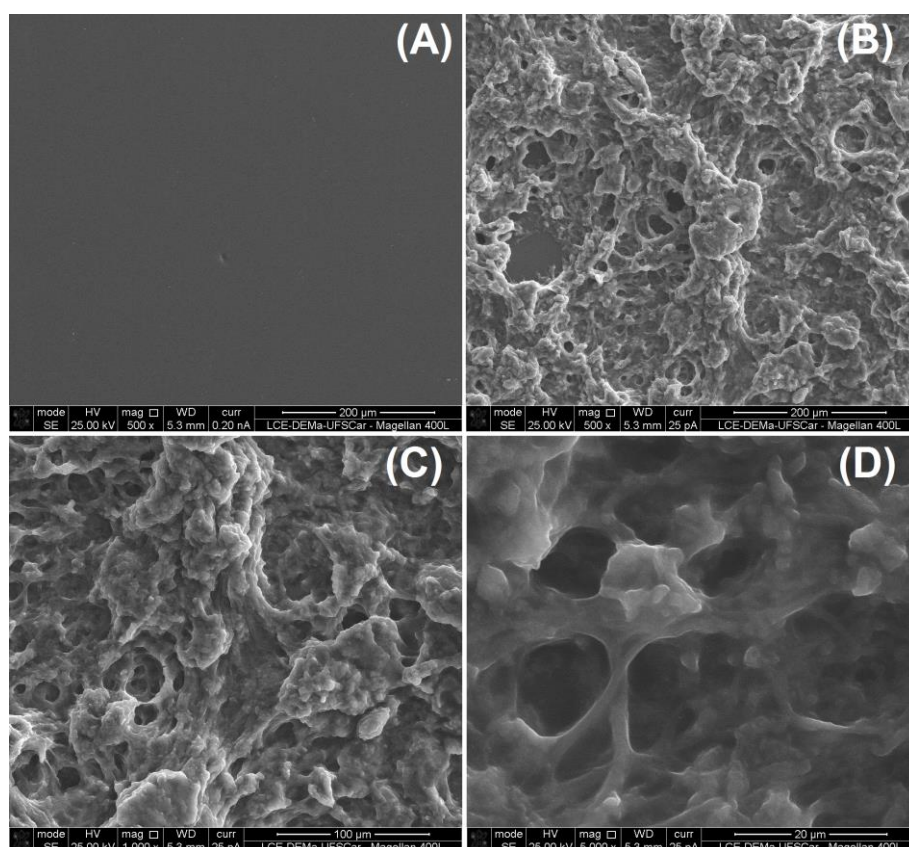


Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura para eletrodo de carbono vítreo sem modificação para ampliações de 500 (A) e para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs-CHT para aproximações de 500 (B), 1.000 (C) e 5.000 vezes (D).

No entanto, as imagens utilizando as aproximações de 500 (B), 1.000 (C) e 5.000 (D) vezes para o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono-quitosana, mostraram grande diferença quando comparadas as do eletrodo sem modificação. Na Figura 3, a partir de aproximação de 500 vezes (Figura 3.B), é possível observar grande rugosidade e porosidade referente ao compósito MWNTs-CHT na superfície do eletrodo. Para a aproximação de 5000 vezes, já se identifica os nanotubos de carbono aglomerados a grandes partículas referentes à quitosana (Figura 3.D).

Os espectros de energia dispersiva de raios X (EDS) para ambos os eletrodos são mostrados na Figura 4. Para o eletrodo sem modificação, apenas átomos de carbono são encontrados (Figura 4.I). Já para o eletrodo modificado com MWCNTs-CHT, além do carbono, foram encontrados oxigênio e sódio (Figura 4.II). O oxigênio é referente aos grupos éter, carbonila e hidroxila presentes na estrutura da quitosana. Já o sódio identificado é referente à neutralização da solução de ácido acético para o preparo do compósito de MWNTs-CHT.

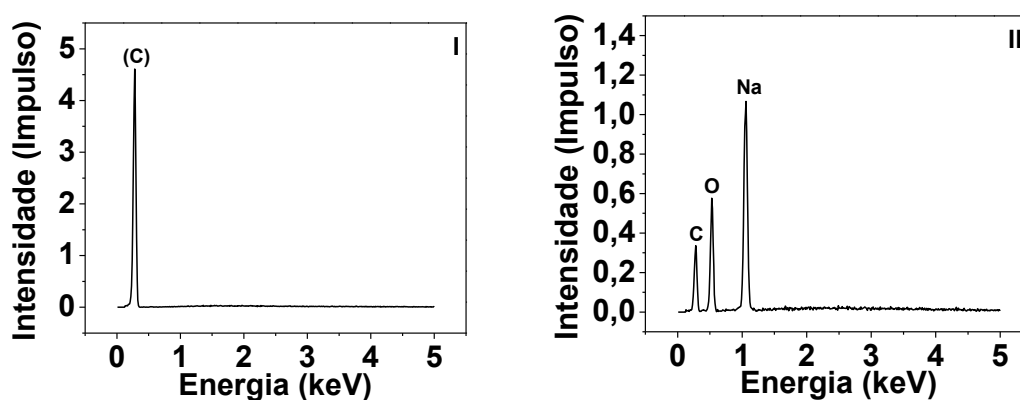


Figura 4 – Espectros de energia dispersiva de raios X para eletrodo de carbono vítreo sem (I) e com (II) modificação pelo compósito MWCNTs-CHT.

4.1.2. Oxidação voltamétrica de PPD e RSN sobre GCE e MWCNTs-CHT/GCE

Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução contendo $11,00 \text{ mg L}^{-1}$ de PPD e $11,00 \text{ mg L}^{-1}$ RSN em tampão B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,00) em MWNTs-CHT/GCE são mostrados, respectivamente, na Figura 5. Na Figura 5.I,

observa-se que a oxidação do grupo amina ocorre em potencial de 0,17 e apresenta um pico na varredura reversa em potencial de 0,11 V. A variação entre $E_{pa} - E_{pc} = 60$ mV e os valores da relação entre $I_{pa}/I_{pc} = 1$, apresentam características de um processo reversível⁸⁶. A oxidação de RSN (Figura 5.II), mostra um pico em 0,56 V referente a oxidação do grupo fenólico presente em sua estrutura. A ausência de pico catódico na varredura reversa de potencial em qualquer velocidade de varredura indica características de um processo irreversível⁵³.

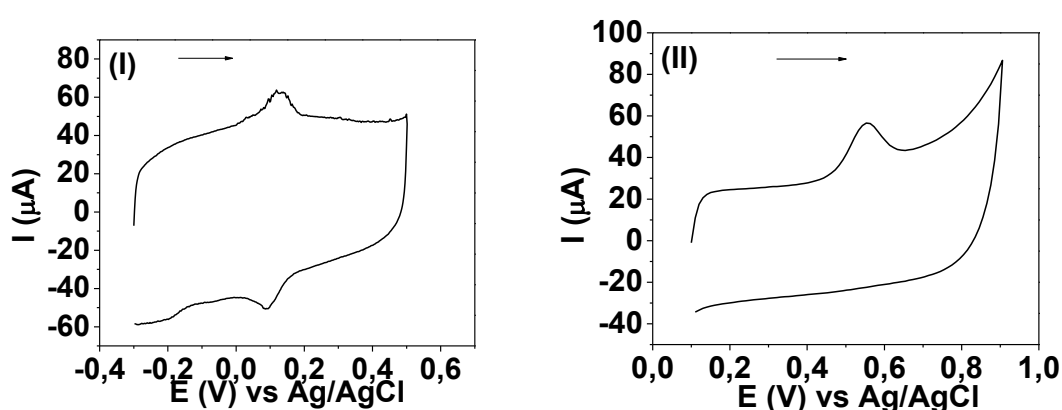


Figura 5 – Voltamogramas cíclicos para 11,00 mg L⁻¹ de PPD (I) e RSN (II) em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,00) em MWCNT-CHT/GCE. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

A oxidação para soluções contendo ambos os analitos PPD e RSN sobre o MWNTs-CHT/GCE é mostrado na Figura 6 (Curva b). Para efeito de comparação é mostrado o voltamograma obtido nas mesmas condições experimentais, porém sobre eletrodo GCE (Curva a). Em ambos os eletrodos, é possível observar a oxidação de PPD e RSN em potenciais ao redor de 0,17V e 0,56 V, respectivamente, atribuídas as oxidações do grupo amino no PPD e grupo hidroxila no RSN. No entanto, as correntes anódica (I_{pa}) para PPD e RSN sobre o MWNTs-CHT/GCE são aproximadamente 60% e 100% maiores, respectivamente, quando comparadas com o eletrodo sem modificação (Figura 6). Embora a modificação do eletrodo tenha proporcionado um aumento significativo da área ativa em comparação ao não modificado (conforme mencionado na subseção abaixo), o ganho de corrente pode ser atribuído

também a melhor transferência de elétrons na superfície do MWNTs-CHT/GCE. Esta constatação foi confirmada pela análise de perfis voltamétricos em função da densidade de corrente normalizada, isto é, a corrente depende da área ativa dos eletrodos. Comparando os resultados com os obtidos para o eletrodo sem e com modificação, é evidente que o filme de MWNTs-CHT facilita a oxidação de ambos, PPD e RSN.

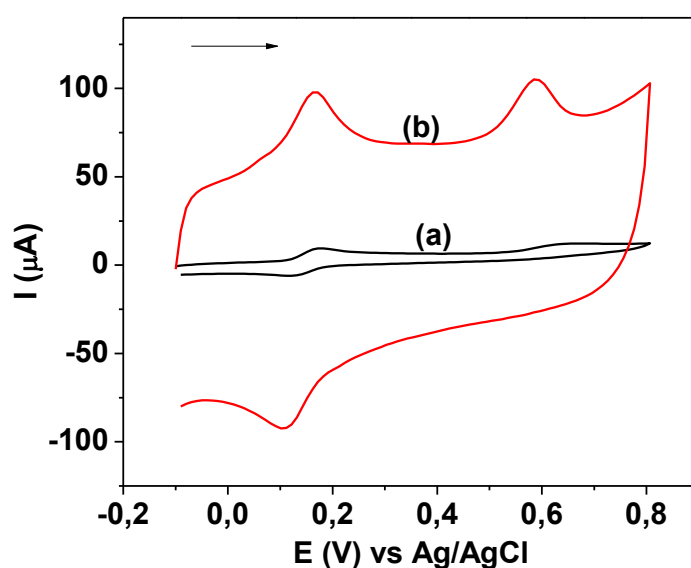


Figura 6 – Voltamogramas cíclicos para 11,00 mg L⁻¹ de PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,00) em GCE (a) e MWCNT-CHT/GCE (b). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

4.1.3. A influência da velocidade de varredura na oxidação de PPD e RSN

O efeito da velocidade de varredura na resposta voltamétrica de PPD e RSN para uma concentração de 11,00 mg L⁻¹, para ambos os analitos, em tampão B-R 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,00), foi investigado para o MWNTs-CHT/GCE no intervalo de 10 a 400 mV s⁻¹. A corrente de pico anódico variou linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, tendo como relação às seguintes equações: $I_{pa} = 1,21 \times 10^{-4} v^{1/2} + 8,87 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,99$) para PPD e de $I_{pa} = 1,47 \times 10^{-4} v^{1/2} - 5,75 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,99$) para RSN, sugerindo que o mecanismo de oxidação para PPD e RSN é controlado por difusão^{87; 88}. A partir

desses resultados, a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} foi escolhida para os estudos futuros.

A fim de determinar o coeficiente de difusão, cronoamperogramas foram feitos para PPD e RSN, fixando-se os potenciais em 0,14 e 0,56 V, respectivamente. Para cada analito, foram feitas medidas individuais no intervalo de 2,72 a $21,80 \text{ mg L}^{-1}$. O coeficiente de difusão foi calculado utilizando a equação de Cottrell, como mostrado na seguinte equação:

$$I_{pa} = \frac{nFAC_0 D_0^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \text{ (Equação 1),}$$

onde I_{pa} é a corrente anódica (μA), n é o número de elétron, F é a constante de Faraday (96500 C mol^{-1}), A é a área ativa do eletrodo (cm^2), C_0 é a concentração do analito (mol cm^{-3}), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e t o tempo (s). Porém, primeiramente é necessário conhecer a área ativa do eletrodo. Para isso, fez-se o uso da equação de Randles-Sevick para o cálculo da área, como ilustrado na seguinte equação:

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \text{ (Equação 2),}$$

onde I_{pa} é a corrente anódica (μA), n é o número de elétron, A é a área ativa do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), $v^{1/2}$ é a raiz quadrada da velocidade de varredura (V s^{-1}) e C_0 é a concentração do analito (mol cm^{-3}). Utilizou-se neste experimento uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio 1 mmol L^{-1} (molécula sonda) em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente difusional de oxidação tabelado em $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Com isso, a área ativa do eletrodo modificado foi de $0,75 \text{ cm}^2$ e para o eletrodo sem modificação foi de $0,08 \text{ cm}^2$. Assim, substituindo os valores e a área ativa do MWNTs-CHT/GCE na equação 1, temos que os coeficientes difusionais para PPD e RSN são $5,33$ e $5,29 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Com o intuito de descobrir a concentração das espécies eletroativas que estão na superfície do eletrodo modificado, voltamogramas cíclicos foram obtidos para $11,00 \text{ mg L}^{-1}$ de PPD e RSN, na forma individual, variando-se a

velocidade de varredura no intervalo de 2 a 40 mV s⁻¹. Para isso, utilizou-se a seguinte equação:

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4RT} \quad (\text{Equação 3})$$

onde I_p é a corrente de pico, n é a quantidade de elétrons, F a constante de Faraday, v a velocidade de varredura, A a área ativa do eletrodo, Γ é a concentração superficial das espécies eletroativas (PPD e RSN), R é a constante dos gases ideais (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹) e T a temperatura. Assim, substituindo os valores na equação 3, as concentrações de PPD e RSN na superfície do MWNTs-CHT/GCE são de 2,36 e 8,74 µg L⁻¹, respectivamente.

4.1.4. O efeito do pH na oxidação de PPD e RSN

O efeito do pH na detecção de 11,00 mg L⁻¹ de PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R utilizando voltametria de varredura linear e MWNTs-CHT/GCE foi verificado no intervalo de 4 a 9, com perfis voltamétricos representado na Figura 7.I. Como mostrado na Figura 7.II, com o aumento de pH, o potencial de pico anódico (E_{pa}) do PPD é deslocada linearmente para potenciais mais negativos com inclinação de 63 mV (curva a). Através da seguinte equação:

$$\frac{\Delta E}{\Delta pH} = \frac{59mH^+}{n} \quad (\text{Equação 4}),$$

onde $\frac{\Delta E}{\Delta pH}$ corresponde a inclinação da curva, n o número de elétrons e mH^+ o número de prótons envolvidos na reação, podemos concluir que no processo de oxidação de PPD, a proporção de e^-/H^+ é a mesma, pois o coeficiente angular encontrado (-0,063 V pH⁻¹) é próximo ao valor da equação de Nernst⁸⁹. Para o RSN, O mesmo perfil é observado, onde a E_{pa} diminui linearmente com o aumento de pH (curva b) seguindo a relação linear de $E_{pa} = -0,075pH + 1,127$ ($R^2 = 0,99$). Neste caso, como RSN apresenta mecanismo irreversível, deve-se

levar em considerando o coeficiente de transferência eletrônica (α). Assim, a equação é dada por:

$$\frac{\Delta E}{\Delta pH} = \frac{59mH^+}{\alpha n} \text{ (Equação 5)}$$

O coeficiente α pode ser calculado a partir da seguinte expressão:

$$\alpha = \frac{47,7}{(E_p - E_{1/2})} mV \text{ (Equação 6),}$$

onde E_p e $E_{1/2}$ são os potenciais de pico anódico e de pico de meia onda, respectivamente. Assim, para análises de 11,00 mg L⁻¹ de RSN em pH 8,00, substituindo os valores na equação 6, α é igual a 0,9. Com isso, utilizando-se a equação 5, a proporção de e^-/H^+ para a oxidação de RSN é aproximadamente 1⁹⁰. Deste modo, a proporção de prótons e elétrons participantes da reação para PPD é $2e^-/2H^+$ e, também, de $2e^-/2H^+$ para oxidação de RSN conforme mostrado no esquema 1^{87; 89}.

A variação entre os potenciais de pico para oxidação de PPD e RSN foi analisada no intervalo de pH estudado, observando-se que os deslocamentos dos E_{pa} de ambos os compostos proporcionam um deslocamento com separações semelhantes, por volta de 400 mV, indicando que os analitos podem ser analisados sem interferência no intervalo de pH entre 4 – 9 (Figura 7). Porém, o máximo de corrente para ambos apresentou divergência, sendo que o melhor pH para PPD foi observada em pH 4 e para o RSN em pH 7. Os elevados valores de correntes para os analitos ocorre devido a possível pré-concentração de PPD e RSN através da interação com os grupos funcionais (-OH) e (-NH₂) presentes na estrutura da CHT ($pK_a \cong 7,0$)⁹¹.

Em condições ácidas, a corrente do PPD é máxima devido à interação eletrostática entre os grupos hidroxilas da CHT presentes na superfície do eletrodo e os grupos amina protonados da PPD ($pK_a = 6,04$)⁹² (Figura 7.II, curva c). Porém, com o aumento de pH, os grupos aminas começam a ser desprotonados, resultando na redução da I_{pa} devido a menor interação entre os

grupos funcionais da PPD e CHT (grupos -NH_2 e -OH , respectivamente) que promovem a pré-concentração do analito.

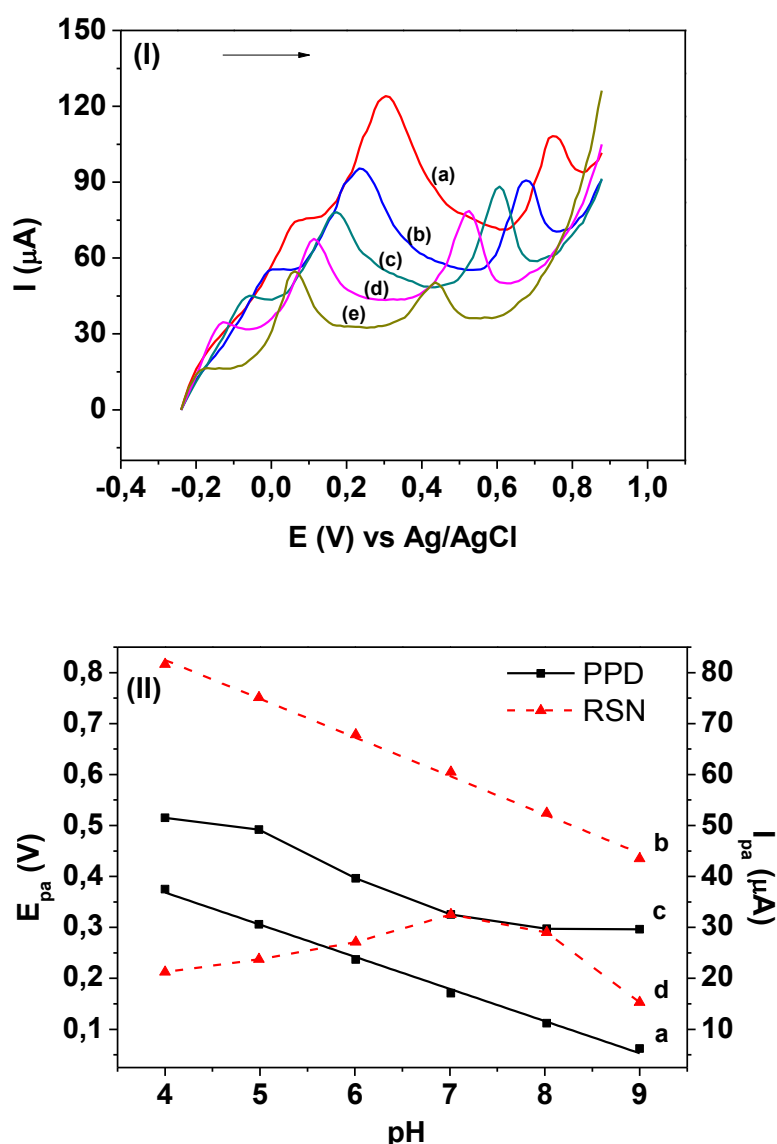
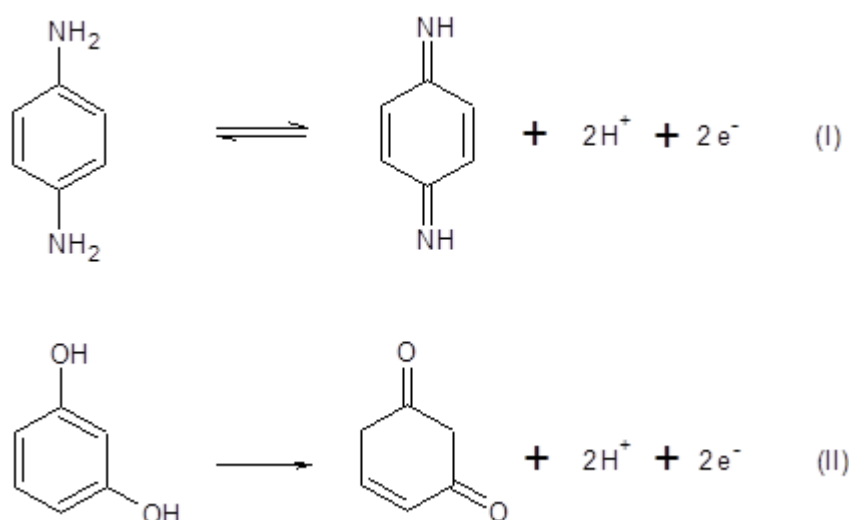


Figura 7 – Voltamogramas de varredura linear para determinação simultânea de $11,00 \text{ mg L}^{-1}$ de PPD e RSN em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R em pH de 5 (a), 6 (b), 7 (c), 8 (d) e 9 (e) (I). Relação entre E_{pa} vs pH (curvas a e b) e I_{pa} vs pH (curvas c e d). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Por outro lado, o aumento no valor de pH de 4 para 7 reflete um aumento na corrente de pico do RSN ($\text{p}K_a = 9,40$)⁹⁰ (Figura 7.II, curva d). Isto é observado, pois os grupos amina protonados da quitosana promovem interações eletrostáticas com os grupos hidroxilas presentes no RSN⁹⁰. Porém, a partir do pH 7, a I_{pa} do RSN diminui, pois o $\text{p}K_a$ da CHT é atingido,

desprotonando os grupos amina, consequentemente, ocorre uma diminuição drástica na interação eletrostática entre os grupos funcionais amina e hidroxila presentes na CHT e no RSN, respectivamente⁹⁰. No intervalo de pH estudado, a melhor relação de I_{pa} para ambos analitos foi encontrada na faixa de pH entre 7 e 8 (Figura 7.II). Sabendo-se que os corantes de cabelo são aplicados preferencialmente em condições alcalinas^{93; 94}, escolheu-se o pH 8 para os demais experimentos.



Esquema 1 – Oxidação de PPD (I) e RSN (II) sobre MWCNT-CHT/GCE.

4.1.5. Efeito do eletrólito suporte na determinação de PPD e RSN

A fim de avaliar o efeito do eletrólito suporte na resposta voltamétrica para oxidação do PPD e RSN, voltamogramas de varredura linear foram registrados para 11,00 mg L⁻¹ de PPD e RSN em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹, 0,10 mol L⁻¹ de tampão fosfato (TF), tampão B-R (TB-R) e tampão amoniacal (TA), todos ajustados para pH 8,00. Como mostrado na Figura 8.1, picos bem definidos para PPD e RSN foram obtidos em solução de KCl, TB-R, TF e TA, com potenciais de oxidação semelhantes para ambos analitos.

Visto que a determinação de PPD e RSN pode ser realizada em todos os meios estudados, a I_{pa} foi utilizada como resposta analítica para escolha do eletrólito a ser fixado. A Figura 8.II compara a influência do eletrólito na intensidade de corrente dos processos de oxidação de PPD e RSN em solução de KCl e tampões fosfato e B-R, observando-se semelhantes variações nas

correntes de pico, porém, o melhor desempenho foi encontrado em meio amoniacal. Os picos de oxidação para PPD e RSN em tampão amoniacal, foram observados em 0,14 e 0,56 V (vs Ag/AgCl), respectivamente (Figura 8.1).

Além disto, soluções de amônia em pH levemente alcalino são usualmente utilizadas para tinturas de cabelo comerciais^{93; 94}, o qual poderia ser importante para análise do corante quando se deseja monitorar os produtos. Assim, o tampão amoniacal 0,10 mol L⁻¹ (pH 8,00) foi escolhido para ser utilizado nos estudos posteriores.

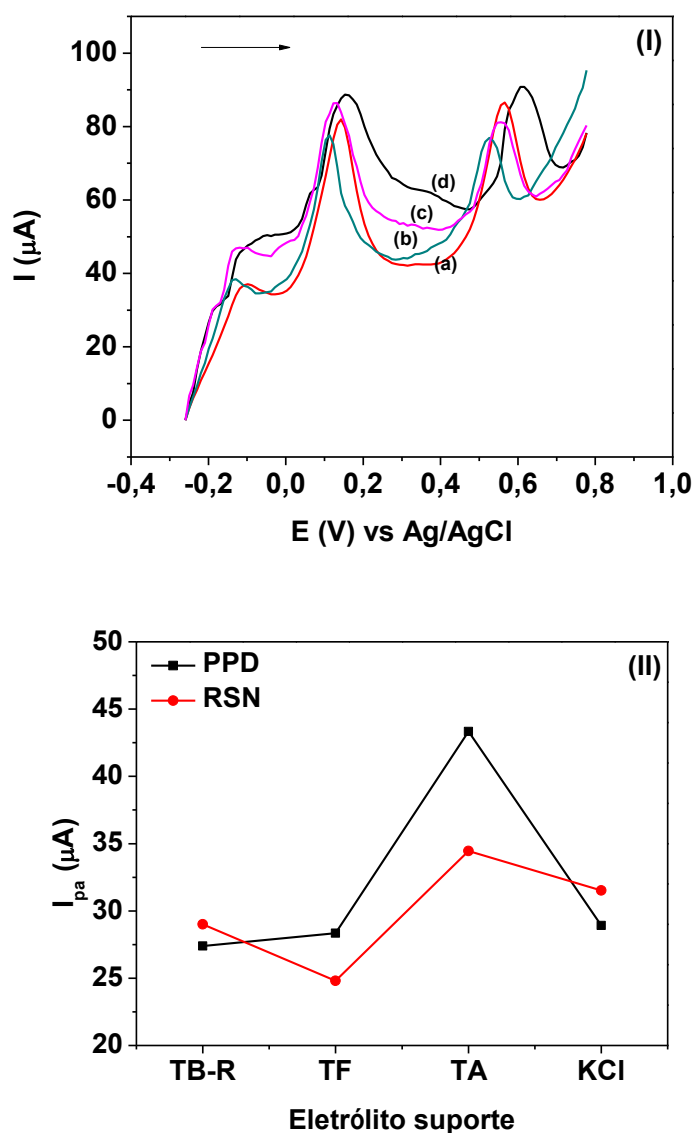


Figura 8 – Voltamogramas de varredura linear para 11,00 mg L⁻¹ de PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (a), tampão B-R (b), tampão fosfato (c) e cloreto de sódio (d) todos em pH 8,00 (I). Relação entre I_{pa} vs eletrólito suporte (II). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

4.1.6. Monitoramento da reação de PPD na presença de agente oxidante

Sabendo-se que PPD é instável em meio oxidante, diversos produtos de dimerização podem ser formados a partir da oxidação de PPD. Com o intuito de monitorar os possíveis dímeros de PPD, análises comparativas foram realizadas para amostra contendo 2 mg mL^{-1} de PPD em tampão fosfato salino (pH 7,20) em meio de 2% (m/V) de peróxido de hidrogênio e em meio de O_2 . Primeiramente, as amostras foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis em intervalos de tempo até 24 h.

Amostras de PPD colocadas em ambiente de ar atmosférico foram monitoradas por espectros de UV-Vis entre 0 e 24 h, conforme as respectivas curvas na Figura 9.I. No tempo $t = 0$ (b), apenas uma banda com absorção máxima é observada no comprimento de onda de 307 nm referente ao agente precursor. Após 6 h (c), outra banda é observada em 474 nm referente ao intermediário PQD. Com o passar do tempo, a única diferença entre os espectros de 16 (d) e 24 h (e) é o aumento na intensidade da banda de PQD devido à contínua oxidação de PPD.

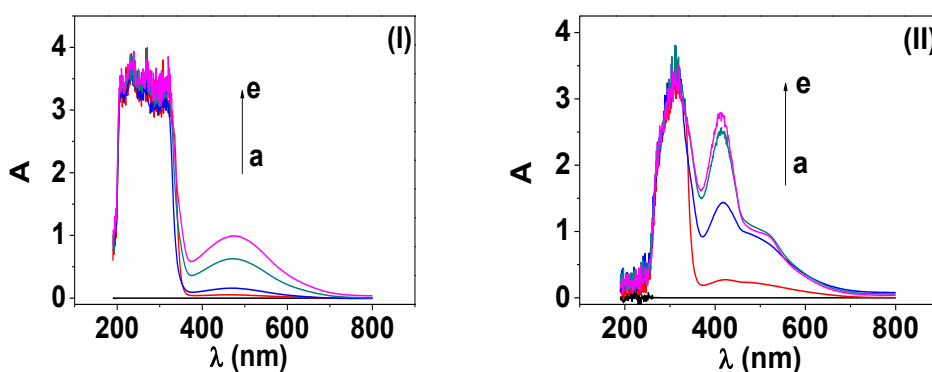


Figura 9 – Espectros de UV-Vis para solução contendo 2 mg mL^{-1} de PPD em tampão fosfato salino (pH 7,20) (a) em meio de O_2 (I) e em meio de 2% (m/v) de H_2O_2 (II) nos tempos de 0 (b), 6 (c), 16 (d) e 24 h (e).

Análises similares foram feitas para 2 mg mL^{-1} de PPD na presença de 2% (m/v) de H_2O_2 . Na Figura 9.II, no tempo $t = 0$ (b), além da banda de absorção característica de PPD, outras duas bandas são encontradas nos

comprimentos de onda de 416 e 510 nm. Com o decorrer do tempo, as bandas dos produtos observados aumentam, sendo perceptíveis a partir do $t = 6$ h (c).

No entanto, pelas análises através da técnica de espectrofotometria UV-Vis não é possível atribuir estas bandas as possíveis substâncias que podem ser formadas a partir da oxidação de PPD.

Uma forma de identificar os produtos encontrados por espectrofotometria UV-Vis é por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (LC-MS/MS). As técnicas cromatográficas são muito empregadas para classificação e identificação de diferentes espécies por apresentar grande sensibilidade, além de pouca quantidade de amostra. Os analitos são separados em uma coluna, onde as substâncias que possuem maior afinidade com o material da coluna ficam mais aderidas e possuem maiores tempos de retenção. Porém, muitas vezes, por si só as técnicas de separação não são capazes de fornecer informações sobre alguns analitos. Para isso, o espectrômetro de massas acoplado às técnicas cromatográficas supre esta deficiência, pois assim, é possível identificar compostos desconhecidas por meio da razão massa/carga.

Deste modo, análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foram realizadas para as amostras de PPD na presença de O_2 e H_2O_2 .

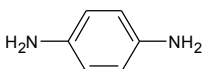
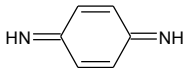
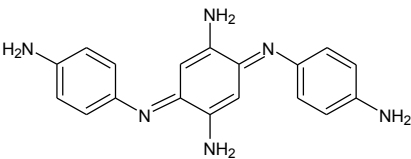
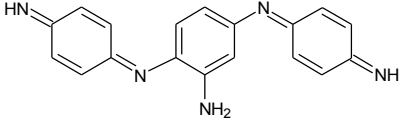
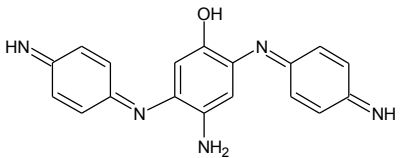
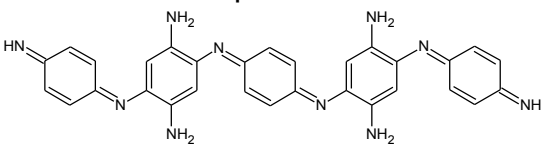
Análises utilizando a técnica de LC-MS/MS foram realizadas com objetivo de identificar os produtos encontrados nos espectros de UV-Vis (Figura 9). Para isso, cromatogramas para soluções de 2 mg mL^{-1} de PPD em ambiente atmosférico e em meio de 2% de peróxido de hidrogênio foram registrados após 24 h (APÊNDICE I).

A solução de PPD submetida à ação de O_2 apresentou três produtos. O intermediário p-quinonadiimina (PQD), observado no tempo de retenção de 2,07 min e $m/z = 107,4$ (APÊNDICE II). O trímero de PPD (BB) apresentou tempo de retenção de 8,41 min e m/z de 319,3 (APÊNDICE VI). Outro trímero denominado “PPD trimer- NH_3 ” foi identificado no tempo de retenção de 6,37 min (APÊNDICE IV).

O pentâmero foi identificado apenas para a solução de PPD em meio de peróxido de hidrogênio, em tempo de retenção de 8,02 min e $m/z = 264,1$ (APÊNDICE VII), bem como outro trímero denominado “PPD trimer+OH”,

sendo observado em 9,03 min (APÊNDICE V). Na Tabela 2, são mostrados todos os compostos encontrados para solução de PPD em meio atmosférico e em meio de H₂O₂.

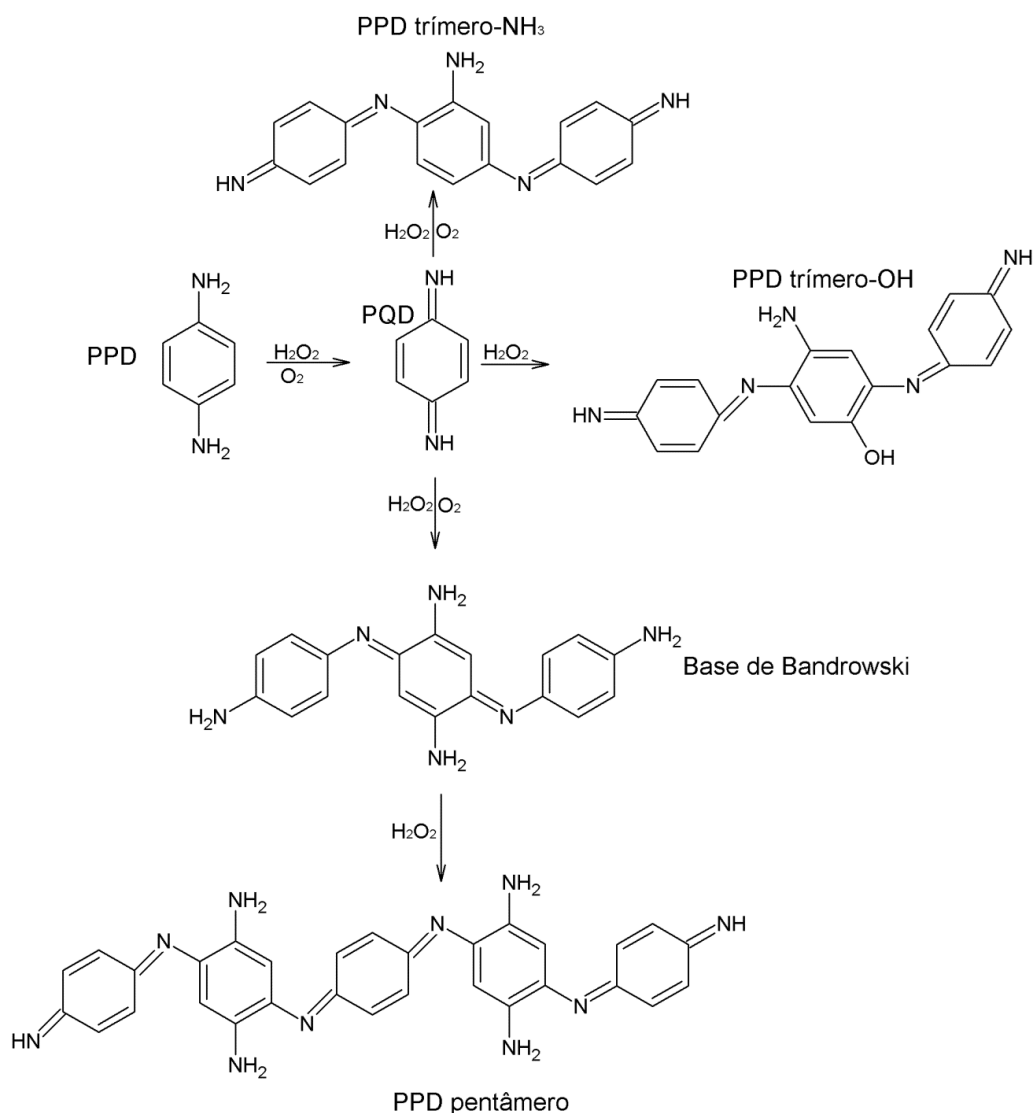
Tabela 2 – Produtos encontrados através da oxidação de PPD exposto ao ar atmosférico e em meio de peróxido de hidrogênio.

Espécies	PPD na presença de O ₂		PPD na presença de H ₂ O ₂	
	Experimental Valor de m/z [M+H] ⁺ íon	<i>t_r</i> (min)	Experimental Valor de m/z [M+H] ⁺ íon	<i>t_r</i> (min)
PPD 	109,3	1,71	109,2	1,79
PQD 	107,4	2,07	107,2	2,09
BB 	319,3	8,41	319,0	8,23
PPD trímero-NH₃ 	302,4	6,37	302,0	6,37
PPD trímero-OH 	---	---	318,2	9,03
PPD pentâmero 	---	---	527,0 (264,1, [M+2H] ²⁺)	8,02

t_r: tempo de retenção.

O mecanismo da reação de oxidação e a formação dos dímeros de PPD em meio de O₂ e H₂O₂ são demonstrados no esquema 2. Os mecanismos de formação de PQD, BB e do trímero-NH₃ são semelhantes em ambos os meios

oxidantes. Já em meio de peróxido de hidrogênio, a reação vai além, chegando até a formação do pentâmero.



Esquema 2 – Oxidação e formação dos dímeros de PPD em meio de oxidante.

4.1.7. Influência do peróxido de hidrogênio na reação entre PPD e RSN

Em tinturas de cabelo permanentes, a coloração do cabelo geralmente é produzida no interior da fibra capilar pela mistura de um agente precursor (Ex: PPD) e um agente acoplador (Ex: RSN) em meio alcalino na presença de um agente oxidante (Ex: peróxido de hidrogênio)^{93; 94}. Portanto, a determinação desses precursores de corante e substâncias análogas em produtos comerciais tem sido monitorada por agências governamentais e indústrias de cosméticos.

Entretanto, além do precursor e acoplador usado na mistura, há uma grande preocupação da comunidade científica com os produtos gerados desta reação.

Com o intuito de avaliar os produtos gerados na reação entre PPD e RSN, utilizou-se as técnicas de espectroscopia UV-Vis, LC-MS/MS e o sensor desenvolvido com vistas a detecção dos possíveis produtos gerados.

Primeiramente, investigou-se a estabilidade de PPD e RSN pela técnica espectrofotométrica na região do UV-Vis. Como mostrado na Figura 10.I, na ausência de agente oxidante, os espectros de PPD, monitorados durante 120 min, são caracterizados apenas por uma banda em 307 nm. Porém, quando peróxido de hidrogênio é adicionado em solução de PPD, após 20 min de reação, além da banda característica do PPD, observa-se a presença de outra banda em 474 nm, indicando a formação do PQD⁹⁵. Com o decorrer do tempo, a banda do intermediário aumenta ininterruptamente devido a contínua oxidação do PPD (Figura 10.II).

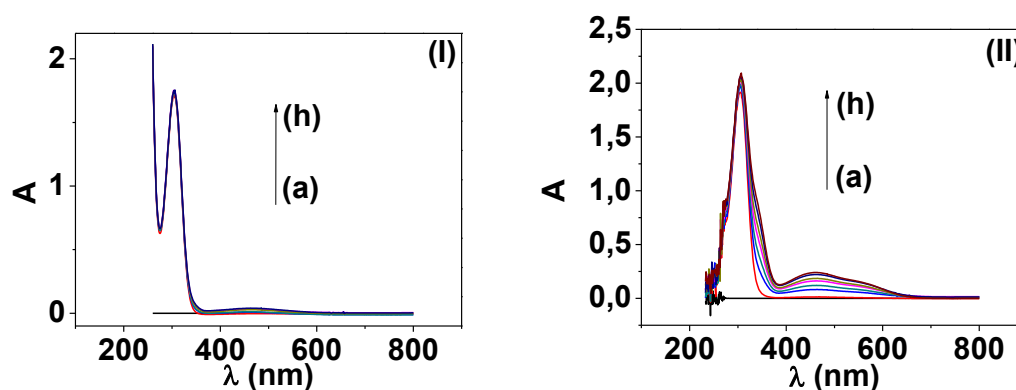


Figura 10 – Espectros de UV-Vis para de 11,00 mg L⁻¹ de PPD em 0,10 mol L⁻¹ de solução amoniacal (a) (pH 8,00) na ausência (I) e na presença (II) de 1% de peróxido de hidrogênio nos tempos 0 (b), 20 (c), 40 (d), 60 (e), 80 (f), 100 (g) e 120 min (h).

De maneira semelhante, a estabilidade do RSN foi verificada. Como mostrado na Figura 11, apenas uma banda em 281 nm é encontrada para solução contendo RSN na ausência (I) e na presença (II) de H₂O₂ durante o tempo estudado, indicando boa estabilidade do analito em meio oxidante.

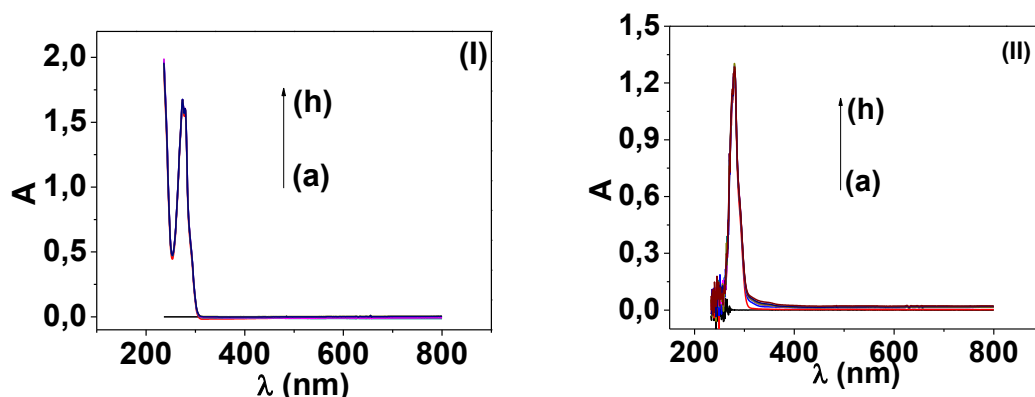


Figura 11 – Espectros de UV-Vis para de 11,00 mg L⁻¹ de RSN em 0,10 mol L⁻¹ de solução amoniacal (a) (pH 8,00) na ausência (I) e na presença (II) de 1% de peróxido de hidrogênio nos tempos 0 (b), 20 (c), 40 (d), 60 (e), 80 (f), 100 (g) e 120 min (h).

Para melhor identificação dos produtos formados entre PPD e RSN, espectros na região do UV-Vis foram registrados para soluções de RSN e PPD em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) + 1% de H₂O₂ nas proporções de 2:1, 5:1, 7:1 e 10:1(v/v) , respectivamente. Como exemplificado na Figura 12.I, para concentrações fixas de PPD em meio oxidante, não há evidências de produtos após 30 min de reação. No entanto, para concentrações fixas de RSN em meio oxidante, o aumento da concentração de PPD apresenta o surgimento de duas bandas em 423 e 604 nm, onde suas intensidades de banda aumentam com a concentração de PPD, sugerindo a formação de pelo menos 2 produtos, como mostra a Figura 12.II.

Desta forma, para melhor evidência da formação dos produtos vistos por espectrofotometria UV-Vis, a reação foi conduzida e os produtos analisados por LC-MS/MS (APÊNDICE VIII). De acordo com o comportamento observado nos estudos de espectrofotometria na região do visível (Figura 12.II), optou-se por realizar a reação na proporção 7:1 de PPD e RSN, respectivamente [PPD (75,70 mg L⁻¹) e RSN (11,00 mg L⁻¹)] em meio de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) + 1% de peróxido de hidrogênio.

As análises individuais do PPD mostraram um pico intenso no cromatograma em 1,79 min com m/z = 109,2 (APÊNDICE III), como mostrado na Figura 13. As características são semelhantes ao padrão descrito na literatura para o PPD²⁶. As análises individuais de RSN por LC-MS/MS

apresentaram um pico com baixa intensidade no tempo de retenção (t_r) de 6,43 min com $m/z= 111,1$ (APÊNDICE IX).

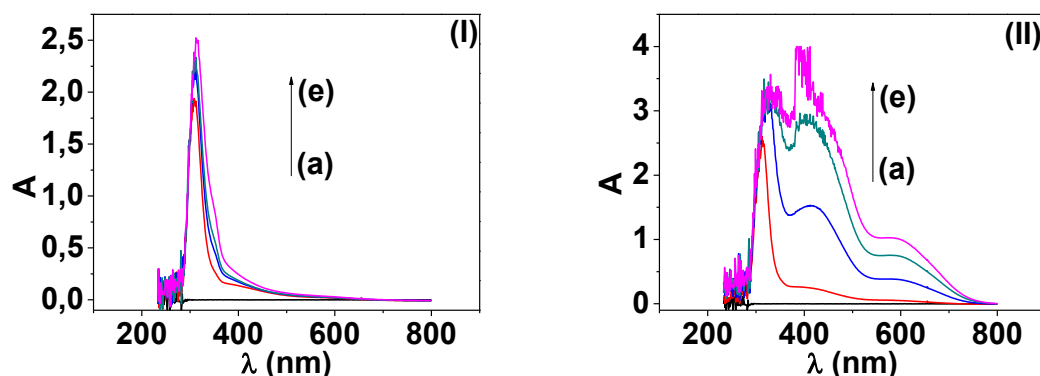


Figura 12 – Espectros para soluções de 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (a) (pH 8,00) variando-se a concentração de RSN em 21,60 (b), 55,00 (c), 75,70 (d) e 108,00 mg L⁻¹ (e), fixando PPD em 11, 00 mg L⁻¹ (I) e variando-se a concentração de PPD de 21,60 (b), 55,00 (c), 75,70 (d) e 108,00 mg L⁻¹ (e), fixando RSN em 11,00 mg L⁻¹.

No entanto, através da mistura entre soluções de PPD e RSN em 1% de H₂O₂, após 30 min de reação, três produtos principais são identificados, além de PPD (Figura 13). Primeiramente, a oxidação de PPD forma o intermediário reativo PQD caracterizado por um pico no tempo de retenção de 2,09 min e $m/z= 107,2$ (APÊNDICE II)²⁶. Concomitantemente, observa-se a formação do produto Base de Basndrowski (BB) no tempo de retenção de 8,23 min com $m/z= 319,0$ (APÊNDICE VI)²⁶, mostrando que o mesmo também ocorre na reação com resorcinol. Este dado é importante, pois estudos na literatura indicam que BB é um produto indesejado devido as suas características mutagênicas²⁶. A seguir, também identificou-se a formação do corante vermelho no tempo de retenção de 5,38 min com $m/z= 215,0$ (APÊNDICE X). Ainda observou-se a formação do corante verde em 6,84 min com uma $m/z= 321,2$ (APÊNDICE XI), composto denominado “corante verde Indoanilina”. Os produtos envolvidos na reação entre PPD e RSN em meio alcalino contendo peróxido de hidrogênio, detectados por LC-MS/MS são apresentados na Tabela 3.

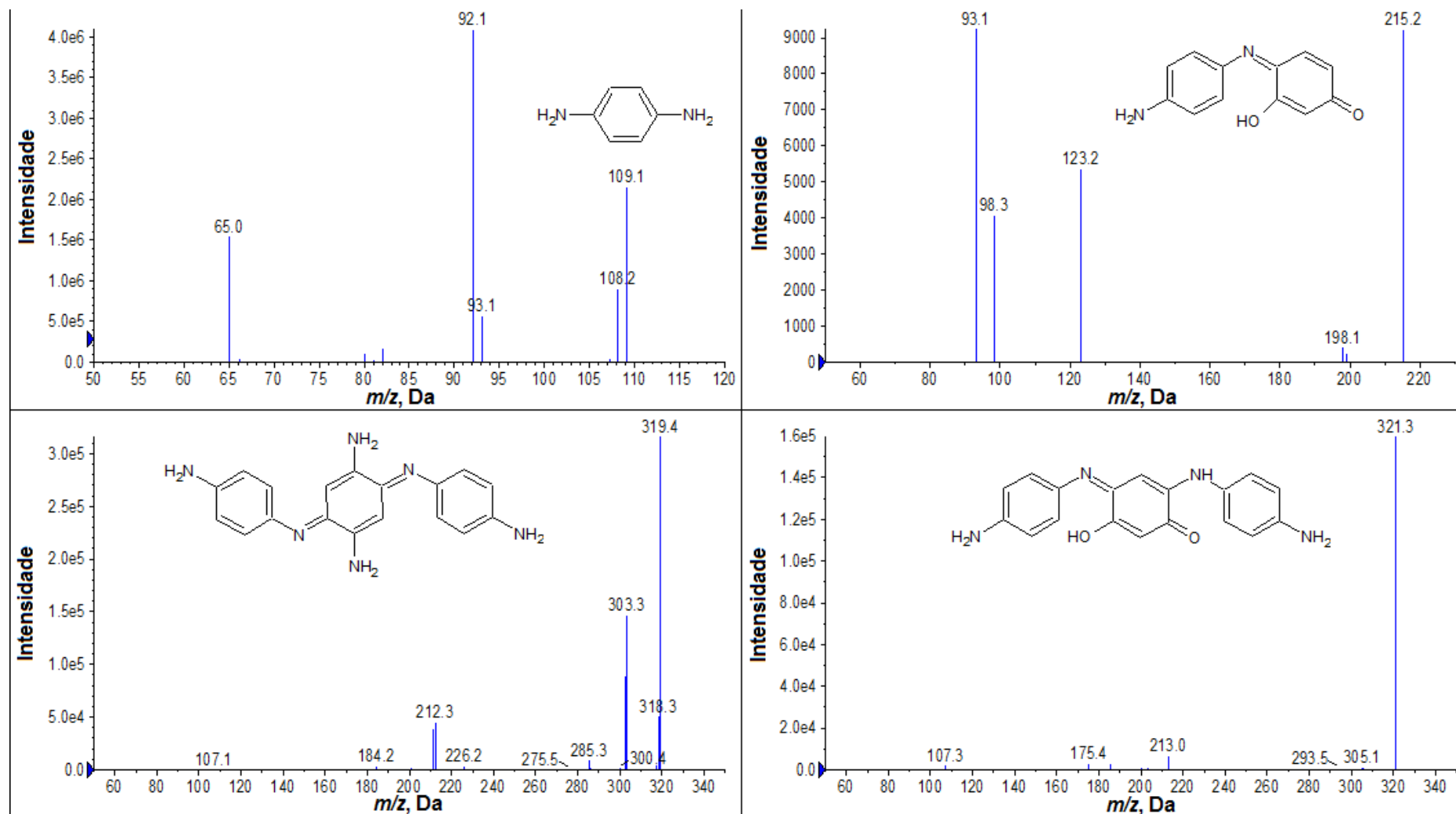
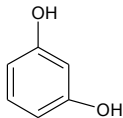
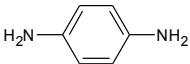
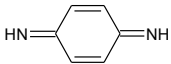
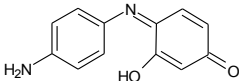
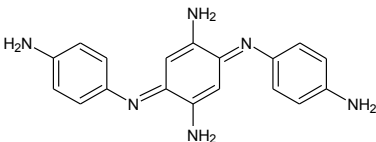
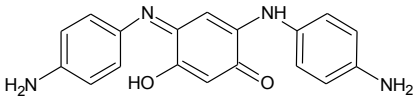


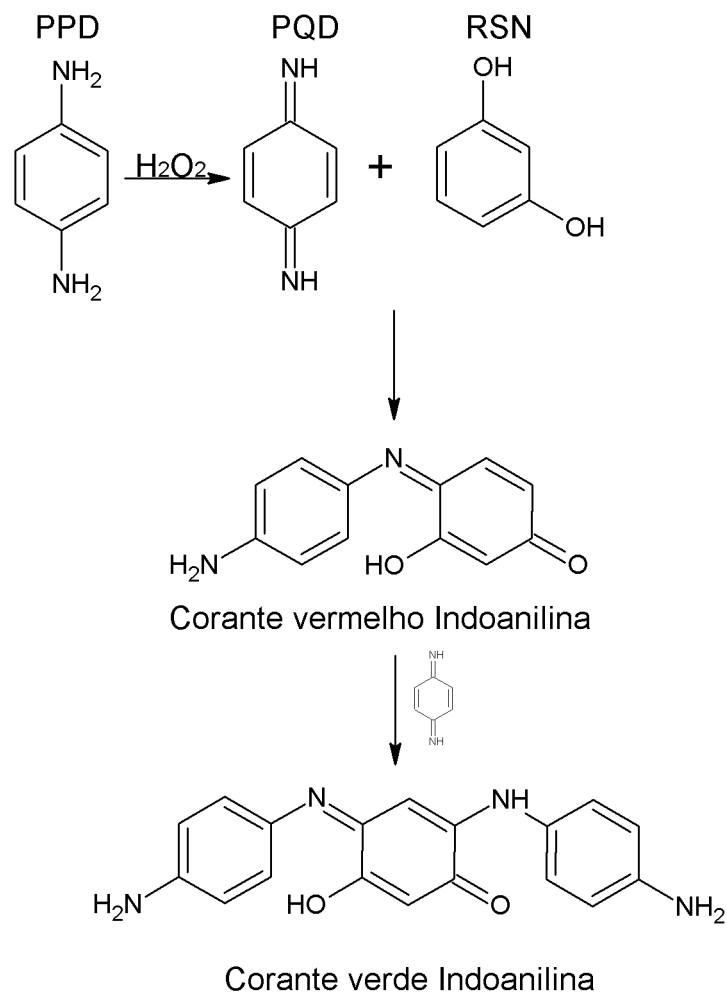
Figura 13 – LC-MS/MS para 75,70 mg L⁻¹ de PPD e 11,00 mg L⁻¹ de RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) com 1% de H₂O₂.

Tabela 3 – Substâncias encontradas para reação entre PPD e RSN antes e depois da adição de 1% de H₂O₂ analisadas por LC-MS/MS.

Espécies	PPD + RSN + H ₂ O ₂	
	Experimental m/z valor do íon [M+H] ⁺	t _r . (min.)
RSN		
	111,1	6,43
PPD		
	109,2	1,79
PQD		
	107,2	2,09
corante vermelho Indoanilina		
	215,0	5,38
BB		
	319,0	8,23
corante verde Indoanilina		
	321,2	6,84

t_r. = tempo de retenção.

Segundo a literatura, a reação entre PPD e RSN pode formar diversos produtos. Conforme mostrado no esquema 3, quando PPD está em meio de peróxido de hidrogênio, forma-se o produto intermediário PQD. Com isso, na presença de RSN, ocorre a formação dos corantes de cabelo propriamente dito como exemplificado no esquema 3.



Esquema 3 – Possíveis produtos formados através da reação entre PPD e RSN na presença de H_2O_2 .

4.1.8. Aplicação do sensor voltamétrico na determinação dos produtos da reação entre PPD e RSN em meio de H_2O_2

Voltamogramas de varredura linear foram registrados para a mistura de $75,70 \text{ mg L}^{-1}$ de PPD e $11,00 \text{ mg L}^{-1}$ de RSN em tampão amoniacal $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,00) com 1% de H_2O_2 . Como mostrado na Figura 14 (curva III), as respectivas curvas obtidas para a mistura apresentam quatro picos de oxidação. Os picos (a) e (b) são atribuídos a oxidação de PPD e RSN nos potenciais de +0,14 e +0,52 V vs Ag/AgCl, respectivamente. Outros dois picos em potenciais de -0,11 e +0,36 V, indicam a detecção de dois produtos assinalados como (c) e (d) na Figura 14 (curva III), que podem ser atribuídos aos produtos BB e aos corantes verde e vermelho, conforme dados anteriores.

Voltamograma de varredura linear para 75,70 mg L⁻¹ de PPD em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) com 1% de H₂O₂ foi realizado e mostrado na curva II da Figura 14. Observa-se apenas um pico no potencial de +0,14 V, correspondendo ao PPD (a). Considerando que nestas condições BB seria preponderante, pode-se concluir que este trímero não é detectado na faixa eletroquímica estudada. Assim, os picos encontrados nos potenciais de -0,11 e +0,36 V (c e d) (Figura 14, curva III), bem como as bandas de absorção em 423 e 604 nm (Figura 12.II), poderiam ser atribuídas aos produtos “corante vermelho Indoanilina” e “corante verde Indoanilina”.

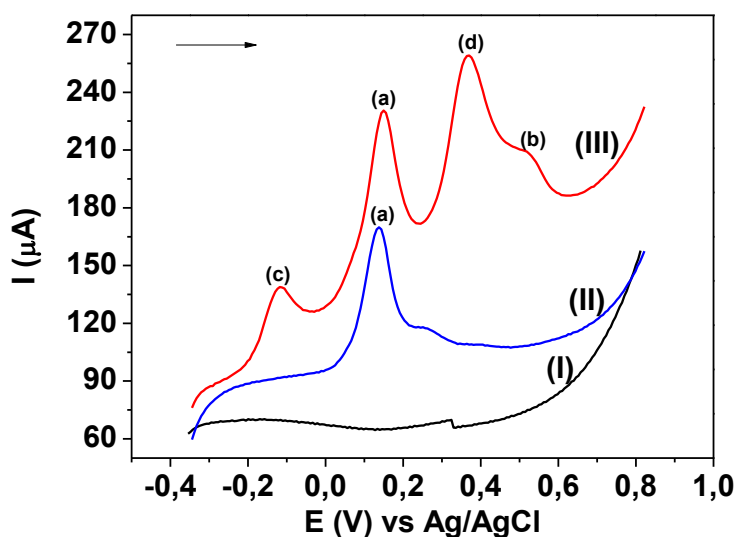


Figura 14 – Voltametria de varredura linear para o monitoramento da reação entre PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) em meio de 1% de peróxido de hidrogênio (I) na presença de 75,70 mg L⁻¹ de PPD (II) e na presença de 75,70 mg L⁻¹ de PPD e 11,00 mg L⁻¹ de RSN (III). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

4.1.9. Desempenho analítico

Para verificar o desempenho analítico do sensor usando MWNTs-CHT/GCE para a detecção simultânea de PPD e RSN em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00), varreduras lineares, de pulso diferencial e onda quadrada foram registradas para melhor sensibilidade do método. No entanto,

para as técnicas de pulso (pulso diferencial e onda quadrada), apenas o pico de PPD foi observado, enquanto que para voltametria linear, ambos os picos foram identificados.

Deste modo, em virtude da complexidade dos produtos formados da reação entre PPD e RSN, nesta etapa do trabalho optou-se por monitorar PPD e RSN na ausência de peróxido de hidrogênio. Utilizando-se as condições previamente otimizadas, curvas analíticas foram construídas no intervalo de 0,55 a 21,2 mg L⁻¹. Os voltamogramas são mostrados na Figura 15 sob velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. As correntes de pico para ambos os analitos aumentam linearmente com o aumento de suas concentrações, apresentando as seguintes equações de regressão linear: $I_{pa} = 0,37x[PPD] + 5,20 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,99$) e $I_{pa} = 0,31x[RSN] + 0,81 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,99$), com excelente linearidade no intervalo estudado, como mostra a Figura 16.

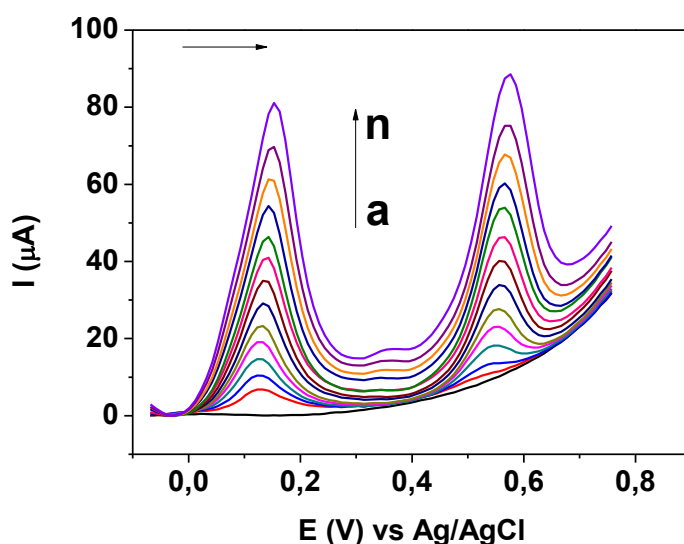


Figura 15 – Voltamogramas de varredura linear em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00) para PPD e RSN nas seguintes concentrações: a (a), 0,55 (b), 1,10 (c), 2,20 (d), 3,30 (e), 4,40 (f), 6,00 (g), 7,60 (h), 9,20 (i), 10,80 (j), 12,90 (k), 15,00 (l), 17,10 (m) e 21,20 mg L⁻¹ (n). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

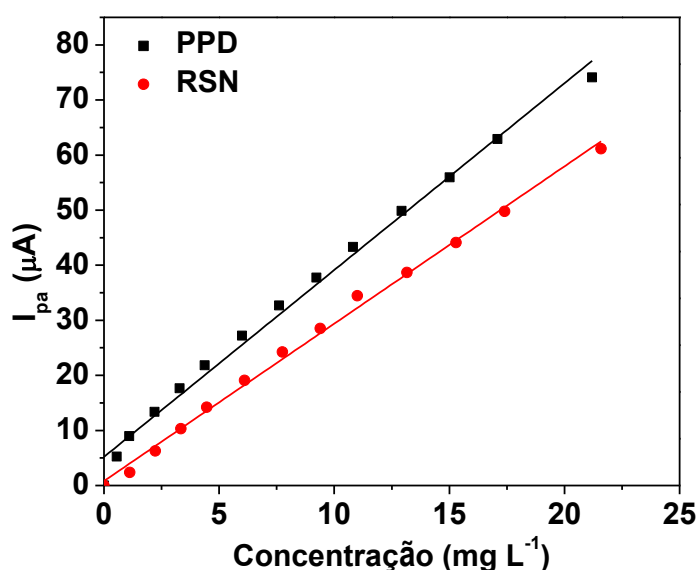


Figura 16 – Relação linear entre I_{pa} vs [PPD] e I_{pa} vs [RSN] no intervalo de 0,55 a 21,2 mg L⁻¹ em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 8,00).

Os limites de detecção (*L.D.*) e quantificação (*L.Q.*) foram calculados com base nas seguintes equações: $L.D. = 3std / m$ e $L.Q. = 10std / m$, onde *std* é o desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração e *m* o coeficiente angular da curva⁹⁶. Assim, o *L.D.* foi de 0,79 e 0,58 mg L⁻¹ e *L.Q.* foi de 2,66 e 1,87 mg L⁻¹ para PPD e RSN, respectivamente.

A reprodutibilidade do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo entre os valores de corrente de pico para 10 determinações. Os valores encontrados foram 0,73 e 2,35% para 2,70 mg L⁻¹ e 0,87 e 1,08% para 15,96 mg L⁻¹ para PPD e RSN, respectivamente.

A seguir, investigou-se a correlação entre a resposta linear de uma das espécies mantendo-se a outra fixa. A Figura 17.I mostra os voltamogramas para a variação de PPD no intervalo de 0,55 a 17,20 mg L⁻¹, fixando-se RSN em concentração de 2,16 mg L⁻¹. A curva analítica correspondente a determinação de PPD em diferentes concentrações fixando-se RSN é mostrada na Figura 17.II. De maneira semelhante, variou-se a concentração de RSN entre 0,55 a 9,40 mg L⁻¹ e fixou-se PPD em 2,16 mg L⁻¹ (Figura 18.I). O estudo mostra que a curva analítica para determinação de RSN pode ser construída na presença da PPD e segue uma relação linear como mostrado na Figura 18.II. Em adição, todas as medidas utilizando o MWNTs-CHT/GCE não

houve necessidade de nenhum tratamento eletroquímico ou lavagem para regenerar a superfície do eletrodo, o que sugere que a superfície do eletrodo não sofre envenenamento.

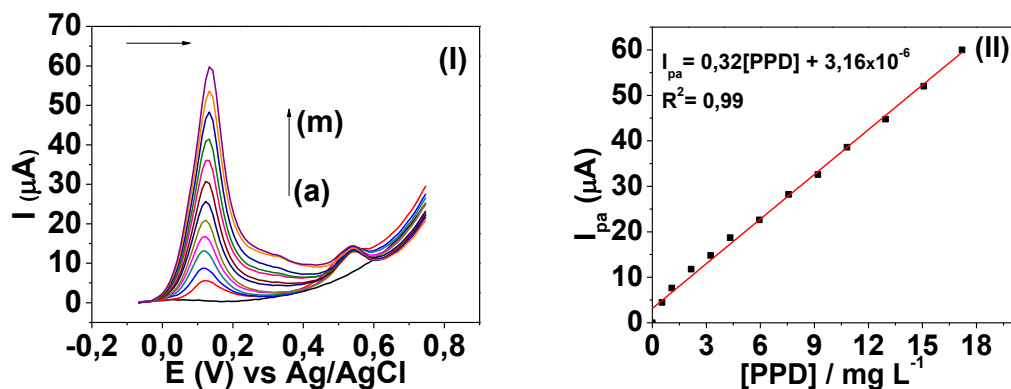


Figura 17 – Voltamogramas de varredura linear em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão amoniacal (a) fixando RSN em $2,16 \text{ mg L}^{-1}$ e variando PPD em 0,55 (b), 1,10 (c), 2,20 (d), 3,30 (e), 4,40 (f), 6,05 (g), 7,70 (h), 9,40 (i), 10,81 (j), 12,95 (k), 15,08 (l) e $17,20 \text{ mg L}^{-1}$ (m) (I) e relação linear entre I_{pa} vs [PPD] (II). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

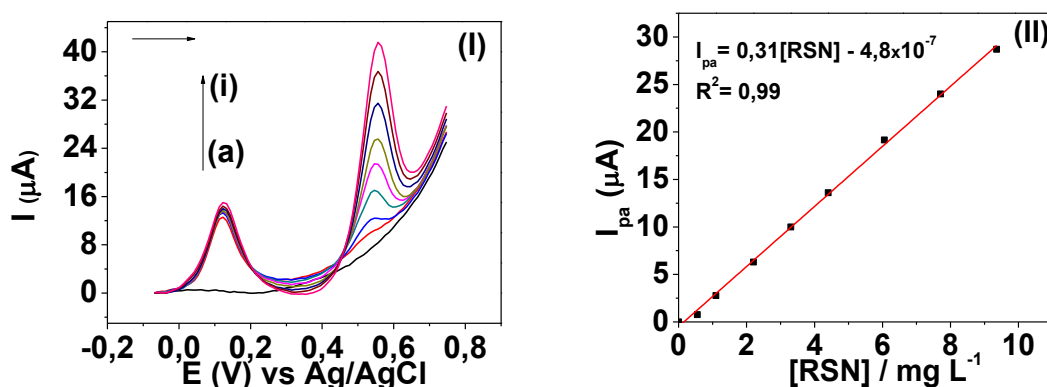


Figura 18 - Voltamogramas de varredura linear em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão amoniacal (a) fixando PPD em $2,16 \text{ mg L}^{-1}$ e variando PPD em 0,55 (b), 1,10 (c), 2,20 (d), 3,30 (e), 4,40 (f), 6,05 (g), 7,70 (h) e $9,40 \text{ mg L}^{-1}$ (i) (I) e relação linear entre I_{pa} vs [RSN] (II). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

4.1.10. Aplicação analítica do método proposto

Amostras de água de torneira foram contaminadas com $2,74 \text{ mg L}^{-1}$ de PPD e RSN foram analisadas utilizando o método proposto. Como mostrado na Tabela 4, para todas as amostras, os valores encontrados para as recuperações ficaram no intervalo de 97,1 a 102,2%. O valor de t calculado (teste t não pareado) ($t_{calc.}$) foi menor do que o t crítico ($t_{crit.}$), indicando que não existe diferença significativa no nível de 95% de confiança entre a concentração contaminada e a recuperada. Além disso, as recuperações de PPD e RSN em água de torneira não excederão 3% de erro, indicando boa aplicabilidade do método.

Tabela 4 – Recuperação de PPD e RSN em água de torneira contaminada com $2,74 \text{ mg L}^{-1}$.

Amostra	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
Analito	PPD	RSN	PPD	RSN	PPD	RSN
Adicionado (mg L^{-1})	2,74	2,74	2,74	2,74	2,74	2,74
Encontrado (mg L^{-1})	$2,73 \pm 0,03$	$2,79 \pm 0,04$	$2,66 \pm 0,04$	$2,70 \pm 0,05$	$2,78 \pm 0,02$	$2,80 \pm 0,06$
Recuperação (%)	99,63	101,82	97,10	98,54	101,46	102,20
$t_{calc.}$	0,58	2,16	3,46	1,38	3,46	1,73

$t_{crit.} = 4,30$; $n = 3$.

A aplicabilidade do MWNTs-CHT/GCE foi testada em amostras de corante de cabelo permanente. Segundo procedimento descrito na parte experimental, após dissolução da amostra, uma alíquota foi utilizada para determinação de PPD e RSN em amostra de corante comercial sem qualquer pré-tratamento. As determinações de ambos compostos foram feitas em triplicata aplicando-se o método de adição de padrão, onde os voltamogramas apresentaram picos bem definidos (Figura 19.I) e excelente relação linear para a adição de padrão no intervalo de concentração entre $2,20$ a $10,90 \text{ mg L}^{-1}$, como mostrado na Figura 19.II.

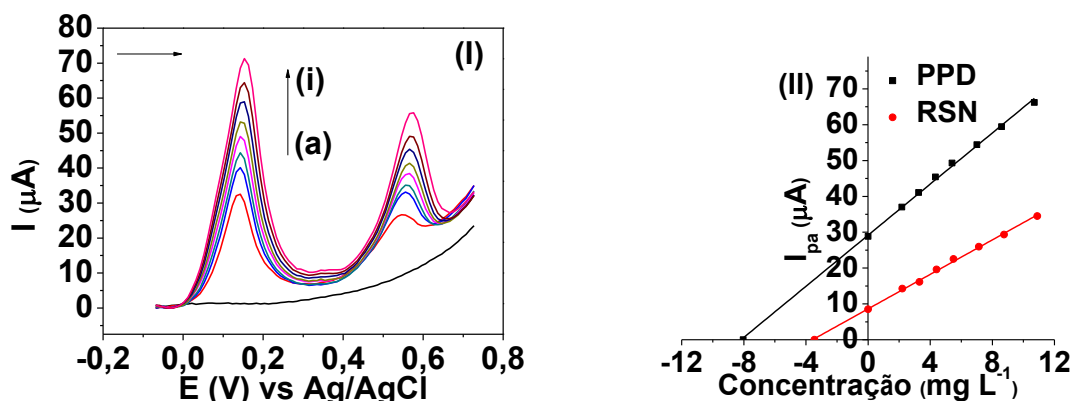


Figura 19 – Voltamogramas de varredura linear para MWCNTs-CHT/GCE em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão amoniacal (pH 8,00) (a), adição de $100 \mu\text{L}$ da amostra (b) e sucessivas adições de solução padrão de PPD e RSN nas concentrações 2,20 (c), 3,36 (d), 4,35 (e), 5,50 (f), 7,10 (g), 8,60 (h) e $10,90 \text{ mg L}^{-1}$ (i) (I). Relação linear entre I_{pa} vs [PPD] e I_{pa} vs [RSN] (II). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Os valores médios encontrados para PPD e RSN no corante de cabelo permanente foram $24,10$ e $10,34 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, por grama de corante de cabelo.

A seguir o método foi validado por espectrofotometria na região UV-Vis, onde os resultados encontrados para os dois métodos são mostrados na Tabela 5. Calculando o teste *t students* (teste *t* pareado), os valores encontrados foram de 1,07 para o PPD e de 1,54 para o RSN, onde os valores calculados são menores que o valor do $t_{crit. (4,30)}^{97}$. Desta forma, os resultados não mostraram diferença significativa no nível de 95% de confiança entre os dois métodos.

Tabela 5 – Determinação de PPD e RSN em amostra de corante de cabelo utilizando o método proposto e técnica de espectrofotometria UV-Vis.

Analito	PPD		RSN	
	MWNTs-CHT/GCE	UV-Vis	MWNTs-CHT/GCE	UV-Vis
Valores encontrado				
(mg / g de corante de cabelo)	$24,10 \pm 0,88$	$23,81 \pm 0,20$	$10,34 \pm 0,07$	$10,14 \pm 0,55$

4.2. Análise do corante básico azul 41 sobre eletrodo de carbono impresso

4.2.1. Caracterização morfológica dos eletrodos impressos

As Figuras 20 e 21 comparam os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o eletrodo de carbono impresso antes e após a modificação com grafeno. Na aproximação de 5.000 vezes (Figura 20.A) é observada uma superfície irregular, com pequenas cavidades na superfície do eletrodo de carbono impresso, que mostra uma superfície bastante porosa (Figura 20 C e D).

O eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno apresenta uma superfície bastante rugosa e porosa (Figura 21), que se definem como estruturas laminares com formatos de folhas, referente ao grafeno presente na superfície do eletrodo (a partir de aproximações de 20.000 vezes).

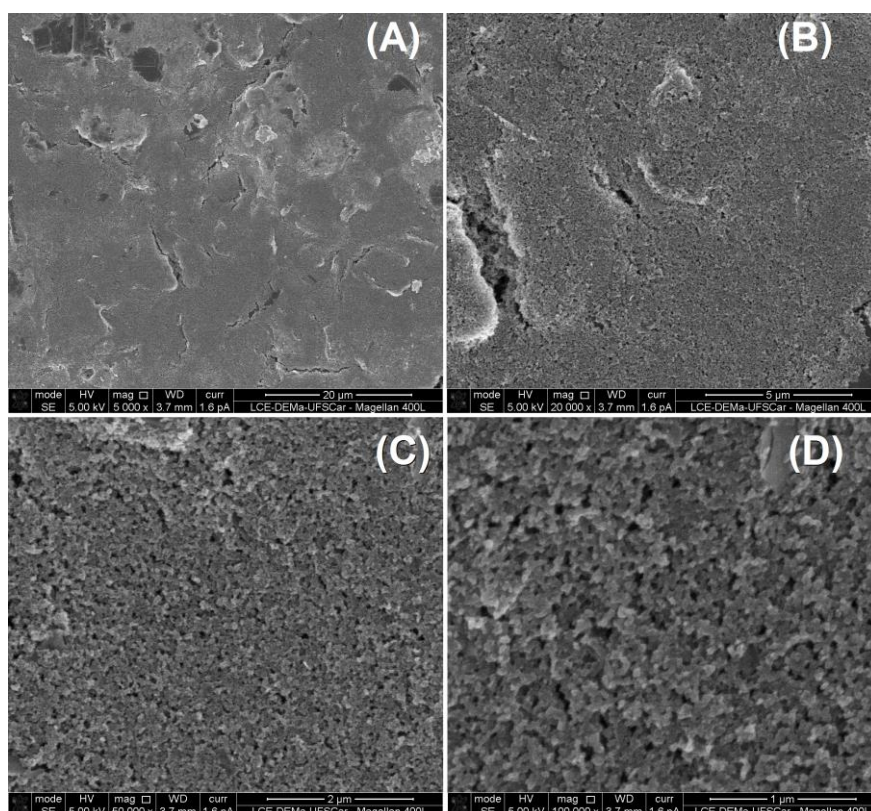


Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura para eletrodo de carbono impresso para ampliações de 5.000 (A), 20.000 (B), 50.000 (C) e 100.000 vezes (D).

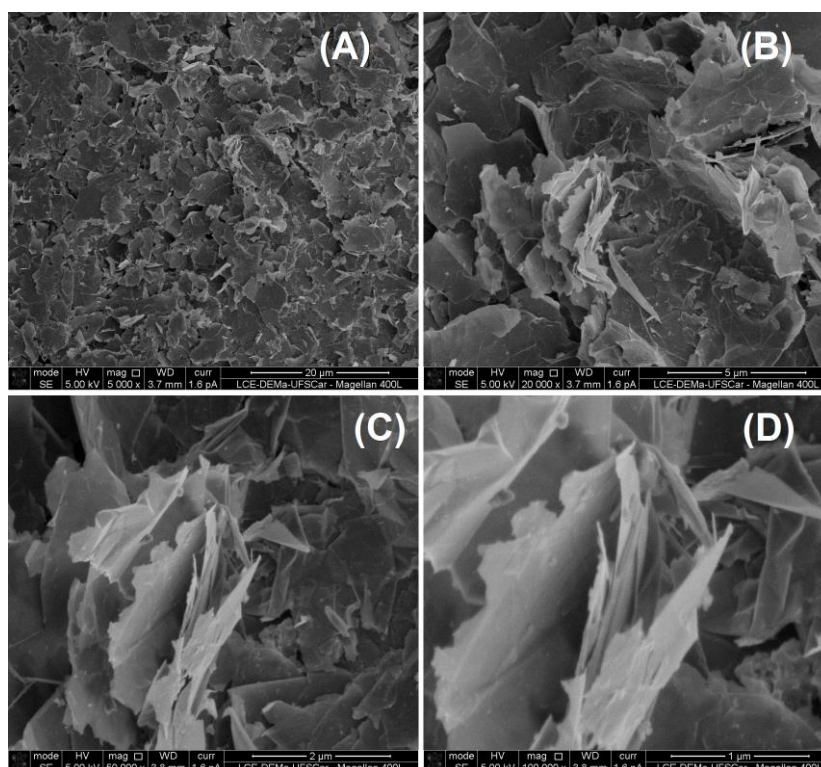


Figura 21 – Microscopia eletrônica de varredura para eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno para ampliações de 5.000 (A), 20.000 (B), 50.000 (C) e 100.000 vezes (D).

4.2.2. Redução voltamétrica do corante BA-41

A Figura 22 apresenta o voltamograma cíclico obtido para redução de BA-41 em tampão B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,30) sob vários tipos de eletrodos. Como mostrado na Figura 22.a, o corante é reduzido sobre o eletrodo de carbono vítreo (GCE), apresentando um par de picos de pequena intensidade nos potenciais de $-0,26 \text{ V}/-0,28 \text{ V}$, correspondendo à redução do grupo azo⁹⁸. Sobre o eletrodo de carbono impresso (ECI), a redução do corante apresenta picos com características semelhantes ao GCE (Figura 22.b). A redução do corante sobre o eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno (ECIMG), nas mesmas condições de trabalho (Figura 22.c), apresentou um par de picos nos potenciais $-0,23 \text{ V}/-0,26 \text{ V}$, resultando em uma variação entre $E_{pa} - E_{pc} = 30 \text{ mV}$ e valores de $I_{pa}/I_{pc} = 1$. Este comportamento é típico de um processo com transferência de carga reversível de $2e^-$ e semelhante com outros processos que envolvem redução do grupo azo à hidrazo (esquema 4). Além disto, observa-se que ambas as correntes anódica e catódica apresentam

acréscimo de 1.300% comparada aos eletrodos de carbono impresso e carbono vítreo, ambos sem modificação.

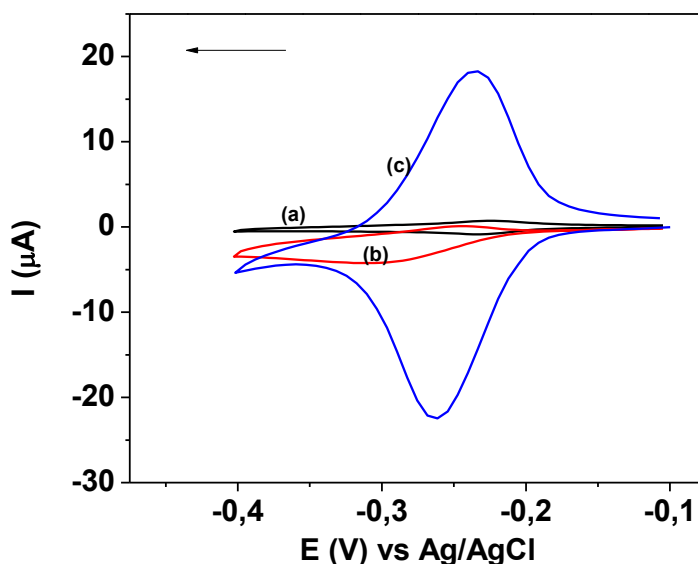
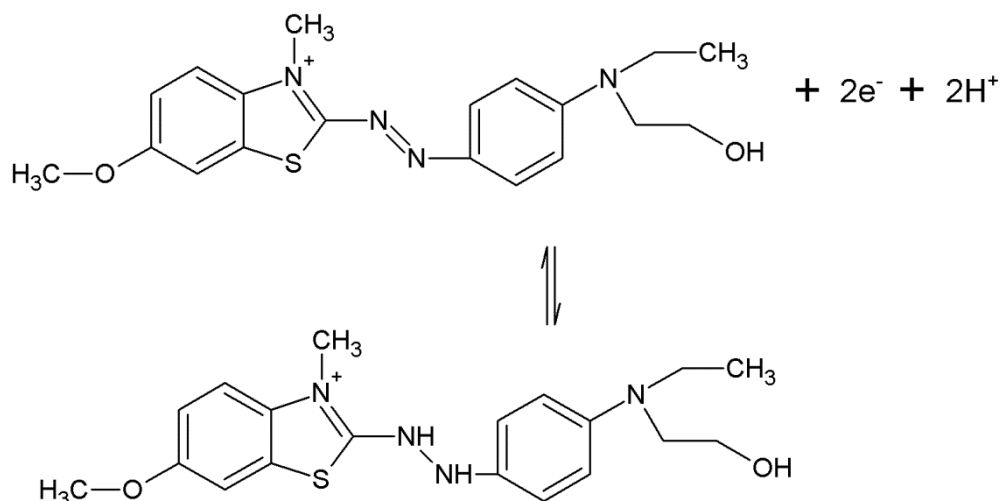


Figura 22 – Voltamogramas cíclicos registrados para 48,25 mg L⁻¹ de BA-41 em 0,10 mol L⁻¹ de tampão amoniacal (pH 7,30) sobre GCE (a), ECI (b) e ECIMG (c). Velocidade de varredura de 75 mV s⁻¹.



Esquema 4 – Redução do corante BA-41 sobre ECIMG.

A Figura 23.I apresenta as curvas de varreduras sucessivas obtidas para o corante sobre ECIMG. Observa-se claramente um aumento de ambas as correntes catódica e anódica em função do tempo, sugerindo que o corante é

acumulado na superfície do eletrodo impresso modificado em função da exposição ao analito.

Deste modo, investigou-se um procedimento padrão para a obtenção de uma resposta estável. Para isto, testou-se o pré-acúmulo sobre tempo de acúmulo em tempo pré-determinado ($t_{ac.}$). O corante foi adsorvido no ECIMG durante 45 s sob agitação magnética. Em seguida, o ECIMG foi submetido à lavagem da superfície com água ultra pura para remoção do excesso superficial. Após este procedimento, o eletrodo foi transferido para a cela eletroquímica contendo apenas o eletrólito suporte. A Figura 23.II apresenta os ciclos voltamétricos sucessivos obtidos para redução do corante adsorvido. Os voltamogramas apresentaram corrente média de $15,53 \pm 0,24 \mu A$.

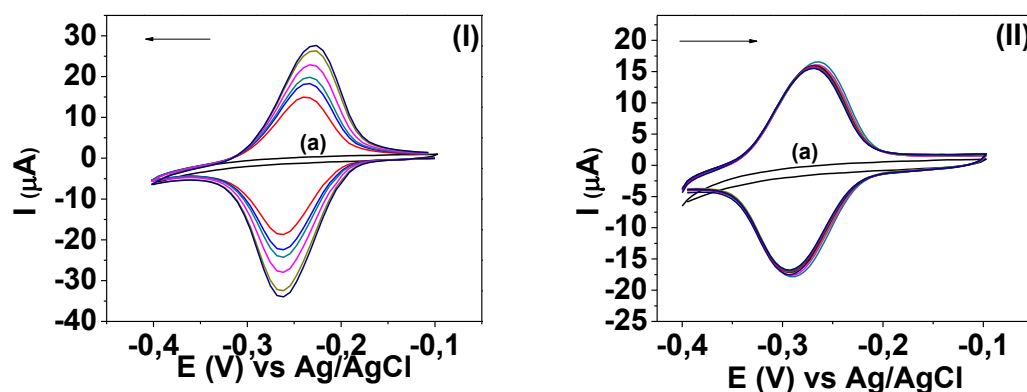


Figura 23 – Voltamogramas cíclicos em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 7,30) (a) para $48,26 \text{ mg L}^{-1}$ de BA-41 fazendo-se replicas com BA-41 na célula eletroquímica (I) e replicas deixando o eletrodo em béquer com BA-41 por 45 s e analisando na célula eletroquímica apenas com eletrólito suporte (II) no ECIMG. Velocidade de varredura de 75 mV s^{-1} .

4.2.3. O efeito da velocidade de varredura no processo redox do BA-41

O efeito da velocidade de varredura (v) sobre a intensidade dos picos anódico e catódico foi investigada para $24,13 \text{ mg L}^{-1}$ de BA-41 em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 7,30) usando pré-acúmulo de 45 s. Os respectivos voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 24.I. A corrente anódica aumenta segundo uma relação linear, com equação de $I_{pa} = 2,14 \times 10^{-4} v - 1,28 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,99$), já a corrente catódica aumenta linearmente com equação

de $I_{pc} = -2,21 \times 10^{-4}v + 8,98 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,99$) (Figura 24.II). Este comportamento é indicativo de que a transferência de carga é controlada por processo adsorativo⁵³.

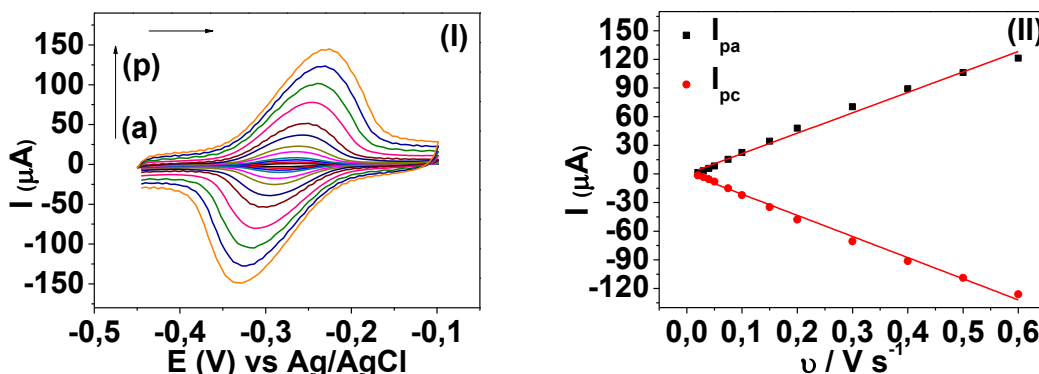


Figura 24 – Voltamogramas cíclicos para 24,13 mg L⁻¹ de BA-41 em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,30) nas velocidades de varredura de 2 (a), 5 (b), 7 (c), 10 (d), 20 (e), 30 (f), 40 (g), 50 (h), 75 (i), 100 (j), 150 (k), 200 (l), 300 (m), 400 (n), 500 (o) e 600 mV s⁻¹ (p) (I) e relação linear entre I_{pa} vs v e I_{pc} vs v (II). t_{ac} : 45 s.

A área ativa do eletrodo modificado foi calculada através da equação de Randles-Sevcik, representada pela equação 2. Para isso, utilizou-se neste experimento, uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio 1 mmol L⁻¹ (molécula sonda) em KCl 0,10 mol L⁻¹, com coeficiente difusional de oxidação tabelado em $7,60 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹. Através do estudo de velocidade de varredura pela técnica de voltametria cíclica (Figura 25.I), é possível encontrar a relação entre I_{pa} vs $v^{1/2}$, onde está relação (Figura 25.II), tem como equação de pico anódico $I_{pa} = 1,045 \times 10^{-4}v^{1/2} + 5,475 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,99$) e de pico catódico de $I_{pc} = -9,730 \times 10^{-5}v^{1/2} - 5,496 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0,99$). Com isso, a área ativa do eletrodo modificado foi de 0,14 cm² e para o eletrodo impresso sem modificação foi de 0,10 cm². Conhecendo-se a área ativa do eletrodo, utilizou-se a equação de Cottrell (equação 2) para descobrir o coeficiente de difusão do BA-41. Para isso, cronoamperogramas foram registrados no intervalo de 12,16 a 48,26 mg L⁻¹ de BA-41 fixando o potencial em -0,23 V, com a finalidade de descobrir o valor da relação I_p vs $t^{1/2}$. Assim, substituindo os valores na equação 2, o coeficiente de difusão encontrado foi de $2,73 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹.

Com o intuito de descobrir a concentração do corante BA-41 na superfície do eletrodo impresso modificado com grafeno, análises para 24,13 mg L⁻¹ de BA-41 foram realizados no intervalo de velocidade de varredura de 20 a 75 mV s⁻¹. Com isso, substituindo os valores na equação 3, a concentração de BA-41 presente na superfície do ECIMG é de $2,35 \times 10^{-7}$ g L⁻¹.

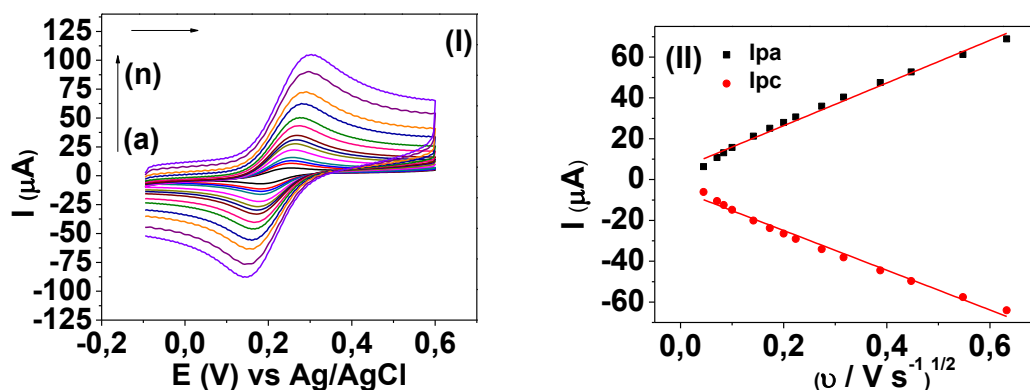


Figura 25 – Voltametria cíclica para solução de 1 mmol L⁻¹ de Fe²⁺/Fe³⁺ em meio de 0,10 mol L⁻¹ de KCl em velocidade de varredura de 2 (a), 5 (b), 7 (c), 10 (d), 20 (e), 30 (f), 40 (g), 50 (h), 75 (i), 100 (j), 150 (k), 200 (l), 300 (m) e 400 mV s⁻¹ (n) (I) e relação linear entre I_{pa} vs v e I_{pc} vs v (II).

4.2.4. Otimização do método

Afim de obter baixos níveis de detecção do BA-41 em meio aquoso, diferentes modos de varredura foram testados com o intuito de melhorar a sensibilidade do método. Assim, as técnicas voltamétricas de varredura linear, pulso diferencial e onda quadrada foram realizadas em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 7,30) para 4,82 mg L⁻¹ após 45 s de tempo de acúmulo. A comparação das correntes observadas para todos os processos são mostradas na Figura 26. Observa-se um aumento de pico de aproximadamente 5.445 e 321% para voltametria de onda quadrada quando comparada à voltametria de varredura linear e à voltametria de pulso diferencial, respectivamente. Sendo assim, a técnica de onda quadrada foi escolhida para quantificação do corante.

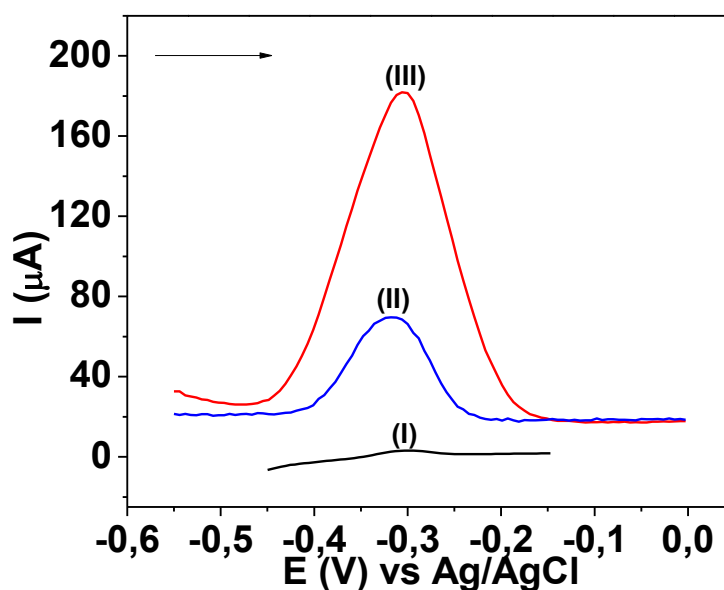


Figura 26 – Voltametria de varredura linear (I), pulso diferencial (II) e onda quadrada (III) em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 7,30) para $4,82 \text{ mg L}^{-1}$ de BA-41 em ECIMG. t_{ac} : 45 s.

A seguir, os parâmetros inerentes da técnica de voltametria de onda quadrada, bem como o pH, foram otimizados por meio do planejamento fatorial 2^4 , matriz de Doehlert e metodologia multi-respostas^{82; 83; 85}. A Tabela 6 apresenta os parâmetros estudados, bem como seus respectivos níveis e, na Figura 27, alguns voltamogramas do planejamento fatorial são mostrados.

Tabela 6 – Parâmetros e níveis estudados no planejamento fatorial 2^4 .

Parâmetros	Mínimo (-)	Ponto Central (0)	Máximo (+)
pH	3	5,5	8
f (Hz)	8	16,5	25
E_{sw} (mV)	2	6	10
ΔE (mV)	10	55	100

f : frequência, E_{sw} : rampa de potencial, ΔE : amplitude de pulso.

Os sinais analíticos (I_{pa} e $W(1/2)$) provenientes do planejamento fatorial 2^4 , realizados em triplicata, foram convertidos em termos de desejabilidade individual. Posteriormente, foram transformados em desejabilidade global, pois, como utilizou-se duas respostas analíticas, através destes termos é possível

reunir as diversas respostas analíticas em apenas uma, facilitando o tratamento estatístico.

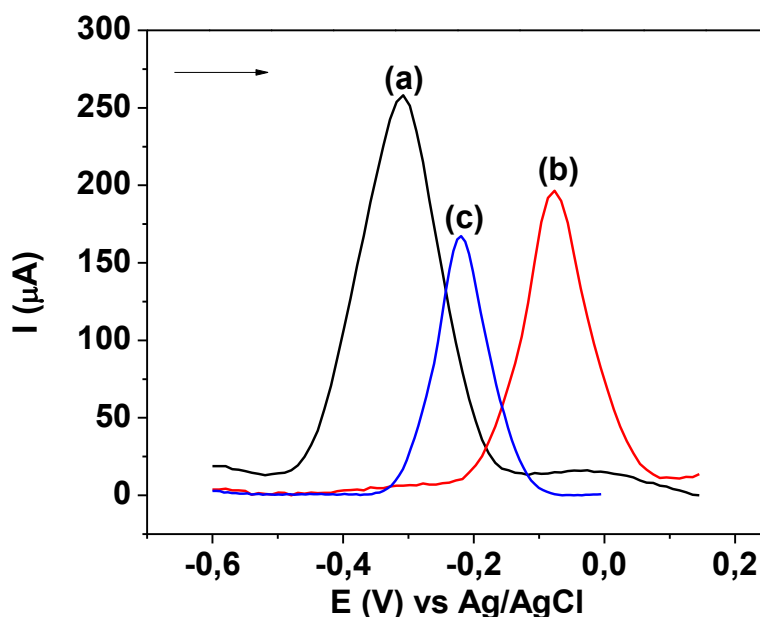


Figura 27 – Voltamogramas de onda quadrada para os experimentos 1 ($f = 100$ Hz, $E_{sw} = 10$ mV, $pH = 8$ e $\Delta E = 100$ mV) (a), 2 ($f = 100$ Hz, $E_{sw} = 10$ mV, $pH = 3$ e $\Delta E = 100$ mV) (b) e 17 ($f = 16,5$ Hz, $E_{sw} = 6$ mV, $pH = 5,5$ e $\Delta E = 55$ mV) (c) do planejamento fatorial 2^4 .

Para o cálculo da desejabilidade global de cada experimento, foram determinadas primeiramente desejabilidades individuais (Di). A desejabilidade individual é expressa em um valor adimensional variando de 0 (resposta indesejada) à 1 (resposta desejada). Como o objetivo deste trabalho é maximizar a intensidade de variação de corrente, a desejabilidade individual da I_{pa} para cada experimento pode ser calculada através da equação 7:

$$Di_{I_{pa}} = \frac{(y-L)}{(H-L)} \quad (\text{Equação 7}),$$

onde y é o valor adquirido experimentalmente, L o menor valor obtido entre todos os experimentos feitos e H o maior valor obtido entre todos os experimentos analisados.

Porém, para a $W(1/2)$, a menor largura de pico é a melhor resposta, assim, o cálculo da desejabilidade individual para esta resposta pode ser feita através da equação 8:

$$Di_{W(\frac{1}{2})} = \frac{(H-y)}{(H-L)} \quad (\text{Equação 8}).$$

Desta forma, de posse das desejabilidades individuais, determinou-se a desejabilidade global ($D.G.$) por meio da média geométrica das desejabilidades individuais, como demonstrado na equação 9:

$$D.G. = \sqrt{\left(Di_{I_{pa}}\right)\left(Di_{W(\frac{1}{2})}\right)} \quad (\text{Equação 9}).$$

Os resultados da otimização, expressos em termos de desejabilidade global ($D.G.$), são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados do planejamento fatorial 2^4 expressos em termos de desejabilidade.

Exp.	pH	ΔE	f	E_{sw}	I_{pa} (μA)	$W(1/2)$	$Di I_{pa}$	$Di W(1/2)$	$D.G.$
1	+	+	+	+	245,0	0,141	1,000	0,339	0,582
2	-	+	+	+	191,0	0,111	0,765	0,593	0,674
3	+	-	+	+	47,90	0,101	0,143	0,678	0,311
4	-	-	+	+	21,90	0,101	0,030	0,678	0,142
5	+	+	-	+	29,83	0,070	0,064	0,941	0,246
6	-	+	-	+	34,41	0,181	0,084	0	0
7	+	-	-	+	21,00	0,070	0,026	0,941	0,155
8	-	-	-	+	18,20	0,070	0,013	0,941	0,113
9	+	+	+	-	234,0	0,141	0,952	0,339	0,568
10	-	+	+	-	189,0	0,103	0,756	0,661	0,707
11	+	-	+	-	41,30	0,089	0,114	0,780	0,298
12	-	-	+	-	20,60	0,091	0,024	0,763	0,135
13	+	+	-	-	30,37	0,069	0,066	0,949	0,251
14	-	+	-	-	35,16	0,179	0,087	0,017	0,038
15	+	-	-	-	16,30	0,063	0,005	1	0,072
16	-	-	-	-	15,10	0,075	0	0,898	0
*17	0	0	0	0	165,0	0,089	0,652	0,780	0,713
*17	0	0	0	0	165,0	0,089	0,652	0,780	0,713
*17	0	0	0	0	166,0	0,095	0,656	0,729	0,692
*17	0	0	0	0	166,0	0,095	0,656	0,729	0,692
*17	0	0	0	0	167,0	0,095	0,661	0,729	0,694
*17	0	0	0	0	167,0	0,095	0,661	0,729	0,694

f : frequência; E_{sw} : rampa de potencial; ΔE : amplitude de pulso. *replicas do ponto central

As respostas em *D.G.* foram utilizadas para tratamento estatístico. Como observado no Diagrama de Pareto (Figura 28), todos os efeitos e as interações entre os parâmetros, exceto a interação pH vs E_{sw} , apresentaram significância para o método.

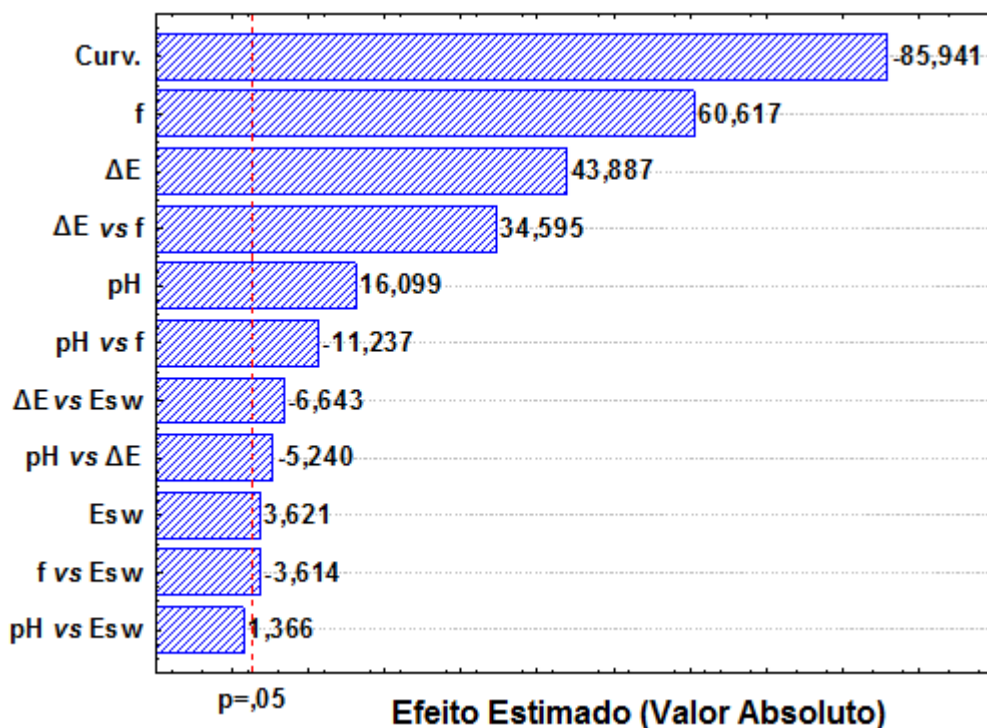


Figura 28 – Diagrama de Pareto das respostas obtidas no planejamento.

Dentre todos, a curvatura (*Curv.*) foi o estudo mais significativo para o trabalho. A *curv.* é dada pela seguinte equação⁹⁹:

$$Curv. = R_{ed} - R_{cp} \text{ (Equação 10),}$$

onde R_{ed} é a média das respostas obtidas a partir dos experimentos do planejamento fatorial e R_{cp} é a média das respostas obtidas para o ponto central. Analisando a Figura 28, o estudo da curvatura apresentou um efeito negativo, indicando que os melhores valores para f , ΔE , pH e E_{sw} são próximos aos valores do ponto central e não dos valores dispostos no planejamento. Além disso, os parâmetros inerentes da técnica de onda quadrada e o pH foram significativos, com efeito positivo, indicando que as melhores respostas são obtidas nos maiores níveis.

Visto que todos os parâmetros foram significativos para o método, um estudo mais detalhado foi realizado por meio da matriz de Doehlert para f , ΔE e pH. Apesar da E_{sw} ter apresentado significância no planejamento fatorial 2^4 , optou-se por fixá-lo em 6 mV (valor do ponto central).

Para a matriz de Doehlert, as mesmas respostas foram utilizadas, ou seja, I_{pa} e largura de pico ($W(1/2)$). Assim, as respostas foram convertidas em termos de desejabilidades individuais, conforme as equações 7 e 8 e, em seguida, em desejabilidade global (Equação 9). Os resultados da matriz de Doehlert são expressos na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz de Doehlert utilizada para otimização do ΔE , f e pH.

Exp.	ΔE	f	pH	I_{pa} (μA)	$W(1/2)$	$Di I_{pa}$	$Di W(1/2)$	$D.G.$
1	80 (0)	60 (0)	6 (0)	282	0,107	0,612	0,818	0,707
1	80 (0)	60 (0)	6 (0)	283	0,107	0,615	0,818	0,709
1	80 (0)	60 (0)	6 (0)	282	0,107	0,612	0,818	0,707
2	120 (1)	60 (0)	6 (0)	402	0,107	1	0,818	0,905
3	100 (0,5)	105 (0,866)	6 (0)	286	0,113	0,624	0,727	0,674
4	100 (0,5)	75 (0,289)	7,5 (0,817)	346	0,113	0,819	0,727	0,772
5	40 (-1)	60 (0)	6 (0)	140	0,101	0,152	0,909	0,372
6	60 (-0,5)	15 (-0,866)	6 (0)	182	0,095	0,288	1	0,536
7	60 (-0,5)	45 (-0,289)	4,5 (-0,817)	93,1	0,107	0	0,818	0
8	100 (0,5)	15 (-0,866)	6 (0)	186	0,161	0,301	0	0
9	100 (0,5)	45 (-0,289)	4,5 (-0,817)	153	0,107	0,194	0,818	0,398
10	60 (-0,5)	105 (0,866)	6 (0)	174	0,113	0,262	0,727	0,436
11	80 (0)	90 (0,577)	4,5 (-0,817)	93,7	0,113	0,002	0,727	0,038
12	60 (-0,5)	75 (0,289)	7,5 (0,817)	212	0,107	0,385	0,818	0,561
13	80 (0)	30 (-0,577)	7,5 (0,817)	278	0,107	0,599	0,818	0,700

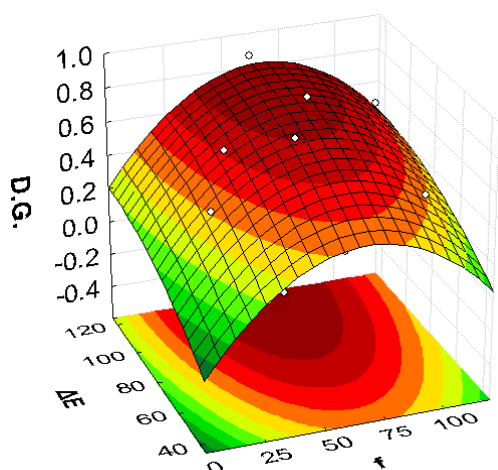
* ΔE (mV); f (Hz); Δi (μA)

Com isso, os dados referentes à matriz de Doehlert se ajustaram ao modelo estatístico linear quadrático, gerando as superfícies de respostas representadas pela Figura 29 e as seguintes equações:

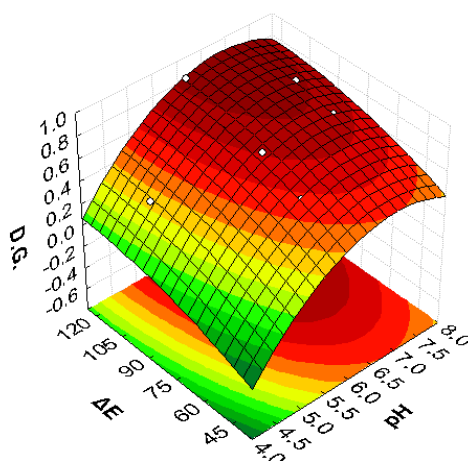
$D.G.(\Delta E \text{ vs } f) = -0,53 + 0,0115\Delta E - 0,0000451 \Delta E^2 + 0,0182f - 0,000136f^2$
(Equação 11);

$D.G.(\Delta E \text{ vs } pH) = -4,557 + 0,0115\Delta E - 0,000045\Delta E^2 + 1,366pH - 0,099pH^2$
(Equação 12);

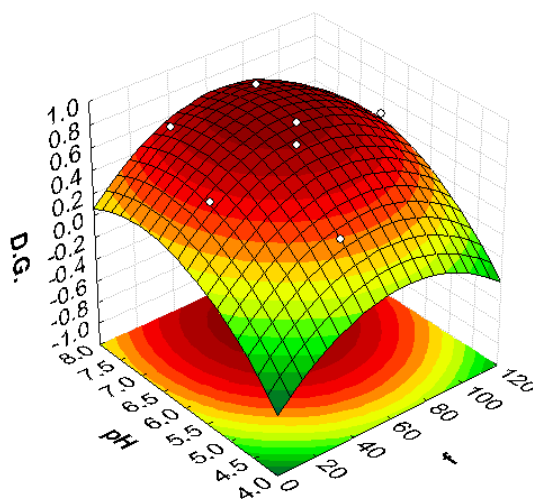
$D.G.(pH \text{ vs } f) = -4,527 + 0,0182pH - 0,000136pH^2 + 1,366f - 0,099f^2$ (Equação 13).



(a)



(b)



(c)

Figura 29 – Superfícies de resposta fixando o pH em 6 (a), f em 60 Hz (b) e ΔE em 80 mV (c).

Assim, por meio da derivada das equações provenientes do modelo estático acima em função da f , pH e ΔE , obteve-se os valores máximos para f (67 Hz), pH (6,90) e ΔE (128 mV).

4.2.5. Desempenho analítico

Voltamogramas de onda quadrada para o corante BA-41 em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R sob as condições otimizadas usando 45 s para o tempo de pré-acúmulo foram registrados e as curvas são mostradas Figura 30. Excelente relação linear foi encontrada no intervalo de $7,24$ a $48,70 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ (Figura 31), apresentando a seguinte relação linear: $I_{pa} = 0,24[\text{BA-41}] + 5,58 \times 10^{-5}$ ($R^2 = 0,99$). Os limites de detecção ($L.D.$) e quantificação ($L.Q.$) foram calculados com base nas seguintes equações: $L.D. = 3std / m$ e $L.Q. = 10std / m$, onde std é o desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração e m o coeficiente angular da curva⁹⁶. Assim, os valores para $L.D.$ e $L.Q.$ foram $2,39$ e $7,98 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

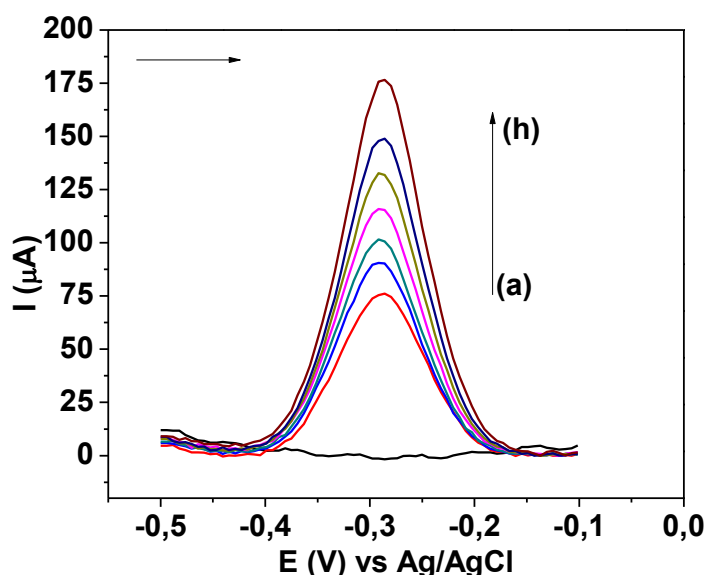


Figura 30 – Voltamogramas de onda quadrada em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 6,90) para BA-41 nas concentrações de 0 (a), $7,24$ (b), $14,47$ (c), $19,78$ (d), $24,61$ (e), $29,43$ (f), $39,10$ (g) e $48,70 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ (h). f : 67 Hz, ΔE : 128 mV, E_{sw} : 6 mV, t_{ac} : 45 s.

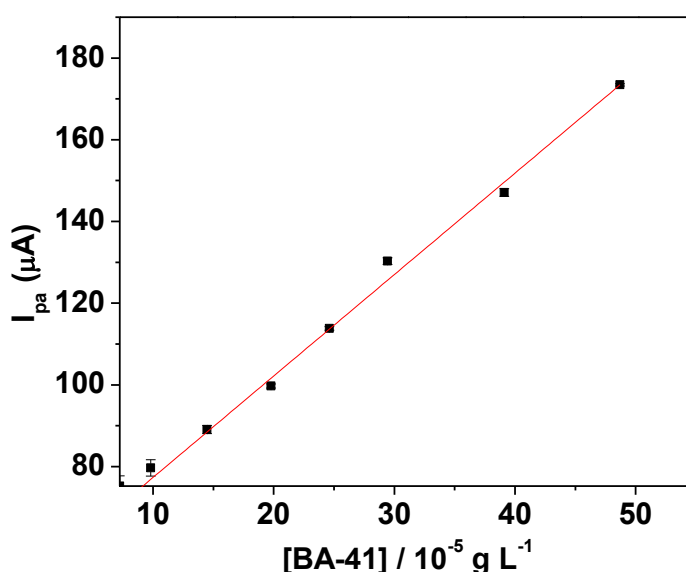


Figura 31 – Relação linear entre I_{pa} vs [BA-41] no intervalo de 7,24 a 48,70 x 10⁻⁵ g L⁻¹ em 0,10 mol L⁻¹ de tampão B-R (pH 6,90).

4.2.6. Aplicação analítica do método

O sensor baseado em ECIMG foi aplicado em amostras de água de torneira fortificadas com 2,65 x 10⁻⁴ g L⁻¹ do corante BA-41. As recuperações foram feitas em triplicatas aplicando-se o método de adição de padrão, onde os voltamogramas apresentaram picos bem definidos (Figura 32.I) e excelente relação linear para a adição de padrão no intervalo de concentração entre 8,50 a 54,40 x 10⁻⁵ g L⁻¹, como mostrado na Figura 32.II.

Como mostrado na Tabela 9, para todas as amostras, os valores encontrados para as recuperações ficaram no intervalo de 98,73 a 102,54%. O valor de t calculado ($t_{calc.}$) foi menor do que o t crítico ($t_{crit.}$), indicando que não existe diferença significativa no nível de 95% de confiança entre a concentração fortificada e a recuperada. Além disso, as recuperações de BA-41 em água de torneira não excederão 2,54% de erro, indicando boa aplicabilidade do método.

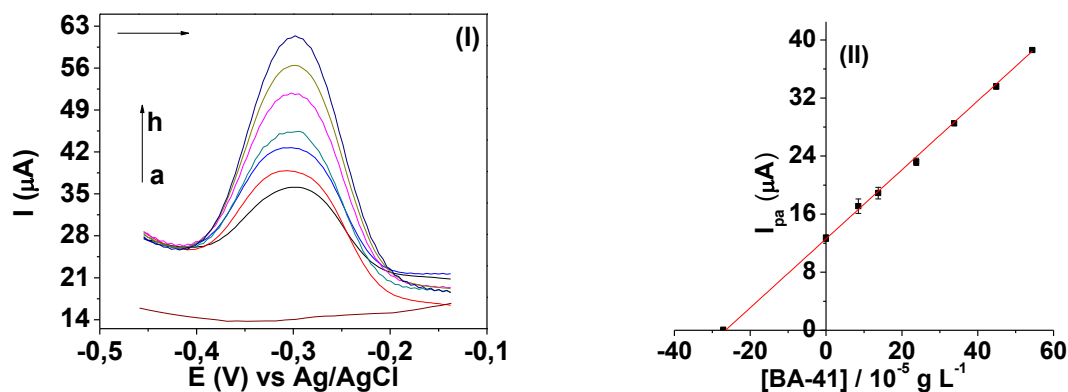


Figura 32 – Voltamogramas de onda quadrada para ECIMG em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão B-R (pH 6,90) (a), adição de $50 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra (b) e sucessivas adições de solução padrão de BA-41 nas concentrações 8,50 (c), 13,75 (d), 23,80 (e), 33,80 (f), 44,90 (g) e $54,40 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ (h) (I). Relação linear entre I_{pa} vs $[BA-41]$ (II).

Tabela 9 – Recuperações de BA-41 em água de torneira fortificada com $2,65 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$.

Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Adicionado (10^{-4} g L^{-1})	2,65	2,65	2,65
Encontrado (10^{-4} g L^{-1})	$2,71 \pm 0,045$	$2,62 \pm 0,045$	$2,72 \pm 0,094$
Recuperação (%)	102,00	98,73	102,54
$t_{cal.}$	4,23	2,69	2,57

$t_{crit.} = 4,30$; $n = 3$.

5. CONCLUSÃO

Um eletrodo de carbono vítreo modificado com compósito de MWNTs-CHT foi desenvolvido e proposto para determinação simultânea de PPD e RSN em amostras de corantes de cabelo comercial e água de torneira. Os resultados mostraram claramente que a modificação do eletrodo de carbono vítreo com filme de MWNTs-CHT apresentou grande aumento de área ativa, além de facilitar a transferência eletrônica dos analitos, permitindo a detecção de ambos compostos simultaneamente em baixas concentrações e com ampla faixa linear, possibilitando ainda, a determinação em diferentes proporções de PPD e RSN sem alteração significativa na sensibilidade. O sensor voltamétrico mostrou também a capacidade para detecção dos produtos gerados através da reação entre PPD e RSN encontrados pela técnica de LC-MS/MS. Ademais, as análises são realizadas em pH 8 em meio de tampão amoniacal, sendo o meio usualmente utilizado nas tinturas de cabelo permanentes. O presente método mostrou que o sensor eletroquímico proposto é estável, simples, barato e verde, devido a pouca utilização de reagentes. Diante dos bons resultados mostrados, o trabalho foi publicado recentemente na revista "Microchemical Journal" intitulado "Voltammetric sensor for simultaneous determination of p-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode".

Outro sensor baseado em eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno foi proposto para determinação do corante BA-41. O ECIMG apresentou grande aumento de corrente em comparação ao eletrodo de carbono vítreo e ao eletrodo de carbono impresso, ambos sem modificação. Através da utilização de ferramentas estatísticas como planejamento fatorial, matriz de Doehlert e metodologia multi-respostas, o método foi otimizado utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Através desta otimização multivariada, informações relevantes foram obtidas, sendo possível identificar os parâmetros e interações significativas para o método. Por fim, os dados do planejamento se ajustaram ao modelo linear quadrático, obtendo-se valores máximos de 6 mV, 67 Hz, 6,9 e 128 mV para E_{sw} , f , pH e ΔE , respectivamente. Sob as condições otimizadas, construiu-se uma curva analítica para o corante BA-41, onde foi possível encontrar baixos valores para os limites de detecção e

quantificação. O método foi aplicado em amostras de água de torneira fortificadas com o corante temporário BA-41 e, através de tratamentos estatísticos, não houve diferença significativa entre a quantidade adicionada e recuperada, indicando boa aplicabilidade do sensor baseado em ECIMG.

REFERÊNCIAS

- 1 THYSSEN, J. P.; WHITE, J. M. L. Epidemiological data on consumer allergy to *p*-phenylenediamine. **Contact Dermatitis**, v. 59, p. 327-343, 2008.
- 2 HUANG, Y.-C. et al. *p*-Phenylenediamine induced DNA damage in SV-40 immortalized human uroepithelial cells and expression of mutant p53 and COX-2 proteins. **Toxicology Letters**, v. 170, p. 116-123, 2007.
- 3 MASUKAWA, Y. Separation and determination of basic dyes formulated in hair care products by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, p. 140-144, 2006.
- 4 NOHYNEK, G. J. et al. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 517-543, 2004.
- 5 GHOSH, P.; SINHA, A. K. Hair colors: classification, chemistry and a review of chromatographic and electrophoretic methods for analysis. **Analytical Letters**, v. 41, p. 2291-2321, 2008.
- 6 CHISVERT, A.; CHÁFER, A.; SALVADOR, A. Hair dye in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. In: SALVADOR, A.; CHISVERT, A. (Ed.). **Analysis of cosmetic products**. Amsterdam: Elsevier, 2007. cap. 4.3, p. 190-209.
- 7 YAZAR, K.; BOMAN, A.; LIDÉN, C. *p*-Phenylenediamine and other hair dye sensitizers in Spain. **Contact Dermatitis**, v. 66, p. 27-32, 2011.
- 8 THYSSEN, J. P. et al. *p*-phenylenediamine sensitization is more prevalent in central and southern european patch test centres than in Scandinavian: results from a multicenter study. **Contact Dermatitis**, v. 60, p. 314-319, 2009.
- 9 MENNÉ, T. et al. Hair dye contact allergy: quantitative exposure assessment of selected products and clinical cases. **Contact Dermatitis**, v. 50, p. 344-348, 2004.
- 10 WATANABE, T.; HIRAYAMA, T.; FUKUI, S. Mutagenicity of commercial hair dyes and detection of 2,7- diaminophenazine. **Mutation Research**, v. 244, p. 303-308, 1990.
- 11 WANG, L.-H.; TSAI, S.-J. Simultaneous determination of oxidative hair dye *p*-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 312, p. 201-207, 2003.
- 12 RAGHU, S. et al. Evaluation of electrochemical oxidation techniques for degradations of dye effluents-A comparative approach. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 748-754, 2009.

13 COMBES, R. D.; HAVELAND-SMITH, R. B. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. **Mutation Research**, v. 98, p. 101-248, 1982.

14 CZONE, K.; TIIKKAJA, S.; HEMMINKI, K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. **International Journal of Cancer**, v. 105, p. 108-112, 2003.

15 GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 203-210, 2004.

16 COOK, L. S. et al. Hair products use and the risk of breast cancer in young women. **Cancer Causes and Control**, v. 10, p. 551-559, 1999.

17 ZHENG, T. et al. Use of hair colouring products and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 1647-1652, 2002.

18 ANDREW, A. S. et al. Bladder cancer risk and personal hair dye use. **International Journal of Cancer**, v. 109, p. 581-586, 2004.

19 KOGEVINAS, M. et al. Hair dye use is not associated with risk for bladder cancer: evidence from a case-control study in Spain. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 1448-1454, 2006.

20 ROS, M. M. et al. Personal hair dye use and the risk of bladder cancer: a case-control study from the netherlands. **Cancer Causes Control**, v. 23, p. 1139-1148, 2012.

21 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Tinturas para cabelo**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp 2013>. Acesso em: 21 mar. 2013.

22 ARALDI, J.; GUTERRES, S. S. Tinturas capilares: existe risco de câncer relacionado à utilização desses produtos? **Infarma**, v. 17, n. 7/9, p. 78-83, 2005.

23 OLIVEIRA, R. A. G. de et al. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, 2014. No prelo. Disponível: <submission.quimicanova.sbq.org/qn/NoPrelo/RV/RV13582.pdf>. Acesso em: 24 de jun. 2014.

24 SCARPI, C. et al. High-performance liquid chromatography determination of direct and temporary dyes in natural hair colourings. **Journal of Chromatography A**, v. 796, p. 319-325, 1998.

- 25 MOTZ-SCHALCK, L.; LEMAIRE, J. Photochemical and thermal modifications of permanent hair dyes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 147, p. 225-231, 2002.
- 26 JAHN, S. et al. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in the investigation of the potent skin sensitizer *p*-phenylenediamine and its reactivity toward nucleophiles. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 1453-1464, 2012.
- 27 McFADDEN, J. P.; YEO, L.; WHITE, J. Clinical and experimental aspects of allergic contact dermatitis to para-phenylenediamine. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 316-324, 2011.
- 28 COULTER, E. M. et al. Activation of T-Cells from allergic patients and volunteers by *p*-phenylenediamine and Bandrowski's Base. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 897-905, 2008.
- 29 WANG, P. G.; KRYNITSKY, A. J. Rapid determination of para-phenylenediamine by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring in henna-containing cosmetic products. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1795-1801, 2011.
- 30 GIOIA, M. L. D. et al. Determination by gas chromatography/mass spectrometry of *p*-phenylenediamine in hair dyes after conversion to an imine derivative. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 143-148, 2005.
- 31 DRAELOS, Z. D. **Hair care**: an illustrated dermatologic handbook. London: Taylor & Francis, 2005. 208 p.
- 32 HARRISON, S.; SINCLAIR, R. Hair colouring, permanent styling and hair structure. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, p. 180-185, 2004.
- 33 YOLA, M. L.; EREN, T.; ATAR, N. A novel sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe@Au nanoparticles decorated graphene oxide. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 38-47, 2014.
- 34 ÁVILA, M. et al. Determination of sudan dyes in food samples using supercritical fluid extraction-capillary liquid chromatography. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 977-982, 2011.
- 35 YAN, H. et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to liquid chromatography for determination of Sudan dyes in preserved beancurds. **Food Chemistry**, v. 132, p. 649-654, 2012.
- 36 DONG, S. et al. Simultaneous determination of phenylenediamine isomers and dihydroxybenzene isomers in hair dyes by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 653-659, 2008.

- 37 NARITA, M.; MURAKAMI, K.; KAUFFMANN, J.-M. Determination of dye precursors in hair coloring products by liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, p. 316-320, 2007.
- 38 RADI, A. et al. Electrochemical study of vinylsulphone azo dye Reactive Black 5 and its determination at a glassy carbon electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 67, n. 11, p. 890-894, 2012.
- 39 MEIJU, D. et al. Determination of Sudan I in hot chili powder by using an activated glassy carbon electrode. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 883-888, 2007.
- 40 VIANA, E. R. C.; PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical reduction and determination of Cibacron Blue F3GA at poly-L-lysine modified glassy carbon electrode. **Dyes and Pigments**, v. 71, n. 2, p. 145-152, 2006.
- 41 OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONI, M. V. B. Highly ordered TiO₂ nanotubes for electrochemical sensing of hair dye Basic Brown 17. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2507-2514, 2013.
- 42 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Voltammetria. In: _____. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 25, p. 566-595.
- 43 MAYS, D. E.; HUSSAM, A. Voltammetric methods for determination and speciation of inorganic arsenic in the environment-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 646, p. 6-16, 2009.
- 44 FLOROU, A. B. et al. Flow electrochemical determination of ascorbic acid in real samples using a glassy carbon electrode modified with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, n. 1/2, p. 113-121, 2000.
- 45 DEROCO, P. B. et al. Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 719, p. 19-23, 2014.
- 46 DUARTE, E. H. et al. A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid. **Talanta**, v. 127, p. 26-32, 2014.
- 47 MAZLOUM-ARDAKANI, M.; SHEIKH-MOHSENI, A.; ABDOLLAHI-ALIBEIK, M. Electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine, paracetamol and folic acid by a nanostructured mesoporous material. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 171/172, p. 380-386, 2012.

- 48 SHARMA, P. et al. A novel disposable electrochemical immunosensor for phenyl urea herbicide diuron. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 10, p. 4209-4212, 2011.
- 49 BANDZUCHOVÁ, L. et al. Voltammetric method for sensitive determination of herbicide picloram in environmental and biological samples using boron-doped diamond film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 111, p. 242-249, 2013.
- 50 CHEN, L. et al. Sensitive square wave anodic stripping voltammetric determination of Cd^{2+} and Pb^{2+} ions at Bi/Nafion/overoxidized 2-mercaptoethanesulfonate-tethered polypyrrole/glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 94-101, 2014.
- 51 ILLUMINATI, S. et al. Square-wave anodic-stripping voltammetric determination of Cd, Pb and Cu in wine: set-up and optimization of sample pre-treatment and instrumental parameters. **Electrochimica Acta**, v. 104, p. 148-161, 2013.
- 52 DONG, Y. et al. Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of Pb ion at a montmorillonites/polyaniline nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 717-718, p. 206-212, 2014.
- 53 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Potential sweep methods. In: _____. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley, 2001. cap. 6, p. 226-260.
- 54 DENG, P.; XU, Z.; LI, J. Simultaneous determination of ascorbic acid and rutin in pharmaceutical preparations with electrochemical method based on multi-walled carbon nanotubes–chitosan composite film modified electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 76, p. 234-242, 2013.
- 55 IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.
- 56 MAZOV, I. et al. Oxidation behavior of multiwall carbon nanotubes with different diameters and morphology. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 17, p. 6272-6280, 2012.
- 57 SOUZA FILHO, A. G. de; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.
- 58 BABAEI, A.; TAHERI, A. R.; AFRASIABI, M. A multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode as a new sensor for the sensitive simultaneous determination of Paracetamol and Tramadol in pharmaceutical preparations and biological fluids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1549-1558, 2011.

- 59 BABAEI, A.; GARRETT, D. J.; DOWNARD, A. J. Selective simultaneous determination of Paracetamol and Uric Acid Using a glassy carbon electrode modified with multiwalled Carbon Nanotube/Chitosan composite. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 417-423, 2011.
- 60 GUO, S. et al. MWNT/Nafion composite modified glassy carbon electrode as the voltammetric sensor for sensitive determination of 8-hydroxyquinoline in cosmetic. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 45-49, 2011.
- 61 DUARTE, E. H.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Carbon Nanotube based sensor for simultaneous determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid exploiting multiple response optimization and measures in the presence of surfactant. **Electroanalysis**, v. 24, n. 12, p. 2291-2301, 2012.
- 62 CHIANG, Y.-C.; LIN, W.-H.; CHANG, Y.-C. The influence of treatment duration on multi-walled carbon nanotubes functionalized by $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ oxidation. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 2401-2410, 2011.
- 63 OSORIO, A. G. et al. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3/\text{HCl}$ -functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 2485-2489, 2008.
- 64 XING, Y. et al. Sonochemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Langmuir**, v. 21, p. 4185-4190, 2005.
- 65 NAEIMI, H. et al. Efficient and facile one pot carboxylation of multiwalled carbon nanotubes by using oxidation with ozone under mild conditions. **Applied Surface Science**, v. 256, p. 631-635, 2009.
- 66 ROSCA, I. D. et al. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. **Carbon**, v. 43, p. 3124-3131, 2005.
- 67 ZHAO, Z. et al. Multiple functionalization of multi-walled carbon nanotubes with carboxyl and amino groups. **Applied Surface Science**, v. 276, p. 476-481, 2013.
- 68 WANG, X. et al. Electrochemical determination of estrogenic compound bisphenol F in food packaging using carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Food Chemistry**, v. 157, p. 464-469, 2014.
- 69 NIGOVIĆ, B.; SADIKOVIĆ, M.; SERTIĆ, M. Multi-walled carbon nanotubes/Nafion composite film modified electrode as a sensor for simultaneous determination of ondansetron and morphine. **Talanta**, v. 122, p. 187-194, 2014.
- 70 NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodo fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, 2008.

- 71 HART, J. P.; WRING, S. A. Recent developments in the desing and application of screen-printed electrochemical sensor for biomedical, environmental and industrial analysis. **Trends in Analytical Chemist**, v. 16, n. 2, p. 89-103, 1997.
- 72 CARAMIT, R. P. et al. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Fuel**, v. 105, p. 306-313, 2013.
- 73 RADI, A.-E. et al. Anodic voltammetric determination of gemifloxacin using screen-printed carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2013.
- 74 LIU, Y.; DONG, X.; CHEN, P. Biological and chemical sensors based on graphene materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2283-2307, 2012.
- 75 XU, Y. et al. Electronic transport in monolayer graphene with extreme physical deformation: ab initio density functional calculation. **Nanotechnology**, v. 22, p. 1-4, 2011.
- 76 WANG, Z. et al. Electrochemical determination of lead and cadmium in rice by a disposable bismuth/electrochemically reduced graphene/ionic liquid composite modified screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 199, p. 7-14, 2014.
- 77 EISSA, S. et al. Electrochemical immunosensor for the milk allergen β -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 308-313, 2012.
- 78 PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Revista Engenharia Sanitária**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.
- 79 NASCIMENTO, J. A. et al. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-VIS e quimiometria. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 351-357, 2010.
- 80 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
- 81 TARLEY, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58-67, 2009.
- 82 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: _____. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. cap. 3, p. 99-163.
- 83 FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, p. 1061-1067, 2004.

- 84 YILDIZ, G. et al. Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode. **Food Chemistry**, v. 152, p. 245-250, 2014.
- 85 HUDARI, F. F. et al. Voltammetric method optimized by multi-response assays for the simultaneous measurements of uric acid and acetaminophen in urine in the presence of surfactant using MWCNT paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 696, p. 52-58, 2013.
- 86 LAWRENCE, N. S. et al. Voltammetric investigation of hair dye constituents: application to the quantification of p-phenylenediamine. **Analyst**, v. 126, p. 1897-1900, 2001.
- 87 LIU, X. et al. Simple sensor for simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 3, p. 883-889, 2012.
- 88 YU, Q. et al. Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at MWCNTs/ β -Cyclodextrin modified carbon ionic liquid electrode in the presence of Cetylpyridinium Bromide. **Electroanalysis**, v. 22, n. 9, p. 1012-1018, 2010.
- 89 KE, N. J.; LU, S.-S.; CHENG, S.-H. A strategy for the determination of dopamine at a bare glassy carbon electrode: p-Phenylenediamine as a nucleophile. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 9, p. 1514-1520, 2006.
- 90 YIN, H. et al. Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 6, p. 2748-2753, 2011.
- 91 GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.
- 92 DONG, S. et al. Simultaneous determination of dihydroxybenzene and phenylenediamine positional isomers using capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3232-3238, 2009.
- 93 SEO, J.-A. et al. Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, n. 1, p. 12-19, 2012.
- 94 MOSLEY-FOREMAN, C. et al. Phototoxicity of phenylenediamine hair dye chemicals in *Salmonella typhimurium* TA102 and human skin keratinocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3780-3784, 2008.

95 CLARE, L. A. et al. The effect of h-bonding and proton transfer on the voltammetry of 2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylenediamine in Acetonitrile. An unexpectedly complex mechanism for a simple redox couple. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, p. 8938-8949, 2010.

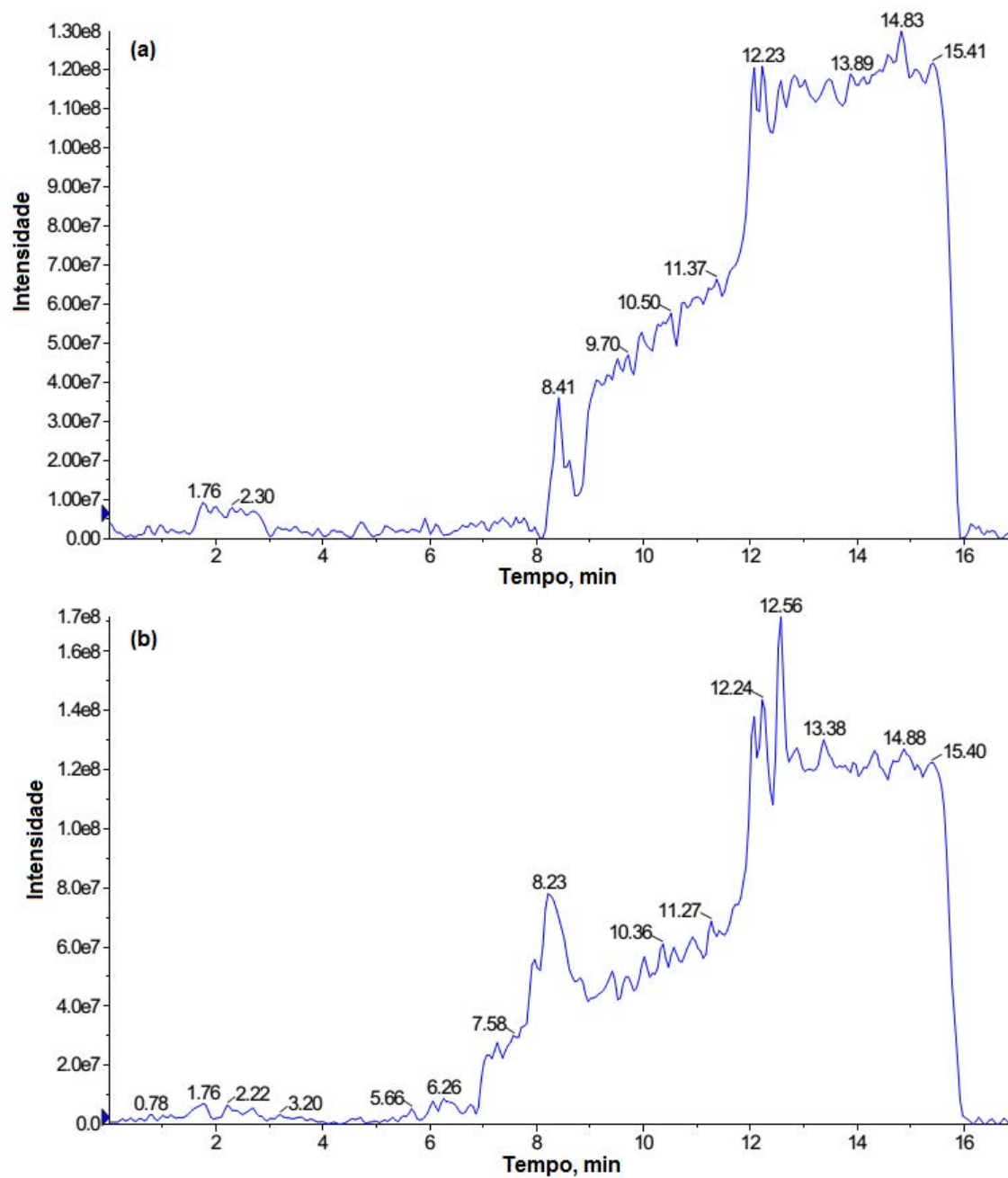
96 MOCAK, J. et al. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 297-328, 1997.

97 MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for analytical chemistry**. 2nd ed. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 227 p.

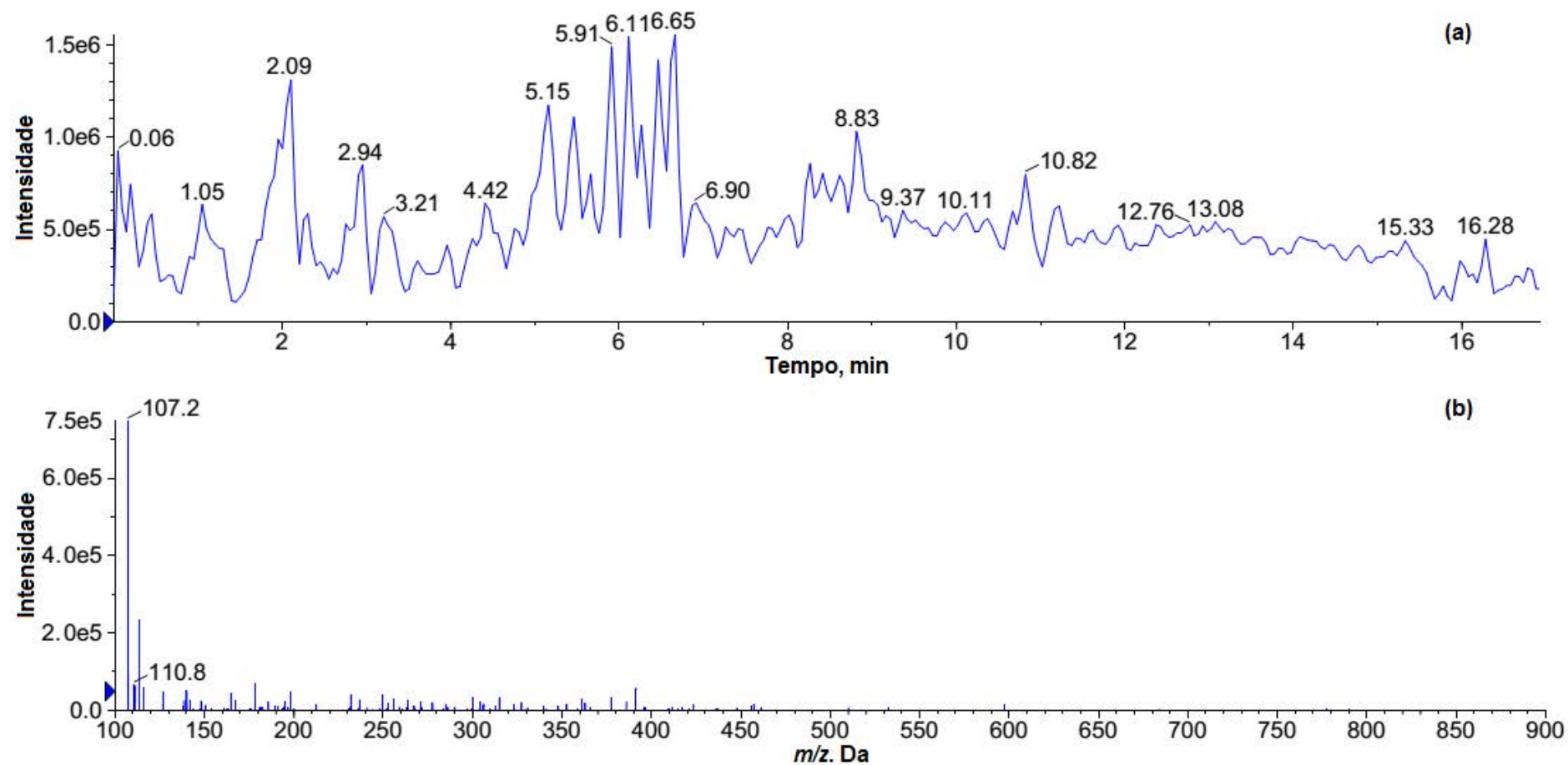
98 FRAGA, L. E.; ZANONI, M. V. B. Photoelectrocatalytical degradation of basic blue 41 dye using nanoporous semiconductor of Ti/TiO₂. **Eclética Química**, v. 34, n. 4, p. 27-36, 2009.

99 JESUS, R. M. et al. Determination of mercury in phosphate fertilizers by cold vapor atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 106, p. 293-297, 2013.

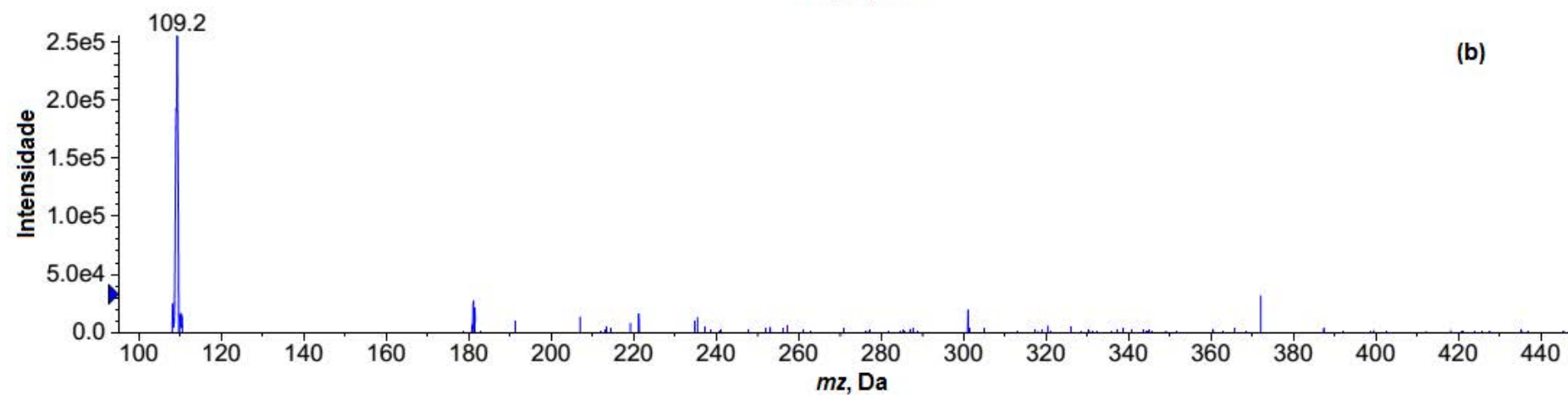
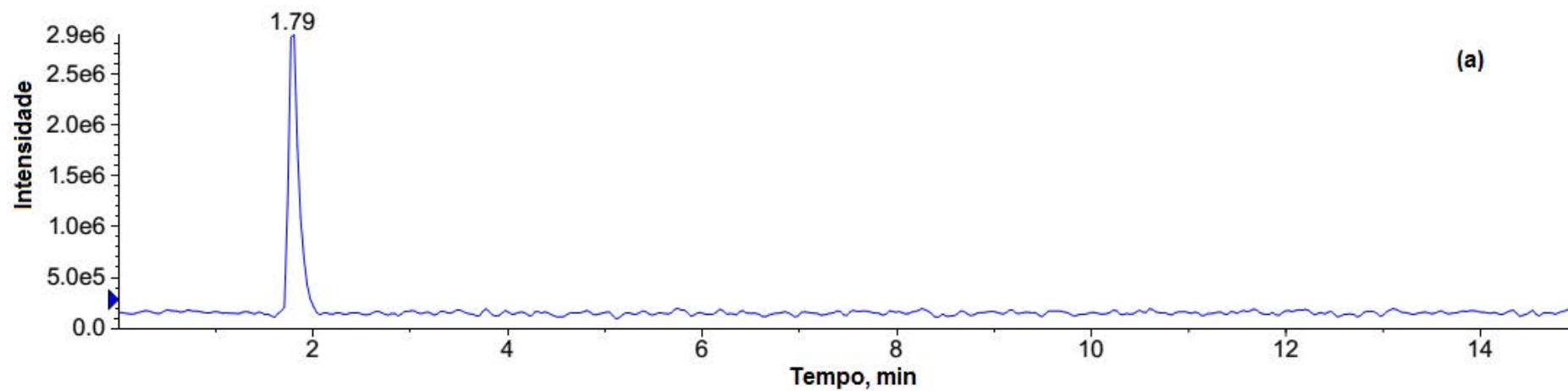
APÊNDICE I: Cromatograma de íons totais para reação de PPD em meio de O_2 (a) e H_2O_2 (b) após 24 h.



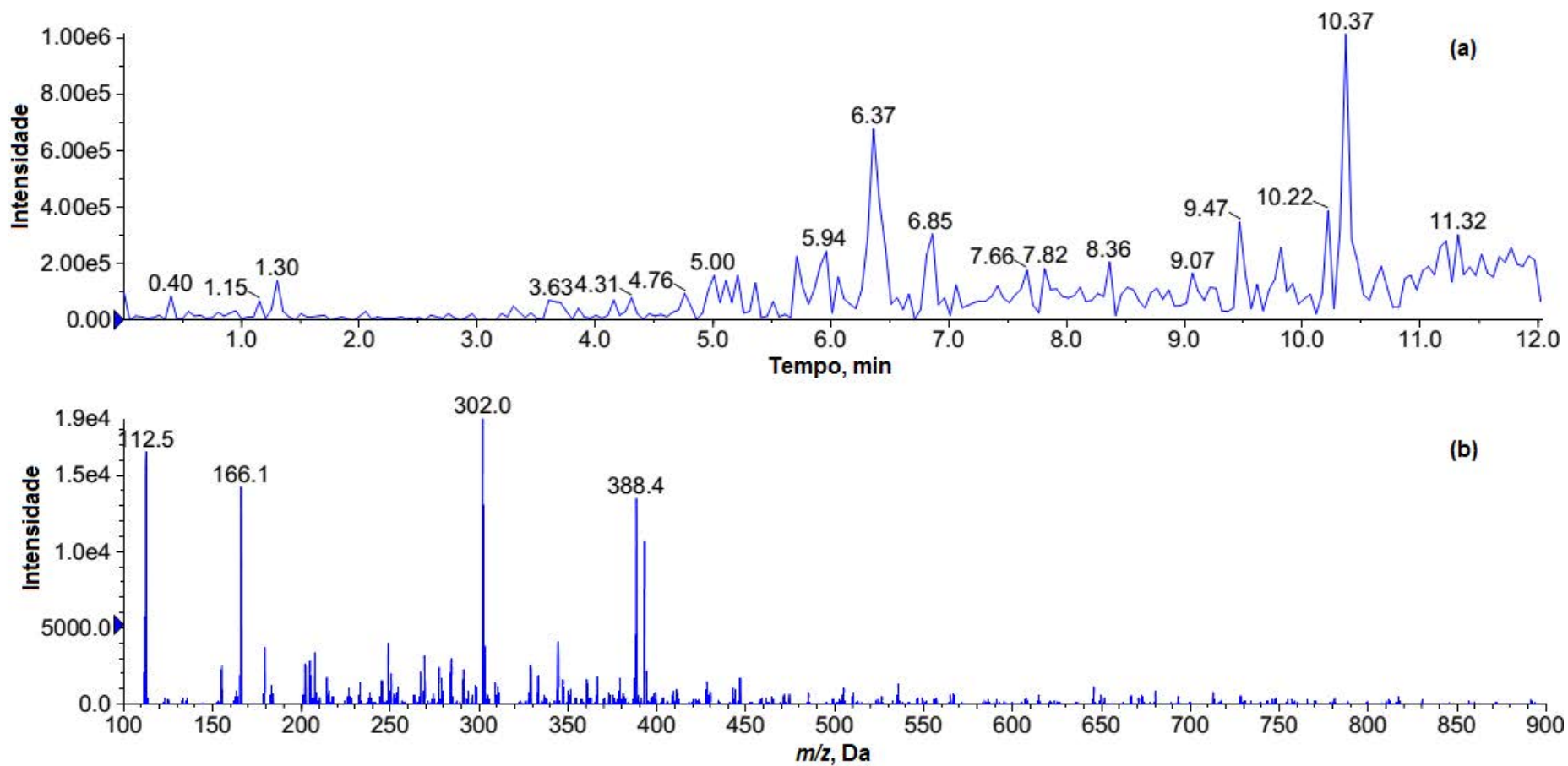
APÊNDICE II: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 107.



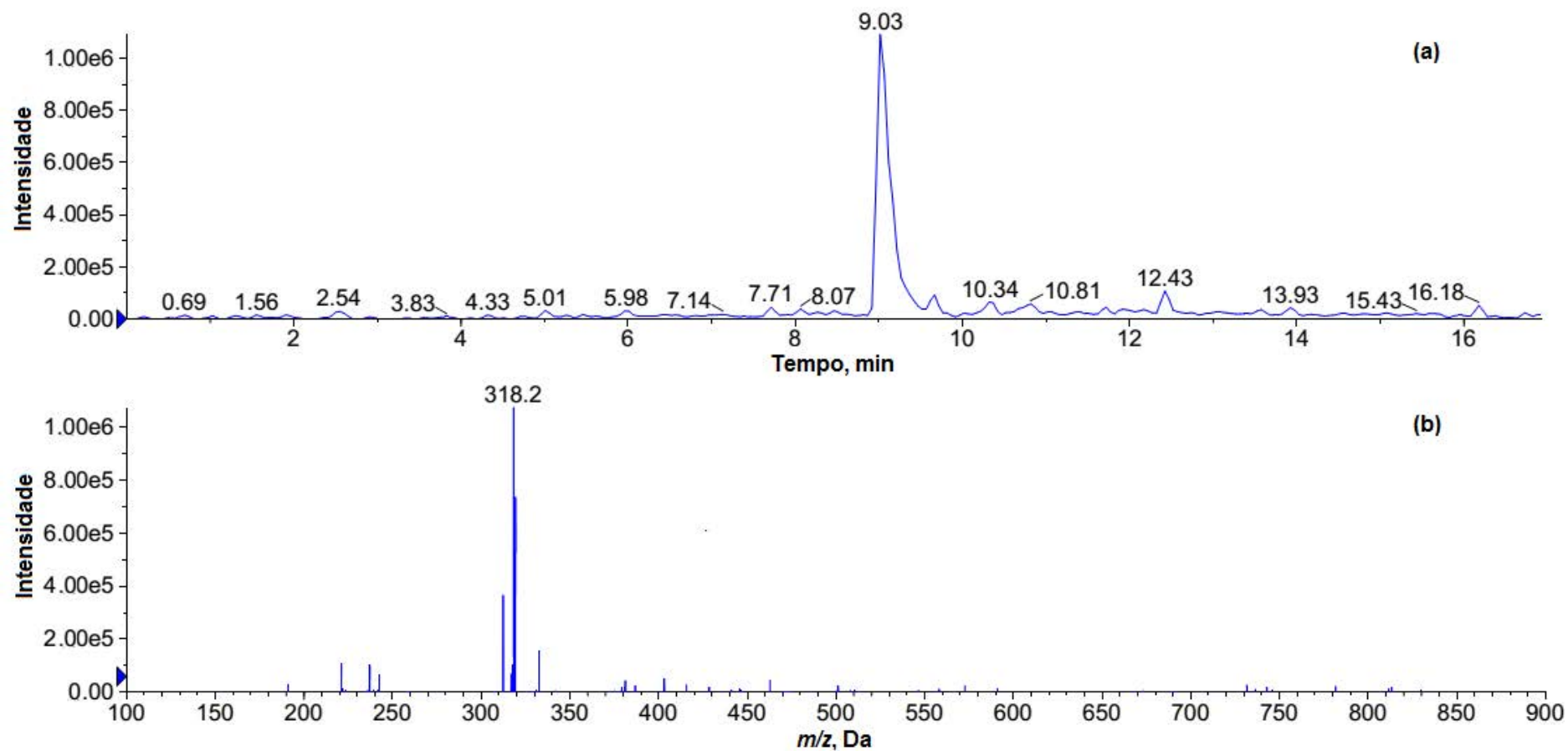
APÊNDICE III: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 109.



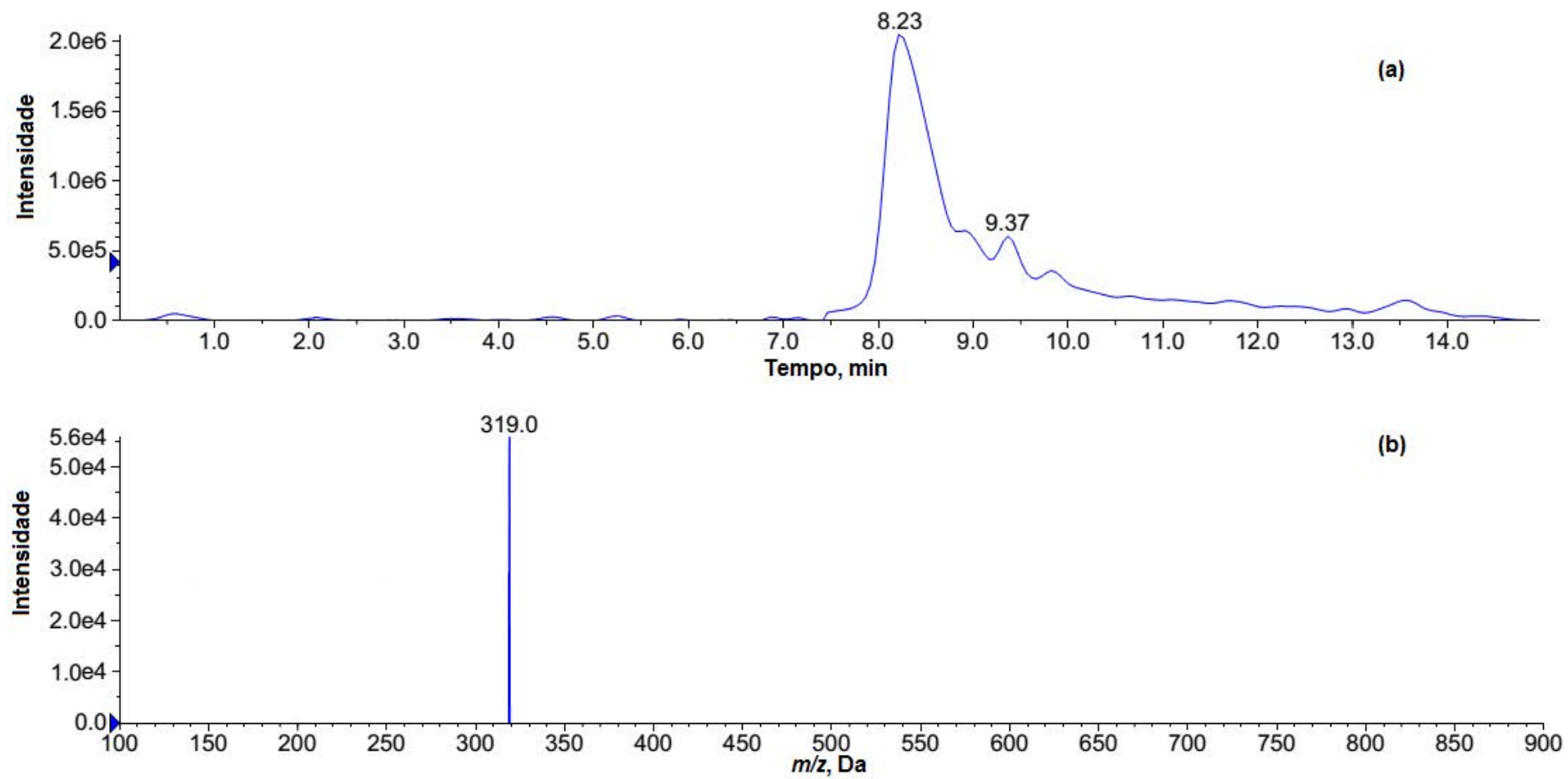
APÊNDICE IV: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 302.



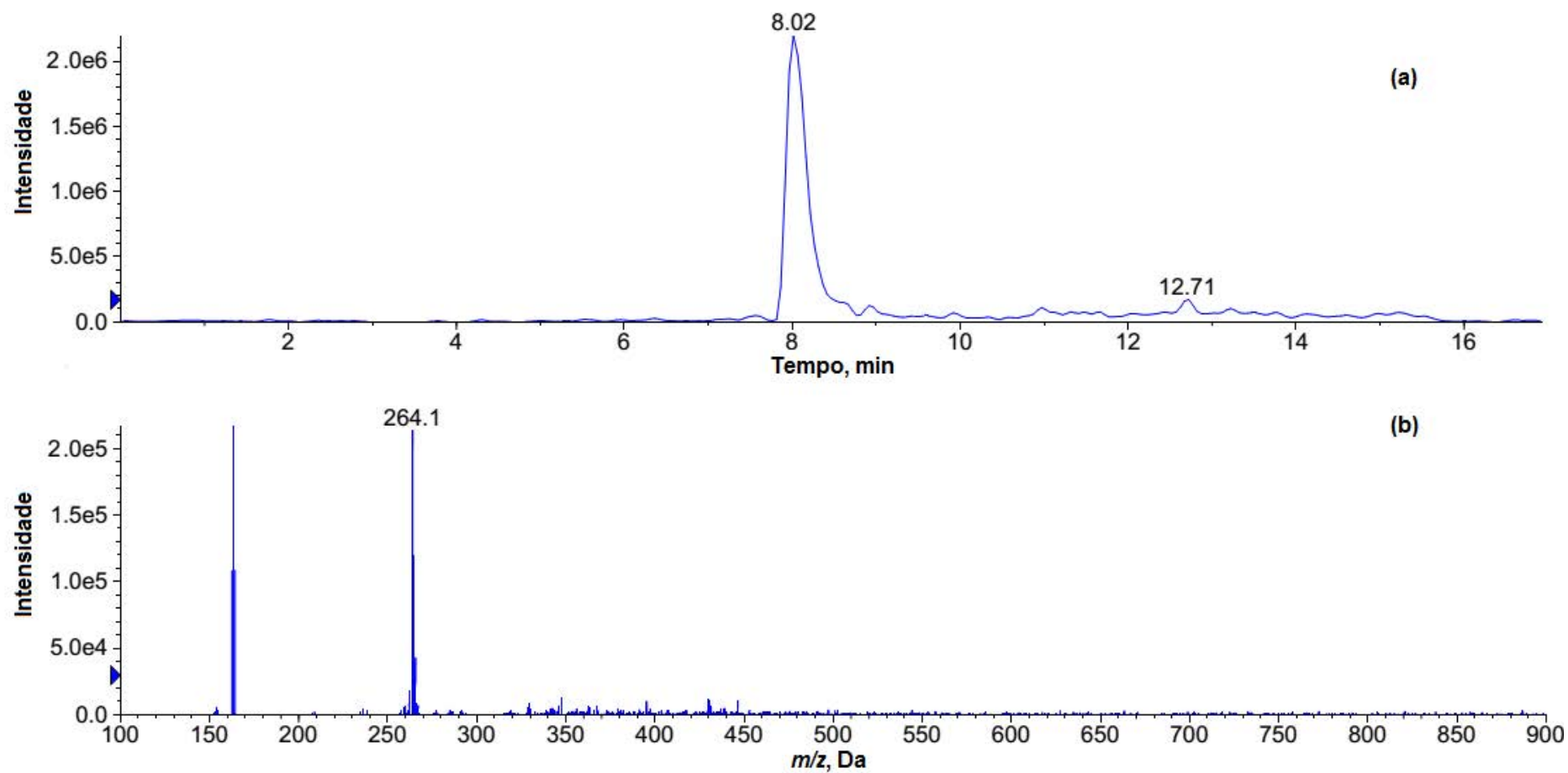
APÊNDICE V: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 318.



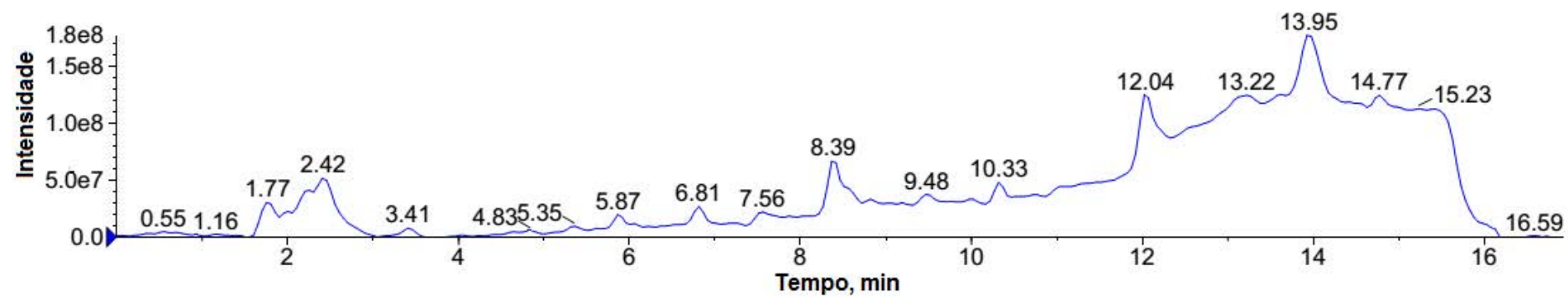
APÊNDICE VI: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 319.



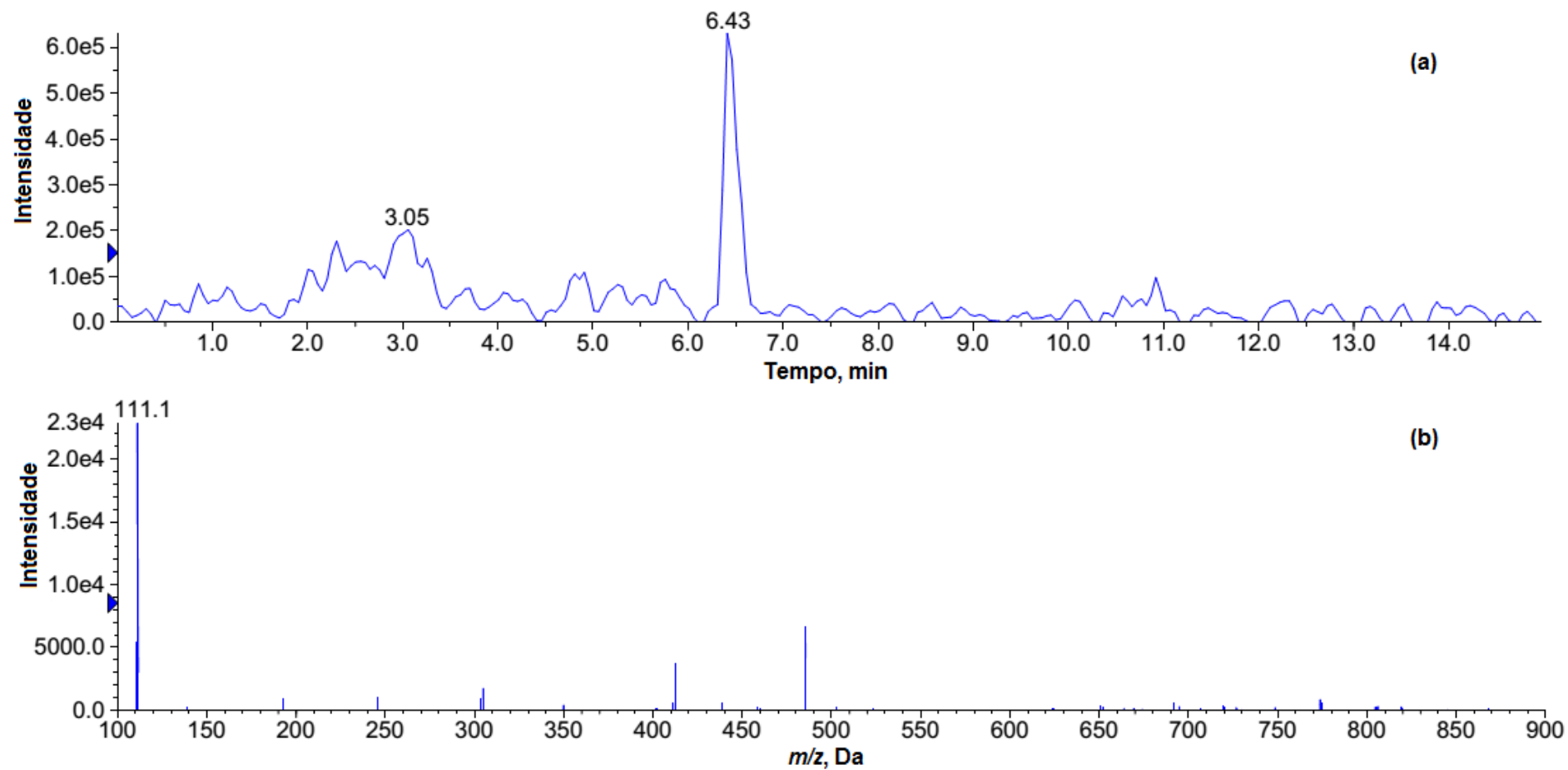
APÊNDICE VII: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 527.



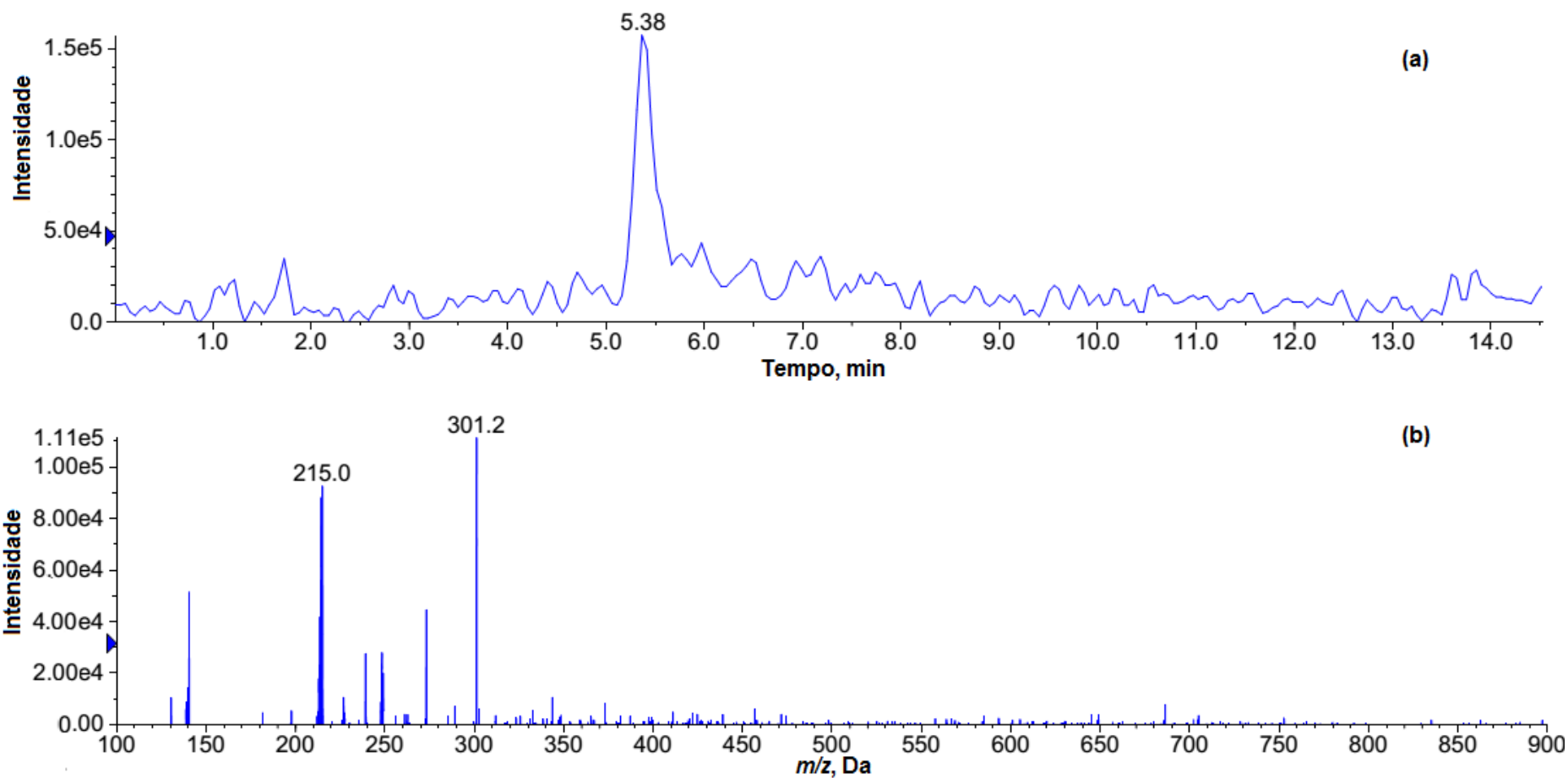
APÊNDICE VIII: Cromatograma de íons totais para reação entre PPD e RSN em meio de H_2O_2 após 30 min.



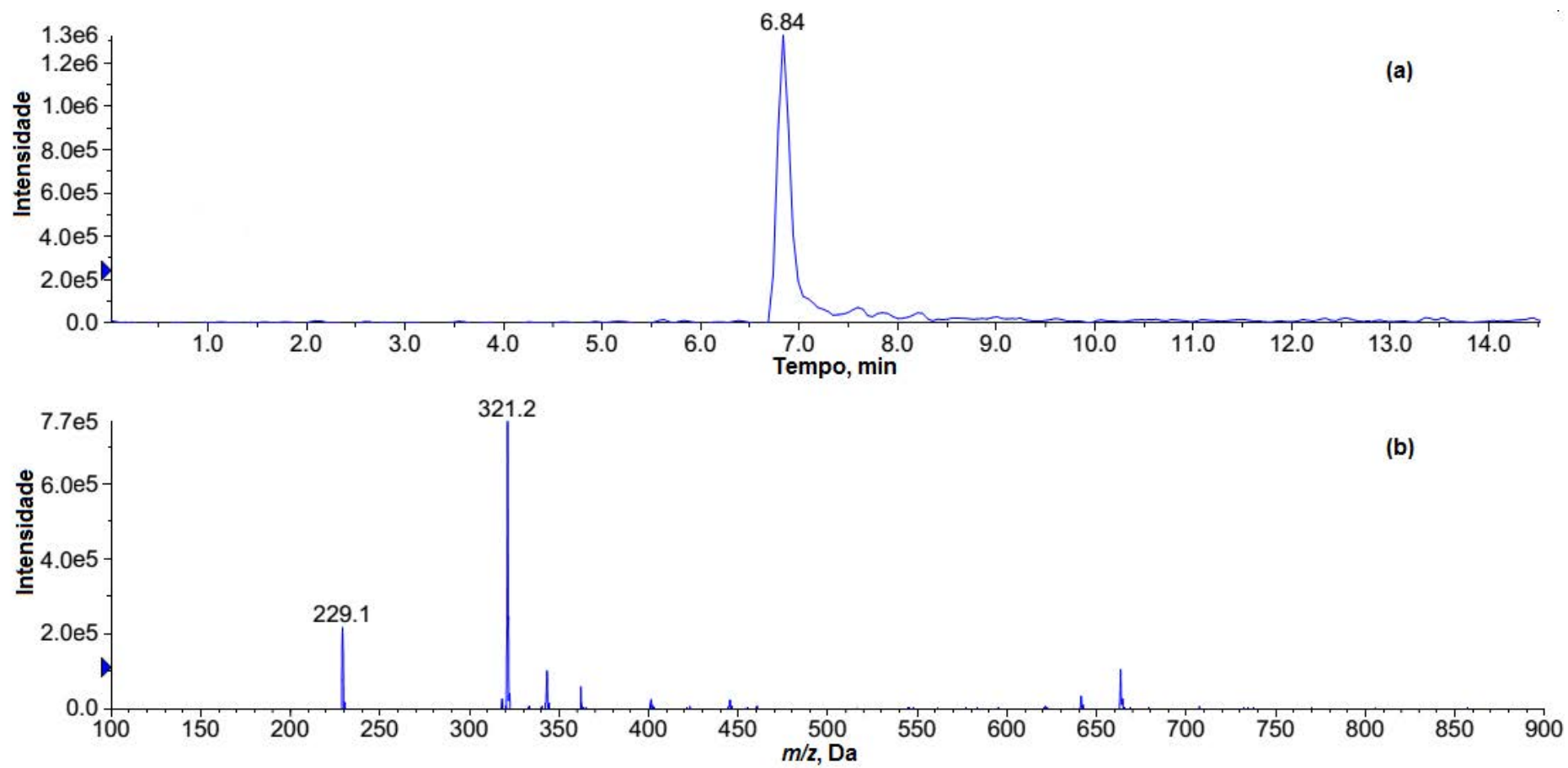
APÊNDICE IX: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 111.



APÊNDICE X: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 215.



APÊNDICE XI: Cromatograma de íon extraído (a) e espectrometro de massas (b) para m/z 321.



Anexo I



Voltammetric sensor for simultaneous determination of *p*-phenylenediamine and resorcinol in permanent hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode[☆]



Felipe Fantinato Hudari, Lucio César de Almeida, Bianca Ferreira da Silva, Maria Valnice Boldrin Zanoni^{*}

UNESP, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química, Rua Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2013

Received in revised form 15 April 2014

Accepted 9 May 2014

Available online 20 May 2014

Keywords:

p-Phenylenediamine

Resorcinol

Modified glassy carbon electrode

Hair dye

ABSTRACT

p-Phenylenediamine (PPD) and resorcinol (RSN) are hair dye precursors of permanent dyeing more used worldwide. The present work describes a simple and economic voltammetric sensor for simultaneous determination of both components in commercial hair dyeing and tap water at low concentrations. PPD and RSN are oxidized at +0.17 and +0.61 V vs. Ag/AgCl at glassy carbon electrode coated by composites of multiwall carbon nanotubes with chitosan (MWNTs–CHT/GCE), which anodic currents density normalized are 10% and 70% higher in relation to the unmodified electrode, respectively. The calibration curve for simultaneous determination of PPD and RSN showed linearity between 0.55 and 21.2 mg L⁻¹ with detection limits of 0.79 and 0.58 mg L⁻¹ to PPD and RSN, respectively. The relative standard deviations found for ten determinations were of 0.73 and 2.35% to 2.70 mg L⁻¹, and 0.87 and 1.08% to 15.96 mg L⁻¹ to PPD and RSN, respectively. The voltammetric sensor was applied to determination of PPD and RSN in tap water and commercial hair dyeing samples and the average recovery for these samples was around 97%. The products generated from PPD and RSN reaction such as was *p*-quinonediimine and bandrowski base were detected by LC–MS/MS and UV–vis spectrophotometry.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Synthetic dyes used in hair dye are consumed today by millions of people, making this an important area of cosmetic industry worldwide [1]. According to the time and manner of attachment to the hair, these dyes are marketed as semi-permanent, permanent, temporary and metallic dyes. However, among these, permanent dyes are used more worldwide and represent about 80% of hair dyes available in the market [2]. The products used in continuous dyeing are based on reaction between two components which are mixed before use in an oxidizing environment and alkaline medium [3]. The dye itself is formed in the hair through chemical reactions. It is known that permanent hair dyes require basically three components. The first one is assigned as precursor agent and based on aromatic amines and derivatives, such as *p*-phenylenediamine (Scheme 1) [4–6]. The second component is called coupling agent and consists of aromatic compounds substituted with electron donor groups such as resorcinol (Scheme 1) or other naphthol derivatives [5,6]. The third component is an oxidant in an

alkaline medium, mainly hydrogen peroxide in the presence of ammonia [3]. The mixture is applied to the hair and precursors and hydrogen peroxide diffuse into the hair, where after specific chemical reactions forms a colored compound with high molecular weight (see Scheme 1). Usually, *p*-phenylenediamine (PPD) and resorcinol (RSN) are the precursors and coupling agent most used in permanent hair dyeing, respectively and their monitoring in water and cosmetics is a challenge.

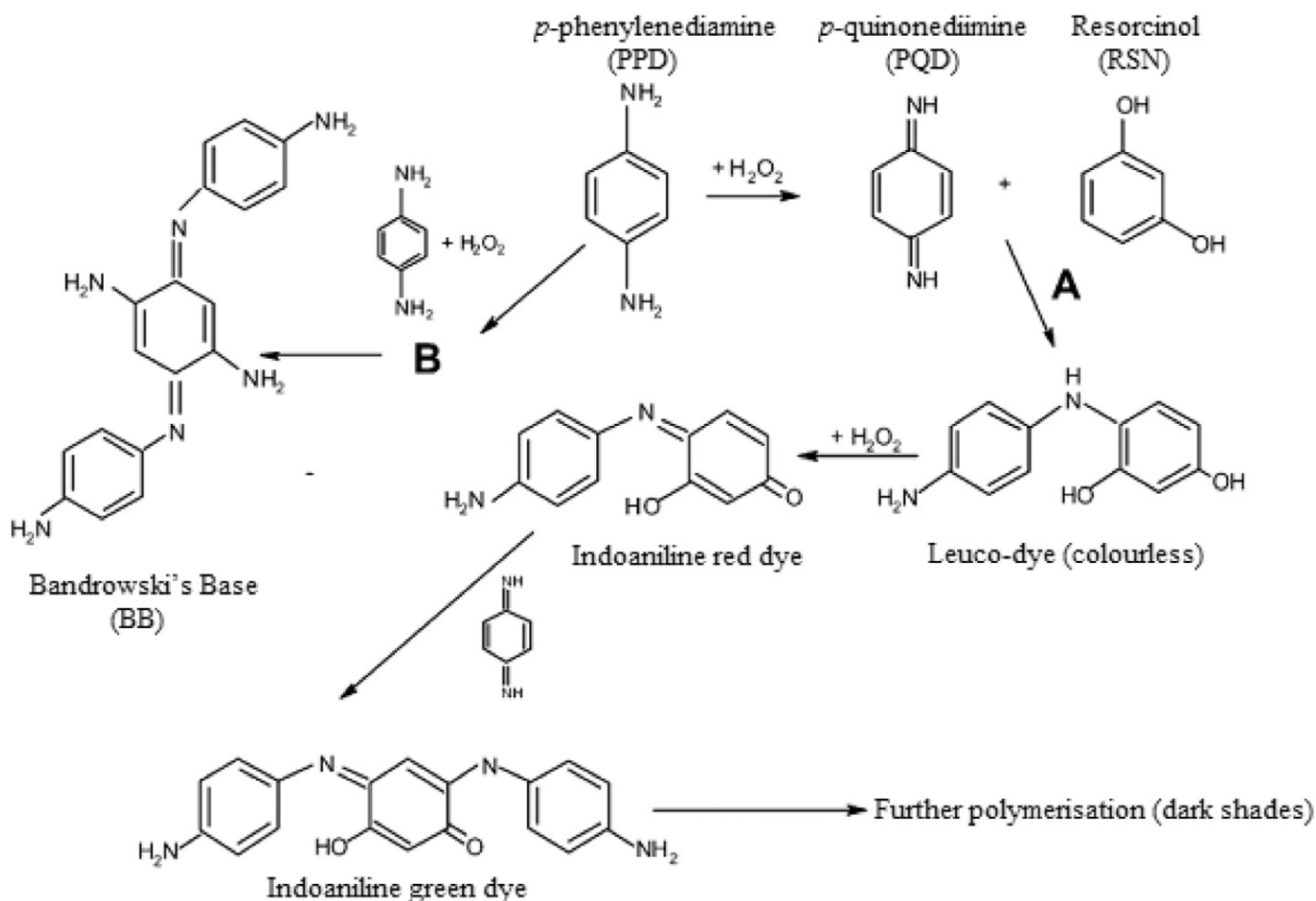
RSN is an important phenolic compound [7] which is widely used in cosmetics, tanning, pesticides, flavoring agents, medicines, antioxidant, dye, and photography chemicals [8,9]. Due to your high toxicity and low degradability in the ecological environment [8], it was included in the lists of priority pollutants to be monitored by international agencies such as the US Environmental Protection Agency (EPA) and the European Union (EU) [8,10]. Consequently, several analytical methods have been developed for quantification of RSN based on chromatography [11], fluorescence [12,13], electrochemical [14], capillary electrophoresis [15] and chemiluminescence methodologies [16].

The PPD is an aromatic amine widely used as a component in polymer, composites, pigments, hair dyes and textiles products [17–19]. The control of PPD is required due to reports of allergic reactions and indication of potential carcinogenic properties [20–22]. The detection of PPD can be accomplished by numerous methods including

[☆] This paper was presented at the Brazilian Congress on Analytical Chemistry.

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 9619.

E-mail addresses: boldrinvi@iq.unesp.br (M.V.B. Zanoni), biribisfs@gmail.com (B.F. da Silva).



Scheme 1. Possible products from the reaction between PPD and RSN in the oxidant medium (H_2O_2).

gas chromatography (GC) [23], hyphenated techniques such as gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [20,24], high performance liquid chromatography (HPLC) [22,25,26], capillary electrophoresis (CE) [17], UV spectrophotometric detection [27] and fluorescence [19]. In this way, the determination of these dye precursors and analogs in commercial products is closely monitored by government agency and cosmetic industry. Although there are many chromatographic methods, all the chromatographic methods share common limitations such as peak tailing and poor resolution.

Therefore, the simultaneous determination of PPD and RSN in hair dyeing products or effluents containing residues of these compounds can be a tool to control the quality of hair dyeing and also its occurrence as hazardous products. In this way, Nesterenko and Penner [28] have proposed the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to UV detector for simultaneous determination of PPD and RSN, with limit of detection for PPD and RSN equals to 0.10 and 0.09 mg mL^{-1} , respectively. The simultaneous determination of *o*, *m*, *p*-phenylenediamine, catechol and resorcinol was also performed by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection [29]. However, these methods usually require large amounts of samples, high analysis time and great use of solvents. Wang and coworkers [30] have proposed a voltammetric method for the determination of catechol, resorcinol and hydroquinone using pre-anodized inlaying ultrathin carbon paste electrode. Lawrence et al. [31] have shown the use of glassy carbon electrode without modification for quantification of PPD, with limit of detection equal to 0.13 mg L^{-1} .

The modification of solid electrodes with multiwall carbon nanotubes (MWNTs) is strongly highlighted in the literature due to its

great ability to improve the electron transfer reactions, higher surface area and good mechanical roughness, which offers electroanalytical methods highly sensitive for determination of several analytes [32–35]. In addition, chitosan (CHT) is a linear hydrophilic polysaccharide with abundant $-\text{NH}_2$ and $-\text{OH}$ functional groups that has received great attention due to its excellent film forming ability as CHT–MWNTs composites and easy use as platforms for the development of electrochemical sensors [36–40]. Although several successful works based on electroanalytical methods are reported, as far as we know, their application to detect simultaneously both compounds (i.e., PPD and RSN) in complex samples has not been previously reported.

Taking into consideration the economic importance of hair dyes and some risks involved with the use of these compounds, these products are regulated by standards set according to rules implemented by the regulatory agencies [41]. However, analytical methods able to detect and quantify hair dyes and their derivatives in environmental matrices and commercial samples are scarce. Thus, the present work describes the development of an electrochemical sensor for PPD and RSN based on a glassy carbon electrode modified with a CHT–MWNTs composite. The device was applied to direct and simultaneous determination of both compound in tap water and commercial sample of hair dyeing. In this modified electrode, presumably the PPD and RSN could be pre-concentrated by the strong interaction with the amide and hydroxyl group of the CHT groups in the film, and the signal is improved due to presence of MWNTs film. The products generated from chemical reaction proceeded during a usual hair dyeing process was monitored by the voltammetric sensor and the results were compared with UV–vis spectrophotometry and LC–MS/MS techniques.

2. Experimental

2.1. Reagents and equipments

All chemicals used in this work were of analytical grade and the solutions were prepared using ultra-pure water (Milli-Q® system, Millipore). Resorcinol (RSN), *p*-phenylenediamine (PPD) and CHITOSAN were obtained from Sigma-Aldrich with high purity grade. Boric acid, phosphate acid, acetic acid, ammonium chloride and potassium chloride were from Merck. Multiwall carbon nanotubes (MWNTs) were purchased from DROPSSENS. Sodium hydroxide, ethanol and hydrogen peroxide were obtained from Synth. Standard solutions of 11.01 mg L⁻¹ PPD were prepared in solution of ethanol and water 1:1 (v/v) and RSN in aqueous media. Britton–Robinson buffer (B-R) 0.10 mol L⁻¹ used as supporting electrolyte was prepared by mixing appropriated amounts of 0.1 mol L⁻¹ sodium hydroxide to orthophosphoric acid, acetic acid and boric acid (0.1 mol L⁻¹ in each) solution. Measurements of pH were carried out in a TECNOPON mPA 210 pH-meter. Spectrophotometric measurements were carried out in a Hewlett-Packard 8453 UV–vis spectrophotometer using a 1.0 cm quartz cell. The electrochemical experiments were carried out in a galvanostat/potentiostat μ Autolab type III controlled by the GPES software. LC–MS/MS analyses were performed in a High Performance Liquid Chromatography of 1200 Agilent Technologies coupled to a Mass Spectrometer 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC–ESI–MS/MS).

2.2. Procedures

2.2.1. Preparation of MWNTs–CHT/GCE

A glassy carbon electrode (GCE) was manually polished with alumina paste of different particles sizes (0.5, 0.3 and 0.05 μ m) for 5 min and washed ultra-pure water (Milli-Q® system, Millipore). The composite was prepared using a stock solution of 0.5 wt.% chitosan prepared by adding 5.0 mg of chitosan in 1.0 mL of 1% (v/v) acetic acid adjusted to pH 5.0 using 0.10 mol L⁻¹ NaOH solutions. Afterwards, 2.0 mg of MWNTs was added to this solution and maintained under ultrasonic agitation for 30 min, forming a homogeneous and black solution of MWNTs–chitosan [42]. Finally, 20 μ L of this composite was placed on the GCE surface and the electrode dried at room temperature to obtain a multiwall carbon nanotubes/chitosan composite (MWNTs–CHT/GCE).

2.2.2. Electrochemical measurements

All electrochemical experiments were conducted by using a conventional three-electrode electrochemical cell of 10 mL capacity. The working electrode was a Glassy Carbon (3.0 mm) without and with modification by using a MWNTs–CHT/GCE. The auxiliary electrode was a platinum wire and the reference electrode was an Ag/AgCl (KCl, 3.0 mol L⁻¹). Before each electrochemical experiment, nitrogen gas was bubbled into the solution for 10 min to purge oxygen and prevent nonspecific oxidation of PPD and RSN compounds.

2.2.3. Hair dye samples preparation

Analyses of dosage forms of hair dye were carried out using a commercial hair dyeing containing resorcinol and *p*-phenylenediamine. For this, 1.00 g of these formulations were diluted with 30 mL of deionized water and maintained under constant stirring for 30 min. After, 100 μ L of this solution was transferred directly into the voltammetric cell containing 10 mL of ammonium buffer (pH 8.0) and voltammetric curves were obtained subsequently after 10 min of oxygen removal. The same procedure was adopted during spectrophotometric analysis, but with the samples diluted 100 times before analysis.

Samples of tap water were analyzed; three samples were spiked with aliquots of stock solution 1.10 g L⁻¹ of PPD and RSN. Thus, 25 μ L of this solution was transferred directly into the electrochemical cell containing 9.95 mL of ammonia buffer (pH 8.0) resulting in a concentration of 2.74 mg L⁻¹ of PPD and RSN in the samples.

3. Results and discussion

3.1. Electrochemical behavior of PPD and RSN at the GCE and MWNTs–CHT/GCE

Fig. 1 compares the cyclic voltammograms obtained for a solution containing 11.00 mg L⁻¹ of PPD and RSN in B-R buffer 0.10 mol L⁻¹ (pH 7.0) at GCE before and after modification with MWNTs–CHT. For the unmodified GCE electrode (Fig. 1a) the PPD oxidation is characterized by a pair of peaks at 0.17/0.11 V with $i_{pa}/i_{pc} = 1$, indicating that amine group is oxidized in one step of one electron ($E_{pc} - E_{pa} = 35$ mV) and presenting characteristics of a reversible process of two electrons [31]. The second peak at 0.61 V does not present any peak in the reverse scan and this is attributed to the irreversible oxidation of phenolic group in the RSN structure. This behavior is confirmed by individual cyclic voltammograms obtained for PPD and RSN compounds.

Similar profiles are observed for oxidation of PPD and RSN at MWNTs–CHT/GCE electrode (Fig. 1b) with anodic current densities (i_{pa}) for PPD and RSN oxidations approximately 10% and 70% higher than that obtained by using the unmodified electrode, respectively. Although the modification of the electrode has provided a significant increase in surface area as compared to the unmodified (as mentioned in subsection below), the current gain was ascribed to the improvement of electron transfer at the surface of MWNTs–CHT/GCE. This finding can be confirmed by analyzing Fig. 1, where the voltammetric profiles are presented as function of normalized current densities, which are dependent of the active area of the electrodes. Comparing these results with those obtained with GCE unmodified, it is clear that the MWNT films facilitate the oxidation of both PPD and RSN.

3.2. The scan rate effect of oxidation of PPD and RSN

The effect of scan rate on the voltammetric response at a concentration of 11.01 mg L⁻¹ of PPD and RSN in B-R buffer 0.10 mol L⁻¹ (pH 7.0) in oxidation in the MWNTs–CHT/GCE was investigated between 10 and 400 mV s⁻¹. The anodic peak current varied linearly with the square root of the scan rate was $I_{pa} = 1.47 \times 10^{-4} v^{1/2} - 5.75 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0.99$) to RSN and of $I_{pa} = 1.21 \times 10^{-4} v^{1/2} + 8.87 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0.99$) for PPD, suggesting that PPD and RSN oxidation follows diffusion-controlled mechanism to the surface of MWNTs–CHT/GCE [43,44]. From these results, the scan rate of 100 mV s⁻¹ was chosen for further studies.

In order to confirm the electron number involved in the oxidation process of both analytes investigated, chronoamperograms were conducted at bias potential of 0.146 and 0.565 V for PPD and RSN, respectively. For this, concentrations of PPD and RSN in range of 2.72 to

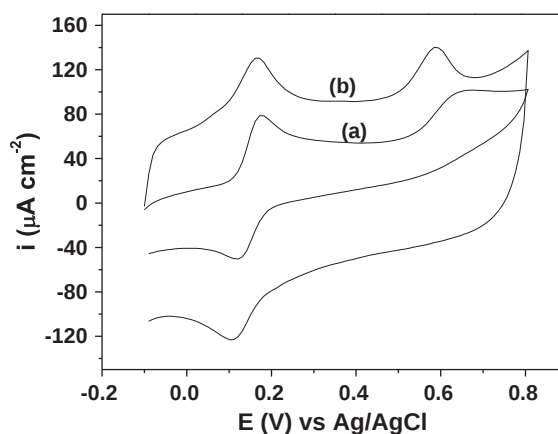


Fig. 1. Cyclic voltammograms in terms of current density for 11.01 mg L⁻¹ of PPD and RSN in 0.10 mol L⁻¹ B-R buffer (pH 7.0) in GCE (a) and MWNTs–CHT/GCE (b). Scan rate of 100 mV s⁻¹.

21.80 mg L⁻¹ were studied. By using the Cottrell equation and considering the diffusion coefficient as the order of magnitude of 10⁻⁶ cm² s⁻¹ [45–49], the number of electrons found for PPD and RSN was 2.02 and 2.05, respectively, indicating that two electrons are transferred in each oxidative process. Moreover, the diffusion confirmed by using the equation $I_{pa} = 2.69 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times D_0^{1/2} \times \nu^{1/2} \times C_0$, where I_{pa} is the anodic current (μA), n is the number of electrons, A is the active area of the electrode (cm²), D_0 is the diffusion coefficient (cm² s⁻¹), ν is the scan rate (V s⁻¹) and C_0 is the concentration of analyte (mol cm⁻³). Taking voltammograms recorded for 1 mmol L⁻¹ potassium hexacyanoferrate (III) as model compound in 1.0 mol L⁻¹ KCl solution (with diffusion coefficient of oxidation estimated in 7.6 μm² s⁻¹) the active area of the modified electrode was calculated. The active areas of the unmodified and MWNTs–CHT/GCE electrodes were estimated to be 0.08 and 0.75 cm², respectively. For the modified electrode (MWNTs–CHT/GCE), the diffusion coefficient calculated by using the Randles–Sevcik equation for PPD and RSN was equal to 5.33 and 5.29 μm² s⁻¹, respectively [49].

3.3. The effect of pH on E_{pa} of PPD and RSN

The effect of pH on the detection of 10.81 mg L⁻¹ PPD and 11.01 mg L⁻¹ RSN in 0.10 mol L⁻¹ B–R buffer by using linear voltammetry and MWNTs–CHT/GCE was recorded. Due to limitations of stability, voltammograms were recorded for pH values from 4.0 to 9.0, following the two peaks of responses (i.e., for PPD and RSN compounds) simultaneously. Influences of the pH on the peak current (Fig. 2) of the PPD showed a maximum at pH 4.0 (curve a), with lower oxidation potential observed at pH 9.0 (curve b). From 4.0 < pH < 9.0, the results showed a shift to a less positive potential and a linear relationship, with a slope of –63.0 mV pH⁻¹, suggesting that the mechanism of electron–proton transfer occurs in this pH range. According to the equation $\Delta E/\Delta pH = (59.1 \text{ mV}/n) \times \text{NH}^+$ ($n = 2$) and using the slope obtained, we can suggest that the number of protons (NH⁺) and electrons involved in the electronic transfer for PPD oxidation may be two [50]. The pH effect on both current and potential peaks of RSN is shown in Fig. 2 (see curves c and d, respectively). Maximum current values are observed at pH 7.0–8.0. Increasing the pH value, the potential peak is shifted to more negative values, where a slope of –70.0 mV pH⁻¹ was obtained from E_{pa} vs. pH curves (Fig. 2d). This behavior is an indicative that the oxidation mechanism of RSN also involves two protons and two electrons [8].

The separation between peak potential of PPD and RSN was compared in all pH intervals and it is possible to see that despite the shift observed for each compound individually they are always separated for around 400 mV, which indicates that both peaks can be followed in the pH range of 4.0–9.0. On the other hand, although maximum current is observed at pH 4.0 for PPD, the maximum peak current for RSN is

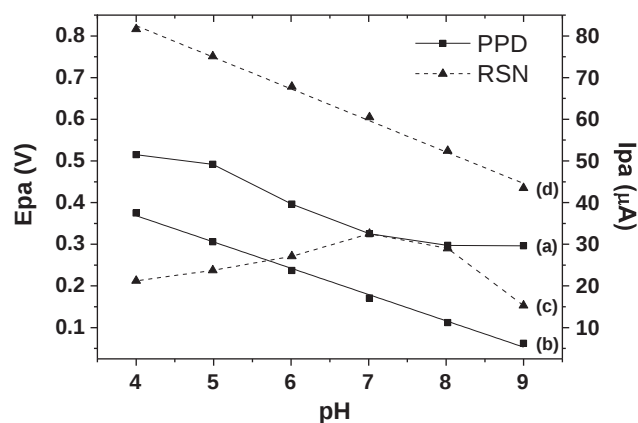


Fig. 2. Relation between I_{pa} vs. pH (curves a and c) and E_{pa} vs. pH (curves b and d) to 11.01 mg L⁻¹ of PPD and RSN in 0.10 mol L⁻¹ B–R buffer. Scan rate of 100 mV s⁻¹.

achieved at pH 7.0. The higher current values observed for both processes indicate that chitosan ($pK_a \approx 7.0$) besides being acting as agglutinant of MWNTs [51], also is favoring the pre-concentration of both PPD and RSN compounds due to functional groups (–OH) and (–NH₂) present in the chemical structure of chitosan [51]. In acidic conditions the electrostatic interactions between hydroxyl group of CHT present on the GCE and protonated amine group of PPD are improved. As the pH increases, the PPD begins to deprotonate, resulting in the reduction of the current peak due to an inefficient interaction between the hydroxyl groups of PPD and the chitosan. On the other hand, the increase of pH value from 4.0 to 7.0 provides an increase in the peak current for RSN oxidation. It seems that the amine groups also present in the chitosan structure ($pK_a \approx 7.0$) [51] could be acting as RSN accumulation. Nevertheless, taking into account that permanent dyeing usually is carried out in alkaline conditions [52,53], electrolyte solutions at pH 8.0 were chosen for the additional experiments.

In order to monitor the effect of electrolyte on the voltammetric response of PPD and RSN oxidation, linear voltammograms were recorded for 11.01 mg L⁻¹ of PPD and RSN in 0.10 mol L⁻¹ KCl and 0.10 mol L⁻¹ B–R buffers, 0.10 mol L⁻¹ phosphate and ammonia buffers (all solutions at pH 8.0). Well-defined peaks were obtained for PPD and RSN in B–R buffer, phosphate and in KCl. However, better signals were obtained in ammonia buffer [52,53]. Taking into account that this is a usual ingredient of commercial hair dyeing, the ammonia buffer was chosen for further analysis and the linear scan voltammograms obtained are shown in Fig. 3 (curve I), which can be used to monitor simultaneously both compounds in commercial hair dyeing. It is possible to observe that PPD and RSN oxidation in 0.10 mol L⁻¹ ammonia buffer (pH 8.0) presents peaks at +0.10 V and +0.43 V (vs. Ag/AgCl), respectively. Thus, the ammonia buffer (0.10 mol L⁻¹ and at pH 8.0) was used in all further experiments.

3.4. Monitoring the reaction between PPD and RSN

Permanent hair colorants are commonly produced inside the hair fiber by a commercial mixture of a dye precursor (ex: *p*-phenylenediamine) and a coupler (ex: resorcinol) agents in an alkaline medium with an oxidant such as hydrogen peroxide [52,53]. Therefore, the determination of these dye precursors and analogs in commercial products has been monitored by government agencies and cosmetic industries. However, a great preoccupation is also verified the formed products.

In order to evaluate the possibility to use electroanalytical methods to determine both precursor and coupler in the same commercial product but also the product formed, linear sweep voltammograms were

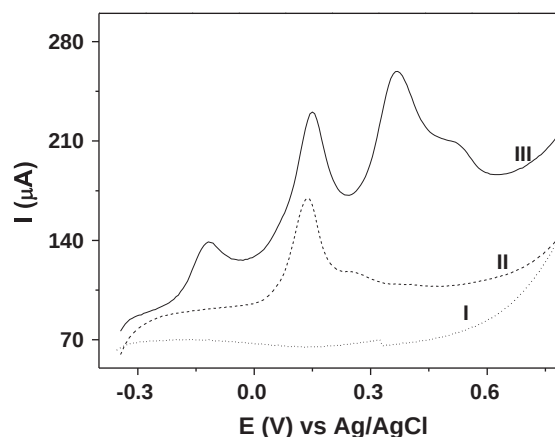


Fig. 3. Linear sweep voltammetry to monitoring of the reaction between PPD and RSN in 0.10 mol L⁻¹ ammoniacal buffer (pH 8.0) in middle of 1% of hydrogen peroxide (I) in the presence of 75.70 mg L⁻¹ of PPD (II) and in the presence of 75.70 mg L⁻¹ of PPD and 11.00 mg L⁻¹ of RSN (III).

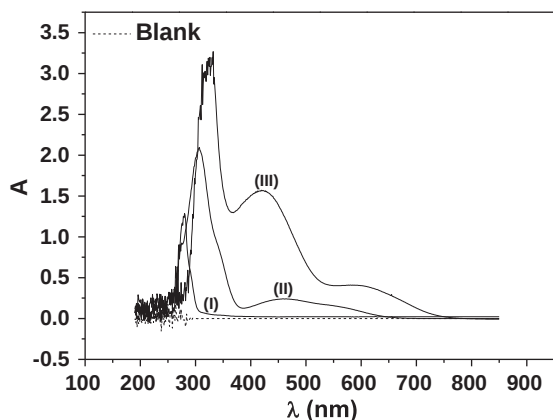


Fig. 4. Spectrophotometer UV–vis with 11.00 mg L⁻¹ of RSN (I), 75.70 mg L⁻¹ of PPD (II) and RSN and PPD (III) in middle of hydrogen peroxide 1%.

recorded for the mixture of 75.70 mg L⁻¹ of PPD and 11.01 mg L⁻¹ of RSN in 0.10 mol L⁻¹ ammonia buffer (pH 8.0) in the presence of hydrogen peroxide. As shown in Fig. 3 (curve I), 1% of hydrogen peroxide in ammonia buffer pH 8.0 does not present any oxidation peak up to +0.6 V. The curve II illustrates the voltammetric profile observed for PPD in the presence of peroxide that has shown only a peak at +0.14 V vs. Ag/AgCl correspondent to the PPD oxidation. Although, literature indicates the occurrence of Base of Bandrowski and *p*-quinonediimine, there is no evidence of oxidation of these products. However, Fig. 3 (curve III) illustrates the product of 30 min reaction of PPD and RSN in 1% hydrogen peroxide in ammonia buffer pH 8.0. Apart from the peaks corresponding to the oxidation of PPD and RSN, two additional peaks at +0.36 V and -0.11 V were observed, clearly indicating the formation of a product during the chemical reaction. Although PPD can be easily followed in the mixture of peroxide, the resorcinol is complicated by these products.

In order to obtain more information about new possible products, UV–vis spectroscopy was carried out for 11.01 mg L⁻¹ of RSN (Fig. 4, curve I) and 75.70 mg L⁻¹ of PPD (Fig. 4, curve II) solutions in 0.10 mol L⁻¹ ammonia buffer (pH 8.0). Additionally, a mixture of PPD and RSN in 0.10 mol L⁻¹ ammonia buffer pH 8.0 containing 1% of hydrogen peroxide also was analyzed by UV–vis spectroscopy (Fig. 4, curve III). As shown in Fig. 4, RSN is characterized by an intense peak at 281 nm (curve I) while PPD presents two peaks at 307 and 474 nm (curve II) referent the PPD and reactive intermediate *p*-quinonediimine (PQD), respectively [54–58]. Additionally, two peaks were identified at 423 and 604 nm (curve III), which can be assigned the products of the hair dye properly said.

To obtain more information about the generated products identified by linear scan voltammetry and spectrophotometry, LC–MS/MS measurements were carried out for PPD and RSN before and after reaction with hydrogen peroxide in ammonia buffer. Analysis of PPD showed two intense peaks in the chromatograms (Fig. 5) at 1.76 min with the characteristic *m/z* ratio of [M + H⁺] = 109.2, as shown in Table 1, confirming the pattern described for PPD already described in literature [58,59]. All the proposed structure was confirmed by MS² spectra. As can be seen in Fig. 5, the product generated after 30 min of reaction indicates the occurrence of three main products besides residues of PPD. Firstly, the oxidation of PPD forms a reactive intermediate *p*-quinonediimine (PQD) [54–57], which is characterized by a peak with retention time of 2.22 min and *m/z* of [M + H⁺] = 107.2. As mentioned above, this peak is attributed to the band at 474 nm on UV–vis spectra (Fig. 4, curve II) [58]. Thus, in the course of time, concentration of PQD increases due to continuous oxidation of PPD and decreases after spectra recorded after 24 h (not shown here). Concomitantly, the formation of a product assigned in literature as Bandrowski's Base (BB) at retention time of 8.23 min and *m/z* = 319.4, which is not electroactive in the potential range examined (see Fig. 3, curve II), is observed. The first product with coloring of the reaction between PPD and RSN called indoaniline red dye (see Scheme 1) was observed in the peak at retention time of 5.37 min with a *m/z* = 215.2. The final product is green colored and presents the peak at retention time of 6.82 min

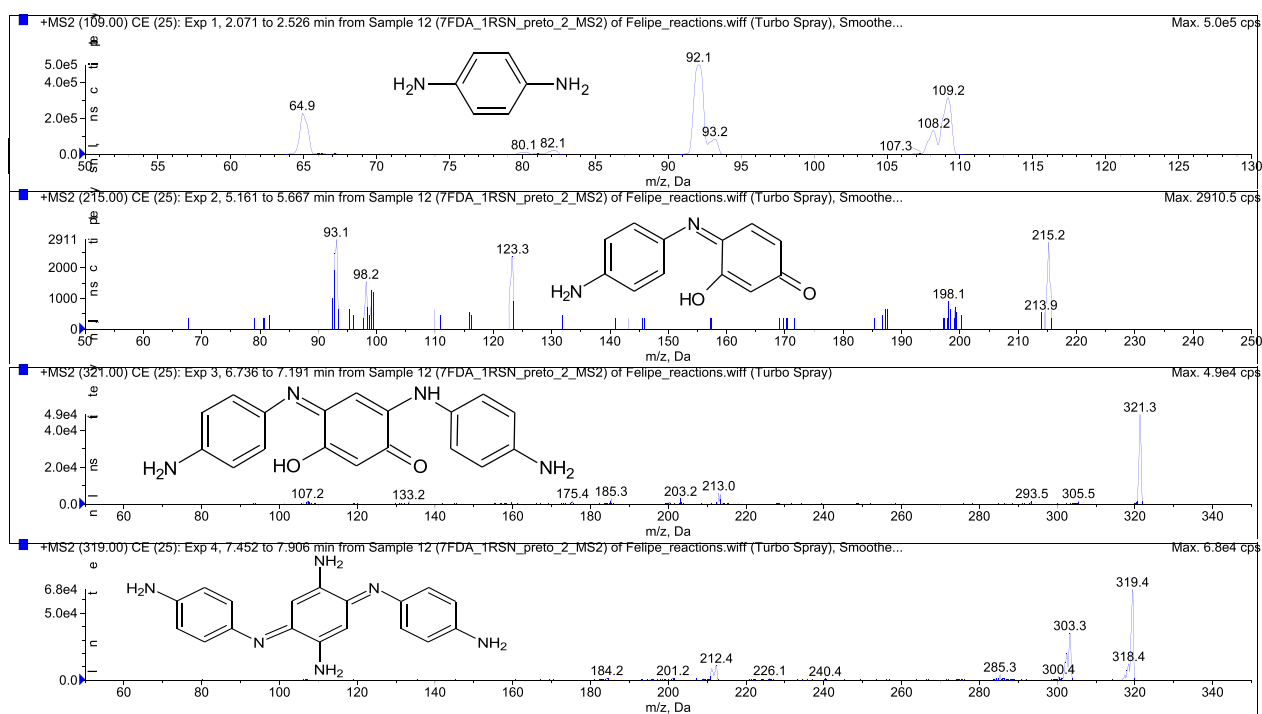
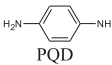
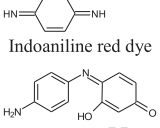
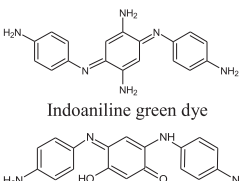


Fig. 5. LC–MS/MS with 75.70 mg L⁻¹ of PPD and 11.00 mg L⁻¹ of RSN in middle of hydrogen peroxide 1%.

Table 1

LC–MS/MS patterns obtained for PPD and RSN in the before and after chemical reaction with hydrogen peroxide in alkaline medium.

Species	PPD + RSN + H ₂ O ₂	
	Experimental <i>m/z</i> value of [M + H] ⁺ ion	<i>t</i> _{ret.} (min)
RSN	111.0	6.88
	109.2	1.76
	107.0	2.22
	215.2	5.37
	319.4	8.23
Indoaniline green dye	321.3	6.82

*t*_{ret.}: retention time.

with a (*m/z* = 321.3), due to the indoaniline green dye [58,59]. The oxidation products involving PPD and RSN in alkaline medium containing hydrogen peroxide, detected by LC–MS/MS are represented in Table 1. The Indoaniline red dye and indoaniline green dye products could be responsible by absorption band at 423 and 604 nm (see Fig. 4, curve III) and by peaks observed in –0.11 and +0.36 V vs. Ag/AgCl (Fig. 3, curve III).

Thus, PPD and RSN could be monitored by linear scan voltammograms, since the sample cannot be treated by hydrogen peroxide. Further studies were carried out with the aim to optimize the analytical methods for simultaneous detection of PPD and RSN compounds in ammonia buffer, which are usually present in commercial hair dyeing samples.

3.5. Analytical performance

In order to detect of PPD and RSN compounds simultaneously by oxidation at MWNTs–CHT/GCE in 0.10 mol L^{–1} ammonia buffer (pH 8.0), analytical curves were carried out from 0.55 to 21.2 mg L^{–1}. Fig. 6 illustrates the electroanalytical responses obtained. The current peaks of both analytes increase proportionally with their respective concentrations and with linear regression equation of: $I_{pa1} = 0.37 \times [PPD] + 5.20 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0.990$) and $I_{pa2} = 0.31 \times [RSN] + 0.81 \times 10^{-6}$ ($R^2 = 0.990$) with linear relationship between 0.55 and 21.2 mg L^{–1}. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated with basis on the following equations: L.D. = $3 \times \text{std}/M$ and L.Q. = $10 \times \text{std}/M$, where std is the standard deviation of the calibration curve and *M* the slope of the curve, respectively. Thus, the LOD was 0.79 and 0.58 mg L^{–1} and LOQ was 2.66 and 1.87 mg L^{–1} to PPD and RSN, respectively. The reproducibility was evaluated by the relative standard deviation for ten determinations, found 0.73 and 2.35% for 2.70 mg L^{–1} and 0.87 and 1.08% for 15.96 mg L^{–1} to PPD and RSN, respectively. These results indicate that the proposed procedure showed a satisfactory reproducibility.

The influence of each analyte in the presence of the other one was evaluated by recording voltammograms. Firstly, a concentration of 2.16 mg L^{–1} of RSN was fixed and the PPD concentration was varied

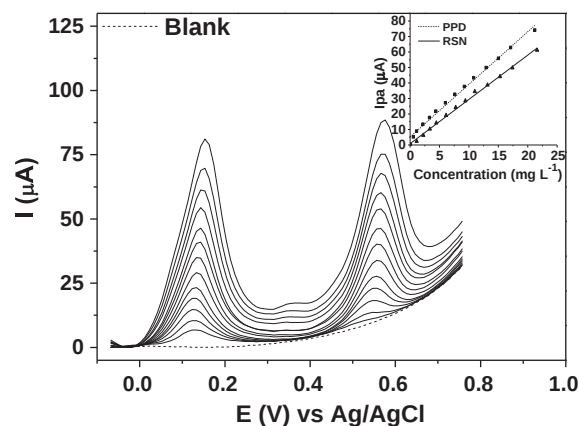


Fig. 6. Linear sweep voltammetry to PPD and RSN at various concentrations (0.55 to 21.2 mg L^{–1}).

from 0.55 to 17.19 mg L^{–1}. Similar procedure was realized by fixing PPD and increasing concentration of RSN. Fig. 7 (curves a and b) illustrates the respective linear scan voltammograms obtained for both arrangements. In both cases, no interference in the peak current and linear analytical curves was observed for PPD in the presence of 2.16 mg L^{–1} RSN with similar sensitivity of the analytical curves. Similarly, by fixing the PPD concentration it was possible to construct a linear analytical curve for RSN in the range of 0.55 to 9.36 mg L^{–1}. After each measurement, it was not necessary to use any electroanalytical treatment or washing for cleaning the electrode surface, suggesting an excellent property anti-fouling sensor.

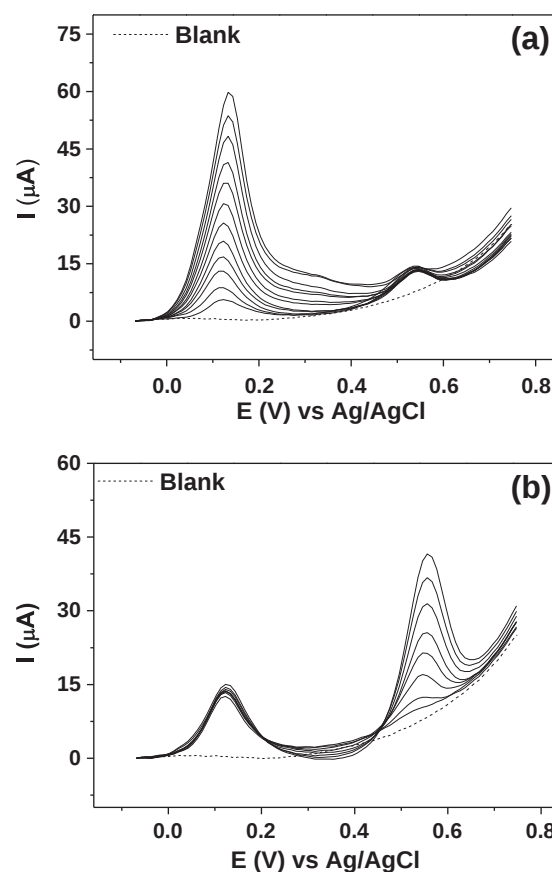


Fig. 7. Linear sweep voltammetry fixing RSN in 2.16 mg L^{–1} and ranging PPD between 0.55 and 17.19 mg L^{–1} (a) and fixing PPD 2.16 mg L^{–1} and ranging RSN between 0.55 and 9.36 mg L^{–1} (b).

Table 2Recovery of PPD and RSN in tap water fortified with 2.74 mg L⁻¹.

Sample	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
Analyte	PPD	RSN	PPD	RSN	PPD	RSN
Added (mg L ⁻¹)	2.74	2.74	2.74	2.74	2.74	2.74
Found (mg L ⁻¹)	2.73 ± 0.03	2.79 ± 0.04	2.66 ± 0.04	2.70 ± 0.05	2.78 ± 0.02	2.80 ± 0.06
Recovery (%)	99.63	101.82	97.08	98.54	101.46	102.19
<i>t</i> _{value}	0.58	2.16	3.46	1.38	3.46	1.73

n = 3, *t*_{critical} = 4.30.

3.6. Analytical application of the proposed method

Samples of tap water fortified with 2.74 mg L⁻¹ of PPD and of RSN were analyzed using the proposed method. As shown in Table 2, for all samples, the recovery reached values from 97.08 to 102.19%. The calculated *t* values were less than the *t* critical, indicating the absence of significant difference at 95% confidence between the fortified and recovery concentration. Moreover, the recoveries of PPD and RSN in tap water did not exceed 3.0% error, showing good applicability of the developed method.

To test the applicability of MWNTs–CHT/GCE the method, a sample of a permanent hair dye was tested. As described in Section 2.2.3, after dissolution of the sample, an aliquot was used for determination of PPD and RSN analytes in commercial sample of hair dyeing without any pre-treatment. The determination of the amount of both compounds was carried out in triplicates using the methodology described in the experimental section submitting the sample to standard addition method for PPD and RSN in the concentration range of 1.08 to 11.01 mg L⁻¹ without any pre-treatment. Taking an amount of 100 μL of the sample in 10 mL of 0.10 mol L⁻¹ ammonia buffer (pH 8.0), the researchers recorded well defined peaks for both analytes as shown in Fig. 8. Excellent linear relationships were obtained for both PPD and RSN, as can be seen in the insert of Fig. 8. These results indicate mean values of 24.10 and 10.34 mg g⁻¹ hair dye (*n* = 3 repetitions) for

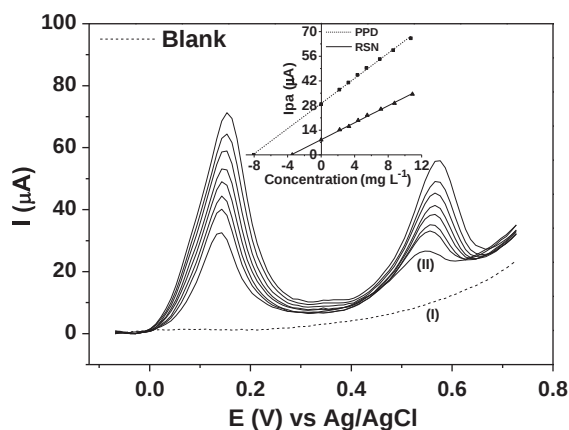


Fig. 8. Linear sweep voltammetry to MWNTs–CHT/GCE in 0.10 mol L⁻¹ ammonia buffer (pH 8.0) (I), addition of 100 μL of sample (II) and successive standard additions of PPD and RSN between 1.08 and 11.01 mg L⁻¹.

Table 3

Determination of PPD and RSN in hair dye sample by using the proposed method and UV–vis spectrophotometry technique.

Analyte	PPD		RSN	
	MWNTs–CHT/GCE	UV–vis	MWNTs–CHT/GCE	UV–vis
Found values (mg g ⁻¹ hair dye)	24.10 ± 0.88	23.81 ± 0.20	10.34 ± 0.07	10.14 ± 0.55

n = 3.

PPD and RSN, respectively. The method was validated by using UV–vis spectrophotometry analysis and the results are shown in Table 3. The concentration values found for PPD and RSN in the commercial sample using both methods were very close, as can be seen in Table 3. Low standard deviations were obtained when both methods were compared. The Students *t* test indicates values of 1.07 for PPD and 1.54 for RSN, which were lower than the critical one (4.30) [60]. This results show that there is no significant difference (at 95% confidence level) between both methods.

The results indicate that the method offers the possibility to detect simultaneously PPD and RSN at low concentrations (low detection limits) in tap water and commercial hair dyeing samples without any pretreatment and within an acceptable range of error.

4. Conclusions

In this study, a simple composite electrode based on films of MWNTs–CHT on glassy carbon electrode was prepared. This electrode was efficient for the simultaneous determination of PPD and RSN in hair dyeing solutions. The results clearly show that the MWNTs–CHT/GCE presents a polymeric network on its surface, allowing the detection of both compounds simultaneously at low concentration in complex sample without any pre-treatment. The voltammetric sensor also gave positive answer to detection of other intermediates generated during oxidative step with hydrogen peroxide, but deserves more conclusive studies. These species generated during hair dyeing performance was detected by LC–MS/MS. The present method shows good possibilities to construct a stable electrochemical sensor applying a simple, cheap and green method, due to the use of small amounts reagents to monitor both PPD and RSN at low concentration in both residual water and dyeing hair sample. Finally, this method is an attractive way to develop an environmentally friendly detection method.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CAPES and CNPq.

References

- [1] A.G. Püntener, U. Schlesinger, *Colorants for Non-Textile Applications*, Elsevier, 2000.
- [2] O.J.X. Morel, R.M. Christie, Current trends in the chemistry of permanent hair dyeing, *Chem. Rev.* 111 (2011) 2537–2561.
- [3] T. Kojima, H. Yamada, T. Yamamoto, Y. Matsushita, K. Fukushima, Dyeing regions of oxidative hair dyes in human hair investigated by nanoscale secondary ion mass spectrometry, *Colloids Surf. B* 106 (2013) 140–144.
- [4] G.P. Hooff, N.A.V. Huizen, R.J.W. Meesters, E.E. Zijlstra, M. Abdelraheem, W. Abdelraheem, M. Hamdouk, J. Lindemans, T.M. Luiders, Analytical investigations of toxic p-phenylenediamine (PPD) levels in clinical urine samples with special focus on MALDI–MS/MS, *PLoS One* 6 (2011) 1–8.
- [5] J. Araldi, S.S. Guterres, Tinturas capilares: existe risco de câncer relacionado à utilização desses produtos? *Infarma* 17 (2005) 78–83.
- [6] G.J. Nohynek, R. Fautz, F. Benesch-Keffler, H. Tountain, Toxicity and human health risk of hair dyes, *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 517–543.
- [7] W. Hong-Wei, C. Mei-Lan, S. Dan, Z. Yan, Determination of resorcinol and phloroglucinol in environmental water samples using ion chromatography with chemiluminescence detection, *Chin. J. Anal. Chem.* 40 (2012) 1747–1751.
- [8] H. Yin, Q. Zhang, Y. Zhou, Q. Ma, T. Liu, L. Zhu, S. Ai, Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene–chitosan composite film modified

- glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 2748–2753.
- [9] M.U.A. Prathap, B. Satpati, R. Srivastava, Facile preparation of polyaniline/MnO₂ nanofibers and its electrochemical application in the simultaneous determination of catechol, hydroquinone, and resorcinol, *Sensors Actuators B* 186 (2013) 67–77.
 - [10] T. Xie, Q. Liu, Y. Shi, Q. Liu, Simultaneous determination of positional isomers of benzenediols by capillary zone electrophoresis with square wave amperometric detection, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 317–321.
 - [11] H. Cui, J. Zhou, F. Xu, C.-Z. Lai, G.-H. Wan, Determination of phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with Ce⁴⁺-Tween 20 chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 273–279.
 - [12] W. Xiao, D. Xiao, Aminopyrene functionalized mesoporous silica for the selective determination of resorcinol, *Talanta* 72 (2007) 1288–1292.
 - [13] J. Fan, T. Zhang, J. Sun, M. Fan, Kinetic fluorimetric measurement of trace resorcinol in phenol mixtures, *J. Fluoresc.* 17 (2007) 113–118.
 - [14] S.M. Ghoreishi, M. Behpour, E. Hajisadeghian, M. Golestaneh, Voltammetric determination of resorcinol on the surface of a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotube, *Arab. J. Chem.* (2014) (in press).
 - [15] M.R. Gomez, R.A. Olsina, L.D. Martinez, M.F. Silva, Simultaneous determination of cloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms, *Talanta* 61 (2003) 233–238.
 - [16] J. Du, Y. Li, J. Lu, Flow injection chemiluminescence determination of polyhydroxy phenols using luminol-ferrocyanide/ferrocyanide system, *Talanta* 55 (2001) 1055–1058.
 - [17] S. Dong, L. Chi, Z. Yang, P. He, Q. Wang, Y. Fang, Simultaneous determination of dihydroxybenzene and phenylenediamine positional isomers using capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3232–3238.
 - [18] Y.-H. Chen, Y.-Y. Liu, R.-H. Lin, F.-S. Yen, Photocatalytic degradation of p-phenylenediamine with TiO₂-coated magnetic PMMA microspheres in an aqueous solution, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 973–981.
 - [19] K. Ngamdee, S. Martwiset, T. Tuntulani, W. Ngeontae, Selective fluorescence sensors for p-phenylenediamine using formyl boronate ester with an assistance of micelles, *Sensors Actuators B* 173 (2012) 682–691.
 - [20] P.G. Wang, A.J. Krynitsky, Rapid determination of para-phenylenediamine by gas chromatography–mass spectrometry with selected ion monitoring in henna-containing cosmetic products, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 1795–1801.
 - [21] M.L.D. Gioia, A. Leggio, A.L. Pera, A. Liguori, F. Perri, C. Siciliano, Determination by gas chromatography/mass spectrometry of p-phenylenediamine in hair dyes after conversion to an imine derivative, *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 143–148.
 - [22] L.-H. Wang, S.-J. Tsai, Simultaneous determination of oxidative hair dye p-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 201–207.
 - [23] H. Tokuda, Y. Kimura, S. Takano, Determination of dye intermediates in oxidative hair dyes by fused-silica capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 367 (1986) 345–356.
 - [24] R.J. Turesky, J.P. Freeman, R.D. Holland, D.M. Nestorick, D.W. Miller, D.L. Ratnasingham, F.F. Kadlubar, Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes, *Chem. Res. Toxicol.* 16 (2003) 1162–1173.
 - [25] J. Zhou, H. Xu, G.-H. Wan, C.-F. Duan, H. Cui, Enhancing and inhibiting effects of aromatic compounds on luminol-dimethylsulfoxide-OH — chemiluminescence and determination of intermediates in oxidative hair dyes by HPLC with chemiluminescence detection, *Talanta* 64 (2004) 467–477.
 - [26] S.-P. Wang, T.-H. Huang, Separation and determination of aminophenols and phenylenediamines by liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography, *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 207–214.
 - [27] H.M. Pinheiro, E. Touraud, O. Thomas, Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters, *Dye. Pigment.* 61 (2004) 121–139.
 - [28] N.A. Penner, P.N. Nesterenko, Simultaneous determination of dihydroxybenzenes, aminophenols and phenylenediamines in hair dyes by high-performance liquid chromatography on hypercross-linked polystyrene, *Analyst* 125 (2000) 1249–1254.
 - [29] S. Dong, L. Chi, S. Zhang, P. He, Q. Wang, Y. Fang, Simultaneous determination of phenylenediamine isomers and dihydroxybenzene isomers in hair dyes by capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 653–659.
 - [30] Z. Wang, Z. Sun, H. Zhu, G. Gao, H. Liu, X. Zhao, Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers using preanodized inlaying ultrathin carbon paste electrode, *Electroanalysis* 22 (2010) 1737–1742.
 - [31] N.S. Lawrence, E.L. Beckett, J. Davis, R.G. Compton, Voltammetric investigation of hair dye constituents: application to the quantification of p-phenylenediamine, *Analyst* 126 (2001) 1897–1900.
 - [32] P. Xiao, F. Zhao, B. Zeng, Voltammetric determination of quercetin at a multi-walled carbon nanotubes paste electrode, *Microchem. J.* 85 (2007) 244–249.
 - [33] S.L.R. Gomes-Filho, A.C.M.S. Dias, M.M.S. Silva, B.V.M. Silva, R.F. Dutra, A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T, *Microchem. J.* 109 (2013) 10–15.
 - [34] M.A. Lorenzo, A.S. Arribas, M. Moreno, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, Determination of butylparaben by adsorptive stripping voltammetry at glassy carbon electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes, *Microchem. J.* 110 (2013) 510–516.
 - [35] S. Lü, Electrochemical determination of 8-azaguanine in human urine at a multi-carbon nanotubes modified electrode, *Microchem. J.* 77 (2004) 37–42.
 - [36] L. Jiang, C. Liu, L. Jiang, Z. Peng, G. Lu, A chitosan-multiwall carbon nanotube modified electrode for simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid, *Anal. Sci.* 20 (2004) 1055–1059.
 - [37] Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, S. Dong, The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 984–988.
 - [38] M. Zhang, A. Smith, W. Gorski, Carbon nanotube–chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5045–5050.
 - [39] X. Chen, W. Wang, Z. Song, J. Wang, Chitosan/carbon nanotube composites for the isolation of hemoglobin in the presence of abundant proteins, *Anal. Methods* 3 (2011) 1769–1773.
 - [40] J. Venkatesan, B. Ryu, P.N. Sudha, S.-K. Kim, Preparation and characterization of chitosan–carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 393–402.
 - [41] P. Ghosh, A.K. Sinha, Hair colors: classification, chemistry and a review of chromatographic and electrophoretic methods for analysis, *Anal. Lett.* 41 (2008) 2291–2321.
 - [42] A. Babaei, D.J. Garrett, A.J. Downard, Selective simultaneous determination of paracetamol and uric acid using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotube/chitosan composite, *Electroanalysis* 23 (2011) 417–423.
 - [43] Q. Yu, Y. Liu, X. Liu, X. Zeng, S. Luo, W. Wei, Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at MWCNTs/β-cyclodextrin modified carbon ionic liquid electrode in the presence of cetylpyridinium bromide, *Electroanalysis* 22 (2010) 1012–1018.
 - [44] X. Liu, Y. Li, X. Liu, X. Zeng, B. Kong, S. Luo, W. Wei, Simple sensor for simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 883–889.
 - [45] K. Balaji, K. Reddaiah, T.M. Reddy, S.R.J. Reddy, Voltammetric reduction behavior and electrode kinetics, *Port. Electrochim. Acta* 29 (2011) 177–185.
 - [46] A. Varga, G. Gyetvai, L. Nagy, G. Nagy, Electrochemical time of flight method for determination of diffusion coefficients of glucose in solutions and gels, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1955–1963.
 - [47] M. Straws, M. Szklarczyk, Determination of diffusion coefficients of o-alkoxyanilines by RDE technique at platinum electrode, *J. Electroanal. Chem.* 641 (2010) 23–27.
 - [48] B. Csóka, G. Nagy, Determination of diffusion coefficient in gel and in aqueous solutions using scanning electrochemical microscopy, *J. Biochem. Biophys. Methods* 61 (2004) 57–67.
 - [49] T.-Y. Wu, S.-G. Su, H.P. Wang, Y.-C. Lin, S.-T. Gung, M.-W. Lin, I.-W. Sun, Electrochemical studies and self diffusion coefficients in cyclic ammonium based ionic liquids with allyl substituents, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 3209–3218.
 - [50] N.J. Ke, S.-S. Lu, S.-H. Cheng, A strategy for the determination of dopamine at a bare glassy carbon electrode: p-phenylenediamine as a nucleophile, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1514–1520.
 - [51] A.A. Gonsalves, C.R.M. Araújo, N.A. Soares, M.O.F. Goulart, F.C. Abreu, Different strategies for crosslinking of chitosan, *Quim. Nova* 34 (2011) 1215–1223.
 - [52] C. Mosley-Foreman, J. Choi, S. Wang, H. Yu, Phototoxicity of phenylenediamine hair dye chemicals in *Salmonella typhimurium* TA102 and human skin keratinocytes, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3780–3784.
 - [53] J.A. Seo, I.H. Bae, W.H. Jang, J.H. Kim, S.Y. Bak, S.H. Han, Y.H. Park, K.M. Lim, Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss, *J. Dermatol. Sci.* 66 (2012) 12–19.
 - [54] S. Jahn, H. Faber, R. Zazzaroni, U. Karst, Electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry to demonstrate irreversible binding of the skin allergen p-phenylenediamine to proteins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 1415–1425.
 - [55] J.M.L. White, I. Duangdeeden, R. Zazzaroni, N.J. Gilmour, D.A. Basketter, J.P. Mcfadden, p-Phenylenediamine allergy: the role of Bandrowski's base, *Clin. Exp. Allergy* 36 (2006) 1289–1293.
 - [56] P. Aebly, T. Sieber, H. Beck, G.F. Gerberick, C. Goebel, Skin sensitization to p-phenylenediamine: the diverging roles of oxidation and N-acetylation for dendritic cell activation and the immune response, *J. Invest. Dermatol.* 129 (2009) 99–109.
 - [57] J.-P. Lepoittevin, Metabolism versus chemical transformation or pro-versus prehapten? *Contact Dermatitis* 54 (2006) 73–74.
 - [58] L.A. Clare, L.E. Rojas-Sligh, S.M. Maciejewski, K. Kangas, J.E. Woods, L.J. Deiner, A. Cooks, D.K. Smith, The effect of H-bonding and proton transfer on the voltammetry of 2,3,5,6-tetramethyl-p-phenylenediamine in acetonitrile. An unexpectedly complex mechanism for a simple redox couple, *J. Phys. Chem. C* 114 (2013) 8938–8949.
 - [59] S. Jahn, H. Faber, R. Zazzaroni, U. Karst, Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in the investigation of the potent skin sensitizer p-phenylenediamine and its reactivity toward nucleophiles, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 1453–1464.
 - [60] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, second ed. Ellis Horwood Limited, England, 1988.