

JOSÉ LUIZ DA SILVA

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

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradioto

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

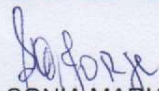
AUTOR: JOSÉ LUIZ DA SILVA

ORIENTADOR: NELSON RAMOS STRADIOTTO

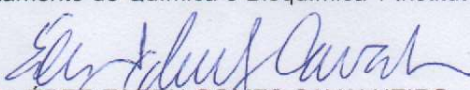
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



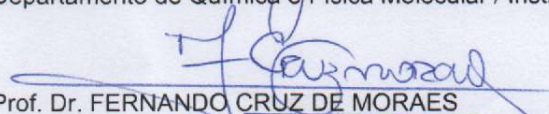
Prof. Dr. NELSON RAMOS STRADIOTTO
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



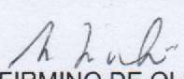
Profa. Dra. SONIA MARIA ALVES JORGE
Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu



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



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



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

Araraquara, 14 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: José Luiz da Silva
Nome em citações bibliográficas: Silva, J. L.; da Silva, J. L.; J.L. da Silva; da Silva, José L.; da Silva, José Luiz; DA SILVA, J. L.
Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Analítica
Rua Prof. Francisco Degni, 55
Bairro Quitandinha
Araraquara
14800-060, SP - Brasil
Endereço Eletrônico: silva_jluiz@yahoo.com.br

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2013 - 2017** Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, Brasil.
Título: Desenvolvimento de detectores nanoestruturados de óxidos metálicos em óxido de grafeno reduzido para detecção eletroquímica de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia de líquida de alta eficiência.
Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto
- 2011 - 2013** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, Brasil.
Título: Detecção eletroquímica de furfural e hidroximetilfurfural em bagaço da cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.
Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto.
- 2006 - 2011** Graduação em Química.
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados,

Brasil.

Título: Parâmetros experimentais e instrumentais para determinação condutométrica do sal sódico de bentazon em formulação comercial de herbicida.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rogério Fiorucci.

2004 - 2005 Técnico em Química.

Instituto Educacional Profissionalizante, IEP, Jales, Brasil.

3 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- 2013 – Atual Bolsista CAPES de doutorado no IQ- UNESP; Carga horária: 40h, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2011 – 2013 Bolsista CAPES de mestrado no IQ- UNESP; Carga horária: 40h, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2013 – 2013 Docente no Centro Educacional Raio de Sol, Américo Brasiliense, São Paulo; Carga horária: 12h, Regime: Contratado.
- 2009 – 2011 Docente no SENAI, Dourados, Mato Grosso do Sul; Carga horária: 12h, Regime: Contratado.
- 2010 – 2011 Bolsista CAPES de Iniciação à Docência na UEMS, Dourados, Mato Grosso do Sul; Carga horária: 20h, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2010 – 2010 Monitor bolsista de química geral e experimental na UEMS, Dourados, Mato Grosso do Sul; Carga horária: 8h.

4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Artigos completos publicados em periódicos

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; SEDENHO, G. C.; STRADIOTTO, N. R. Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode. *Microchemical Journal*, v. 134, p. 374-382, 2017.

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Cathodic electrochemical determination of furfural in sugarcane bagasse using electrode modified with nickel nanoparticles. *Analytical Methods*, v. 9, p. 826-834, 2017.

SEDENHO, G. C.; DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; DE SÁ, A. C.; STRADIOTTO, N. R. Determination of electroactive organic acids in sugarcane vinasse by high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection using a nickel nanoparticle modified boron-doped diamond. *Energy & Fuels*, v. 31, p. 2865-2870, 2017.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; SEDENHO, G. C.; STRADIOTTO, N. R. D-mannitol sensor based on molecularly imprinted polymer on electrode modified with reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. *Talanta*, v. 165, p. 231-239, 2017.

FABRAO, R. M.; BRITO, J. F.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Appraisal of photoelectrocatalytic oxidation of glucose and production of high value chemicals on nanotube Ti/TiO₂ electrode. *Electrochimica Acta*, v. 222, p. 123-132, 2016.

DA SILVA, J. L.; CAMARGO, J. S.; MARCHESIN, C. M.; CARDOSO, C. A. L.; FIORUCCI, A. R. Bentazon determination by conductometric titration using acid hydrochloric as titrant. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 605-621, 2016.

SANTOS, F. C. U.; PAIM, L. L.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical determination of total reducing sugars from bioethanol production using glassy carbon electrode modified with graphene oxide containing copper nanoparticles. *Fuel*, v. 163, p. 112-121, 2016.

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Determination of furanic aldehydes in sugarcane bagasse by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection using a modified electrode with nickel nanoparticles. *Journal of Separation Science*, v. 38, p. 3176-3182, 2015.

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

DA SILVA, J. L.; SILVA, D. A.; MARTINI, C.; DOMINGOS, D. C. A.; LEAL, P. G.; BENEDETTI FILHO, E.; FIORUCCI, A. R. A utilização de vídeos didáticos nas aulas de química do ensino médio para abordagem histórica e contextualizada do tema vidros. *Química Nova na Escola*, v. 34, n. 4, p. 189-200, 2012.

4.2 Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SILVA, J. L.; LEITE, A. I. D.; MARTINI, C.; ALEGRE, D. C. M.; GABANA, J. V.; ROSSINI, N.; SILVA, D. A.; CORREA, W. A.; ROSA, P. P.; FIORUCCI, A. R.; CATANANTE, B. R.; DOMINGOS, D. C. A.; LEAL, P. G. Uso de vídeos relacionados ao tema vidros no ensino médio: a química em uma perspectiva histórica e contextualizada. In: I ENCONTRO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO, Dourados - MS. Anais..., v. 1, n. 1 (1), 2010.

ROSA, P. P.; LEITE, A. I. D.; SILVA, J. L.; BENEDETTI FILHO, E.; NUNES, D. M.; OLIVEIRA, N.; PRADO, J. A. C. O uso de jogos aplicados em atividades escolares. In: I ENCONTRO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO, Dourados - MS. Anais..., v. 1, n. 1 (1), 2010.

SILVA, J. L.; CAVALCANTE, R. P.; ROSA, P. P.; HEGETO, R. S.; BENEDETTI FILHO, E.; FIORUCCI, A. R. Modificação química do eletrodo de pasta de carbono com amostras de ácido húmico para a detecção voltamétrica do pesticida Thiram. In: XVI Encontro Centro-Oeste de Debates sobre o Ensino de Química, Itumbiara. Anais... 2009.

4.3 Resumos publicados em anais de congressos

SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Amino acids determination in sugarcane vinasse by anion-exchange chromatography with electrochemical detection. In: 3rd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2017, Campos do Jordão. Resumos... São Paulo: Tec Art, 2017.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical sensors for monitoring of myo-inositol in sugarcane vinasse based on molecularly imprinted polymer and nanostructures. In: 3rd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2017, Campos do Jordão. Resumos... São Paulo: Tec Art, 2017.

AZEVEDO, V. H. R.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Silver nanoparticles in graphene oxide reduced modified electrode for amino acids oxidation. In: 46th World Chemistry Congress e 40a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2017, São Paulo. Resumos... São Paulo: IUPAC-SBQ, 2017.

DA SILVA, J. L.; ALVES, G. M.; STRADIOTTO, N. R. Pectin modified electrode for copper determination by differential pulse anodic stripping voltammetry. In: 46th World Chemistry Congress e 40a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2017, São Paulo. Resumos... São Paulo: IUPAC-SBQ, 2017.

ALVES, G. M.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Pectin modified electrode for copper determination by anodic stripping voltammetry. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal. Resumos... Natal: SIBEE, 2017.

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Anion-exchange chromatographic determination of amino acids in sugarcane vinasse using nickel nanoparticles in reduced graphene oxide modified electrode. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. Resumos... Florianópolis: ENQA, 2016.

AZEVEDO, V. H. R.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Eletrochemical determination of amino acids using modified electrode with reduced graphene oxide containing silver nanoparticles. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. Resumos... Florianópolis: ENQA, 2016.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Molecularly imprinted sensor based on electropolymerized poly(o-phenylenediamine) in electrode modified with reduced graphene oxide and gold nanoparticles for d-mannitol determination. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. Resumos... Florianópolis: ENQA, 2016.

FREITAS, P. V.; DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; SILVA, D. R.; STRADIOTTO, N. R. Chromatographic determination of polyphenols in sugarcane vinasse using electrochemical detection. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis. Resumos... Florianópolis: ENQA, 2016.

AZEVEDO, V. H. R.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, NELSON RAMOS. Oxidação eletrocatalítica de aminoácidos em eletrodo modificado com nanopartículas prata em grafeno. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP - 1ª Fase, 2016, Araraquara. Resumos... São Paulo: Editora Unesp, 2016.

SANTOS, F. C. U.; PAIM, L. L.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. A sensor with graphene oxide decorated with nanoparticles copper for quantification of total reducing sugars. In: The Energy & Materials Research Conference, 2015, Madrid. Resumos... Badajoz: Formatex Research Center, 2015.

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Electrochemical determination of 5-hydroxymethylfurfural using modified electrode with nickel nanoparticles. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia. Resumos... São Paulo: SBQ, 2015.

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Chromatographic determination of amino acids in sugarcane vinasse using modified electrode with graphene oxide containing nickel nanoparticles. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia. Resumos... Uberlândia: SIBEE, 2015.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determinação de polióis em eletrodo modificado com nanopartículas de cobre em grafeno por técnicas voltamétricas. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia. Resumos... Uberlândia: SIBEE, 2015.

SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Determination of furan aldehydes by hplc-pad using electrode modified with nickel nanoparticles in bagasse sugarcane. In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2014, Lausanne. Resumos... Lausanne: ISE, 2014.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determination of uronic acids in sugarcane bagasse by anion-exchange chromatography using electrode modified with copper nanoparticles. In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2014, Lausanne. Resumos... Lausanne: ISE, 2014.

SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Determination chromatographic of furanic aldehydes in sugarcane bagasse using modified electrode with nickel nanoparticles. In: 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2014, Campos do Jordão. Resumos... São Paulo: Tec Art, 2014.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. New method for determination of uronic acids in sugarcane bagasse using hplc with modified electrode with copper nanoparticles. In: 2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2014, Campos do Jordão. Resumos... São Paulo: Tec Art, 2014.

SA, A. C.; DA SILVA, J. L.; PAIM, L. L.; STRADIOTTO, N. R. Determinação de açúcares em bagaço de cana-de-açúcar por cromatografia de troca aniônica utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono contendo nanopartículas de níquel. In: II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014, Rio Claro. Resumos... Rio Claro: Workshop de Bioenergia, 2014.

BELUOMINI, M. A.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Análise de ácidos urônicos em bagaço de cana-de-açúcar por cromatografia aniônica com detecção amperométrica pulsada utilizando eletrodos modificados com nanopartículas de cobre. In: II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014, Rio Claro. Resumos... Rio Claro: Workshop de Bioenergia, 2014.

DA SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Quantificação de aldeídos furânicos em bagaço de cana-de-açúcar por cromatografia de fase reversa utilizando eletrodos modificados com nanopartículas de níquel. In: II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014, Rio Claro. Resumos... Rio Claro: Workshop de Bioenergia, 2014.

SANTOS, F. C. U.; PAIM, L. L.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determinação de açúcares redutores totais utilizando eletrodo modificado com óxido de grafeno decorado nanopartículas de cobre. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 2ª Fase, 2014, Águas de Lindóia. Resumos... São Paulo: Editora Unesp, 2014.

SANTOS, F. C. U.; PAIM, L. L.; DA SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determinação de açúcares redutores totais utilizando eletrodo modificado com óxido de grafeno decorado nanopartículas de cobre. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP – 1ª Fase, 2014, Araraquara. Resumos... São Paulo: Editora Unesp, 2014.

SILVA, J. L.; BELUOMINI, M. A.; STRADIOTTO, N. R. Determinação voltamétrica de furfural com eletrodo modificado com nanopartículas de níquel em bagaço de cana-de-açúcar. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão. Resumos... Campos do Jordão: SIBEE, 2013.

BELUOMINI, M. A.; SILVA, J. L.; STRADIOTTO, N. R. Determinação eletroquímica do ácido D-galacturônico utilizando eletrodo modificado com nanopartículas de cobre. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão. Resumos... Campos do Jordão: SIBEE, 2013.

OLIVEIRA, N. F. S.; SILVA, J. L.; BENEDETTI FILHO, E.; FIORUCCI, A. R. Proposta de uma sequência didática envolvendo leitura e o uso de palavras cruzadas no ensino de química orgânica. In: X Evento de Educação em Química, 2012, Araraquara. Resumos... Araraquara: EVEQ, 2012.

LEITE, A. I. D.; PRADO, J. A. C.; SILVA, J. L.; OLIVEIRA, N. Atividades de experimentação investigativa e lúdica na escola de ensino médio. In: 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2010, Natal. Resumos... Natal: SBPC, 2010.

ROSA, P. P.; CAVALCANTE, R. P.; FONSECA, C. C.; SILVA, J. L.; BENEDETTI FILHO, E.; ARRUDA, G. J.; FIORUCCI, A. R. Estudo eletroanalítico do pesticida thiram em eletrodo de pasta de carbono usando voltametria de onda quadrada. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. Resumos... São Paulo: SBQ, 2009.

UYARA, C. N.; CAVALCANTE, R. P.; SILVA, J. L.; FIORUCCI, A. R.; BENEDETTI FILHO, E.; SOLALIENDRES, M. O. Otimização de parâmetros experimentais para detecção voltamétrica de Metamidofós utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado. In: XVI Encontro Centro-Oeste de Debates sobre o Ensino de Química, 2009, Itumbiara. Resumos... Itumbiara: ECODEQ, 2009.

SILVA, J. L.; CAVALCANTE, R. P.; ROSA, P. P.; HEGETO, R. S.; BENEDETTI FILHO, E.; FIORUCCI, A. R. Modificação química do eletrodo de pasta de carbono com amostras de ácido húmico para a detecção voltamétrica do pesticida Thiram. In: XVI Encontro Centro-Oeste de Debates sobre o Ensino de Química, 2009, Itumbiara. Resumos... Itumbiara: ECODEQ, 2009.

5 PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

46th World Chemistry Congress (IUPAC) 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, 2017.

18º Encontro Nacional de Química Analítica, Florianópolis, 2016.

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2015.

XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Uberlândia, 2015.

2nd Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, Campos do Jordão, 2014.

65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Lausanne, 2014.

II Workshop de Bioenergia – UNESP, Rio Claro, 2014.

XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Campos do Jordão, 2014.

X Evento de Educação em Química, Araraquara, 2012.

12º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2009.

32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, 2009.

I Ciclo de Palestras em Qualidade de Vida e Saúde, Dourados, 2009.

II Escola de Instrumentação Aplicada: Química Verde, Dourados, 2009.

II Semana Integrada de Química – SEINQUI, Dourados, 2009.

I Workshop Potencialidades da Aplicação de Vinhaça em Áreas de Cana-de-Açúcar em MS, Dourados, 2009.

Workshop Química analítica e legislação: contexto e demandas, Dourados, 2009.

XVI Encontro Centro-Oeste de Debates sobre o Ensino de Química, Itumbiara, 2009.

60ª Reunião Anual da Sociedade para o Progresso da Ciência, Campinas, 2008.

I Semana Integrada de Química UEMS-UFGD, Dourados, 2008.

IV Encontro Bienal de Física da UEMS, Dourados, 2008.

Programa Diálogos Universitários, Dourados, 2008.

12º Congresso Universitário DCE/UEMS, Dourados, 2007.

XV Encontro Centro-Oeste de Debates sobre Ensino de Química e III Semana de Química, Dourados, 2007.

IV Semana de Matemática: Aspectos Teóricos e Aplicados, Dourados, 2006.

6 ORIENTAÇÕES

Victor Hugo Romeiro Azevedo. Desenvolvimento de eletrodo de carbono impresso modificado com nanofibras de carbono para determinação de cobre em bioetanol. Iniciação científica. Instituto de Química/UNESP, Programa de Iniciação Científica Sem Bolsa da UNESP – ICSB, 2016-2017.

Gustavo Murilo Alves. Determinação de ferro em bioetanol combustível utilizando eletrodo de pasta de grafite modificado com pectina. Iniciação científica Júnior. Instituto de Química/UNESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Júnior, Processo 3592).

Victor Hugo Romeiro Azevedo. Desenvolvimento de detector nanoestruturado de óxido metálico em nanofibras de carbono para detecção eletroquímica de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando análise por injeção em fluxo. Iniciação científica. Instituto de Química/UNESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 160604/2015-0).

Gustavo Murilo Alves. Determinação de cobre em bioetanol combustível utilizando eletrodo de pasta de grafite modificado com pectina. 2016. Iniciação científica Júnior. Instituto de Química/UNESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Júnior, Processo 3110).

Flávia Camilo Unterman Santos. Desenvolvimento de sensor para determinação de açúcares redutores totais baseado em eletrodo quimicamente modificado com grafeno contendo nanopartículas de cobre. 2015. Iniciação científica. Instituto de Química/UNESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2013/22846-9).

Dedico este trabalho,

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

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

A todos que confiaram em mim, meus sinceros agradecimentos.

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

RESUMO

A vinhaça de cana-de-açúcar é um coproduto gerado a partir da produção de etanol através da fermentação de carboidratos por leveduras em indústrias de álcool e açúcar, com alto poder poluente (cerca de cem vezes maior do que o esgoto doméstico) e requer alta demanda química de oxigênio. Estima-se que a produção de vinhaça de cana-de-açúcar no Brasil seja entre 265,1 e 370,3 bilhões de litros na safra 2017/2018. O desenvolvimento de métodos para determinação da composição química da vinhaça é de extrema importância para agregar maior valorização a esse coproduto industrial. Com o intuito de avaliar novos processos de aplicação, produção ou extração de aminoácidos a partir da vinhaça, é de fundamental importância a caracterização precisa da composição química desse coproduto. Neste trabalho, foram investigados detectores nanoestruturados de óxido de grafeno reduzido (RGO) contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata para detecção e determinação de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com detecção eletroquímica. Os eletrodos modificados construídos foram caracterizados por voltametria cíclica (CV), espectroscopias de impedância eletroquímica (EIS), fotoemissão de raios X (XPS), Raman e energia dispersiva de raios X (EDX), e microscopias eletrônica de varredura de alta resolução (SEM) e eletrônica de transmissão (TEM). A oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos em meio alcalino foi estudada por CV com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Os resultados mostraram que os aminoácidos estudados não foram oxidados na superfície modificada com RGO. No entanto, os analitos foram oxidados irreversivelmente nas superfícies dos eletrodos modificados com RGO contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata. As separações cromatográficas foram realizadas empregando uma coluna de troca-iônica acoplada com uma pré-coluna e eluição isocrática. Foram avaliados os efeitos do hidróxido, acetato de sódio e água como fase móvel. As separações dos aminoácidos foram completas dentro de 30 min. As respostas dos métodos desenvolvidos melhoraram devido à aplicação de RGO e nanopartículas de óxidos metálicos como modificadores de eletrodo. Os parâmetros analíticos do método desenvolvido foram avaliados. As soluções foram preparadas com concentrações na gama de 1,0×10⁻⁸ a 1,0×10⁻³ mol L⁻¹. Sob as condições cromatográficas otimizadas, os métodos desenvolvidos utilizando os eletrodos modificados apresentaram uma relação linear com as concentrações dos aminoácidos em duas ordens de grandeza com limites de detecção inferiores a 2,0×10⁻⁵ mol L⁻¹, sensibilidades maiores do que 3,3×10⁵ nA mol⁻¹ L e excelente coeficiente de correlação ≥ 0,9991. Os métodos analíticos propostos utilizando eletrodos modificados com RGO contendo NiNPs e CuNPs foram aplicados na detecção de aminoácidos em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar com recuperações variando de 95 ± 5 a 102 ± 3 %. A estabilidade e a repetibilidade dos eletrodos modificados foram investigadas. A excelente estabilidade a longo prazo e a repetibilidade dos eletrodos construídos os tornam atraentes como detectores eletroquímicos. Os resultados mostraram que os detectores desenvolvidos podem ser empregados para detecção e quantificação de aminoácidos, livre de interferentes e com precisão em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar.

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

- Figura 15 – Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de RGO e NiNPs sobre a superfície do GCE em meio de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo..... 73
- Figura 16 – Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de RGO e NiNPs sobre a superfície do GCE em meio de Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo. Inserido: Ampliações das curvas a e b. 73
- Figura 17 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas simultaneamente com RGO em meio de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por CV sobre a superfície do GCE em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo..... 74
- Figura 18 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas simultaneamente com RGO em meio de Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ por CV sobre a superfície do GCE em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo..... 75
- Figura 19 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por CV em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (curva a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b), $2,0 \times 10^{-3}$ (c), $3,0 \times 10^{-3}$ (d), $4,0 \times 10^{-3}$ (e), $5,0 \times 10^{-3}$ (f) e $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (g) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 75
- Figura 20 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ por CV em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (curva a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b), $2,0 \times 10^{-3}$ (c), $3,0 \times 10^{-3}$ (d), $4,0 \times 10^{-3}$ (e), e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (f) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 76
- Figura 21 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs em RGO sobre a superfície do GCE modificado em duas etapas por amperometria em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo.... 78

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

Figura 32 – Voltamogramas cíclicos de nitrato de prata $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de (a) nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, (b) ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e (c) nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1} + \text{ácido nítrico } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}	99
Figura 33 – Voltamogramas cíclicos do RGO/GCE contendo AgNPs em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	101
Figura 34 – Otimização da eletrodeposição das nanopartículas de prata sobre a superfície do RGO/GCE ($n=3$). Curvas da resposta electrocatalítica de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição, (C) composição do eletrólito suporte contendo ácido nítrico (-■-) e nitrato de sódio (-●-), e (D) concentração de nitrato de prata (C_{AgNO_3}).	103
Figura 35 – (A) Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das AgNPs sobre a superfície RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º ciclo, (b) 3º ciclo, (c) 5º ciclo, (d) 10º ciclo, (e) 13º ciclo e (f) 15º ciclo no intervalo de potencial de 0,40 a 0,90 V. (B) 15º voltamograma ciclo da oxidação das AgNPs.....	105
Figura 36 – Voltamograma cíclico do estudo de velocidade de varredura no intervalo de 10 a 700 mV s^{-1} do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	106
Figura 37 – Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$) nas correntes de picos anódicos e catódicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	107
Figura 38 – Correlação correspondente do potencial de pico (E_{A4}) em função do logaritmo da velocidade de varredura ($\text{Log } v$) em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$	109
Figura 39 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e AgNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas azul (a) e preta (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais (A). (B) Circuito electroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de IES.....	110
Figura 40 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE e (C) AgNPs-RGO/GCE. Histograma da distribuição das AgNPs na superfície do RGO/GCE (D).....	111

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

- Figura 50 – (A) Amperogramas obtidos para adições sucessivas de alanina (a) e glicina (b) em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação utilizando o AgNPs-RGO/GCE com potencial de detecção de $0,90 \text{ V}$. (B) Inserido: Curvas analíticas de alanina (a) e glicina (b) obtidas a partir dos amperogramas (A)... 123
- Figura 51 – (A) Voltamograma cíclico de uma solução de sulfato de níquel $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . (B) Inserido: Ampliação do voltamograma..... 132
- Figura 52 – Otimização da eletrodeposição das NiNPs na superfície do RGO/GCE ($n=3$). Curvas do excesso superficial (Γ , -■-) e as respostas eletrocatalíticas (ΔI , -●-) das modificações na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição e (C) concentração de sulfato de níquel (C_{NiSO_4}). 134
- Figura 53 – Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando um NiNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 135
- Figura 54 – Voltamograma cíclico do NiNPs-RGO/GCE em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} 137
- Figura 55 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da passivação do NiNPs-RGO/GCE em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 15º Ciclo; (f) 20º Ciclo; (g) 25º Ciclo; e (h) 30º Ciclo. 138
- Figura 56 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e NiNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas vermelha (a) e preta (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais. (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de IES. 140
- Figura 57 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE, RGO/GCE modificado com nanopartículas metálicas (NiMNPs) de níquel em (D) baixa e (E) alta resolução, e RGO/GCE modificado com nanopartículas de níquel oxidadas (NiNPs) em (F) baixa e (G) alta resolução. 141
- Figura 58 – Histogramas apresentando as destruições das (A) NiMNPs e (B) NiNPs sobre a superfície do RGO/GCE..... 142

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

Figura 71 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:100 com água ultrapura. Picos: alanina (1), glicina (2) e leucina (3).	160
Figura 72 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:10 com água ultrapura. Pico: ácido aspártico (1).	161
Figura 73 – Voltamograma cíclico de uma solução de sulfato de cobre $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}	16969
Figura 74 – Otimização da eletrodeposição das CuNPs na superfície do RGO/GCE (n=3). Curvas do excesso superficial (Γ , -■-) e das respostas eletrocatalíticas (ΔI , -●-) das modificações na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição e (C) concentração de sulfato de cobre (C_{CuSO_4}).	171
Figura 75 – Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o CuNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	172
Figura 76 – Voltamograma cíclico do CuNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}	174
Figura 77 - Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das nanopartículas de cobre na superfície do RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	175
Figura 78 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e CuNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas preta (a) e vermelha (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais. (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de EIS.	176
Figura 79 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE e (C) CuNPs-RGO/GCE. Histograma da distribuição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE (D).	177
Figura 80 – Espectros de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo CuNPs.	178
Figura 81 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo CuNPs.	179
Figura 82 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Cu 2p ³ com suas deconvoluções para o CuNPs-RGO/GCE.	180

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ESQUEMAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

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

α_s	Coeficiente de transferência eletrônica
Γ	Excesso superficial
ΔE_p	Potencial de separação entre os picos anódico e catódico
ΔI	Diferença da corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco
v	Velocidade de varredura
$v^{0,5}$	Raiz quadrada da velocidade de varredura

SUMÁRIO

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

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

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

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

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

1.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

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

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

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

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

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

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

1.2.1 Determinação cromatográfica de aminoácidos com detecção eletroquímica

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

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

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

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

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

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

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

1.3 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE AMINOÁCIDOS

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

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

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

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

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

1.4 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO E DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

1.4.1 Eletrodos não modificados

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

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

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

β -Alanina apresenta um pico de oxidação irreversível em $+1,2 \text{ V}$ na superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo tetrafluoroborato de tetrametilamônio (NBu_4BF_4) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) (35). Utilizando as mesmas condições, α -alanina apresenta um pico de oxidação irreversível em $1,23 \text{ V}$; não foram observados picos catódicos (36).

O ácido aspártico apresenta um pico anódico irreversível em $+1,3 \text{ V}$ na superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo NBu_4BF_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando CV (37). Em um estudo posterior, foi observado um pico de oxidação em $1,0 \text{ V}$ na varredura anódica e um pico de redução em $-0,54 \text{ V}$ na varredura reversa utilizando em meio de tampão fosfato $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,8) (38).

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

O ácido glutâmico apresenta um pico anódico irreversível em $+1,4 \text{ V}$ referente à oxidação do grupo amino na superfície do GCE em solução de acetonitrila contendo NBu_4BF_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando CV (41). Em meio tampão fosfato (pH 7,0), o ácido glutâmico apresenta um pico de oxidação em $+1,50 \text{ V}$ com velocidade de varredura em 100 mV s^{-1} (42).

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

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

1.4.2 Eletrodos quimicamente modificados

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

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

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

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

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

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

1.4.2.1 Eletrodos quimicamente modificados com grafeno

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

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

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

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

1.4.2.2 Eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas metálicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Triptofano e tirosina foram determinadas por DPV através um GCE modificado com filme nanocompósito de Nafion/óxido de titânio (II)-grafeno (GCE/TiO₂-GR/Nafion). Triptofano em solução tampão fosfato apresentou picos de oxidação em +0,96 V (GCE), +0,87 V (GCE/GR/Nafion) e +0,79 V (GCE/TiO₂-GR/Nafion). O método utilizando DPV apresentou uma faixa linear de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, sensibilidade de 75,9 μA mmol⁻¹ L e LOD de $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (68).

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

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver detectores nanoestruturados de óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata para detecção e determinação de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção eletroquímica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Preparar eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata.

Caracterizar através de espectroscópica e microscópica os eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxidos metálicos níquel, cobre e prata.

Estudar o comportamento eletroquímico dos aminoácidos em eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata.

Desenvolver metodologias analíticas para detecção de aminoácidos utilizando eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata como detector amperométrico acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência.

Determinar aminoácidos em amostras de vinhaça de cana-de-açúcar utilizando os eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxidos metálicos de níquel, cobre e prata como detector amperométrico acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência.

CAPÍTULO III. MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO

3.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o grafeno (GR) tem atraído a atenção científica, tecnológica e comercial devido à sua estrutura molecular única, que apresenta uma monocamada rigorosamente bidimensional de átomos de carbono em espessura, interligados por ligações químicas do tipo sp^2 altamente conjugada (69–72). Consequentemente, o GR apresenta propriedades químicas e físicas excepcionais, tais como grande área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), maior condutividade elétrica conhecida a temperatura ambiente (6000 S m^{-1}), excelente resistência mecânica (módulo de Young de $\sim 1 \text{ TPa}$ e força máxima de 130 GPa , aproximadamente duas ordens de magnitude maior do que o aço) e flexibilidade, mobilidade superior de elétrons ($25\,000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), forte efeito de campo elétrico ambipolar, alta transparência, excelente condutividade térmica ($\sim 5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), alta estabilidade térmica e química (69,73–75).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), o GR é definido como uma única camada de carbono da estrutura de grafite, descrevendo sua natureza por analogia com um hidrocarboneto aromático policíclico de tamanho quase infinito (73,76). No entanto, é importante notar que a definição de GR não é adotada estritamente na literatura. Esse termo inclui uma ampla gama de estruturas de grafite que consistem em uma ou mais camadas de GR e grande quantidade de defeitos de carbono com hibridização sp^3 ou buracos físicos na estrutura que diferem devido aos diferentes métodos de preparação e consequentemente, na estrutura química (geralmente o nível de oxidação), forma, tamanho e número de camadas (73,75). Portanto, no presente estudo, será adotada essa tendência de referir a todos os materiais relacionados ao grafeno prístino (sem defeitos) como GR ao discutir os materiais.

Há vários métodos de preparação de grafeno, cada um com características específicas de dimensões, forma, quantidade e qualidade, os quais devem ser cuidadosamente selecionados de acordo com o objetivo e mecanismo de detecção específicos a serem utilizados, com uma consideração equilibrada sobre os desempenhos (por exemplo, LOD e faixa linear), reprodutibilidade, custo e fabricação (69,75). De um modo geral, esses métodos

podem ser classificados como esfoliação, decomposição térmica, deposição química de vapor, abertura de nanotubos de carbono, redução térmica e oxidação-redução, entre outros (69).

Entre estes métodos, a redução química do óxido de grafeno (GO, do inglês *Graphene Oxide*) obtida a partir de esfoliação ultrassônica de grafite oxidada é a maneira mais barata de produzir grandes quantidades de folhas de grafeno (77). No entanto, é bastante difícil produzir GR relativamente puro, pois os produtos químicos envolvidos no método de preparação do GR são tóxicos e limitam a sua aplicação (78).

O GO é uma substância que consiste em uma única camada polimerizada de átomos de carbono cuidadosamente embalada em uma rede bidimensional em forma de favo de mel derivada do GR (79,80), cujos planos basais e bordas são abundantes com vários grupos contendo oxigênio, tais como epóxi, carboxilas e hidroxilas (81). Esses grupos oxigenados não só podem atuar como centros ativos catalíticos no processo eletroquímico, mas também oferecem locais de ancoragem para a funcionalização covalente ou não covalente (73). O GO não só possui as propriedades mencionadas para o GR, mas também possui algumas outras propriedades diferentes de GR, como uma maior hidrofiliabilidade devido a seus abundantes grupos funcionais contendo oxigênio, múltiplas porções de oxigênio e propriedades eletrônicas controláveis (80,81). Todavia, a principal limitação do uso de GO é a formação de defeitos estruturais e buracos que perturbam a rede sp^2 e pioram drasticamente as propriedades eletrônicas, conseqüentemente, o GO possui a tendência de isolar devido à interrupção das redes de ligação sp^2 (73,75).

Recentemente, a redução eletroquímica de GO para GO reduzido (RGO, do inglês *Reduced Graphene Oxide*) tem atraído grande atenção devido à sua natureza simples, rápida, barata, verde e não tóxica (77,78,82). Este procedimento é um tratamento de desoxigenação requerido para recuperar as propriedades originais e atingir materiais que se assemelham, até certo ponto, ao GR prístino (73,83). É importante notar que esses procedimentos de redução eletroquímica não podem remover completamente os grupos funcionais de oxigênio de GO (83). Embora os materiais de GR eletroquimicamente reduzidos exibam características melhores do que o GO, ele permanece mais baixo do que o GR prístino devido à presença de grupos funcionais oxigenados residuais e à alta densidade de defeitos ou buracos irreversíveis criados durante a oxidação do grafite (75,83). Nesse sentido, o RGO reúne características de GR e GO e pode levar a materiais com condutividade razoavelmente boa, estabilidade térmica e processabilidade (75).

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver um método de redução eletroquímica de óxido de grafeno em superfície de eletrodo de carbono vítreo para ser empregado como substrato de nanopartículas de óxido metálicos eletrodepositadas.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas nos experimentos eletroquímicos foram preparadas com reagentes de alto grau de pureza analítica e água deionizada ultrapura (MILLI-Q). Óxido de grafeno (GO, 4 mg mL⁻¹), sulfato de níquel (II) hexahidratado (NiSO₄.6H₂O, 99%), glicina (C₂H₅NO₂, ≥ 99%), hidróxido de sódio (NaOH, ≥ 98%) e sulfato de sódio (Na₂SO₄, ≥ 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, ácido nítrico (HNO₃, ≥ 65%) da Merck, fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄, 99,0%) e fosfato de potássio bibásico anidro (K₂HPO₄, 98,0%) da Synth.

3.2.2 Instrumentação

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato PGSTAT-30 AUTOLAB utilizando uma célula eletroquímica convencional de 25 mL contendo três eletrodos controlados pelo software Nova 1.11. O eletrodo de referência utilizado foi o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl, KCl 3,0 mol L⁻¹), e o eletrodo auxiliar de um fio de platina (0,3 mm × 4,0 cm). O eletrodo de trabalho foi preparado com a modificação de um GCE com diâmetro de 3,0 mm (área aproximadamente igual a 0,07 cm²).

As suspensões de GO foram submetidas ao ultrassônico (Eco-Sonics, modelo Q3.0/25A com frequência de 25 kHz).

A caracterização morfológica dos eletrodos modificados foram realizadas utilizando substratos de carbono vítreo com área recoberta de 0,07 cm². Foi realizada microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) para caracterização morfológica da superfície dos eletrodos modificados. Nas análises, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG) da marca Jeol, modelo JSM 7500F acoplado a um módulo de espectroscopia de energia dispersiva de raio X (EDX, do inglês *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*), Thermo Scientific, modelo NORAN System 7.

Os espectros de Raman foram obtidos num LabRAM RH espectrômetro confocal de microscopia RAMAN (Horiba Jobin Yvon S.A.S.) empregando um feixe de laser de 632,8 nm, sendo a posição do sinal calibrada com silicose.

Foram realizadas análises de espectroscopia de fotoemissão de raios X (XPS, do inglês *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) utilizando-se um espectrômetro comercial UNI-SPECS UHV System com pressão menor que 5×10^{-7} Pa. A linha Mg K α foi utilizada ($h\nu = 1253,6$ eV) como fonte de ionização, e a energia de passagem do analisador foi ajustada para 10 eV. O ruído inelástico dos espectros de alta resolução C 1s e O 1s foi subtraído utilizando o método de Shirley. A composição em porcentagem atômica da camada da superficial (<5 nm) foi determinada pelas proporções relativas das áreas dos espectros corrigidas pelos fatores de sensibilidade atômica de Scofield, com uma precisão de $\pm 5\%$. A escala da energia de ligação dos espectros foi corrigida usando a componente de hidrocarbonetos fixa em 285,0 eV. Os espectros foram deconvoluídos utilizando função do tipo Voigtiana, com combinações Gaussianas (70%) e Lorentzianas (30%). A largura à meia altura variou entre 1,2 e 2,1 eV, e a posição dos picos foi determinada com uma precisão de $\pm 0,1$ eV.

3.2.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo

O GCE foi imerso em ácido nítrico 20% por 5 min. Posteriormente, a superfície do GCE foi polida em uma suspensão de pó de alumina 0,3 μm e lavada abundantemente com água ultrapura.

3.2.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente

3.2.4.1 Método 1

Uma suspensão de GO 1,0 mg L $^{-1}$ foi preparada em água utilizando ultrassom durante 4 h. Antes de ser utilizada, a suspensão foi homogeneizada por 30 minutos em ultrassom. Em seguida, 5,0 μL de GO 1,0 mg L $^{-1}$ foram depositados sobre a superfície do GCE e esperando-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, o eletrodo modificado com GO foi imerso em uma solução de Na $_2$ SO $_4$ 0,10 mol L $^{-1}$ e foi aplicado potencial de -1,5 V por 500 s utilizando amperometria para reduzir o GO eletroquimicamente (84).

Em seguida, NiNPs foram eletrodepositadas sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido (RGO) através uma solução de NiSO $_4$ $5,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L $^{-1}$ (pH 6,5), aplicando potencial de -1,5 V por 30 s empregando amperometria. As

NiNPs foram oxidadas em uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de 0,10 a 0,70 V a 100 mV s⁻¹ durante 30 ciclos utilizando CV.

3.2.4.2 Método 2

GCEs foram modificados com GO de acordo com o método amperométrico 1 (*Seção 3.2.4.1*). Posteriormente, os eletrodos modificados com GO foram imersos em uma solução de Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ contendo NiSO₄ 5,0×10⁻³ mol L⁻¹ e foram aplicados potenciais de -1,1 V por 210 s e -1,5 V por 500 s utilizando a amperometria para reduzir o GO eletroquimicamente (84) e eletrodepositar simultaneamente as NiNPs. Em seguida, os eletrodos modificados foram imersos em uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ e foram aplicados potenciais no intervalo de 0,10 a 0,70 V a 100 mV s⁻¹ durante 30 ciclos utilizando CV para oxidar as NiNPs.

3.2.4.3 Método 3

Suspensões de GO 0,50 mg L⁻¹ foram preparadas em água e dispersas usando ultrassom por 4 h. Em seguida, 5,0 µL de GO 0,50 mg L⁻¹ foram depositados sobre a superfície do GCE e esperando-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, o GCE modificado com GO foi submetido à redução eletroquímica em Na₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de -0,20 a -1,6 V a 50 mV s⁻¹ por 40 ciclos utilizando CV (85).

As NiNPs foram eletrodepositadas sobre as superfícies dos GCEs com GO reduzido (GCE/RGO) através de uma solução de NiSO₄ 5,0×10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 6,5), aplicando potencial de -1,0 V por 30, 50 e 100 s através da amperometria. Em seguida, o eletrodo modificado foi imerso em uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de 0,10 a 0,70 V a 100 mV s⁻¹ durante 30 ciclos utilizando CV para oxidar as NiNPs.

3.2.4.4 Método 4

GO 1,0 mg L⁻¹ foi preparado de acordo com metodologia da *Seção 3.2.4.3*. Em seguida, suspensões contendo GO 0,50 mg L⁻¹ e NiSO₄ 5,0×10⁻³ mol L⁻¹ foram preparadas em meio de Na₂SO₄ 0,10 e 0,50 mol L⁻¹. As NiNPs e RGO foram eletrodepositados simultaneamente sobre a superfície de GCE através da técnica de CV aplicando potencial de -0,20 a -1,6 V a 50 mV s⁻¹ por 20 ciclos (85). As NiNPs foram oxidadas em NaOH 0,10 mol

L⁻¹ aplicando potenciais de 0,10 a 0,70 V a 100 mV s⁻¹ por 30 ciclos empregando a técnica de CV.

3.2.4.5 Método 5

Uma suspensão de GO 1,0 mg L⁻¹ foi preparada em água, dispersa através de ultrassom por 4 h e foi diluída a 0,50 mg L⁻¹ em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹. Em seguida, GCE foi imerso nessa suspensão e foi aplicado potencial de -1,5 V por 500 s utilizando a amperometria. O eletrodo modificado com RGO (RGO/GCE) foi lavado e esperando-se secar à temperatura ambiente.

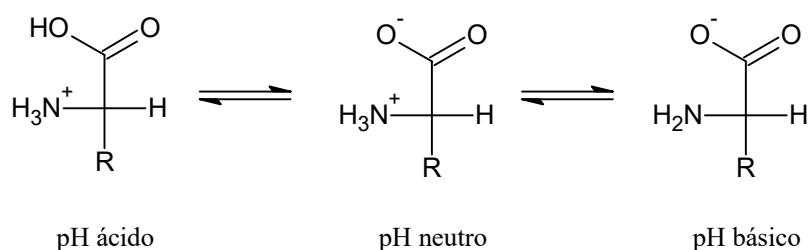
Posteriormente, NiNPs foram eletrodepositadas sobre a superfície do RGO/GCE a partir de uma solução de NiSO₄ 2,0×10⁻² mol L⁻¹ em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ aplicando potencial de -1,3 V por 120 s utilizando a amperometria. E as NiNPs foram oxidadas em NaOH 0,10 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de 0,10 a 0,70 V a 100 mV s⁻¹ por 30 ciclos utilizando CV.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Comportamento eletroquímico dos aminoácidos em eletrodo de carbono vítreo

Os grupos amino e carboxila dos aminoácidos, juntamente com os grupos laterais (R) ionizáveis de alguns aminoácidos, funcionam como bases e ácidos fracos. Quando um aminoácido sem um grupo R ionizável é dissolvido em água em pH neutro, ele passa a existir em solução como um íon dipolar (zwitterion), o qual pode atuar tanto como um ácido quanto como uma base (anfótero) (86).

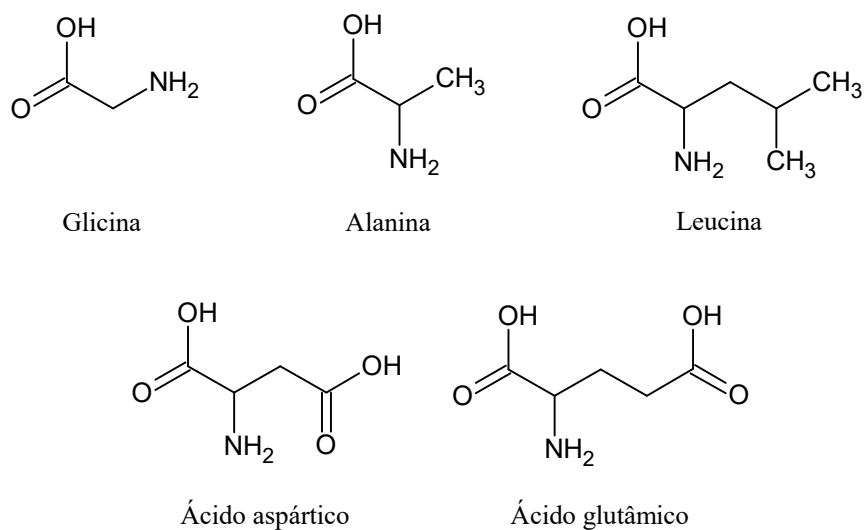
O comportamento anfótero dos aminoácidos é ditado pelo pH da solução, ou seja, os grupos α -carboxílicos ($pK \cong 2,2$) e α -amino ($pK \cong 9,4$) encontram-se quase completamente em suas formas protonadas em pH 3,5; e estes dois grupos estão quase completamente em suas formas desprotonados em pH acima de 8,0, Esquema 1 (87).



Esquema 1 – Forma predominante dos aminoácidos em diferentes meios.

Os aminoácidos alanina, leucina e glicina não possuem cadeias laterais ionizáveis. Os aminoácidos aspártico e glutâmico têm um grupo carboxílico ionizável nas cadeias laterais, no entanto, em solução alcalina encontram-se na forma não ionizada. As estruturas destes aminoácidos são apresentados no Esquema 2.

O comportamento eletroquímico dos aminoácidos aspártico, glutâmico, alanina, glicina e leucina foi investigado sobre a superfície do GCE com CV no intervalo de potencial entre -1,50 e 1,50 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ em solução alcalina de NaOH 0,10 mol L⁻¹. Os voltamogramas cíclicos resultantes do estudo são apresentados na Figuras 1. Nos voltamogramas cíclicos dos aminoácidos em solução alcalina (pH \cong 13,5), não foram observados picos de oxidação ou redução no intervalo de potencial estudado na superfície do GCE sem modificação. Portanto, é necessária a modificação do GCE com matérias que promovam a oxidação ou redução dos aminoácidos em sua superfície.



Esquema 2 – Estrutura molecular dos aminoácidos.

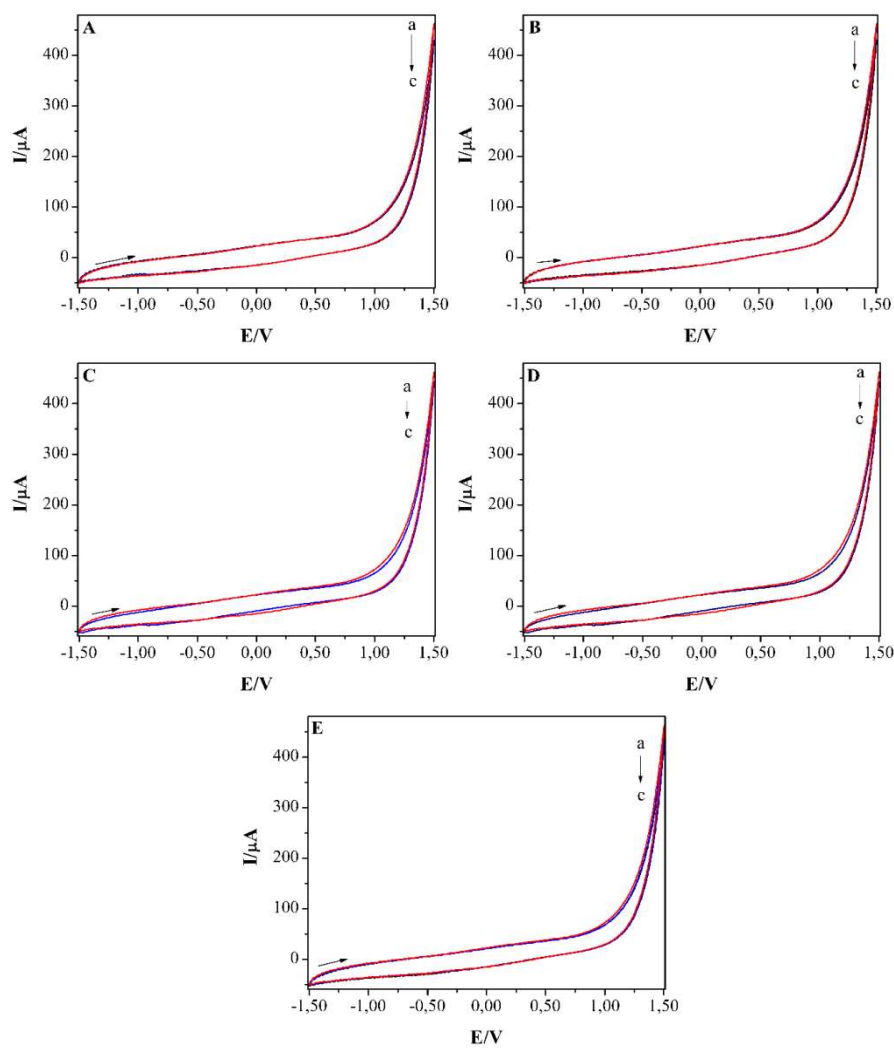


Figura 1 – Voltamogramas cíclicos do GCE em soluções de NaOH 0,10 mol L⁻¹ na ausência (a; curva vermelha) e presença de aminoácidos 1,0×10⁻³ (b; curva preta) e 1,5×10⁻² mol L⁻¹ (c; curva azul) com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

3.3.2 Comportamento eletroquímico do óxido de grafeno

Inicialmente, foi investigada a eletrorredução de GO por CV no intervalo de potencial de -0,20 a -1,6 V em solução de sulfato de sódio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, Figura 2. Na realização do experimento, uma alíquota de $5,0 \mu\text{L}$ de uma suspensão $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO em água ultrapura foi aplicada na superfície do GCE e esperando-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, o GCE contendo GO foi imerso na solução de Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ e a medida voltamétrica foi realizada (85).

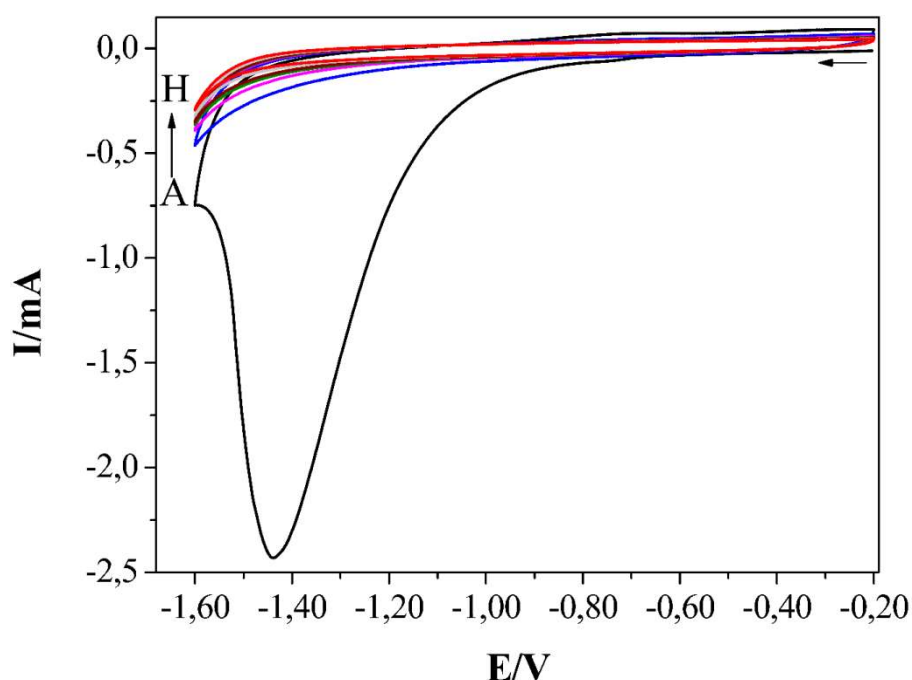


Figura 2 – Voltamogramas cíclicos do óxido de grafeno $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. (A) 1º Ciclo; (B) 2º Ciclo; (C) 3º Ciclo; (D) 4º Ciclo; (E) 5º Ciclo; (F) 10º Ciclo; (G) 20º Ciclo; (H) Sulfato de sódio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Condições: velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

No primeiro voltamograma do GO, foi observado um pico catódico em -1,43 V com potencial inicial de redução do GO iniciando-se em -0,60 V, Figura 2 (curva A). O pico observado é atribuído à redução dos grupos funcionais presentes nas folhas de grafeno, tais como éteres, epóxidos, ésteres, aldeído, ácidos carboxílicos, álcoois e fenóis (82,85,88).

A partir do segundo ciclo voltamétrico, não se observou mais o pico catódico da redução do GO, Fig. 2 (B) - (G). Este resultado indica que o GO foi reduzido de forma irreversível na superfície do GCE e a reação de redução é rápida. Com base nestes resultados, foram realizados os estudos de eletrodeposição do GO na superfície do GCE por amperometria e CV.

3.3.3 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente

Afim de investigar a eletro-oxidação dos aminoácidos na superfície do GCE modificado com GO reduzido (RGO/GCE), um GCE foi modificado de acordo com a *Seção 3.3.2*. Em seguida, voltamogramas cíclicos dos aminoácidos com concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em NaOH 0,10 mol L⁻¹ foram realizados no intervalo de potencial de -1,5 a 1,5 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ utilizando o eletrodo modificado, Figura 3.

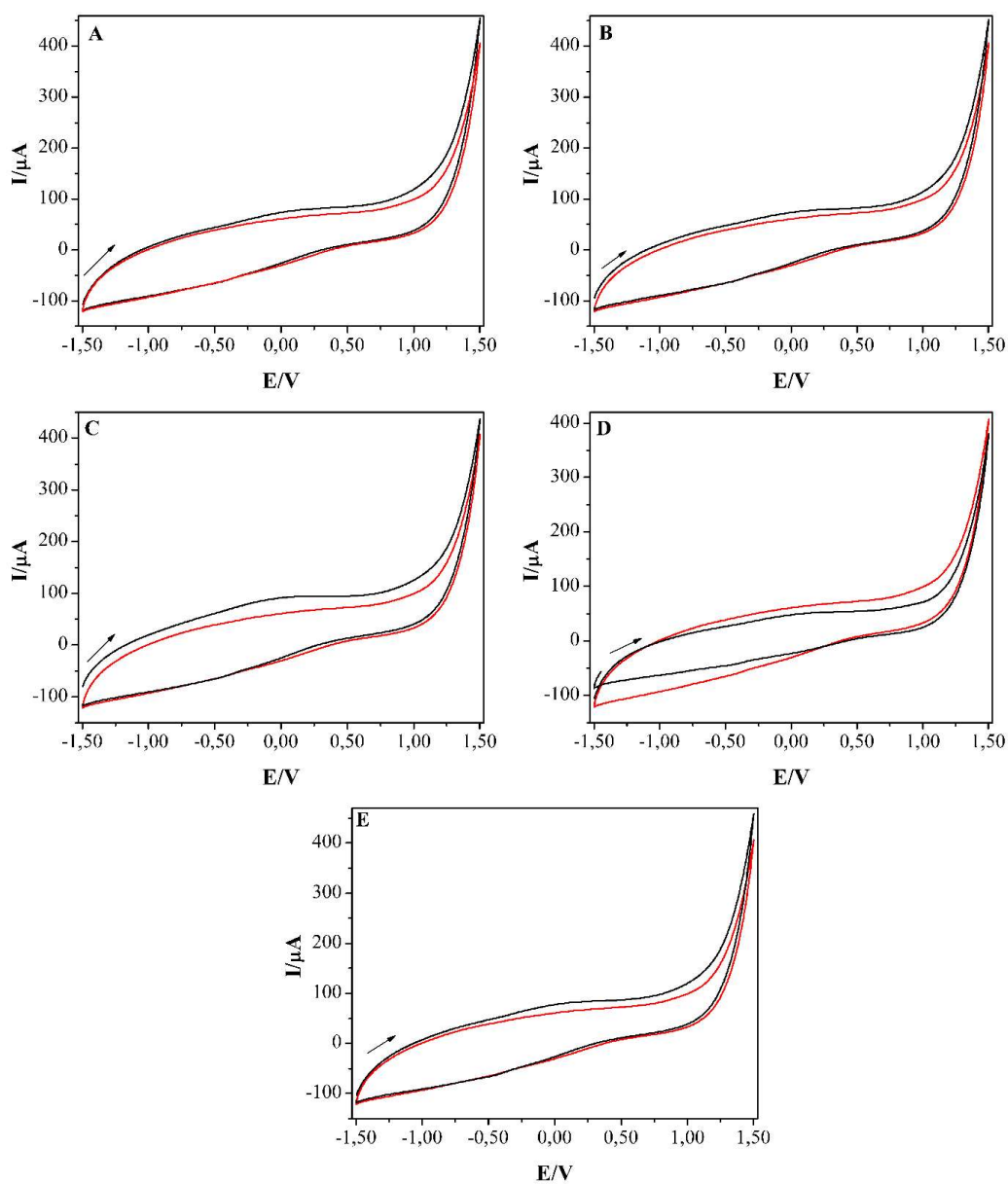


Figura 3 – Comportamento eletroquímico dos aminoácidos ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E) nas concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (curva pretas) em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ (curva vermelhas) sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Os resultados mostram que os aminoácidos não apresentaram picos de oxidação e redução no intervalo de potencial estudado sobre a superfície do RGO/GCE em solução alcalina, Figura 3. Com base neste resultado, os eletrodos modificados com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente desenvolvidos foram modificados com nanopartículas de níquel (NiNPs) que exercem o papel de eletrocatalisador na oxidação ou redução dos aminoácidos. No entanto, cabe ressaltar que o foco principal deste capítulo é o estudo e o desenvolvimento do GCE modificado com RGO para ser utilizado como plataforma de ancoragem das nanopartículas metálicas.

3.3.3.1 Método 1

Um GCE foi modificado com GO e esperando-se secar. Em seguida, o eletrodo foi submetido à redução eletroquímica utilizando amperometria a potencial constante. Posteriormente, as NiNPs foram eletrodepositadas sobre a superfície modificada e oxidadas em solução alcalina. A Figura 4 apresenta os voltamogramas cíclicos da oxidação das NiNPs em meio alcalino com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Nos voltamogramas, podem ser observadas a formação (curva a) e a estabilização (curvas b-g) das nanopartículas.

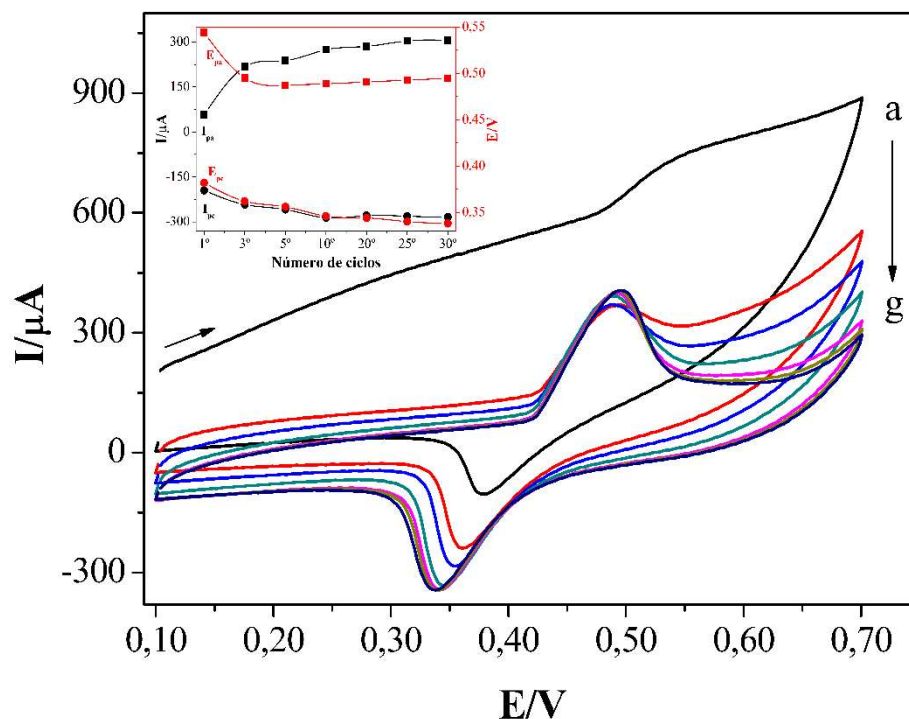


Figura 4 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente em $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potências de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

Foi estudada a oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos alanina, glicina, aspártico, leucina e glutâmico no RGO/GCE contendo NiNPs (NiNPs-RGO/GCE) utilizando a técnica de CV. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em soluções de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo aminoácidos $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de 0,20 a 0,65 V (Figura 5).

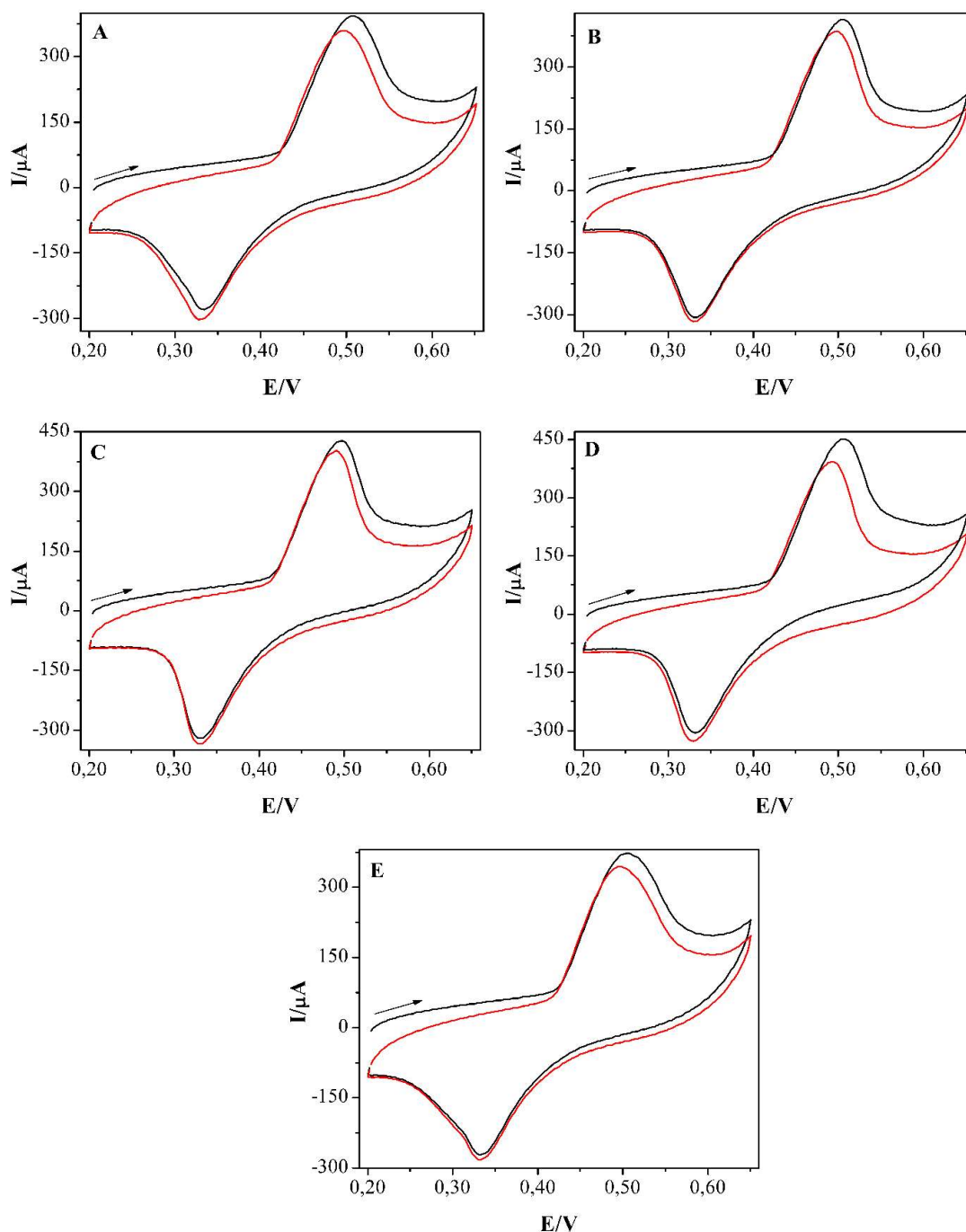


Figura 5 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE em soluções de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (curvas vermelhas) e presença de aminoácidos $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

Nos voltamogramas cíclicos do NiNPs-RGO/GCE em NaOH $0,10 \text{ mol}^{-1}$ (Branco), são observados dois picos referentes à oxidação e à redução do níquel na superfície do eletrodo modificado (Figuras 5 (A) a (E), curvas vermelhas). O primeiro pico é atribuído à oxidação de níquel (II) a níquel (III) em $0,49 \text{ V}$; e o segundo pico refere-se à redução de níquel (III) a níquel (II) em $0,38 \text{ V}$. Quando os aminoácidos $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados em solução alcalina, foi observado um pequeno ganho de corrente no pico de oxidação de níquel (II) a níquel (III) com deslocamento de potencial no sentido positivo (Figuras 5 (A) a (E), curvas pretas), o qual foi atribuído à eletrocatalise dos aminoácidos na superfície do NiNPs-RGO/GCE (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 1 (Figura 5).

Aminoácidos	E_{pa}/V	$\Delta I/\mu\text{A}^*$
Ácido aspártico	0,51	17,8
Ácido glutâmico	0,51	17,2
Alanina	0,50	11,6
Glicina	0,51	52,7
Leucina	0,51	20,7

* ΔI = Corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco

O eletrodo modificado na presença dos aminoácidos apresenta potenciais de oxidação entre $0,50$ e $0,51 \text{ V}$ com ganhos de corrente entre $11,6$ (alanina) e $52,7 \mu\text{A}$ (glicina) (Tabela 1). Os resultados apresentados indicaram que a modificação do GCE com RGO baseado neste método promoveu a eletrocatalise dos aminoácidos em meio alcalino no intervalo de potencial estudado frente ao eletrodo de carbono vítreo. No entanto, o pequeno ganho de corrente não se mostrou atrativo para a detecção dos aminoácidos. Além disso, a aderência do RGO na superfície do GCE foi baixa e a modificação era lixiviada com facilidade para o seio da solução. Portanto, este método não se mostrou eficiente para a detecção dos aminoácidos.

3.3.3.2 Método 2

GCEs foram modificados com GO e esperando-se secar à temperatura ambiente. Em seguida, os eletrodos contendo GO foram reduzidos eletroquimicamente e modificados com

nanopartículas de níquel simultaneamente aplicando potenciais de -1,1 V por 210 s e -1,5 V por 500 s utilizando amperometria, e oxidado em NaOH 0,10 mol L⁻¹ por CV.

Os voltamogramas da oxidação das NiNPs eletrodepositadas sobre as superfícies modificadas sob potencial -1,1 e -1,5 V são apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Nos voltamogramas cíclicos, pôde ser observado a oxidação das nanopartículas de níquel sobre a superfície do RGO/GCE. Ainda, pôde ser verificado que as nanopartículas foram eletrodepositadas com sucesso sobre as superfícies dos eletrodos modificados.

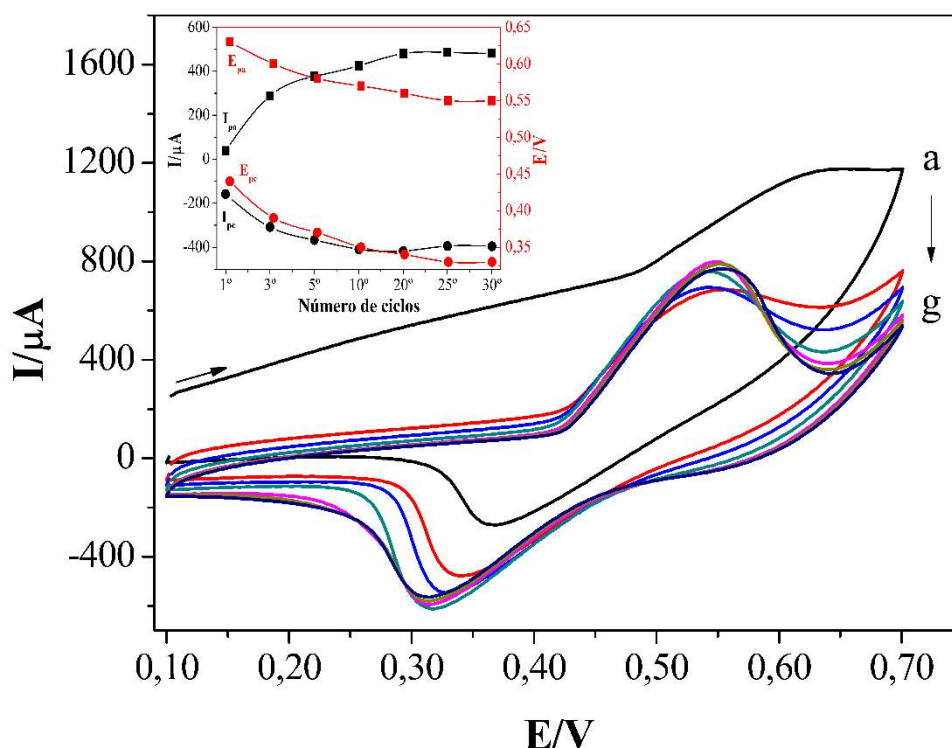


Figura 6 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente sob potencial de -1,1 V por 210 s em NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potenciais de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

A oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos foi avaliada utilizando dois eletrodos modificados por CV no intervalo de potencial de 0,20 a 0,65 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Os voltamogramas cíclicos na presença e na ausência dos aminoácidos são apresentados nas Figuras 8 e 9. As NiNPs apresentam um par de picos bem definidos com potencial de pico anódico (E_{pa}) de aproximadamente 0,52 V e potencial de pico catódico (E_{pc}) com cerca de 0,32 V no eletrodo modificado a -1,1 V por 210 s (Figura 8). Quando o eletrodo foi modificado aplicando potencial de -1,5 V por 500 s, os potenciais do par de pico foram deslocados para aproximadamente 0,54 V (E_{pa}) e 0,33 V (E_{pc}) (Figura 9).

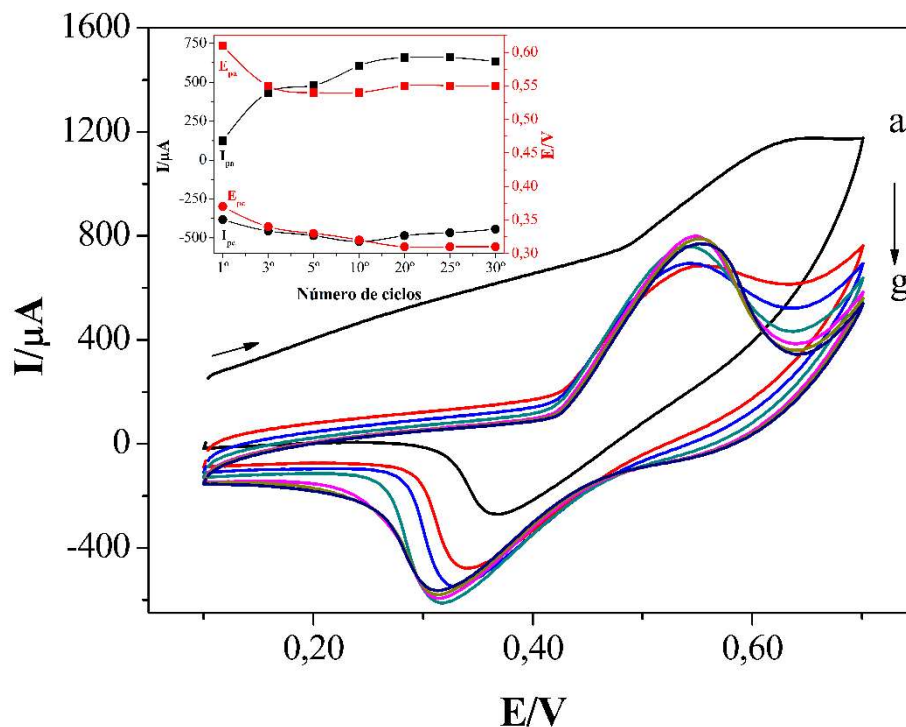


Figura 7 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente sob potencial de -1,5 V por 500 s em NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potências de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

Nos voltamogramas das Figuras 8 e 9 pode ser observado um aumento das correntes de pico anódico na presença dos aminoácidos (curvas pretas) em comparação com os voltamogramas registrados apenas em NaOH 0,10 mol L⁻¹ (curvas vermelhas). Este aumento de corrente ocorre devido à oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos sobre as nanopartículas de níquel, conforme explicação apresentada anteriormente. Os potenciais de pico anódico e as respectivas correntes anódicas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com os eletrodos modificados com o método 2 (Figuras 8 e 9).

Aminoácidos	-1,1 V por 210 s		-1,5 V por 500 s	
	E_{pa}/V	$\Delta I/\mu A^*$	E_{pa}/V	$\Delta I/\mu A^*$
Ácido aspártico	0,53	31,0	0,56	60,4
Ácido glutâmico	0,53	20,2	0,54	36,8
Alanina	0,53	54,2	0,55	40,4
Glicina	0,53	68,2	0,56	99,1
Leucina	0,53	29,1	0,54	41,3

* ΔI = Corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco.

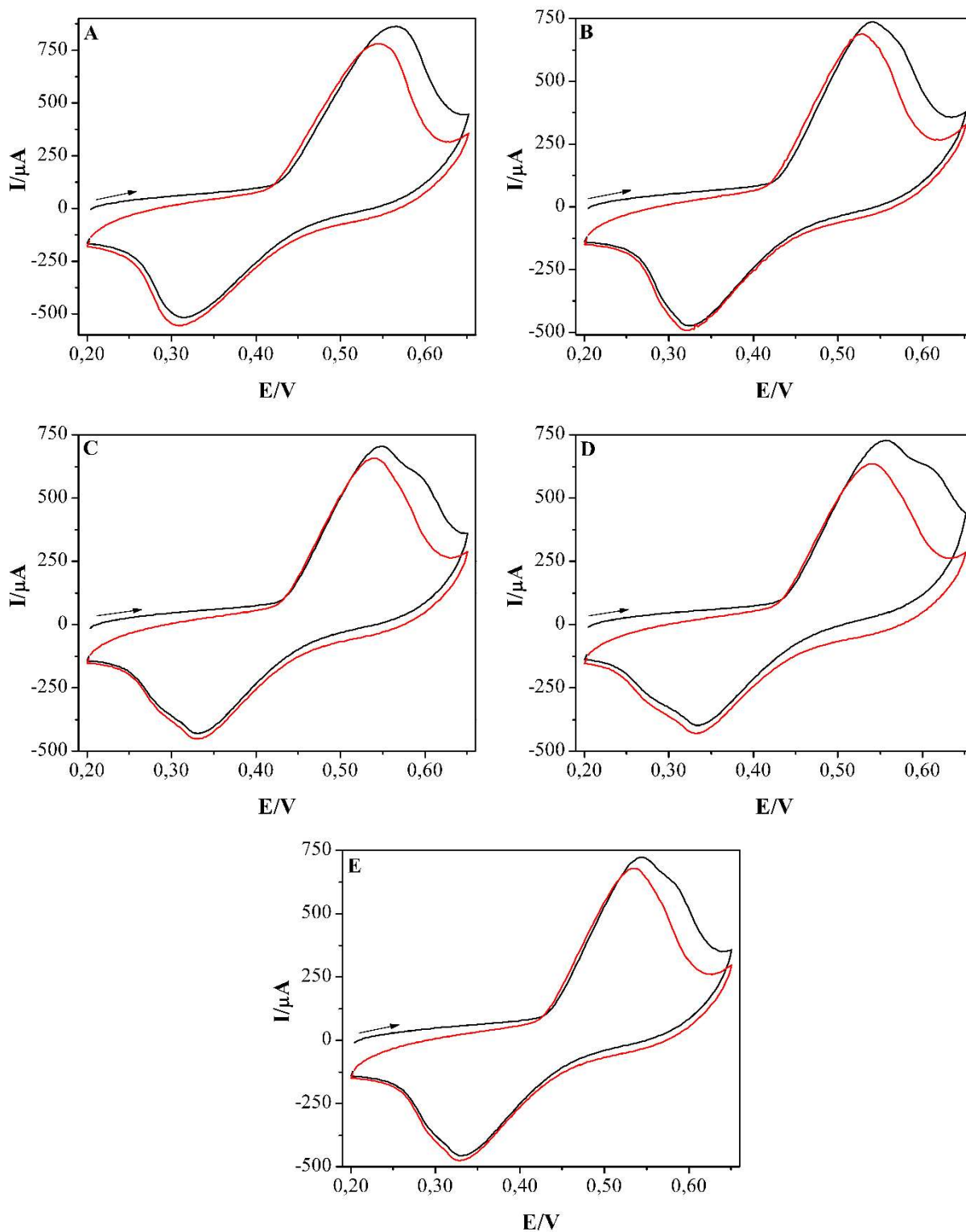


Figura 8 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,1 V por 210 s em soluções de NaOH 0,10 mol L⁻¹ (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

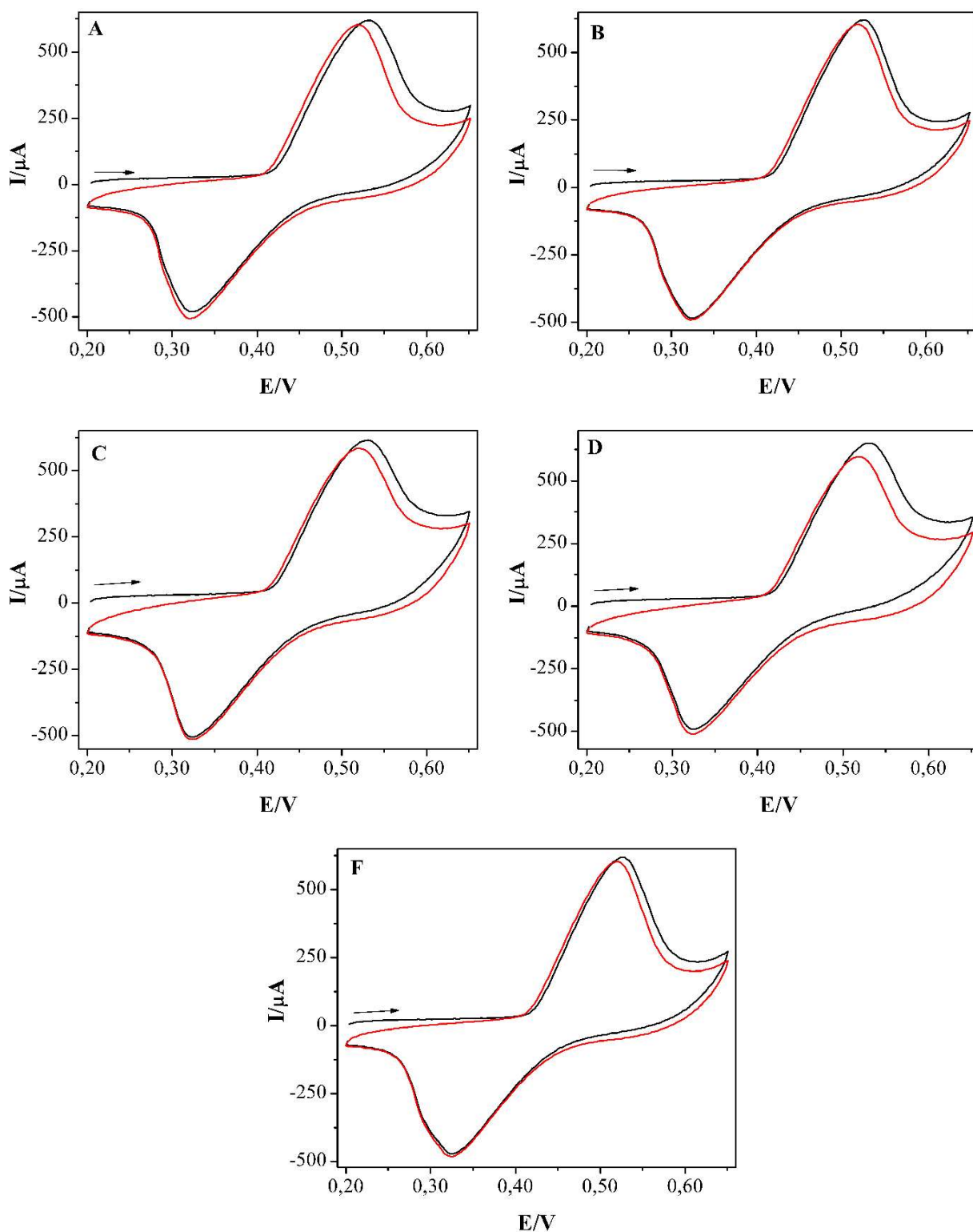


Figura 9 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de $-1,5$ V por 500 s em soluções de NaOH $0,10$ mol L^{-1} (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

Na Tabela 2, pode ser observado que os E_{pa} foram deslocados para regiões mais positivas dos voltamogramas na presença dos aminoácidos em comparação com os voltamogramas na ausência dos aminoácidos devido ao processo electrocatalítico dos aminoácidos na superfície dos eletrodos modificados. Este deslocamento de potenciais catódicos fica mais evidente entre as modificações realizadas na superfície do GCE, as quais são influenciadas pelas NiNPs formadas durante a eletrodeposição e oxidação.

As correntes de pico anódico (I_{pa}) aumentaram na presença dos aminoácidos nas duas modificações realizadas. No entanto, quando se compara as I_{pa} obtidas entre as duas modificações, observa-se que a I_{pa} da alanina diminuiu no eletrodo modificado a -1,5 V por 500 s em comparação com o eletrodo obtido a -1,1 V por 210 s. Além disso, pode ser verificado que as I_{pa} dos aminoácidos aspártico, glutâmico e glicina foram maiores na modificação a -1,5 v por 500 s.

Essas variações podem ocorrer devido ao tamanho das nanopartículas que influenciam no tamanho da área electroativa disponível para oxidação dos aminoácidos, e também devido ao grau de restauração das ligações originais do grafeno e a quantidade de defeito em sua superfície, os quais devem ser menores no eletrodo modificado a -1,5 V por 500s, resultando em uma modificação mais eficiente para oxidação dos aminoácidos. Apesar dos resultados promissores promovidos por essas modificações, nenhuma das duas modificações foi levada adiante porque se apresentavam pouco estáveis com perda dos sinais analíticos e desprendimento das modificações com facilidade da superfície do GCE.

3.3.3.3 Método 3

GCEs foram modificados com GO e esperando-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente, o eletrodo modificado com GO foi imerso em uma solução Na_2SO_4 0,50 mol L^{-1} , e o GO foi reduzido electroquimicamente por CV. Na Figura 10, são apresentados os voltamogramas cíclicos da redução electroquímica de GO no intervalo de potencial de -1,6 a -0,20 V em Na_2SO_4 com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . No primeiro voltamograma, foi observado um pico catódico em -1,4 V devido à redução dos grupos oxigenados presentes nas folhas de GO, Figura 10 (curva A). A partir da segunda curva, não foi mais observado o pico de redução presente na primeira curva, indicando que o GO foi reduzido electroquimicamente, Figura 10 (curvas B a E).

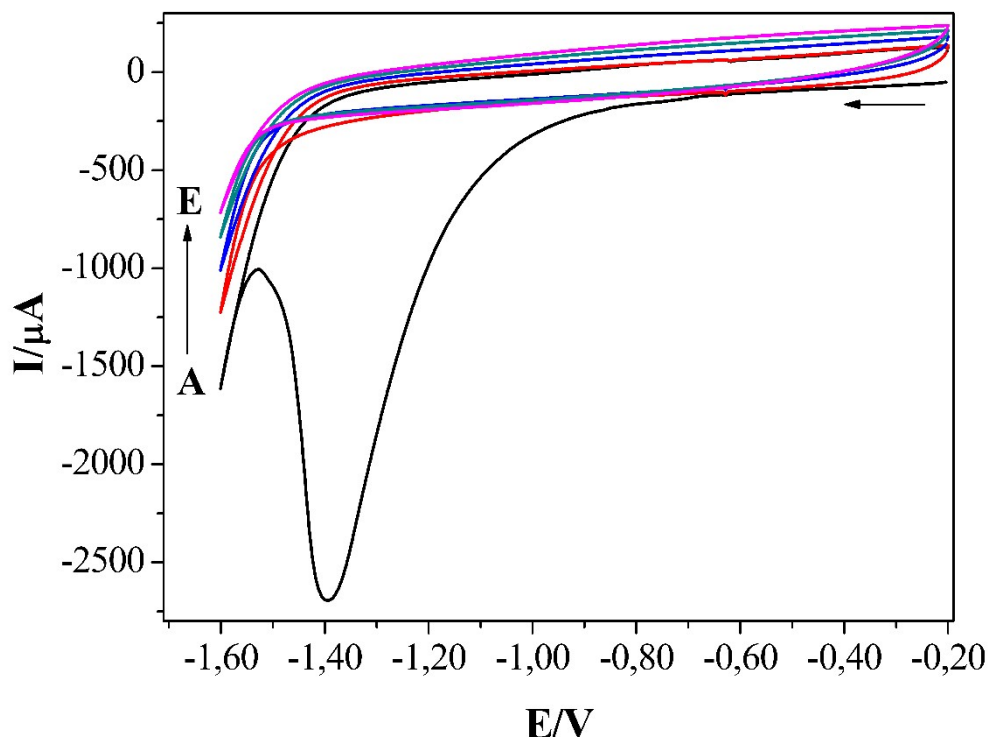


Figura 10 – Voltamogramas cíclicos da redução eletroquímica do GO $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} : (A) 1º Ciclo; (B) 2º Ciclo; (C) 5º Ciclo; (D) 10º Ciclo; (E) e 20º Ciclo.

Após a redução eletroquímica, os eletrodos foram lavados com água e foram modificados com NiNPs eletrodepositadas nos potenciais de $-1,0 \text{ V}$ por 30, 50 e 100 s, e $-1,3 \text{ V}$ por 30 s. Em seguida, as nanopartículas foram oxidadas em meio alcalino usando CV. São apresentados na Figura 11 voltamogramas cíclicos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas sob potencial de $-1,1 \text{ V}$ por 30 s em $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de $0,10$ a $0,70 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

No primeiro voltamograma (Figura 11, curva a), é observada a oxidação das nanopartículas em meio alcalino e consequente estabilização do par de picos do níquel (Figura 11, curvas b a g) em $0,52$ (pico anódico) e $0,29 \text{ V}$ (pico catódico). O mesmo comportamento foi observado para as NiNPs eletrodepositadas nos tempos de 50 e 100 s. No entanto, os eletrodos modificados apresentaram picos anódicos e catódicos estabilizados em $0,45$ e $0,34 \text{ V}$ no tempo de 50 s, e $0,50$ e $0,32 \text{ V}$ com 100 s de eletrodeposição.

Em seguida, a oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos foi avaliada em solução alcalina empregando os três eletrodos preparados. Voltamogramas cíclicos foram realizados no intervalo de potencial de $0,20$ a $0,70 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . As Figuras 12 a 14 apresentam os voltamogramas na ausência e na presença dos aminoácidos ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-3}$).

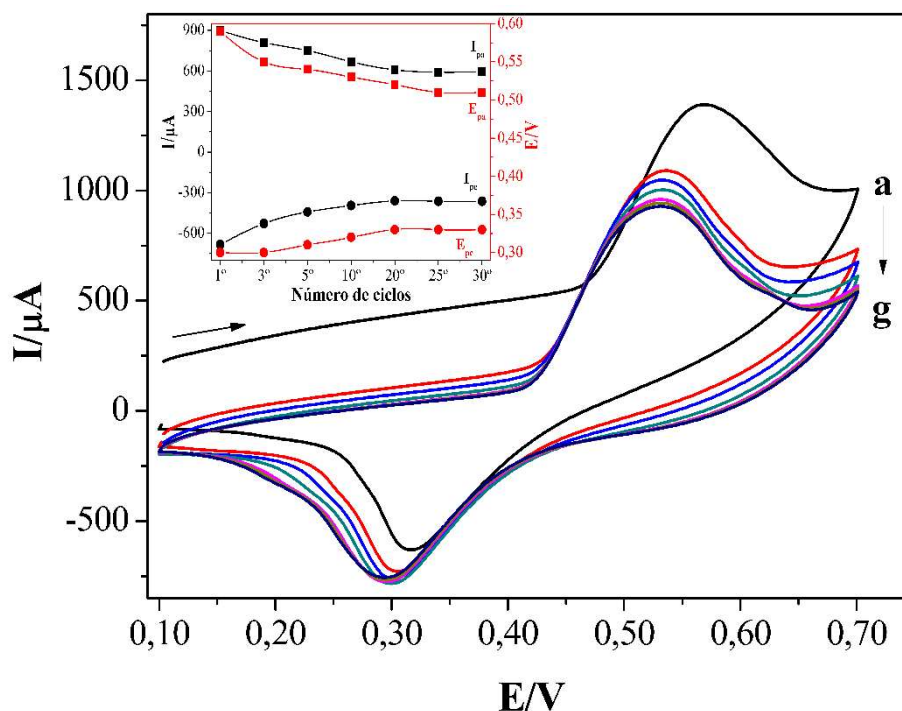


Figura 11 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas com potencial de $-1,0$ V por 30 s sobre a superfície do GCE modificado com GO reduzido eletroquimicamente em NaOH $0,10$ mol L^{-1} com velocidade de varredura de 100 $mV s^{-1}$: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potências de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

Nas Figuras 12 a 14, foi observado um aumento nas I_{pa} para os três eletrodos modificados na presença dos aminoácidos em relação ao branco. Além disso, foi verificado um deslocamento dos picos para potenciais mais positivos, indicando que a ocorrência de eletrocatalise na superfície do eletrodo modificado. Na Tabela 3, são apresentados os parâmetros eletroquímicos obtidos a partir das Figuras 12 a 14.

Tabela 3 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 3 com NiNPs eletrodepositadas nos tempos de 30, 50 e 100 s (Figuras 12 a 14).

Aminoácidos	30 s		50 s		100 s	
	E_{pa}/V	$\Delta I/\mu A^*$	E_{pa}/V	$\Delta I/\mu A^*$	E_{pa}/V	$\Delta I/\mu A^*$
Ácido aspártico	0,54	85,8	0,48	7,96	0,51	68,7
Ácido glutâmico	0,53	64,0	0,48	33,0	0,51	55,9
Alanina	0,54	55,4	0,47	35,1	0,52	69,8
Glicina	0,54	142,0	0,48	58,3	0,53	126,4
Leucina	0,54	96,2	0,47	31,5	0,51	54,8

* ΔI = Corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco.

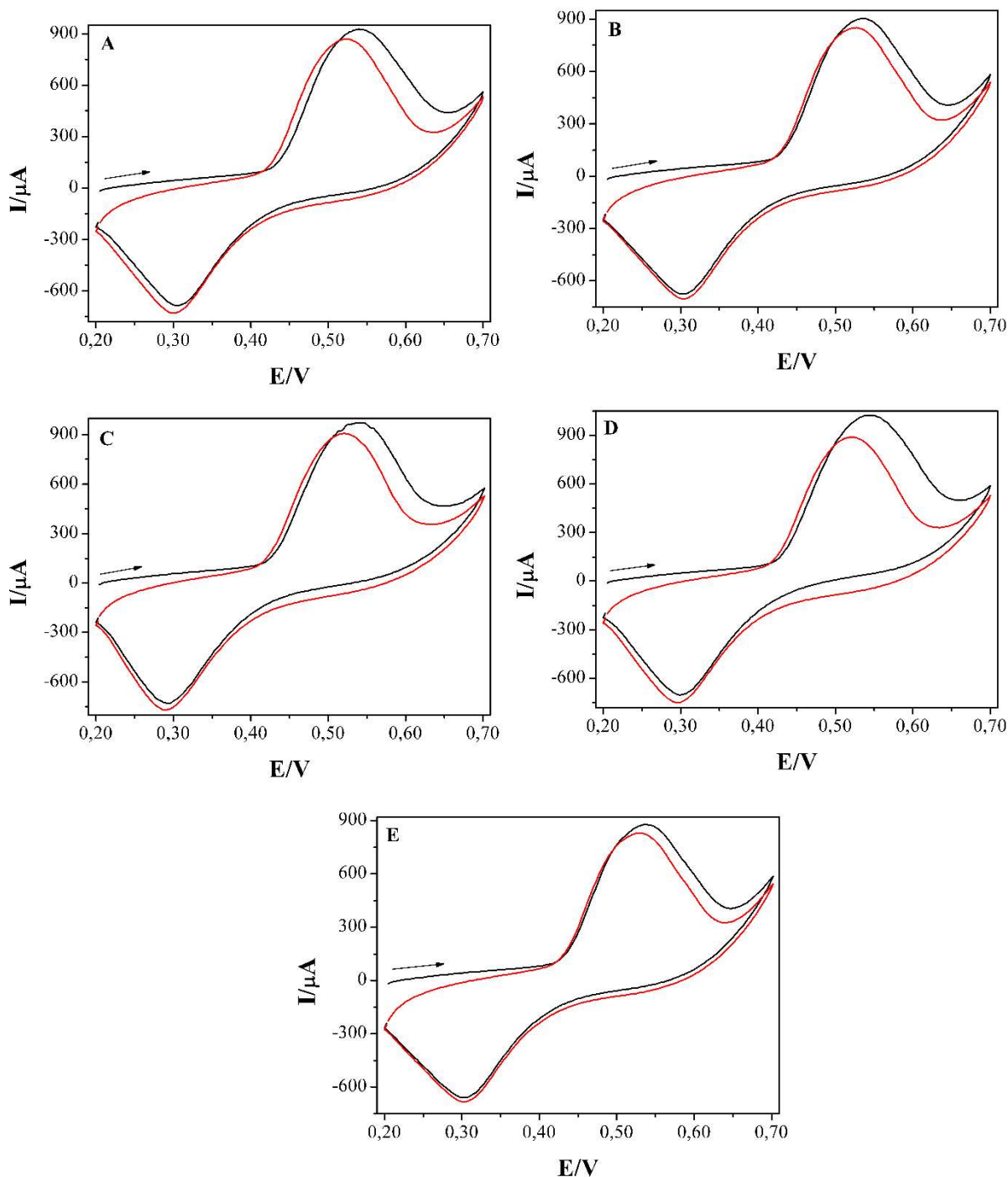


Figura 12 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de $-1,0$ V por 30 s em soluções de NaOH $0,10$ mol L^{-1} (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (curva preta) com velocidade de varredura de 100 $mV s^{-1}$: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

O eletrodo modificado com NiNPs preparadas no tempo de 30 s apresentou maiores correntes catalíticas em relação aos eletrodos modificados nos tempos de 50 e 100 s (Tabela 3). Provavelmente, este ganho de corrente se deve aos menores tamanhos das nanopartículas produzidas. Além do mais, foi observado que a glicina apresenta maior sensibilidade às

modificações realizadas, possivelmente, devido à estereoquímica da molécula que apresenta dois hidrogênios (grupo menos volumoso) ligados ao carbono, diferentemente dos outros aminoácidos que possuem um carbono quiral ao qual um átomo de hidrogênio está ligado e 3 outros grupos ligados mais volumosos do que o hidrogênio, o que facilita a aproximação da glicina à superfície modificada e conseqüentemente, a sua oxidação, Esquema 2.

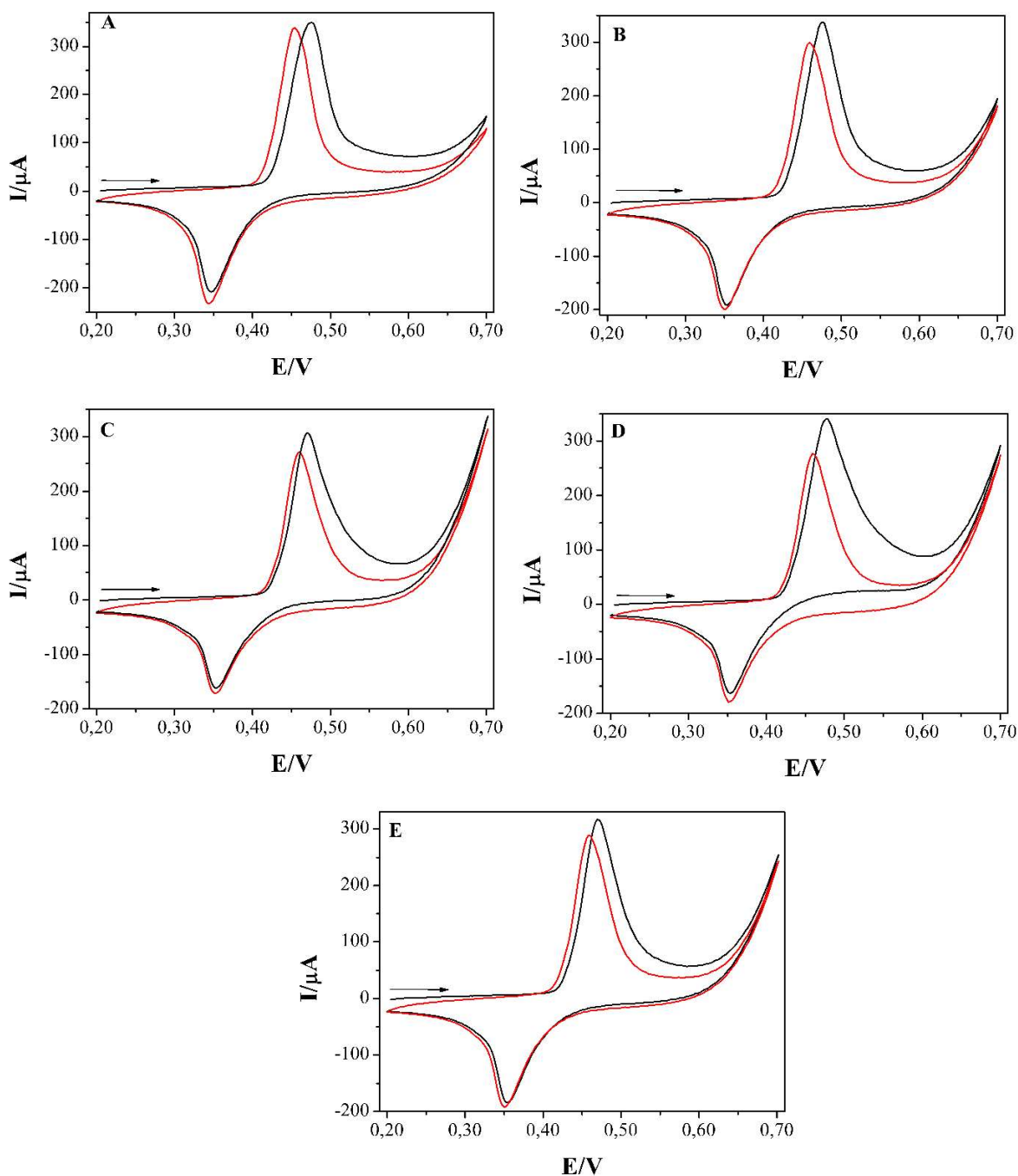


Figura 13 – Voltamogramas cíclicos do NiNPs-RGO/GCE sob potencial de -1,0 V por 50 s em soluções de NaOH 0,10 mol L⁻¹ (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ (curva preta) com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

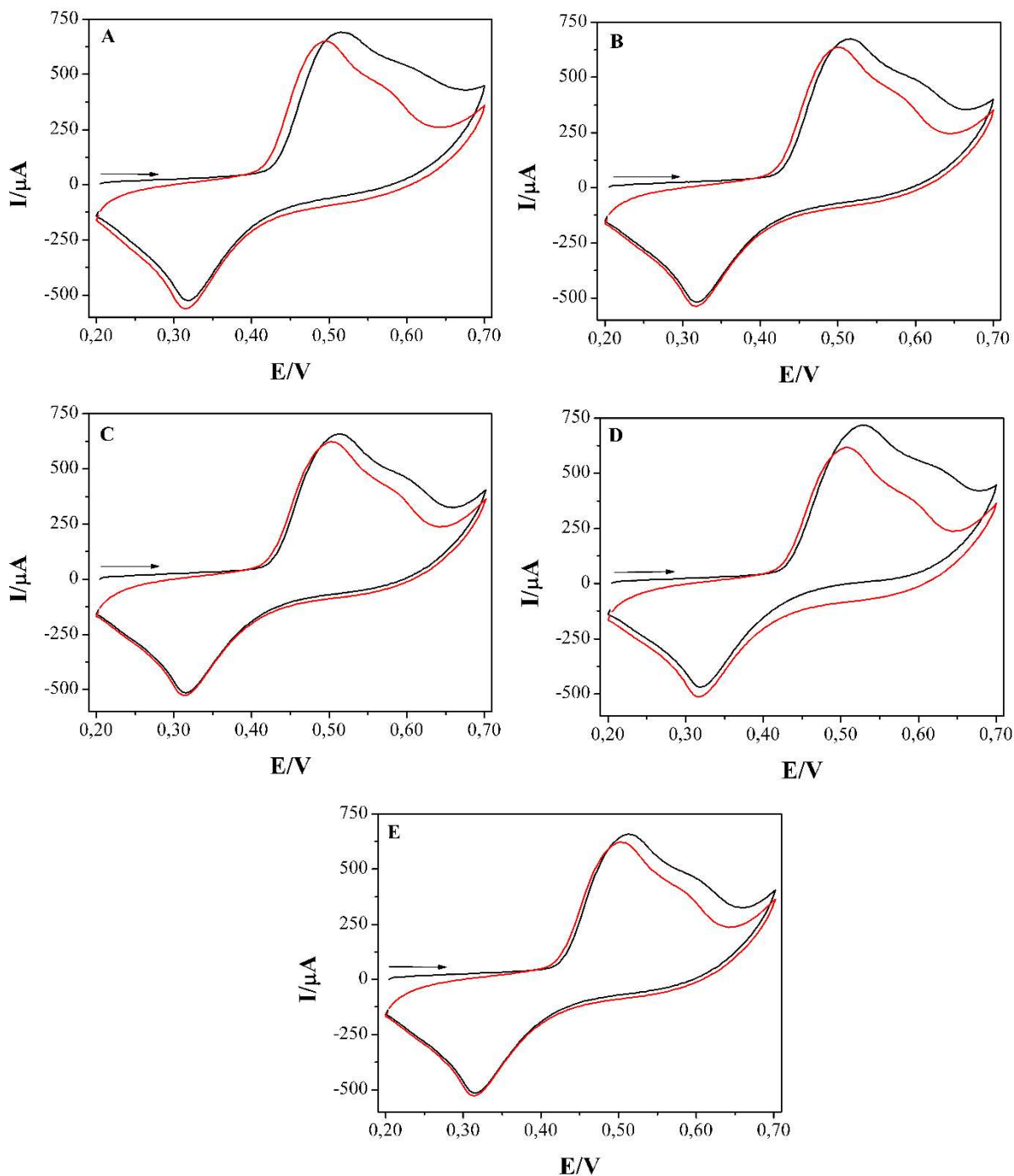


Figura 14 – Voltamogramas cíclicos de um NiNPs-RGO/GCE sob potencial de $-1,0$ V por 100 s em soluções de NaOH $0,10$ mol L^{-1} (curvas vermelhas) e na presença de aminoácidos de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (curva preta) com velocidade de varredura de 100 $mV s^{-1}$: ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E).

Outro fator que pode influenciar nas respostas dos eletrodos modificados é a quantidade de GO depositado sobre a superfície do GCE que pode ser influenciada pela concentração de GO presente no volume transferido da suspensão para a modificação do GCE. Como se trata de uma suspensão, a concentração de GO presente no volume utilizado

nas modificações pode variar e interferir diretamente no sinal analítico. Tal observação pode ser verificada na resposta do eletrodo modificado com nanopartículas a 50 s para o ácido aspártico, por exemplo (Tabela 3).

Os resultados experimentais indicaram que o eletrodo modificado com GO reduzido eletroquimicamente empregando voltametria cíclica apresentou boas condições para serem empregados no desenvolvimento de detectores eletroquímicos para detecção dos aminoácidos. No entanto, assim como nos eletrodos preparados anteriormente, a modificação desenvolvida utilizada no GCE se desprendia facilmente da superfície do eletrodo, tornando-se um candidato não ideal para a detecção dos aminoácidos.

3.3.3.4 Método 4

Os eletrodos modificados através da deposição de GO e subsequente redução eletroquímica de GO sobre a superfície do GCE não se mostraram estáveis e reprodutíveis. Dessa forma, GCE foi modificado através da eletrodeposição direta por CV de GO e NiNPs na superfície do eletrodo a partir de uma suspensão contendo GO e NiSO_4 . Posteriormente, as nanopartículas foram oxidadas em meio alcalino e a resposta foi avaliada apenas com o aminoácido glicina devido à maior sensibilidade apresentada durante os estudos anteriores.

Nas Figuras 15 e 16 são apresentados os voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de GO e NiNPs, e consequente redução eletroquímica do GO sobre a superfície do GCE. Na modificação em Na_2SO_4 0,10 mol L^{-1} , são observados dois picos catódicos no primeiro voltamograma (Figura 15, curva a). O primeiro pico em -1,08 V provavelmente refere-se à redução do níquel na superfície do GCE que possui potencial de redução menor do que GO; e o segundo pico observado em -1,19 V é da redução de GO. A partir do segundo ciclo, os picos de redução de níquel e GO sobre a superfície do GCE não são observados (Figura 15).

Diferentemente do que ocorre na redução em meio de Na_2SO_4 0,10 mol L^{-1} (Figura 15), em Na_2SO_4 0,50 mol L^{-1} foram observados dois picos catódicos não definidos em -1,18 e -1,36 V (Figura 16, curva a), os quais se referem à redução de níquel e GO na superfície do GCE, respectivamente. No segundo voltamograma (Figura 16, curva b), foi observado um pico catódico em -1,23 V referente à redução de níquel, o qual está na mesma região de potencial observada na Figura 16 (curva a). Após o segundo ciclo, não foi observado mais nenhum pico de redução ou oxidação na superfície do GCE.

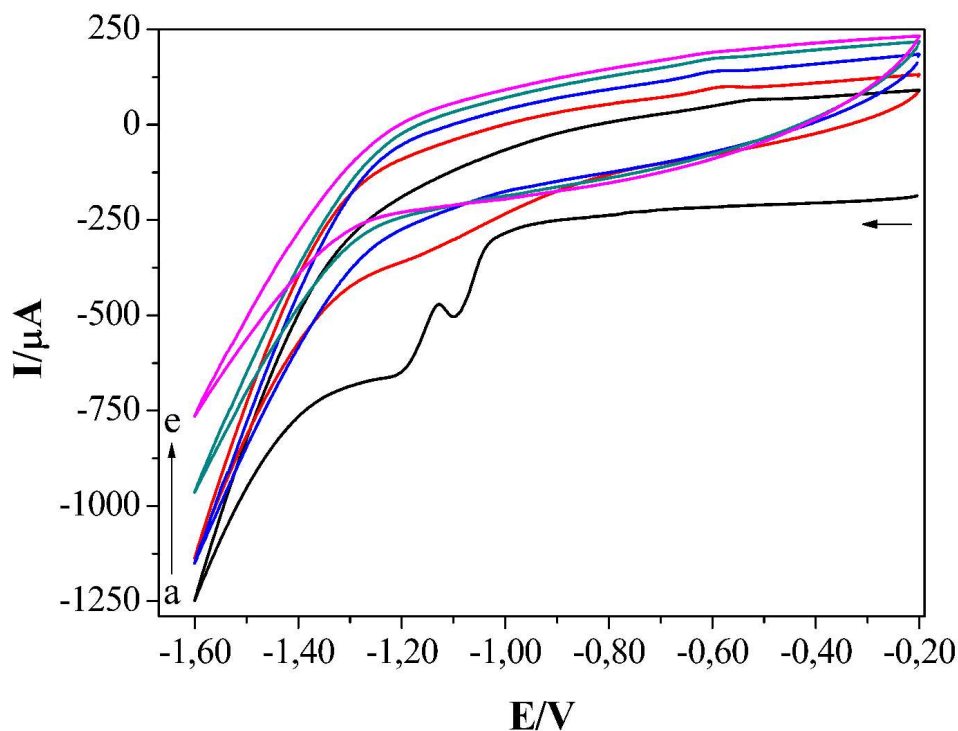


Figura 15 – Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de RGO e NiNPs sobre a superfície do GCE em meio de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo.

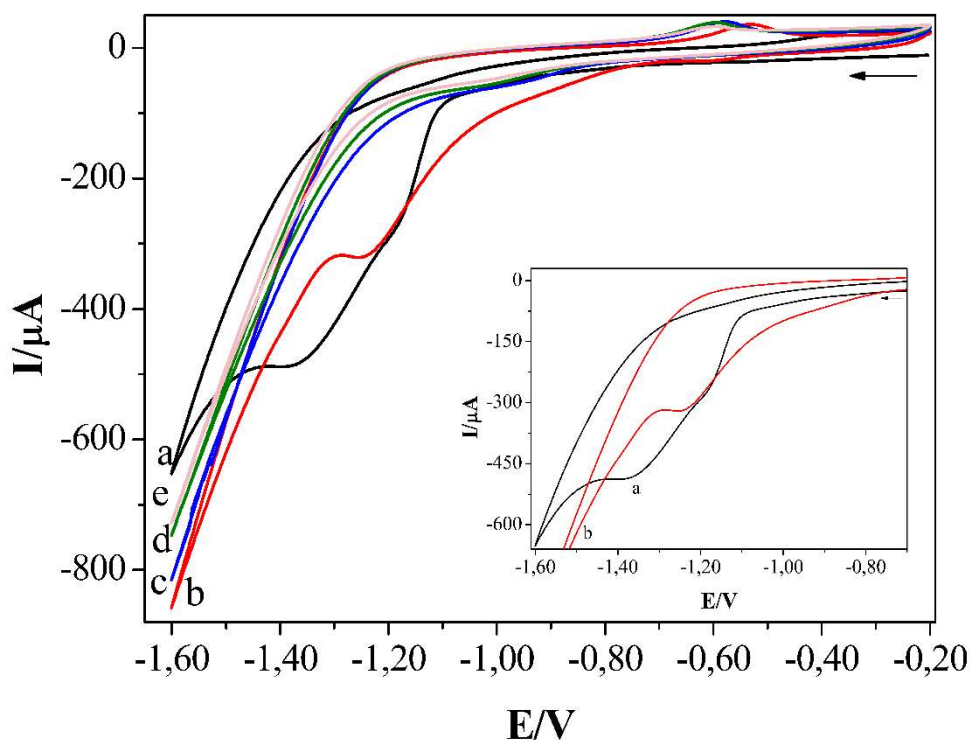


Figura 16 – Voltamogramas cíclicos da eletrodeposição simultânea de RGO e NiNPs sobre a superfície do GCE em meio de Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo. Inserido: Ampliações das curvas a e b.

As nanopartículas foram oxidadas em NaOH 0,10 mol L⁻¹ utilizando CV após a modificação do GCE com RGO e NiNPs. Os voltamogramas cíclicos da oxidação das NiNPs são apresentados nas Figuras 17 e 18. O eletrodo modificado em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ ficou estável após o vigésimo ciclo (Figura 17, curva f), enquanto o eletrodo modificado em Na₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹ não apresentou estabilidade durante os 30 ciclos utilizados para oxidação e estabilização das nanopartículas.

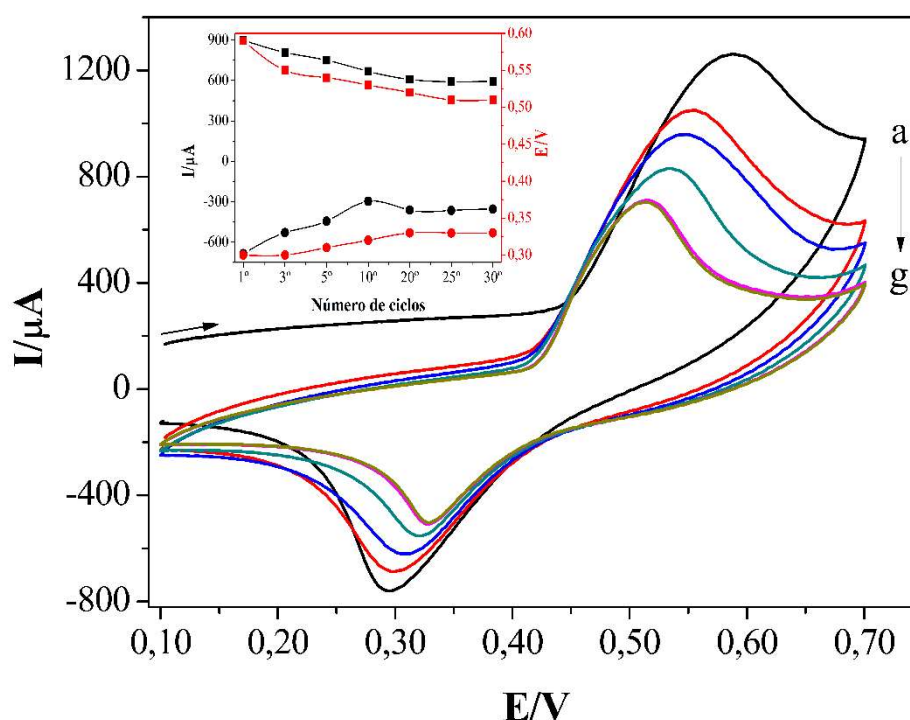


Figura 17 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas simultaneamente com RGO em meio de Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ por CV sobre a superfície do GCE em NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potências de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

Os eletrodos modificados em meio de Na₂SO₄ 0,10 e 0,50 mol L⁻¹ foram utilizados para estudar a eletro-oxidação da glicina em meio alcalino por CV. Nas Figuras 19 e 20, são apresentados os voltamogramas cíclicos das adições sucessivas de glicina em NaOH 0,10 mol L⁻¹. Foi observado um aumento da corrente de pico catódico (I_{pc}) proporcional à concentração de glicina utilizando o eletrodo modificado em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ (Figura 19), indicando que o analito é eletroativo na superfície do eletrodo. O mesmo foi observado para o GCE modificado em Na₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹ (Figura 20). No entanto, a intensidade de resposta foi aproximadamente 5,5 vezes menor do que o eletrodo modificado em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹. Além disso, a resposta do eletrodo ficou estável após $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicina.

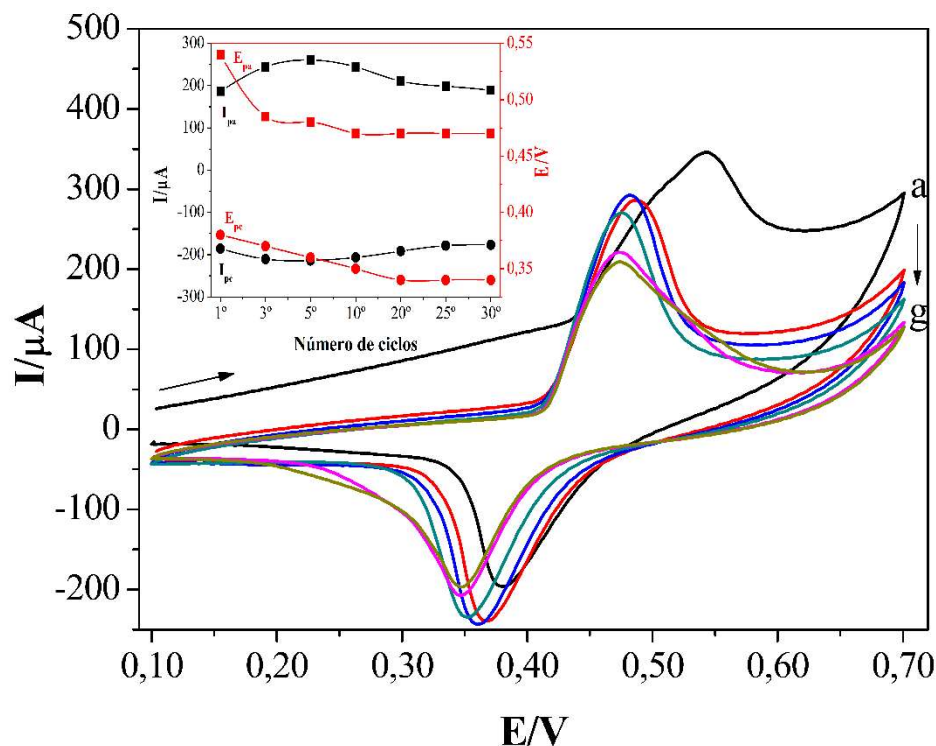


Figura 18 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs eletrodepositadas simultaneamente com RGO em meio de Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ por CV sobre a superfície do GCE em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potências de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

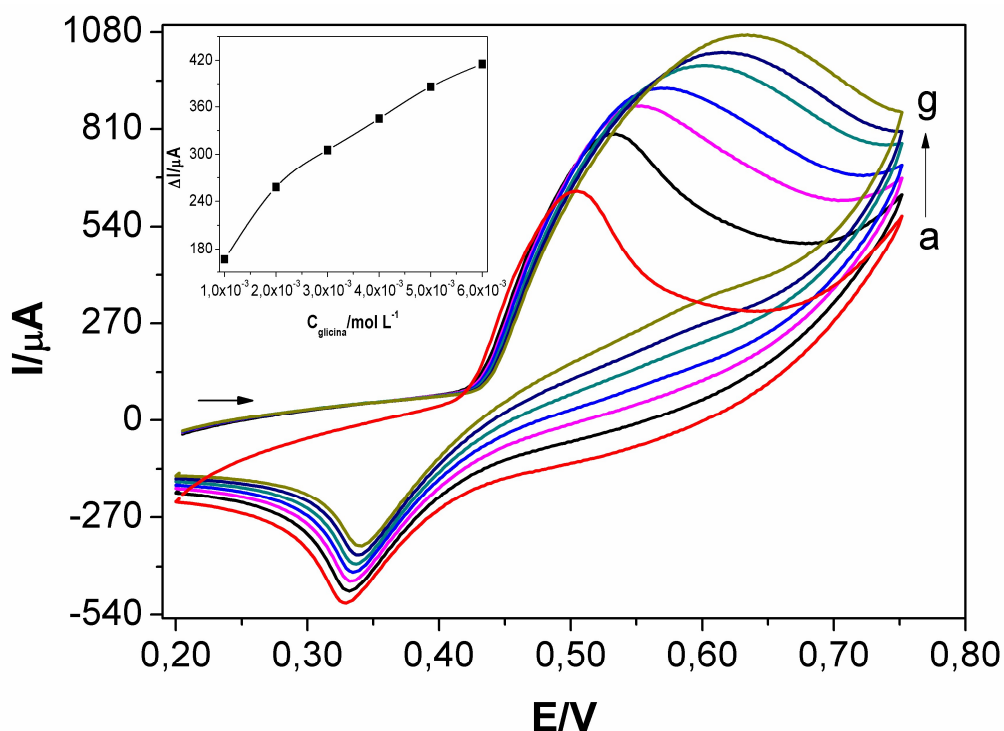


Figura 19 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por CV em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (curva a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b), $2,0 \times 10^{-3}$ (c), $3,0 \times 10^{-3}$ (d), $4,0 \times 10^{-3}$ (e), $5,0 \times 10^{-3}$ (f) e $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (g) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

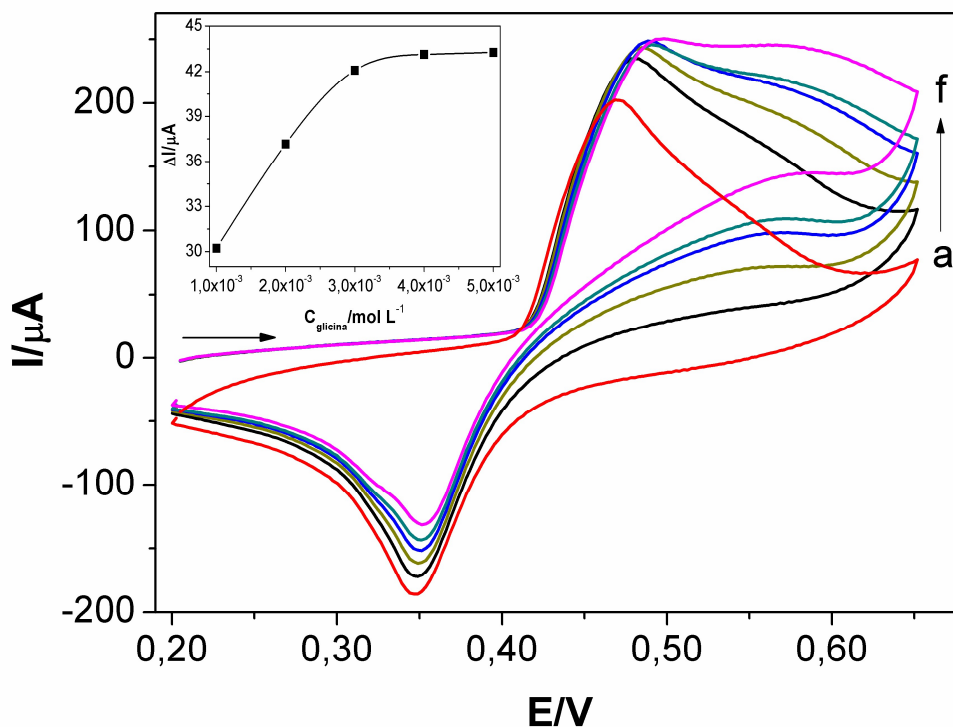


Figura 20 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ por CV em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (curva a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b), $2,0 \times 10^{-3}$ (c), $3,0 \times 10^{-3}$ (d), $4,0 \times 10^{-3}$ (e), e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (f) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

O GCE modificado com RGO e NiNPs eletrodepositados simultaneamente em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou melhores resultados para oxidação eletrocatalítica da glicina do que o eletrodo modificado em Na_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. A partir deste resultado, foram realizados ensaios de repetitividade do método de modificação do GCE desenvolvendo através da eletro-oxidação da glicina no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos para eletrodos modificados ($n= 3$) com RGO e NiNPs em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por CV apresentaram coeficiente de variação de 47,0 a 69,1% para as concentrações de $2,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Ainda, nos ensaios 1 e 2, a superfície do eletrodo modificado saturou nas concentrações a partir de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Tabela 4). Portanto, a modificação do eletrodo em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por CV não foi reproduzível, consequentemente, não foram obtidas respostas similares às obtidas na Figura 19 em outras tentativas de modificação do GCE com este método.

Tabela 4 – Parâmetros da resposta eletroquímica dos aminoácidos em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 4 em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹.

Concentração de glicina/mol L ⁻¹	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	$\Delta I/\mu A^*$	$\Delta I/\mu A^*$	$\Delta I/\mu A^*$
$1,0 \times 10^{-3}$	40,9	76,4	101,6
$2,0 \times 10^{-3}$	71,5	111,9	149,7
$3,0 \times 10^{-3}$	74,8	157,2	179,7
$4,0 \times 10^{-3}$	69,1	155,4	216,6
$5,0 \times 10^{-3}$	64,1	154,7	211,5

* ΔI = Corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco.

3.3.3.5 Método 5

Finalmente, um GCE foi modificado com RGO a partir de uma suspensão de GO em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ utilizando amperometria. O eletrodo modificado com RGO foi lavado e seco à temperatura ambiente; em seguida, o eletrodo foi modificado com NiNPs em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ utilizando amperometria e as nanopartículas foram oxidadas em meio alcalino por CV.

Na Figura 21, são apresentados os voltamogramas cíclicos da oxidação das NiNPs em RGO sobre a superfície do GCE registrados no intervalo de potencial de 0,10 a 0,70 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Nos voltamogramas, pôde ser observado um par de picos referentes à oxirredução de níquel, os quais ficaram estáveis a partir do vigésimo ciclo (Figura 21, curva e) nos potenciais de 0,56 (E_{pa}) e 0,38 V (E_{pc}).

Após a modificação do GCE com RGO e NiNPs, o eletrodo modificado foi utilizado para estudar a eletro-oxidação do aminoácido glicina no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ utilizando CV. O estudo foi realizado na faixa de potencial de 0,20 a 0,75 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Os voltamogramas cíclicos na ausência e na presença de glicina são apresentados na Figura 22. Na ausência da glicina (Figura 22, curva a), foi observado um par de picos da oxirredução de níquel em cerca de 0,56 (E_{pa}) e 0,38 V (E_{pc}) em meio alcalino. Na presença da glicina, foi verificado um aumento na I_{pa} com o aumento da concentração até $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Em concentrações mais altas, a superfície do eletrodo foi saturada e observou-se uma estabilização da corrente com o aumento da concentração de glicina (Tabela 5).

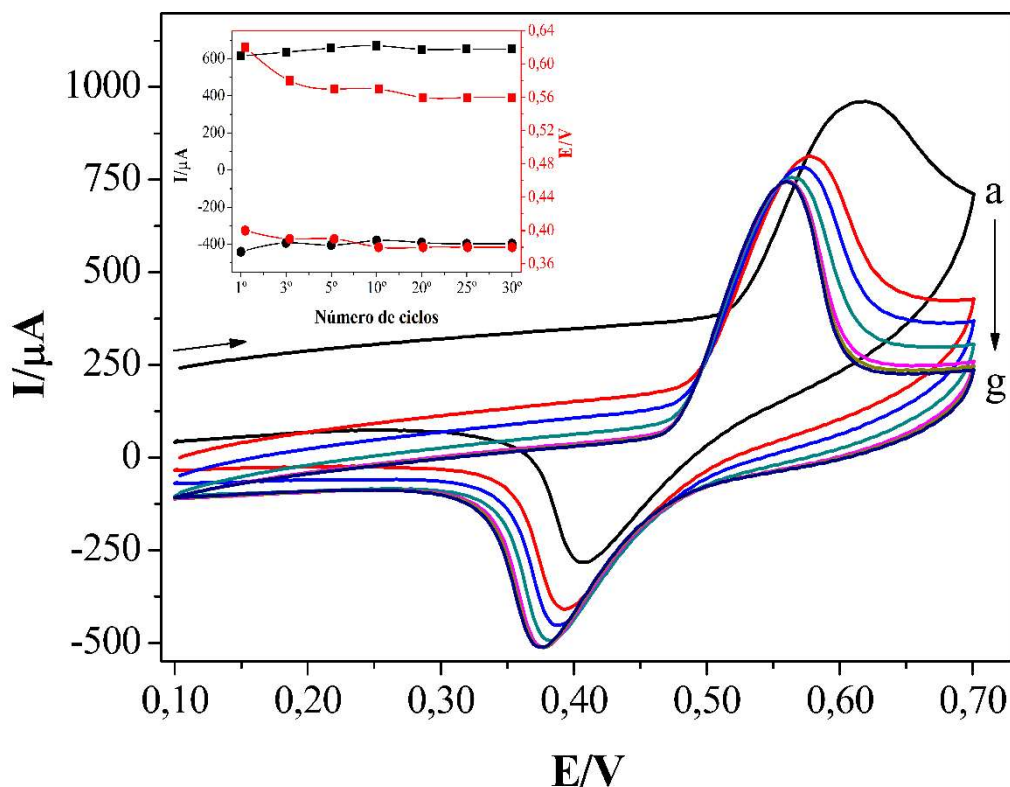


Figura 21 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs em RGO sobre a superfície do GCE modificado em duas etapas por amperometria em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} : (a) 1º Ciclo; (b) 3º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 20º Ciclo; (f) 25º Ciclo; e (g) 30º Ciclo. Inserido: Dependência das correntes e potências de pico anódico (I_{pa} ; E_{pa}) e catódico (I_{pc} ; E_{pc}) com o número de ciclos.

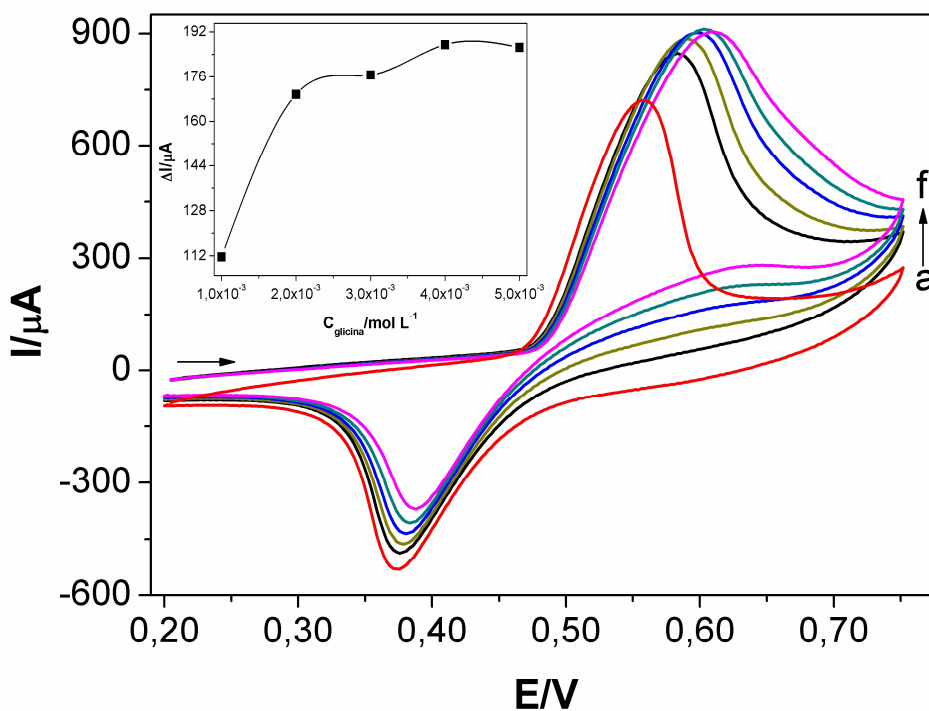


Figura 22 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com RGO e NiNPs em duas etapas por amperometria em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (curva a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b), $2,0 \times 10^{-3}$ (c), $3,0 \times 10^{-3}$ (d), $4,0 \times 10^{-3}$ (e), e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (f) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Tabela 5 – Parâmetros da resposta eletroquímica da glicina em meio alcalino obtidos com o eletrodo modificado com o método 5.

Concentração de glicina/mol L ⁻¹	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Coeficiente de variação (Cv)
	$\Delta I/\mu A^*$	$\Delta I/\mu A^*$	$\Delta I/\mu A^*$		
$1,0 \times 10^{-3}$	113,3	118,7	111,6	114 ± 3	3,2
$2,0 \times 10^{-3}$	160,0	167,6	169,7	166 ± 5	3,1
$3,0 \times 10^{-3}$	164,8	168,7	176,7	170 ± 6	3,6
$4,0 \times 10^{-3}$	177,2	179,4	187,5	181 ± 6	3,0
$5,0 \times 10^{-3}$	179,2	178,2	186,5	181 ± 5	2,5

* ΔI = Corrente de pico anódico dos aminoácidos - corrente de pico anódico do branco

O eletrodo modificado desenvolvido por este método amperométrico de duas etapas se mostrou promissor para a detecção de aminoácidos. A partir dos resultados obtidos com este método de modificação, foram realizados ensaios de repetitividade do método em triplicata através da eletro-oxidação da glicina sobre a superfície do eletrodo modificado (Tabela 5).

Os GCE modificados com RGO e NiNPs por amperometria apresentaram Cv de 2,5 ($5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) a 3,6 % ($3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). Além disso, foi observado que, em concentrações superiores a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicina, a superfície do eletrodo modificado é saturada. Portanto, estes resultados indicam que o método de modificação desenvolvido por amperometria em duas etapas é repetitivo e pode ser aplicado para a modificação dos eletrodos de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente.

3.3.4 Modificação eletroquímica da superfície do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido

A fim de investigar a eletro-oxidação dos aminoácidos na superfície do GCE modificado com GO reduzido (RGO/GCE), inicialmente, o GCE foi modificado com uma suspensão de GO 0,50 mg mL⁻¹ em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹, aplicando tempo de eletrodeposição de 500 s e potencial -1,5 V, de acordo com o método desenvolvido na *Sessão 3.3.3.5*. Os resultados mostram que os aminoácidos nas concentrações de $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em NaOH 0,10 mol L⁻¹ não apresentaram picos de oxidação ou redução no intervalo de potencial de -1,5 a 1,5 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ na superfície do RGO/GCE (Figura 23), corroborando com os resultados obtidos na *Sessão 3.3.1*.

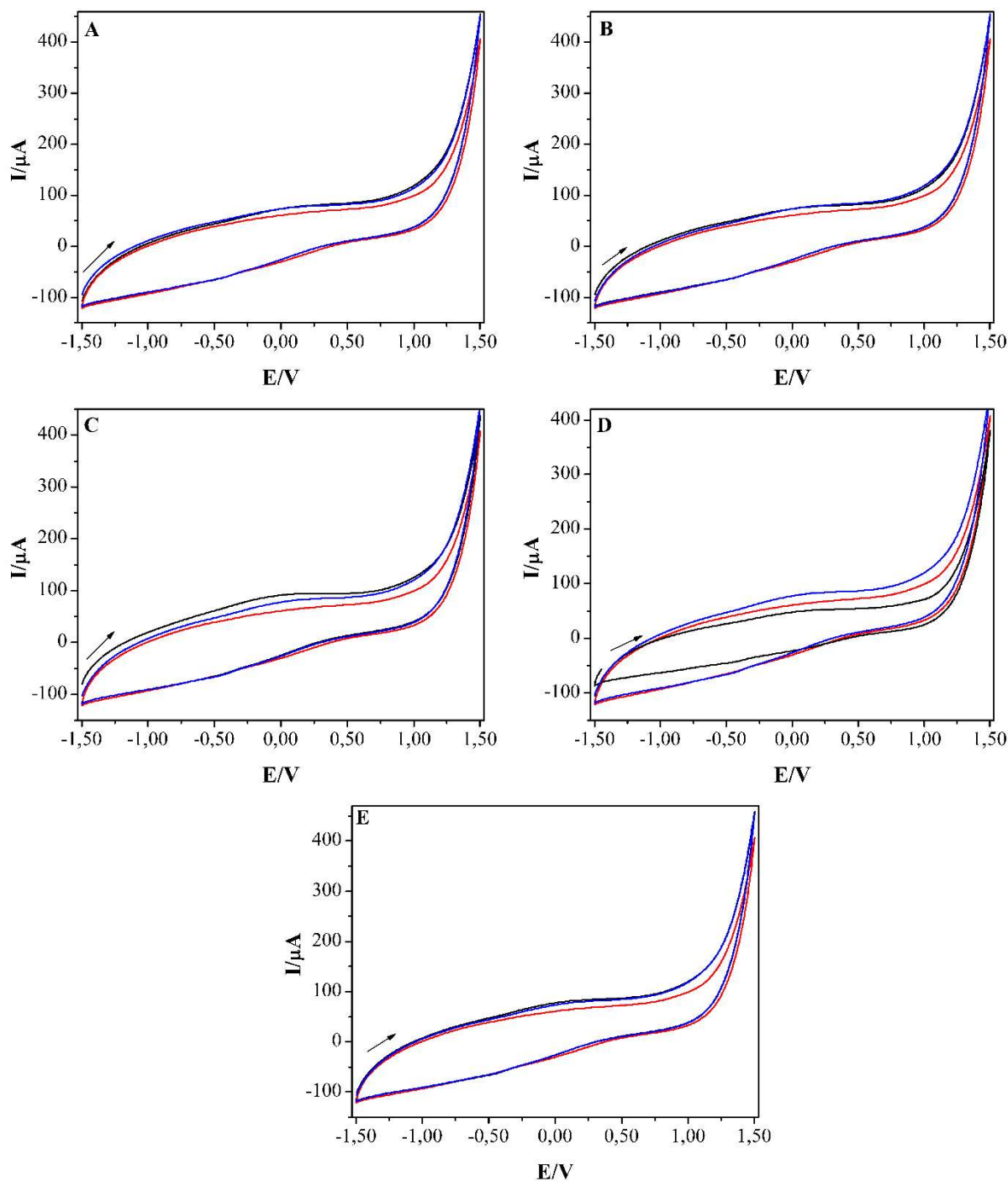


Figura 23 – Comportamento eletroquímico dos aminoácidos ácido aspártico (A), ácido glutâmico (B), alanina (C), glicina (D) e leucina (E) nas concentrações de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (curvas pretas) e $1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (curvas azuis) em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (curvas vermelhas) sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Como os aminoácidos não apresentaram picos de oxidação e/ou redução na superfície do RGO/GCE, este eletrodo foi modificado com NiNPs que exercem o papel do electrocatalisador na oxidação dos aminoácidos. As NiNPs foram eletrodepositadas sobre a superfície do RGO/GCE de acordo com a metodologia proposta na *Sessão 3.2.4.5*.

A otimização da eletrodeposição do RGO sobre a superfície do GCE foi inicialmente investigada pelo efeito do potencial catódico aplicado sobre a redução eletroquímica do GO utilizando uma suspensão de GO $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e aplicando tempo de eletrodeposição de 500 s (Figura 24). Os potenciais de eletrodeposição estudados variaram entre -1,2 e -1,6 V. Estes potenciais de eletrodeposição foram definidos a partir da Figura 2. A atividade eletrocatalítica do GCE modificado com GO contendo nanopartículas de níquel (NiNPs-RGO/GCE) foi avaliada através de uma solução de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

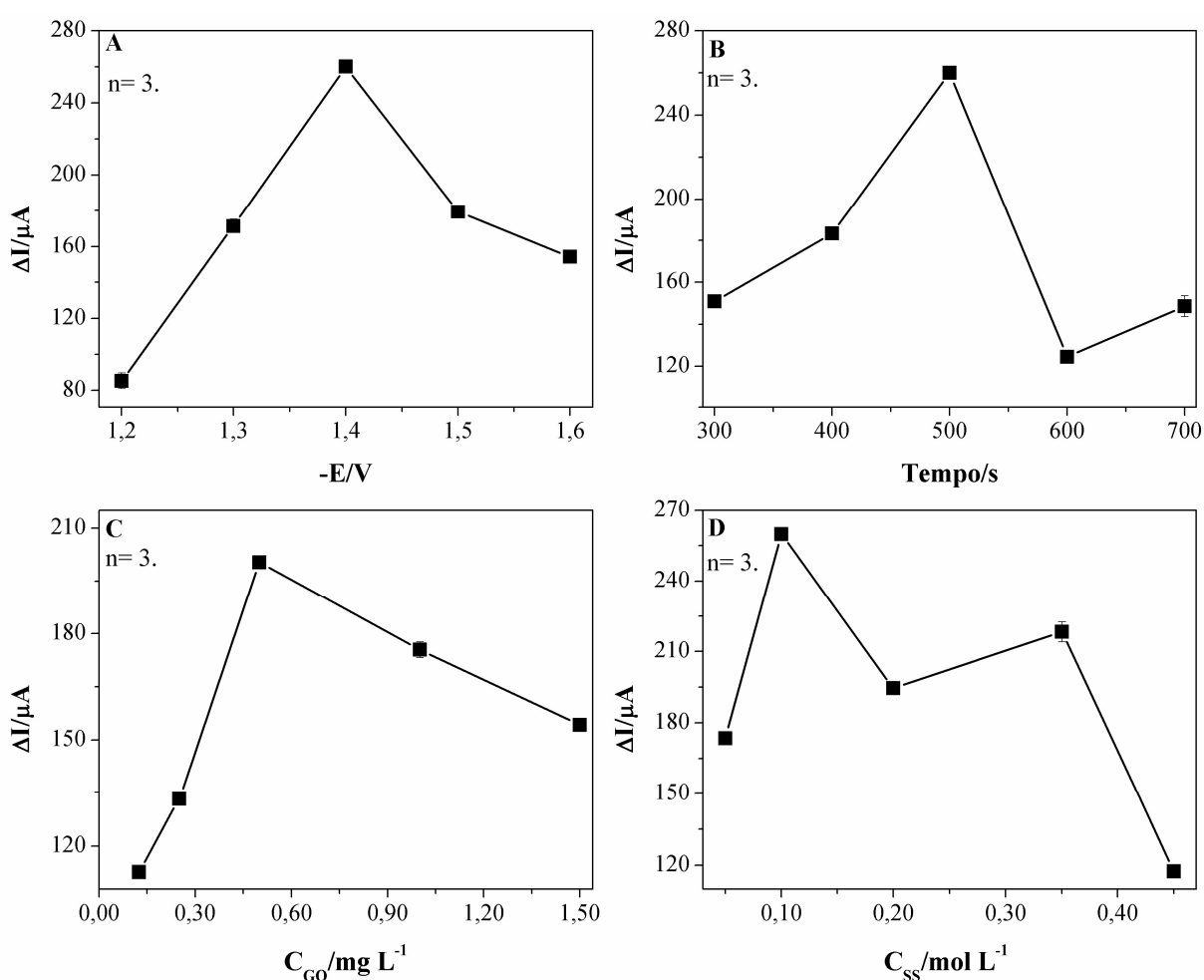


Figura 24 – Otimização da eletrodeposição do RGO sobre a superfície do GCE utilizando a técnica de amperometria. (A) Potencial de eletrodeposição (E). (B) Tempo de eletrodeposição. (C) Concentração de óxido de grafeno (C_{GO}). (D) Concentração de sulfato de sódio (C_{SS}).

Na Figura 24 (A), pode ser observado o aumento da corrente de oxidação da glicina com o aumento do potencial de eletrodeposição do GO, o qual promove a eletrodeposição de uma maior quantidade de RGO na superfície do GCE. Além disso, o aumento da espessura do

filme eletrodepositado no potencial de -1,4 V promove a melhor oxidação da glicina. Neste potencial foi obtido o melhor ganho de corrente de oxidação da glicina. Após este potencial, o aumento da espessura do filme eletrodepositado acabou dificultando a eletro-oxidação da glicina. Conseqüentemente, a resposta da corrente de pico diminui, logo, o potencial de eletrodeposição selecionado para redução do GO foi -1.4 V.

O efeito do tempo na redução eletroquímica de GO na superfície do GCE foi inicialmente investigado com uma suspensão de GO $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e aplicando potencial de eletrodeposição de -1,4 V. Os tempos de eletrodeposição estudados variaram entre 300 e 700 s. O estudo do tempo de eletrodeposição é importante, porque permite a possibilidade de controlar a quantidade de RGO na superfície do eletrodo. Na Figura 24 (B), foi observado um ganho na corrente de oxidação da glicina com aumento do tempo de eletrodeposição até 500 s; posteriormente, a corrente diminui, permanecendo praticamente constante. Estes resultados indicam que a transferência eletrônica é facilitada e mais pronunciada em filmes mais finos. Contudo, este efeito não é observado em filmes muito finos, como aqueles formados em tempo de 300 s, cujo tempo de eletrodeposição não permitiu a cobertura completa da superfície do GCE com RGO ou a redução eletroquímica do GO não foi adequada. Portanto, foi selecionado o tempo de 500 s para eletrodeposição de GO na superfície do GCE.

Outro efeito avaliado na eletrodeposição de GO foi a concentração da suspensão utilizada na eletrodeposição de GO. O estudo foi realizado com as suspensões de GO em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando potencial e tempo de eletrodeposição de -1,4 V e 500 s, respectivamente. As concentrações das suspensões estudadas variaram de 0,12 a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Na Figura 24 (C), pode ser observado o aumento da corrente de oxidação da glicina em função da concentração da suspensão de GO até $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$; posteriormente, foi observada uma diminuição da corrente de oxidação do analito e uma tendência à estabilização. Os resultados observados neste experimento corroboram com os resultados obtidos nos estudos dos efeitos do potencial e tempo, ou seja, o aumento da espessura do filme é favorável à eletro-oxidação do analito até $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, em que é observado o maior ganho de corrente. Assim, a concentração da suspensão de GO utilizada na eletrodeposição foi $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$.

Por último, foi avaliado o efeito do eletrólito suporte na eletrodeposição do GO, pois a condutividade do eletrólito suporte utilizada na suspensão de GO é de suma importância na eletrodeposição de GO. Concentrações não ideais de eletrólito podem desestabilizar a suspensão, o que dificulta a deposição do GO na superfície do GCE. Segundo Hilder et al

(2011) (82), o óxido grafeno contém grupos funcionais aniônicos, tais como fenolatos e carboxilatos, e a dissociação parcial destes grupos resulta em cargas negativas ligadas à superfície da partícula. Em suspensão, essas cargas superficiais são responsáveis pela formação de uma dupla camada eletroquímica que rodeia as partículas. Essa camada estabiliza as partículas em suspensão, evitando a aglomeração física. A espessura da dupla camada diminui com o aumento da concentração do eletrólito. Por conseguinte, a estabilização só pode ser conseguida em sistemas muito diluídos (82), como observado na Figura 24 (D). Deste modo, a concentração do eletrólito suporte utilizado na suspensão de GO foi $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Portanto, os melhores resultados obtidos na otimização da eletrodeposição do GO na superfície do GCE foram: potencial de eletrodeposição de $-1,4 \text{ V}$, tempo de eletrodeposição de 500 s , concentração da suspensão de GO de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ e concentração do eletrólito suporte de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.5 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido

A caracterização eletroquímica dos eletrodos de carbono vítreo sem modificação e modificado com RGO foi realizada em solução aquosa de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por CV. Os experimentos foram feitos no intervalo de potencial de $-0,20$ a $0,80 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos registrados são apresentados na Figura 25.

No voltamograma do GCE, foi observado um par de picos redox nítidos e bem definidos com E_{pa} de $0,34 \text{ V}$, E_{pc} de $0,20 \text{ V}$, potencial de separação entre os picos anódico e catódico ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) de $0,14 \text{ V}$ e I_{pa}/I_{pc} de $0,96$, conforme apresentado na Figura 25 (curva a). Quando o GCE foi modificado com RGO, observou-se um ganho de corrente de aproximadamente 30 vezes para I_{pa} e 19 vezes para I_{pc} em comparação com o GCE. Além disso, foram observados os deslocamentos dos E_{pa} (sentido positivo) e E_{pc} (sentido menos positivo) com ΔE_p de $0,35 \text{ V}$ e I_{pa}/I_{pc} de $1,51$, Figura 8 (curva b). Os valores de I_{pa} , I_{pc} , I_{pa}/I_{pc} , E_{pc} , E_{pa} e ΔE_p para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ obtidos nas superfícies dos eletrodos são apresentados resumidamente na Tabela 6.

A melhoria da condutividade elétrica do RGO/GCE em comparação com o GCE ocorre devido à restauração das ligações sp^2 na rede de grafite durante a eletrodeposição de

RGO na superfície do GCE. A transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo modificado e as espécies eletroativas na solução é facilitada pela alta densidade de sítios defeituosos nos planos das bordas das folhas de GO reduzidas eletroquimicamente, os quais oferecem locais favoráveis para a transferência de elétrons que cineticamente podem ser determinadas por vários fatores, incluindo tunelamento, efeitos eletrostáticos e eletrocatalíticos (89).

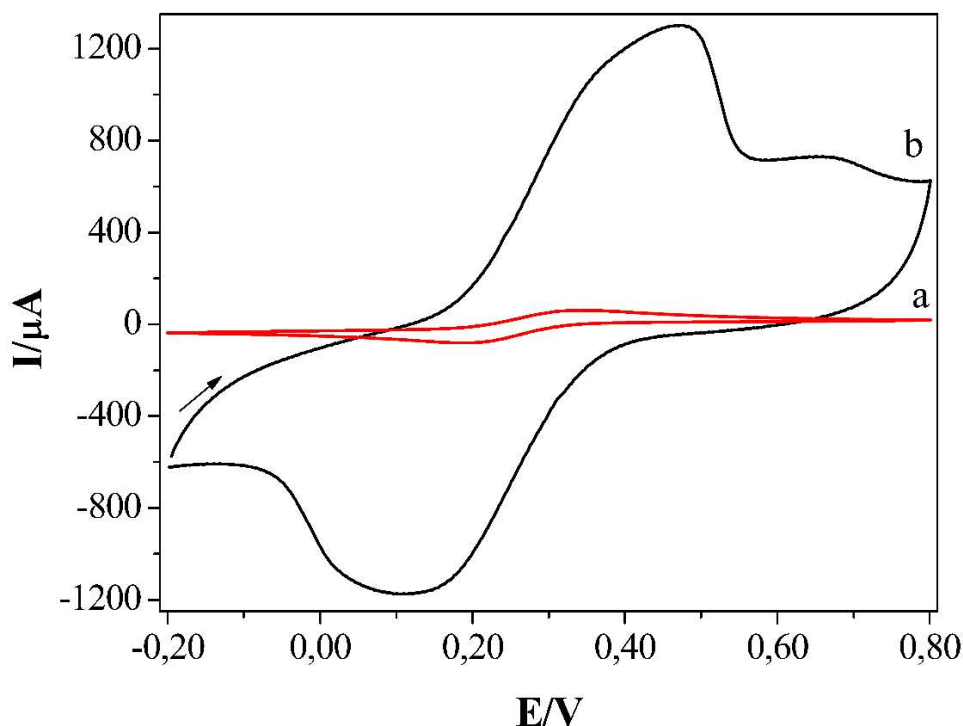


Figura 25 – Voltamogramas cíclicos do GCE (a) e RGO/GCE (b) na presença de $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Tabela 6 – Parâmetros voltamétricos para o par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ ($n=3$) obtidos sobre as superfícies dos eletrodos modificado com RGO e não modificado.

ELETRODO	GCE	RGO/GCE
I_{pa} / A	$6,9 \times 10^{-5} \pm 2,3 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-3} \pm 7,0 \times 10^{-6}$
E_{pa} / V	$0,34 \pm 0,00$	$0,47 \pm 2,2 \times 10^{-6}$
I_{pc} / A	$-7,2 \times 10^{-5} \pm 6,5 \times 10^{-7}$	$-1,4 \times 10^{-3} \pm 4,3 \times 10^{-5}$
E_{pc} / V	$0,20 \pm 1,4 \times 10^{-3}$	$0,11 \pm 4,8 \times 10^{-3}$
I_{pa} / I_{pc}	$0,96 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,05$
$\Delta E_p / V$	$0,14 \pm 0,00$	$0,35 \pm 0,02$
A_e / cm^2	$4,2 \times 10^{-3} \pm 6,8 \times 10^{-4}$	$1,2 \pm 4,2 \times 10^{-3}$

Estudos sobre a área superficial efetiva (A_e) foram realizados para investigar a resposta voltamétrica cíclica dos GCE e RGO/GCE, Tabela 6. As áreas superficiais efetivas dos eletrodos podem ser calculadas em termos de corrente de pico (I_p) e velocidade de varredura (v) a partir da equação de Randle-Sevcik, Equação 1 (90):

$$I_p = 2,69 \times 10^5 A_e D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C \quad \text{Equação (1)}$$

onde I_p é a corrente do pico anódico; n é o número de elétrons transferidos ($n= 1$); v é a velocidade de varredura ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$); A_e é a área superficial efetiva do eletrodo em cm^2 ; D e C são o coeficiente de difusão ($D= 7,63 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (91)); e a concentração ($C= 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$) do $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

A A_e encontrada para o RGO/GCE ($1,2 \pm 4,2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$) foi aproximadamente 300 vezes maior do que a A_e do GCE ($4,2 \times 10^{-3} \pm 6,81 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$), indicando um melhor desempenho eletroquímico para os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, Tabela 6. Estes resultados indicam que o eletrodo modificado com RGO possui uma maior quantidade de sítios eletroativos disponíveis para a eletro-oxidação ou eletrorredução do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ na sua superfície.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) foi utilizada para obter informações sobre a transferência de elétrons entre o eletrólito e a superfície dos eletrodos modificados com RGO (RGO/GCE) e não modificados (GCE). Os gráficos de EIS normalmente incluem uma parte semicircular da curva de Nyquist e uma parte linear, Figura 26 (A). A parte semicircular em frequências mais altas corresponde ao processo de transferência limitada de elétrons, e o diâmetro é equivalente à resistência de transferência de elétrons (R_{ct}). A parte linear em frequências mais baixas corresponde ao processo de difusão (92,93).

A caracterização por IES foi realizada para estudar as R_{ct} e outros parâmetros dos GCE, e RGO/GCE. Na Figura 26 (A), são apresentados os diagramas de Nyquist dos GCE e RGO/GCE no intervalo de 0,10 Hz a 100 kHz. Os diagramas apresentam uma região linear na região de baixa, indicando que há resistência Warburg limitando a difusão no processo eletroquímico, e um semicírculo de transferência de elétrons na região de alta frequência.

O circuito equivalente para um eletrodo que possui transferência heterogênea de elétrons é geralmente descrito com base no modelo de Randles. O circuito equivalente simulado para o eletrodo sem modificação (GCE) inclui uma resistência da solução (R_s); uma resistência de transferência de elétrons (R_{ct}); um elemento de fase constante (CPE1 – *constant phase element*) que está relacionado com a capacitância de dupla camada produzida na

superfície; e uma resistência de Warburg (W) indicando a difusão linear na superfície do eletrodo, Figura 26 (B). Um CPE é aplicado no circuito equivalente para simular o comportamento não ideal do condensador que pode ser modelado como uma série, refletindo a falta de homogeneidade da camada superficial.

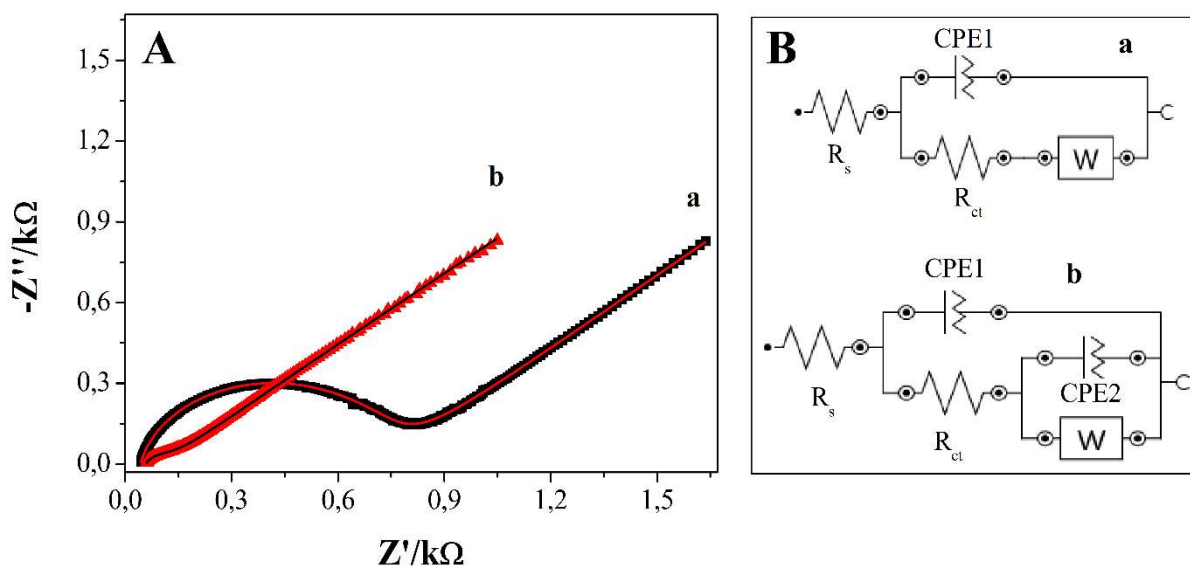


Figura 26 – Diagramas de IES dos GCE (a) e RGO/GCE (b) com as linhas solidas preta (a) e vermelha (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais (A). Circuitos eletroquímicos equivalentes utilizados para ajustar os diagramas de EIS (C).

A substituição da capacitância de dupla camada por um CPE melhorou a adequação da montagem do modelo. Um CPE é definido por $Z_{CPE} = T_{CPE}(j\omega)^{-n}$, em que T_{CPE} e n são constantes independentes de frequências; ω é a frequência angular. O expoente n é um fator de correção relacionado com a rugosidade do eletrodo e determina a extensão do desvio do modelo de Randle (94,95). Os valores para n_1 variam entre 0 e 1. Quando o valor de n_1 é igual a 1, indicando que o elemento de CPE é um condensador ideal; ao passo que n_1 igual a 0 e 0,5 indica uma resistência e um comportamento Warburg, respectivamente (96,97). Os valores encontrados para n_1 estão entre 0,30 e 0,87 ($n_1 < 1$), indicando que o elemento CPE é um capacitor não ideal.

Os valores dos parâmetros cinéticos ajustados são apresentados na Tabela 7. Os pequenos valores de qui-quadrado (χ^2) sugerem que este modelo de Randle se ajusta adequadamente aos dados experimentais. No RGO/GCE, o circuito equivalente simulado representa a superfície dos GCE modificados com RGO, e neste caso o CPE1 corresponde à interface solução/modificação do eletrodo, e R_{ct} a transferência eletrônica no circuito

equivalente. O CPE2 corresponde à interface modificação/GCE e W representa a difusão por meio da estrutura de RGO. O valor encontrado de CPE1 é muito menor do que o de CPE2, deste modo, a capacitância específica do eletrodo modificado com RGO é considerada como sendo o valor aproximado do CPE2. Neste circuito, elementos distribuídos são utilizados em vez de um condensador, devido à falta de homogeneidade na superfície do eletrodo, Figura 26 (B).

Tabela 7 – Valores dos elementos do circuito equivalente da Figura 26 (B) pela simulação dos espectros de IES da Figura 26 (A).

ELETRODO	ELEMENTO							
	$R_s /$ $\Omega \text{ cm}^2$	$R_{ct} /$ $\Omega \text{ cm}^2$	$CPE /$ μmMho	n_1	$CPE2 /$ μmMho	n_2	$W /$ μmMho	X^2
GCE	43,4	718	2,8	0,87	-	-	1,0	$7,7 \times 10^{-3}$
RGO/GCE	58,1	80,9	33,9	0,77	195	0,33	788	$8,5 \times 10^{-3}$

A aplicação de ondas senoidais de baixa amplitude nos dados experimentais de IES possibilitou a separação de frequências entre controle cinético e transporte de massa à oxirredução dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, permitindo, assim, uma avaliação conveniente de parâmetros cinéticos, livre de complicações do transporte de massa. Sob essas condições, a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) da reação pode ser determinada pela Equação 2 (98):

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{ct} C A_e} \quad \text{Equação (2)}$$

na qual R é a constante física dos gases ($8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); T a temperatura em Kelvin (298 K); F a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}); C a concentração do $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-3}$); A_e é área superficial efetiva em cm^2 (Tabela 6) obtido a partir da Equação 1; e R_{ct} a resistência de transferência de carga obtida com a simulação dos circuitos equivalentes (Tabela 7) obtidos a partir da Figura 26 (A).

A k_{app} calculada para o RGO/GCE ($2,7 \times 10^{-4} \pm 9,1 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$, $n=3$) foi menor do que no GCE ($8,9 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$, $n=3$) aproximadamente 3,3 vezes, indicando que a modificação do eletrodo com RGO influencia positivamente na cinética de transferência eletrônica da interface eletrodo/solução.

O GCE modificado com RGO apresentou a menor R_{ct} ($80,9 \Omega \text{ cm}^2$) em comparação com GCE não modificado ($718 \Omega \text{ cm}^2$), Tabela 7. Estes resultados indicam que a transferência de elétrons é cerca de 8,9 vezes maior quando o GCE é modificado com RGO,

concordando com os resultados observados nos experimentos voltamétricos obtidos para a oxirredução dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$.

Os resultados obtidos até o momento através da caracterização eletroquímica demonstram que a modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente melhora consideravelmente a transferência de elétrons, a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente e as correntes anódica e catódica em comparação com o eletrodo sem modificação, indicando que a modificação com RGO foi realizada com sucesso.

3.3.6 Caracterização da superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido

A morfologia superficial dos eletrodos modificados com GO, RGO e sem modificação (GCE) foi investigada por SEM, EDX, Raman e XPS. Na Figura 27, são apresentadas as imagens de SEM dos eletrodos modificados e sem modificação.

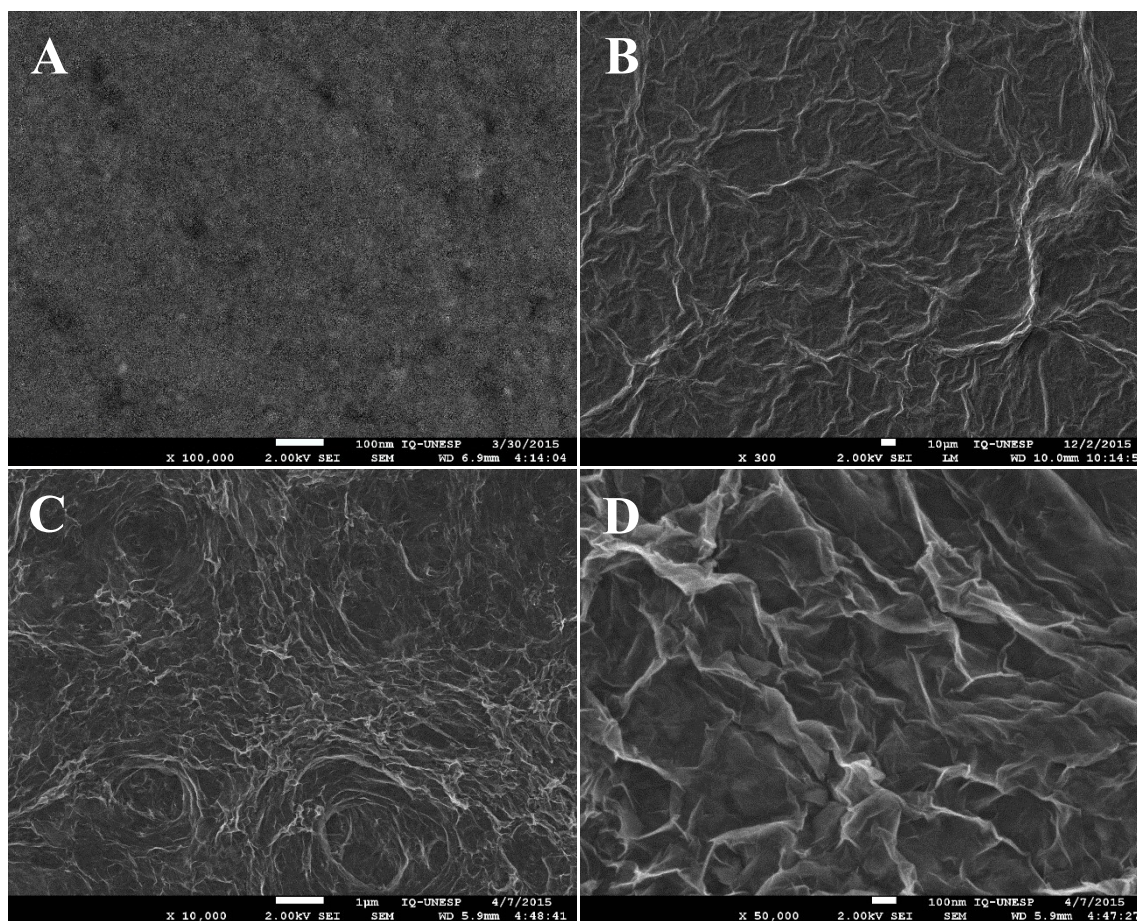


Figura 27 – Imagens de SEM do GCE sem modificação (A), GCE modificado com GO (B), GCE modificado com RGO (RGO/GCE) em (C) baixa e (D) alta resolução.

Na Figura 27 (A), foi observada uma superfície com baixa rugosidade e quase lisa para o GCE sem modificação. Na Figura 27 (B), é apresentada uma imagem do GCE modificado com GO, o qual foi modificado a partir da deposição de 5 μL de GO 0,50 mg L^{-1} em água e esperando-se secar à temperatura ambiente. Na imagem, foi observada a superfície densamente modificada com GO, além disso, pode ser verificado que a rugosidade da superfície aumenta com a modificação.

A modificação do GCE com RGO pode ser observada em baixa e alta resolução na Figura 27 (C e D). Nas imagens, é possível observar a natureza altamente rugosa das folhas de RGO sobre a superfície do GCE devido à superposição das folhas finas de RGO, em uma distribuição aleatória que produz uma superfície enrugada, a qual é altamente favorável a modificações com nanopartículas metálicas. Além disso, em comparação com GO e GCE, o RGO apresenta camadas mais enrugadas em quantidade.

Foram realizadas análises de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) para verificar a composição das modificações realizadas sobre a superfície do GCE. Os espectros obtidos para GCE, GO/GCE e RGO/GCE são apresentados na Figura 28. No espectro do GCE, foi observado apenas o elemento carbono (C), Figura 28 (A).

O espectro do GO/GCE apresentou em sua composição os elementos C, oxigênio (O) e enxofre (S), Figura 28 (B). Carbono e oxigênio são provenientes da estrutura do GO, e enxofre pode ter origem na síntese do GO que utiliza oxidantes fortes, tais como o ácido sulfúrico. Quando o GCE foi modificado com RGO, observou-se no espectro apenas a presença de C e O, Figura 28 (C). Estes resultados indicam que o GCE foi modificado com RGO, e corroboram com os resultados obtidos por SEM.

A espectroscopia Raman foi utilizada como técnica complementar para caracterizar a superfície do GCE sem modificação, e modificado com GO e RGO porque fornece informações sobre os níveis de energia dos materiais estudados. Os espectros de espalhamento Raman para os eletrodos modificados e não modificados são apresentados na Figura 29.

No espectros, foram observadas claramente duas bandas intensas nas amostras em ~ 1328 e ~ 1585 cm^{-1} associadas à banda D (decorrentes do modo respiração dos fônons de ponto K da simetria A_{1g} devido aos defeitos nas bordas) e banda G (banda de defeito devido à dispersão intervalar do fônons E_{2g} de átomos de C sp^2), respectivamente (82,99). A banda 2D em ~ 2650 cm^{-1} (ou banda G') é originada no processo de dupla ressonância que conecta

fônons a estrutura da banda eletrônica e a banda D+G em $\sim 2911 \text{ cm}^{-1}$ é geralmente relacionada a defeitos pontuais do plano basal das arestas, Figura 29.

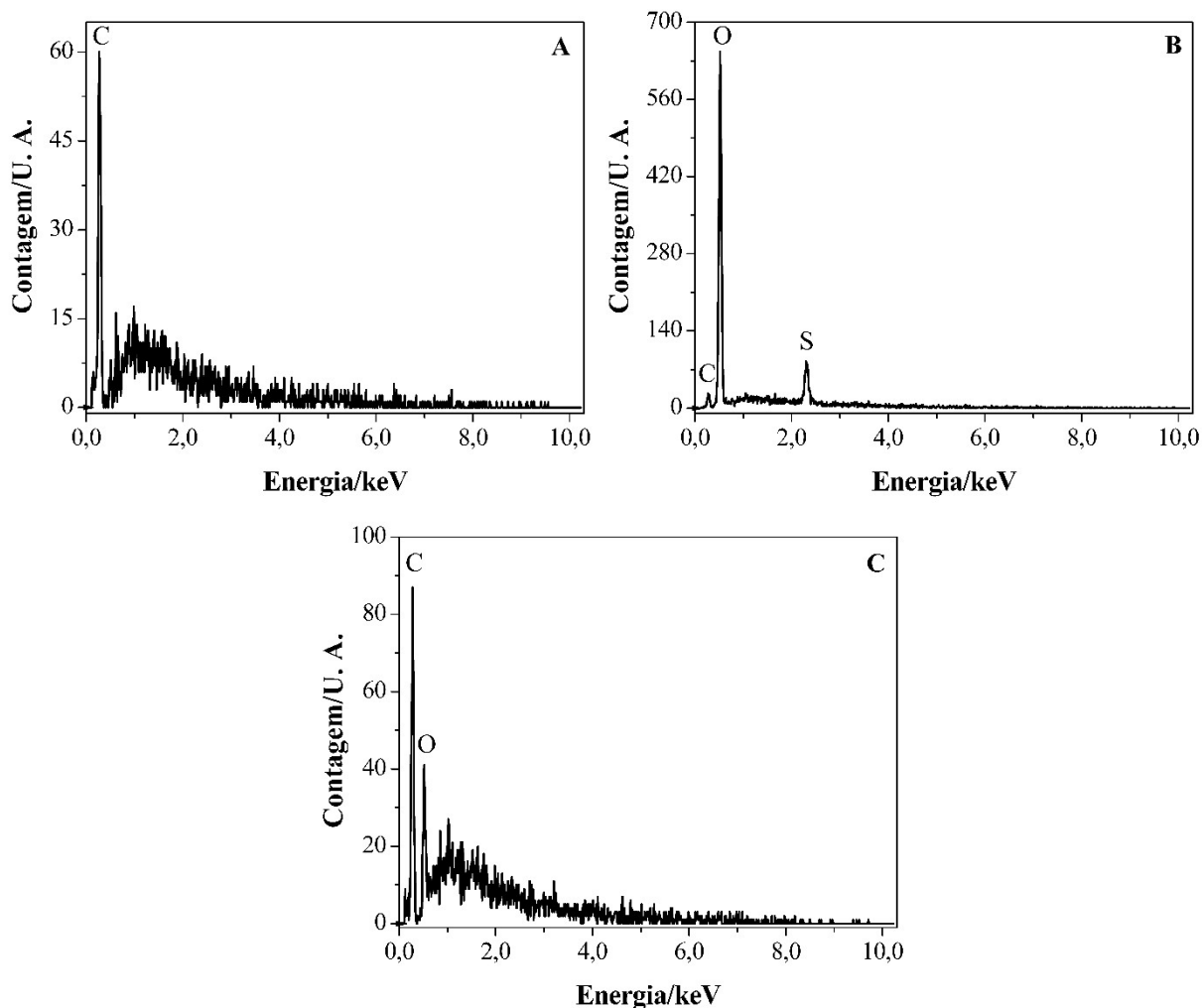


Figura 28 – Espectros de EDX do (A) eletrodo de carbono vítreo sem modificação e modificado com (B) óxido de grafeno (GO/GCE) e (C) óxido de grafeno reduzido (RGO/GCE).

A intensidade da banda D está relacionada ao tamanho dos domínios sp^2 no plano. O aumento da intensidade do pico D indica a formação de mais domínios sp^2 . Além disso, a força relativa da banda D em comparação com a banda G depende fortemente da quantidade de desordem nos materiais gráfiticos (100). O RGO/GCE apresentou uma razão entre as intensidades dos picos D e G (I_D/I_G) de 1,1, a qual foi menor do que no GO/GCE (1,3) e no GCE sem modificação (1,8). Estes resultados indicam que RGO foi reduzido eletroquimicamente sobre a superfície do GCE devido ao maior predomínio das ligações sp^2 na sua superfície em comparação com GO/GCE e GCE, Figura 29.

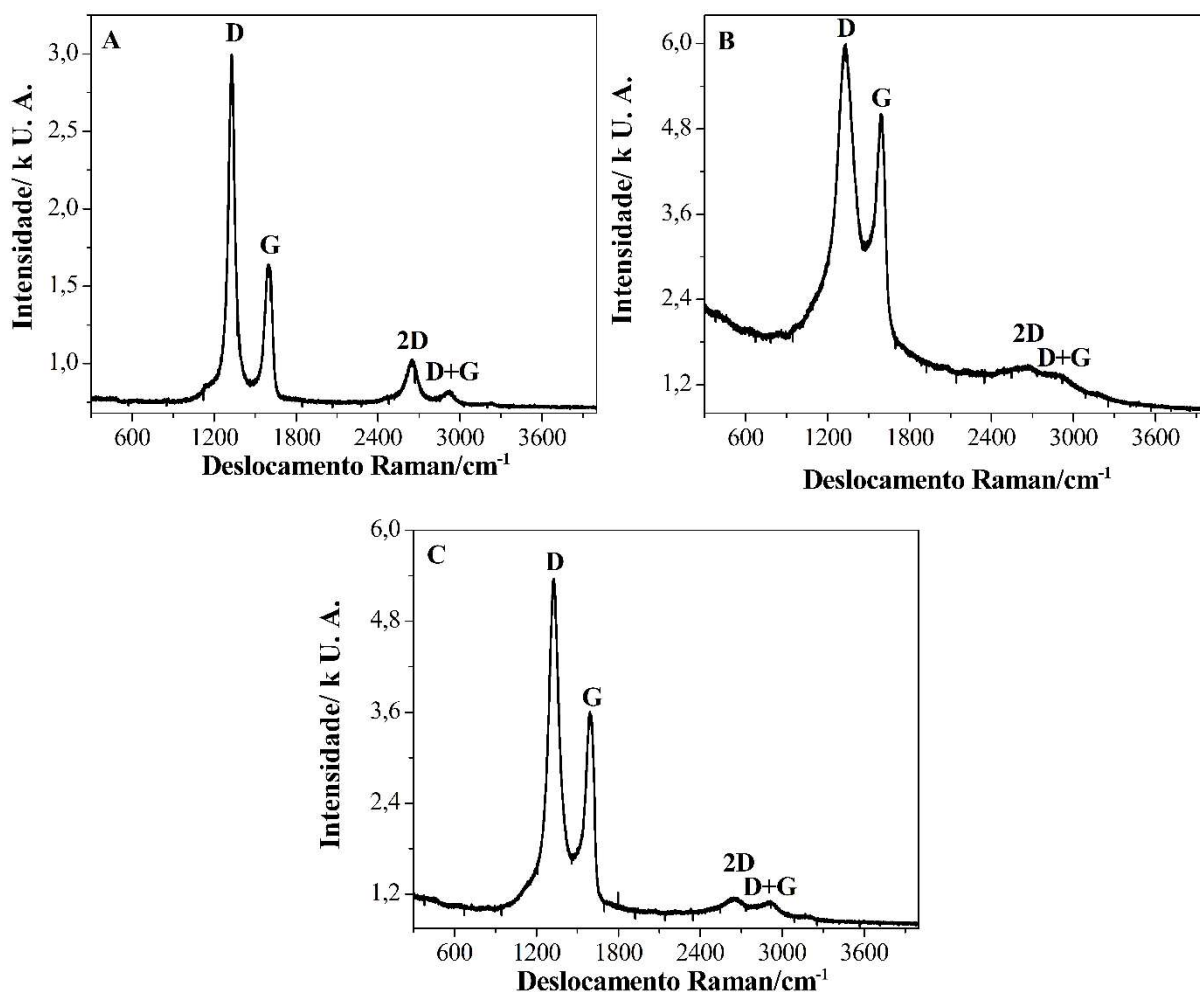


Figura 29 – Espectros de RAMAN dos eletrodos de carbono vítreo sem modificação (A) e modificados com (B) óxido de grafeno (GO/GCE) e (C) óxido de grafeno reduzido (RGO/GCE).

As superfícies dos GO/GCE e RGO/GCE foram caracterizadas por XPS para investigar o nível de oxidação e a natureza das ligações químicas. Os espectros exploratórios de XPS (0 a 1490 eV) para os eletrodos modificados com GO e RGO são apresentados na Figura 30. Os espectros apresentaram principalmente espécies de carbono (C 1s) e oxigênio (O 1s) nas superfícies de GO/GCE e RGO/GCE.

No espectro exploratório de XPS do GO, foram observados dois picos com energias de ligação em 287,4 (C 1s) e 533,6 (O 1s) eV, Figura 30 (A). Após a redução eletroquímica de GO (RGO), os picos foram deslocados e apresentaram energias de ligação em 284,9 (C 1s) e 532,6 (O 1s) eV. Além disso, foi observado um pico de sódio (Na) com energia de ligação em 1072 eV, o qual pode ser proveniente do sulfato de sódio utilizado como eletrólito suporte na eletrodeposição do RGO, Figura 30 (B).

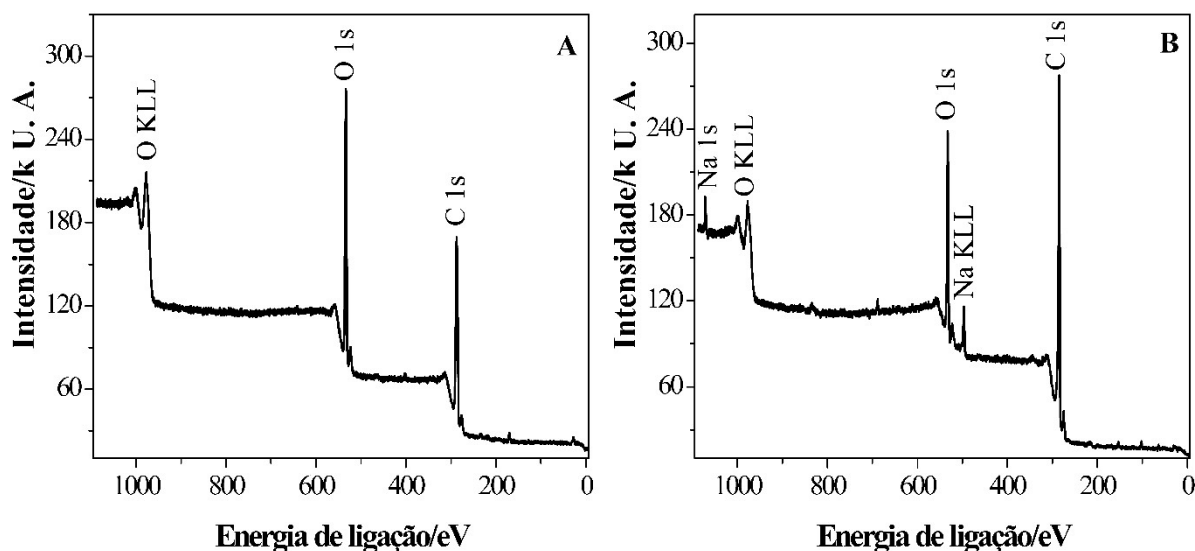


Figura 30 – Espectros exploratórios de XPS dos eletrodos modificados com óxido de grafeno (GO/GCE) e óxido de grafeno reduzido (RGO/GCE).

Os espectros de alta resolução da região de C 1s dos GO/GCE e RGO/GCE podem ser deconvoluídos em cinco componentes correspondentes aos átomos de carbono em diferentes grupos funcionais com energias de ligações em 284,4 ($CC_{\text{aromático}}$), 285,0 (C-H), 286,7 (C-O), 287,7 (C=O) e 288,9 (O-C=O) eV, Figura 31 (82,88,101). Após o processo de redução eletroquímica, o espectro de alta resolução de C 1s do RGO/GCE mostra que as intensidades das componentes dos grupos éteres, epóxidos, ésteres, ácidos carboxílicos e álcoois/grupos fenólicos (C-O, C=O e O-C=O) diminuíram drasticamente em comparação com GO/GCE. Observou-se também que as intensidades da componente aromática sp^2 ($CC_{\text{aromático}}$) aumentou e que a dos grupos de carbono sp^3 (C-H) diminuíram. Além disso, foi observado um pico satélite *shake-up* $\pi \rightarrow \pi^*$ em torno de 290,3 eV para o RGO/GCE. Essa é uma característica de aromático ou sistemas conjugados (88).

O teor de oxigênio foi monitorado através do sinal O 1s, Figura 31. Os espectros de alta resolução da região de O 1s dos GO/GCE e RGO/GCE podem ser deconvoluídos em três componentes correspondentes aos átomos de oxigênio em diferentes grupos funcionais com energias de ligações em 531,4 (C=O), 532,5 (C-O) e 533,7 (O-C=O) eV. Uma componente com energia de ligação em 535,5 (Auger Na) eV foi observada para o RGO/GCE. Tal componente pode ser do sulfato de sódio utilizado, conforme explicação anterior.

A análise quantitativa de XPS a partir dos espectros de alta resolução na região de C1s mostrou que a concentração de oxigênio diminuiu de 51,3 at.% (GO/GCE) para 21,2 at.% (RGO/GCE); a concentração de carbono aumentou de 48,7 at.% (GO/GCE) para 78,8 at.%

(RGO/GCE); e a razão atômica O/C do RGO/GCE (0,27 %) diminuiu aproximadamente 4,1 vezes em comparação com GO/GCE (1,1 %) após a redução eletroquímica. Estes resultados são consistentes com a pequena quantidade de elementos de oxigênio observados no espectro de EDX para RGO/GCE em comparação com GO/GCE.

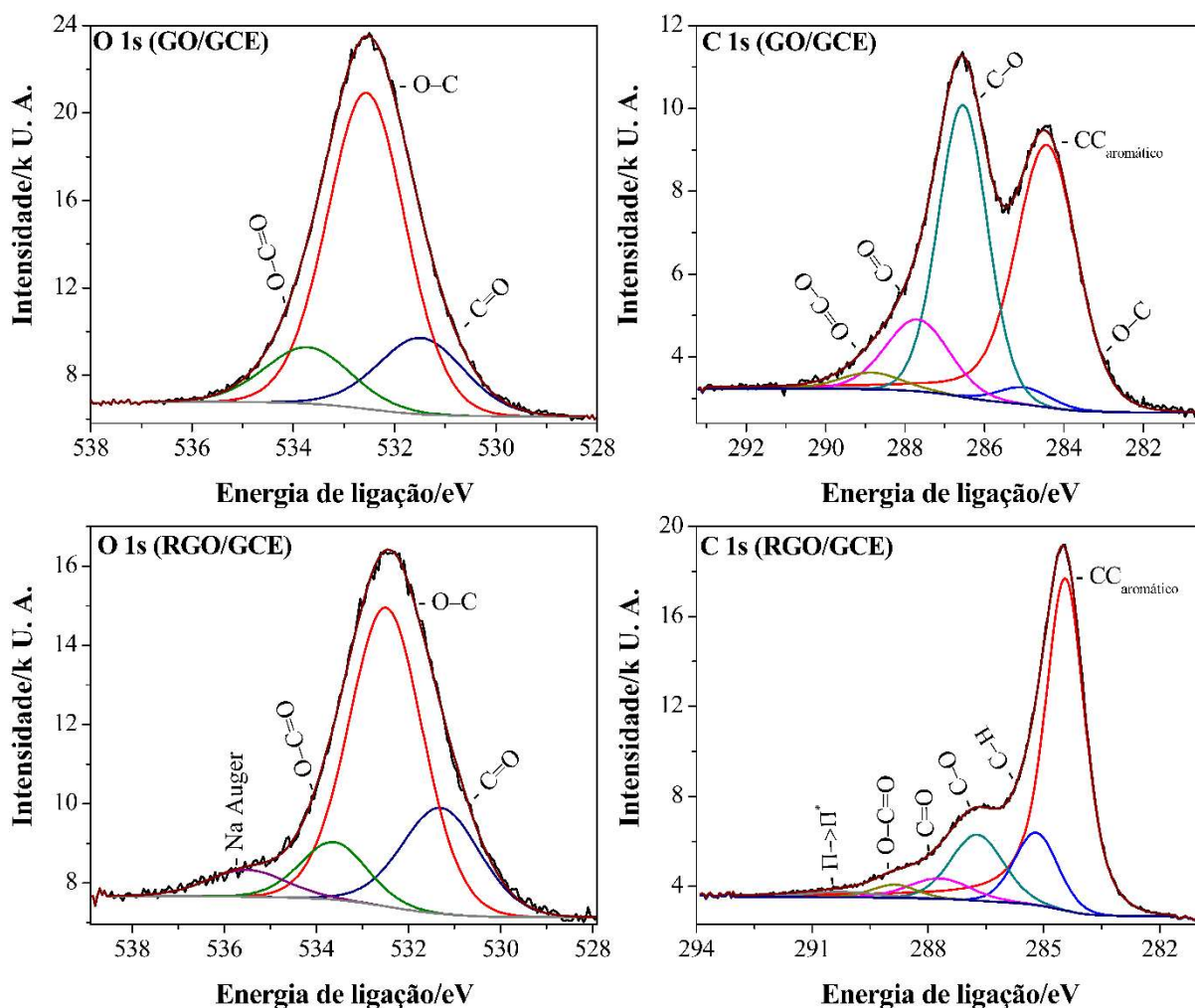


Figura 31 – Espectros de alta resolução de XPS das regiões de O 1s e C 1s com suas deconvoluções para o GO/GCE e RGO/GCE.

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente através dos métodos de deposição de óxido de grafeno e subsequente redução eletroquímica, e redução eletroquímica simultânea com nanopartículas metálicas por voltametria cíclica e amperometria, não foram eficientes para oxirredução dos aminoácidos estudados.

Um método simples para a eletrodeposição de óxido de grafeno reduzido sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi desenvolvido com sucesso através da técnica de amperometria aplicando potencial de -1,4 V por 500 s a partir de uma suspensão aquosa contendo óxido de grafeno 0,50 mol L⁻¹ e sulfato de sódio 0,10 mol L⁻¹.

O filme de óxido de grafeno reduzido melhorou significativamente a transferência eletrônica e a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente do par redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em comparação com o GCE sem modificação.

A modificação do GCE com óxido de grafeno reduzido foi confirmada através dos estudos morfológicos. As técnicas de SEM e EDX indicaram que a superfície do GCE foi modificada com um material a base de óxido de grafeno. A espectroscopia Raman indicou que houve uma mudança química e estrutural durante a redução eletroquímica de GO para RGO. As análises de XPS confirmaram que o teor de oxigênio presentes no GO foram reduzidos durante o processo eletroquímico de redução para RGO.

Portanto, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado com óxido de grafeno reduzido com sucesso, e o eletrodo modificado se apresenta como uma excelente plataforma para modificação com nanopartículas metálicas para detecção dos aminoácidos.

CAPÍTULO IV. OXIDAÇÃO ELETROCATALÍTICA DE AMINOÁCIDOS EM ELETRODO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.1 INTRODUÇÃO

Muito esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de métodos analíticos simples e sensíveis para a determinação de aminoácidos. Isso ocorre em virtude de estes analitos serem blocos construtores essenciais de moléculas biológicas e estarem intimamente relacionados às atividades biológicas dos organismos vivos (102,103). Os aminoácidos também são considerados de grande interesse nos campos clínico, nutricional e biotecnológico (16,26). Apesar da sua inegável relevância, a detecção de aminoácidos através dos métodos fotométricos e fluorométricos tradicionais não é uma tarefa simples devido à falta de cromóforos fortes e fluoróforos, respectivamente. Devido a estes fatores, métodos eletroquímicos, principalmente os que não utilizam sensores não enzimáticos, foram extensivamente aplicados na detecção viável de aminoácidos, uma vez que eles não são dependentes de cromóforos fortes e fluoróforos (16,26,103).

Recentemente, foi publicada uma série de trabalhos relatando o uso de nanomateriais como catalisadores em superfícies de eletrodos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, visto que esses materiais apresentam grande área superficial específica, atividade catalítica e condutividade, e elevada razão superfície/volume (57,58,104). Para amplificar a detecção eletroquímica, os nanomateriais podem ser usados diretamente como materiais de eletrodo ou adesivos catalíticos ou associarem-se com polímero termo sensível para projetar um processo eletrocatalítico térmico comutável (105–107). Até o momento, vários tipos de materiais funcionais, tais como o complexo de níquel-curcumina (102), nanopartículas (NPs) de cobre (CuNPs) (108) e CoNPs (104,109,110) foram utilizados para a detecção de aminoácidos devido às suas propriedades eletrocatalíticas efetivas e confiáveis (103).

As nanopartículas metálicas têm sido amplamente estudadas como resultado de seus múltiplos usos que as tornam adequadas para aplicação em uma ampla gama de áreas. Entre essas áreas de aplicação, incluem-se a sua utilização na determinação da hidrazina através de métodos eletroquímicos e na aplicação bioquímica devido à sua eficácia antimicrobiana (111). Entre os metais precursores das nanopartículas metálicas, a prata se tornou, essencialmente,

uma alternativa promissora e viável em relação a outros metais, em grande parte, como resultado de sua maior abundância, baixo custo e biocompatibilidade. Na busca de uma superfície estável, que é crucial para a química eletroanalítica, vários métodos de síntese de nanopartículas de prata foram desenvolvidos (112).

Além das nanopartículas metálicas, é evidente que o grafeno tornou-se um dos materiais mais intensamente estudados nos últimos tempos devido à sua monocamada carbônica aromática hibridizada sp^2 que é responsável pela formação de cristais 2D (82,113). O grafeno é o bloco de construção de outras espécies de carbono, e sua estrutura atraiu grande atenção devido às suas propriedades elétricas, ópticas e mecânicas únicas, mostrando aplicações promissoras em campos científicos e tecnológicos (77,82,114). As características cruciais do grafeno, que incluem suas propriedades únicas de transporte eletrônico, alta área de superfície e baixo custo, tornaram-se particularmente atraentes e um produto de grande interesse para pesquisa e desenvolvimento de nanomateriais depositados em grafeno considerados adequados para a fabricação de sensores eletroquímicos com propriedades únicas (78,115,116).

Inicialmente, as nanopartículas metálicas foram propostas com o objetivo de separar as folhas de grafeno, mas, atualmente, foi descoberto que a eletrodeposição de nanopartículas metálicas em folhas de grafeno potencialmente desdobra uma nova maneira de desenvolver novos materiais catalíticos, magnéticos e optoeletrônicos (77). Além disso, a intercalação entre folhas de grafeno e nanopartículas metálicas evita a aglomeração de grafeno e contribui para melhorar a condutividade do eletrodo resultante como consequência da elevada área de superfície (77,117).

Algumas modificações com nanopartículas e grafeno, tais como CoNPs/grafeno/GCE (104), Fe_3O_4 -GO (103), nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 /pontos quânticos de grafeno (Fe_3O_4 MNP-GQDs) (118), filme compósito de Nafion/ TiO_2 -grafeno (119), e GO/AuNPs (120) foram desenvolvidas e aplicadas para a detecção de aminoácidos. Neste trabalho, foi desenvolvido um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata com o objetivo de estudar os parâmetros físico-químicos do eletrodo e sua resposta eletrocatalítica na presença de aminoácidos.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Soluções e reagentes

Todas as soluções utilizadas nos experimentos eletroquímicos foram preparadas com reagentes com alto grau de pureza analítica e água deionizada ultrapura (Milli-Q). Óxido de grafeno (GO, 4 mg mL⁻¹), nitrato de prata (AgNO₃ 99 %), aminoácidos (glicina ≥ 99 %, L-alanina ≥ 98 %, ácido L-aspártico ≥ 98 %, ácido L-glutâmico 99 %, L-leucina ≥ 98 %), solução de hidróxido de sódio (NaOH, 50-52 % em H₂O), sulfato de sódio (Na₂SO₄ ≥ 99 %), nitrato de sódio (NaNO₃ ≥ 99 %) e ácido nítrico (HNO₃ ≥ 65 %) foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich.

4.2.2 Instrumentação

Um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-30 (Eco Chemie B.V.) instalado com o programa NOVA 1.11 foi usado para as medidas eletroquímicas, e a EIS foi realizada utilizando o módulo FRA. As caracterizações por EIS e CV foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de 25 mL contendo três eletrodos controlados pelo software. O eletrodo de trabalho foi preparado com a modificação de um eletrodo de carbono vítreo (GCE, área geométrica: 0,07 cm²) modificados com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata (AgNPs-RGO/GCE). Os eletrodos de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e fio de platina (0,3 mm × 4,0 cm) foram utilizados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C).

As espectroscopias Raman, XPS e EDX, e a SEM foram realizadas de acordo com a Seção 3.2.2 do Capítulo III.

4.2.3 Modificação do eletrodo com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata

Antes de eletrodeposição, o GCE (3,0 mm de diâmetro) foi imerso em ácido nítrico (20 % w/w) durante 5 min para remover as impurezas da superfície do eletrodo. Em seguida, a superfície do GCE foi polida em uma suspensão de α -alumina em pó (0,3 μ m) sobre um feltro de polimento, subsequentemente, foi lavado com água ultrapura.

Uma suspensão de $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada para eletrodeposição de GO na superfície de GCE (RGO/GCE) aplicando potencial de $-1,4 \text{ V}$ e tempo de eletrodeposição de 500 s . Em seguida, as AgNPs foram eletrodepositadas na superfície do RGO/GCE em duas etapas. Na primeira etapa, a prata foi eletrodepositada na superfície do RGO/GCE com aplicação de potencial e tempo constantes utilizando amperometria. E na segunda etapa, a prata metálica (Ag) foi oxidada a óxido de prata (AgO) por CV, utilizando varreduras sucessivas.

As AgNPs foram eletrodepositadas a partir de uma solução precursora de nitrato de prata em ácido nítrico contendo nitrato de sódio. O potencial, o tempo, a concentração e o eletrólito suporte (mistura de ácido nítrico e nitrato de sódio) da solução de prata utilizados na eletrodeposição foram otimizados.

Após a eletrodeposição do metal, os eletrodos foram lavados com água, e submetidos a varreduras sucessivas em uma solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em um intervalo de potencial de $-0,40$ a $0,90 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Comportamento eletroquímico da prata sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido

Inicialmente, foi realizado o estudo do comportamento eletroquímico da prata sobre a superfície do RGO/GCE por CV. Foram utilizadas soluções de nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e a mistura destes (nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) contendo AgNO_3 em $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos da prata sobre a superfície do RGO/GCE foram realizados na faixa de potencial de $-0,60$ a $1,2 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos do estudo do comportamento eletroquímico da prata na superfície do RGO/GCE são apresentados na Figura 32.

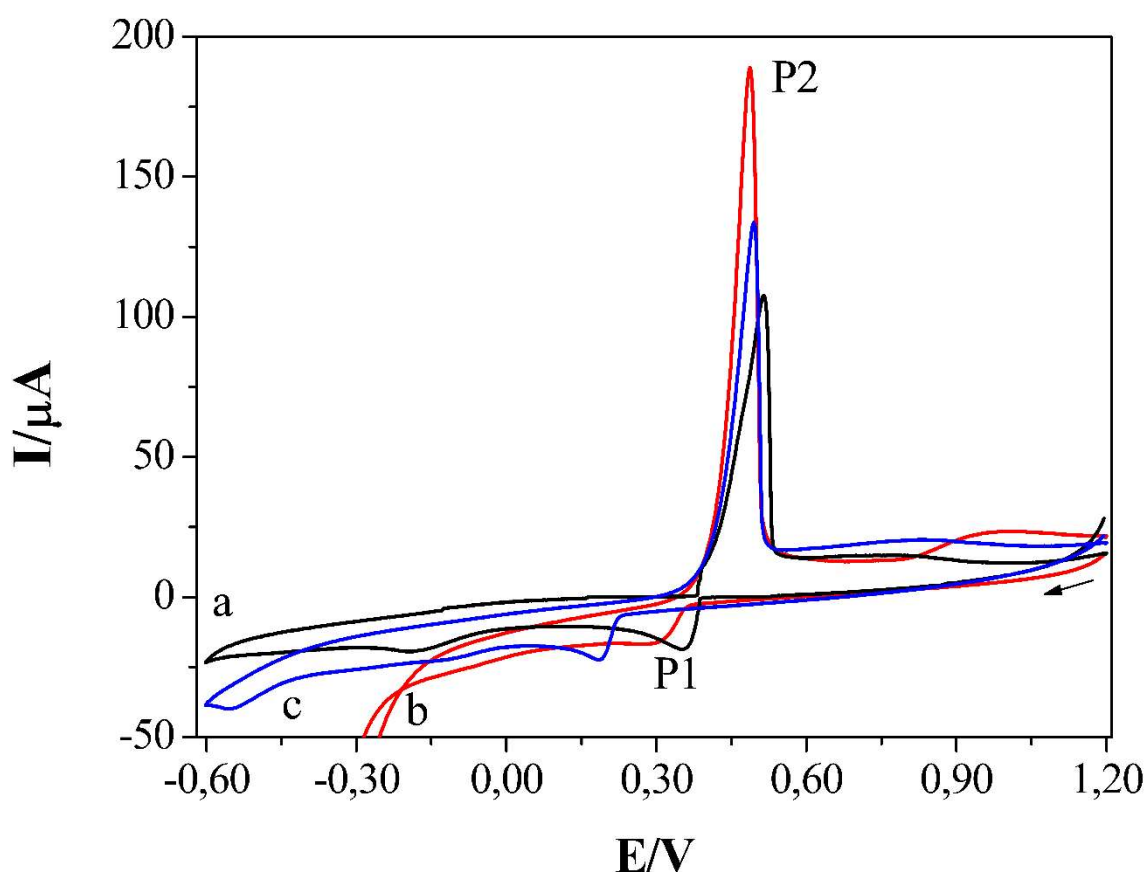


Figura 32 – Voltamogramas cíclicos de nitrato de prata $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de (a) nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, (b) ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e (c) nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ + ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

Nos voltamogramas, foi observada a presença de um par de picos redox P1/P2 bem definidos, os quais podem ser atribuídos a reação quasi-reversível do par redox $\text{Ag}^{1+}/\text{Ag}^0$, Figura 32. O pico P1 surgiu à medida que o potencial foi deslocado para regiões catódicas, que foi atribuído à redução de Ag^+ para Ag^0 , Equação 3. O pico P2 surge na região de varredura anódica e foi atribuído à oxidação de Ag^0 a Ag^+ , Equação 4. O pico P2 mostrou a melhor corrente de pico anódico em ácido nítrico (180 μA em 0,49 V) em comparação com a mistura de ácido + sal (124 μA em 0,49 V) e nitrato de sódio (98 μA em 0,51 V).



Um dos objetivos desse estudo foi avaliar o meio mais adequado para eletrodeposição das nanopartículas de prata na superfície RGO/GCE. Portanto, foi observado que a prata apresentava menor potencial de redução na solução de ácido nítrico contendo nitrato de sódio (0,19 V) em comparação com as soluções de ácido nítrico (0,31 V) e nitrato de sódio (0,36 V), Figura 32. A partir deste resultado, pode-se inferir que a eletrodeposição da prata na superfície do RGO/GCE deve ocorrer em potencial de eletrodeposição inferior a 0,19 V em uma mistura de ácido nítrico com nitrato de sódio.

4.3.2 Otimização da eletrodeposição das nanopartículas de prata sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido

A formação das AgNPs na superfície do eletrodo é influenciada diretamente pelo potencial (E), tempo e concentração do sal metálico (AgNO_3) utilizados na eletrodeposição. Estes fatores influenciam diretamente no tamanho, características morfológicas, atividade electrocatalítica das nanopartículas e propriedades físico-químicas das NPs. O potencial de redução afeta a forma das nanopartículas preparadas. O tempo permite a possibilidade de controlar o tamanho e a cobertura de nanoestruturas eletrodepositadas. A concentração do sal de prata influencia diretamente o tamanho, assim como o tempo, e a quantidade de NPs eletrodepositadas na superfície do eletrodo (56,121). Além disso, para conduzir a nucleação homogênea das NPs em solução, após a eletrodeposição é importante produzi-las em uma elevada concentração de hidroxilas, evitando, assim, a agregação das NPs durante a etapa de conversão das NPs metálica em NPs oxidadas.

Primeiramente, um estudo sobre a eletro-oxidação da glicina utilizando CV foi realizado empregando um GCE modificado com RGO contendo AgNPs (AgNPs-RGO/GCE).

As nanopartículas foram eletrodepositadas aplicando potencial de 0,20 V por 90 s a partir de uma solução de AgNO_3 $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em nitrato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ácido nítrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando a técnica de amperometria. Posteriormente, as AgNPs foram oxidadas em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de -0,40 a 0,90 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} por CV.

Os voltamogramas cíclicos do AgNPs-RGO/GCE na presença e ausência de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 33. No voltamograma do eletrodo modificado na ausência de glicina foram observados cinco picos, sendo três picos anódicos e dois catódicos. Na presença de glicina, foram observados seis picos (três anódicos e três catódicos) com intensidades de corrente maiores. Os potenciais foram deslocados na presença de glicina em comparação com os potenciais na ausência de glicina, com exceção do pico em 0,29 V que não foi deslocado, e do pico em 0,51 V que surgiu apenas na presença de glicina. Os valores dos potenciais e correntes dos picos anódicos (PA) e catódicos (PC) são apresentados na Tabela 8.

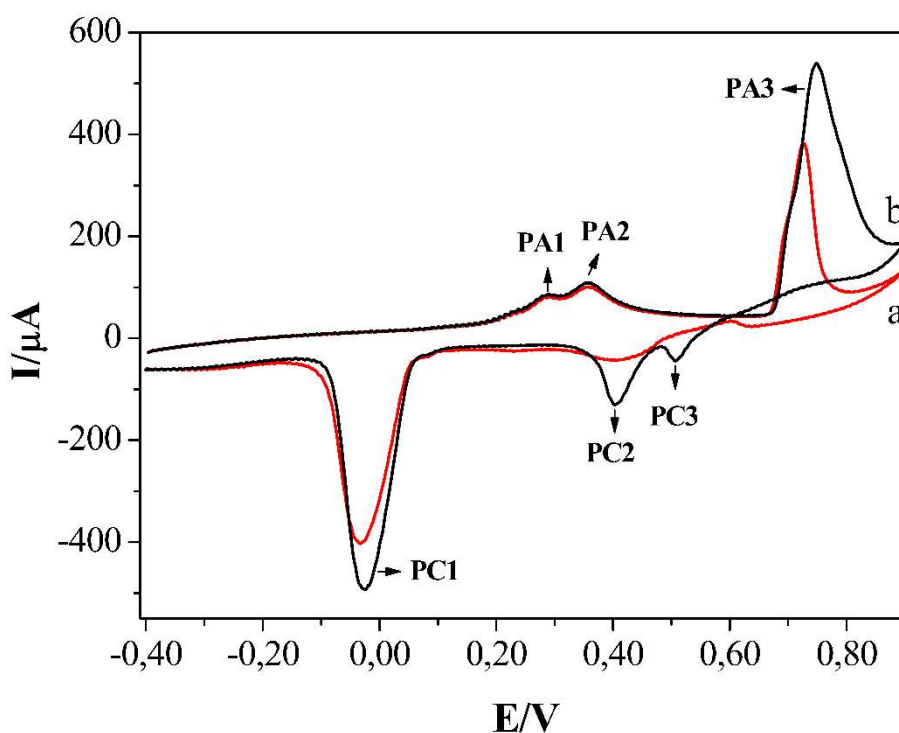


Figura 33 – Voltamogramas cíclicos do RGO/GCE contendo AgNPs em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (a) e na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ (b) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Os picos PA1 e PA2 apresentaram um pequeno ganho de corrente na presença de glicina. No entanto, não indica que houve ocorrência de eletro-oxidação da glicina nestes

potências. Nos picos PA3, PC1, PC2 e PC3 foram observados ganhos significativos de corrente em comparação com os picos PA1 e PA2. Entre estes picos, o PA3 apresentou um ganho de corrente de aproximadamente 1,7, 1,9 e 3,8 vezes maior do que nos picos PC1, PC2 e PC3. Portanto, a eletro-oxidação da glicina foi monitorada através do pico PA3 por se apresentar mais sensível em relação aos outros picos.

Tabela 8 – Parâmetros voltamétricos do AgNPs-RGO/GCE na ausência e presença de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ (Figura 33).

Picos	NaOH 0,10 mol L ⁻¹		Glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹		$\Delta I/\mu A^*$
	E/V	I/ μA	E/V	I/ μA	
PA1	0,29	52,9	0,29	55,4	2,5
PA2	0,36	69,8	0,35	73,2	3,4
PA3	0,73	334,8	0,75	491,1	156,3
PC1	-0,033	-362,3	-0,025	-455,0	-92,7
PC2	0,42	-36,6	0,40	-117,8	-81,2
PC3	-	-	0,51	-41,4	-41,4

* ΔI = Corrente de pico na presença de glicina - corrente de pico na ausência de glicina.

Após o estudo preliminar sobre a eletro-oxidação da glicina utilizando o eletrodo modificado com AgNPs, o tempo, o potencial de eletrodeposição, e as concentrações de nitrato de prata, nitrato de sódio e ácido nítrico foram otimizados utilizando a técnica de amperometria (Figura 34). Os potenciais de eletrodeposição estudados foram definidos a partir da Figura 32. A atividade eletrocatalítica do AgNPs-RGO/GCE foi avaliada através de uma solução de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em NaOH 0,10 mol L⁻¹ utilizando a técnica de CV.

O estudo do potencial foi realizado a partir de uma solução de AgNO₃ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,10 mol L⁻¹ contendo HNO₃ 0,10 mol L⁻¹ por amperometria aplicando potenciais de eletrodeposição de 0,0 a 0,40 V por 90 s, Figura 34 (A). Foi observado um aumento da corrente de oxidação da glicina com o aumento do potencial de eletrodeposição das AgNPs de 0,0 a 0,20 V devido, possivelmente, ao aumento das nanopartículas na superfície do RGO/GCE na Figura 34 (A). No entanto, a partir de 0,20 V, as nanopartículas começam a perder as características de nanomaterial, e a resposta da oxidação da glicina diminui em função do potencial. Sendo assim, o potencial de eletrodeposição de 0,20 V foi selecionado para eletrodeposição das AgNPs.

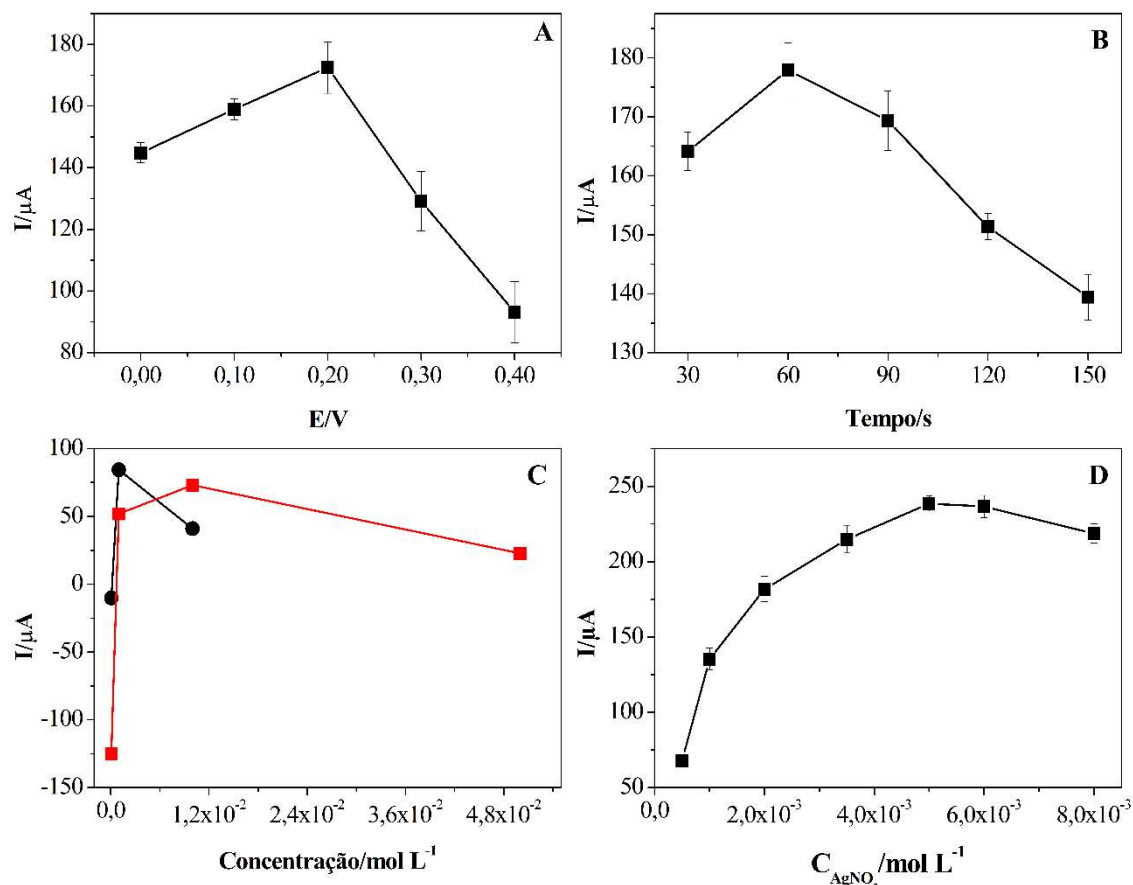


Figura 34 – Otimização da eletrodeposição das nanopartículas de prata sobre a superfície do RGO/GCE ($n=3$). Curvas da resposta electrocatalítica de glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em NaOH $0,10$ mol L⁻¹ em função do (A) potencial de eletrodeposição (E), (B) tempo de eletrodeposição, (C) composição do eletrólito suporte contendo ácido nítrico (-■-) e nitrato de sódio (-●-), e (D) concentração de nitrato de prata (C_{AgNO_3}).

Na Figura 34 (B), é apresentado o efeito do tempo de eletrodeposição das AgNPs sobre a superfície do RGO/GCE. O estudo foi realizado a partir de uma solução de AgNO_3 $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em NaNO_3 $0,10$ mol L⁻¹ contendo HNO_3 $0,10$ mol L⁻¹ aplicando potencial de eletrodeposição de $0,20$ V. Os tempos de eletrodeposição estudados foram variados de 10 a 150 s. Foi observado que as nanopartículas eletrodepositadas sobre o RGO/GCE no tempo de 60 s apresentaram o melhor resultado para a eletro-oxidação da glicina. Em tempos maiores, essas nanopartículas provavelmente estavam perdendo as características de nano sobre o material, influenciando diretamente na razão área-volume e, conseqüentemente, na melhoria das respostas.

Foram avaliados os efeitos das concentrações de NaNO_3 no intervalo de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e HNO_3 na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em uma solução de AgNO_3 $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ aplicando potencial de eletrodeposição de $0,20$ V por 60 s. A Figura 34 (C)

apresenta os resultados obtidos para o estudo. Os melhores resultados foram obtidos em NaNO_3 $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e ácido nítrico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ provavelmente devido a maior cobertura da superfície e a formação de nanopartículas mais homogêneas.

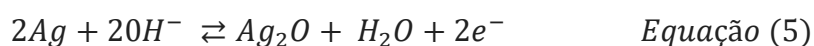
A concentração de AgNO_3 foi avaliada no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ contendo HNO_3 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ aplicando potencial de eletrodeposição de 0,20 V por 60 s. Os resultados do efeito da concentração de AgNO_3 são apresentados na Figura 34 (D). Foi observado que as correntes de oxidação da glicina aumentaram em função da concentração de AgNO_3 até $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, a corrente estiliza e começa a diminuir, provavelmente, devido à formação de um filme fino. Assim, a concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada.

A otimização destes parâmetros buscou as condições que fornecessem melhores respostas para glicina. Portanto, as condições ótimas de eletrodeposição selecionadas para formação das nanopartículas de prata na superfície do RGO/GCE foram: potencial de eletrodeposição de 0,20 V, tempo de 60 s e concentração de nitrato de prata $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido nítrico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contendo nitrato de sódio $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

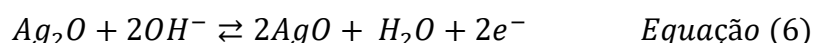
4.3.3 Comportamento eletroquímico da superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata

Na Figura 35, são ilustrados os voltamogramas cíclicos consecutivos da oxidação eletroquímica das nanopartículas metálicas de prata sobre a superfície de RGO/GCE em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Nos voltamogramas, foram observados sete picos realizados no intervalo de potencial de -0,40 V a 0,90 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , Figura 35 (B). Estes picos podem ser atribuídos a uma série de processos redox entre $\text{Ag}(0)$ e óxidos de prata.

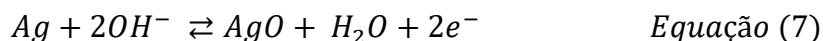
Na varredura de potencial anódico, o AgNPs-RGO/GCE apresentou quatro picos (A1, A2, A3 e A4) nos potenciais de 0,21, 0,28, 0,37 e 0,75 V, respectivamente, Figura 35 (B). O primeiro pico anódico (A1) foi atribuído à eletroformação da monocamada Ag_2O em condições alcalinas de acordo com a seguinte reação:



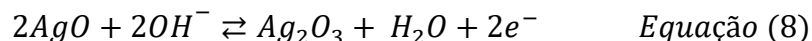
O pico anódico A2 foi associado com a oxidação de Ag_2O para AgO ou a oxidação direta de Ag para AgO , de acordo com as seguintes reações:



ou



O pico anódico (A3) foi atribuído à oxidação de prata (0) para prata (I) (122), e o pico (A4) foi relacionado à oxidação do AgO para Ag_2O_3 de acordo com a reação (123):



Na varredura de potenciais catódicos, foram observados três picos (C1, C2 e C3) nos potenciais 0,42, 0,06 e -0,08 V, respectivamente. O primeiro pico catódico (C1) é atribuído à redução de Ag_2O_3 a AgO; o pico C2 é relacionado à redução de AgO a Ag_2O ; e o pico (C3) é relacionado à redução de Ag_2O a Ag (124), Figura 35 (B).

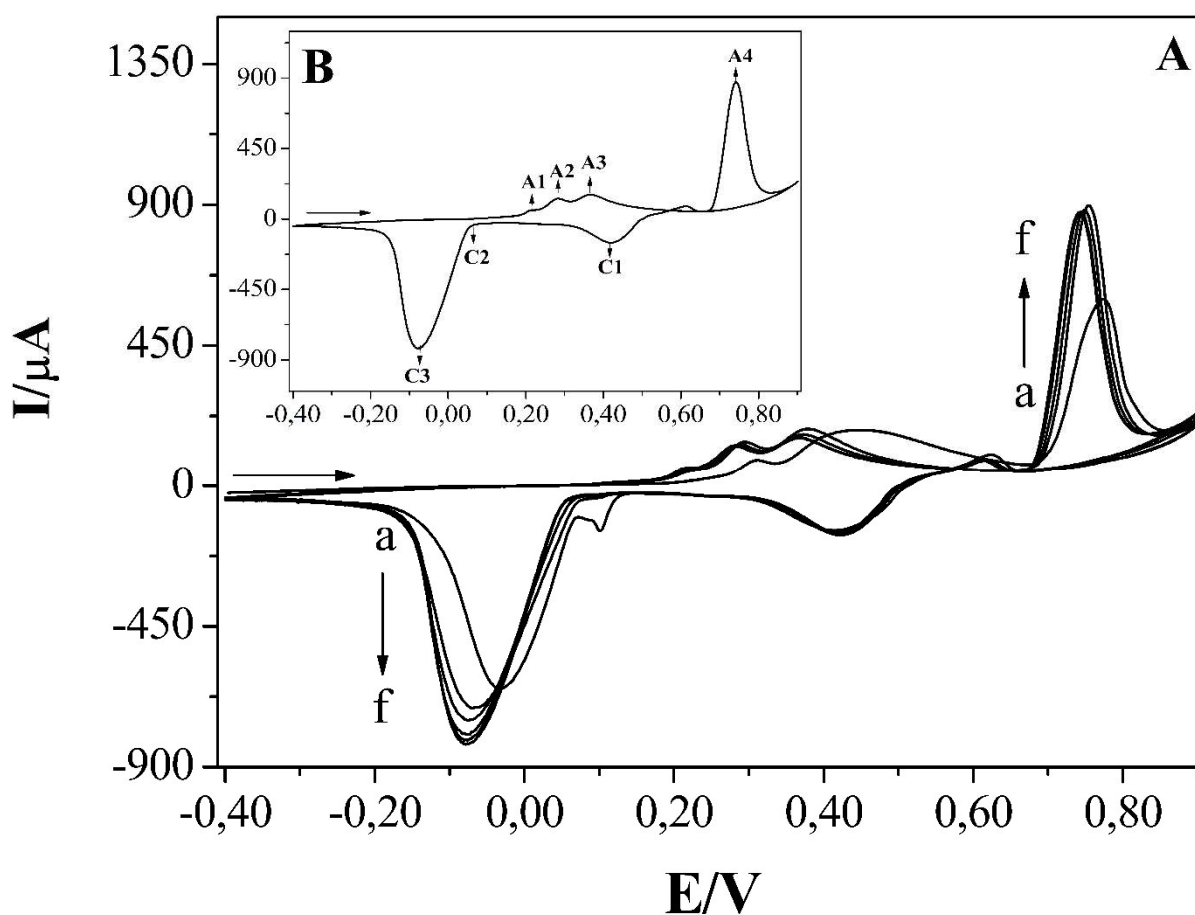


Figura 35 – (A) Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das AgNPs sobre a superfície RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: (a) 1º ciclo, (b) 3º ciclo, (c) 5º ciclo, (d) 10º ciclo, (e) 13º ciclo e (f) 15º ciclo no intervalo de potencial de 0,40 a 0,90 V. (B) 15º voltamograma ciclo da oxidação das AgNPs.

A Figura 36 apresenta voltamogramas cíclicos do AgNPs–RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ no intervalo de velocidade de varredura de 10 a 700 mV s⁻¹. Foi observada a presença de cinco picos bem definidos (A1, A2, A3, C1 e C3). Os picos catódicos

e anódicos responderam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 300 mV s^{-1} , indicando que a eletro-oxidação é controlado por difusão, Figura 37. Na Tabela 9, são apresentados os parâmetros obtidos a partir das correlações lineares das correntes de picos anódicos e catódicos com a raiz quadrada das velocidades a partir da Figura 37.

O pico C2 foi observado a partir de 100 mV s^{-1} , e a corrente de pico exibiu um comportamento linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$) até 300 mV s^{-1} , indicando que a eletro-oxidação de prata está sob controle difusional, Figura 37. Estes resultados mostram claramente que a conversão de AgO para Ag₂O ocorre em altas velocidades; e, em baixas velocidades de varredura, este processo de redução é impossível de ser observado.

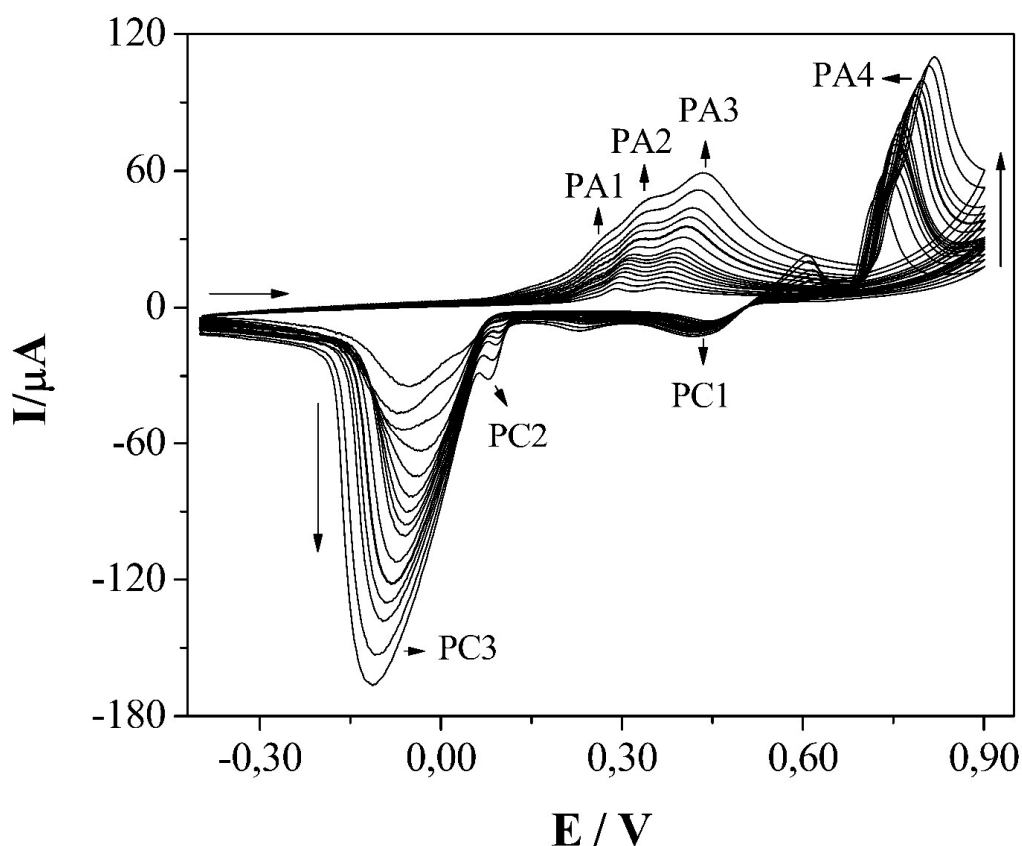


Figura 36 – Voltamograma cíclico do estudo de velocidade de varredura no intervalo de 10 a 700 mV s^{-1} do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L^{-1} .

O potencial de pico médio para A4 e C1 tem o valor de 0,60 V e o potencial de separação pico-a-pico (ΔE_p , com velocidade de varredura de 90 mV s^{-1}) é de 0,35 V. A transição redox envolvida, neste caso, é atribuída às espécies Ag(II)/Ag(III). O potencial de

separação pico-a-pico é desviado do valor teórico de zero e aumenta em velocidades de varreduras maiores, indicando uma limitação na cinética de transferência de carga decorrente de interações químicas entre os íons do eletrólito e a modificação, além de fatores eletrostáticos dominantes e/ou sítios não equivalentes presentes na modificação.

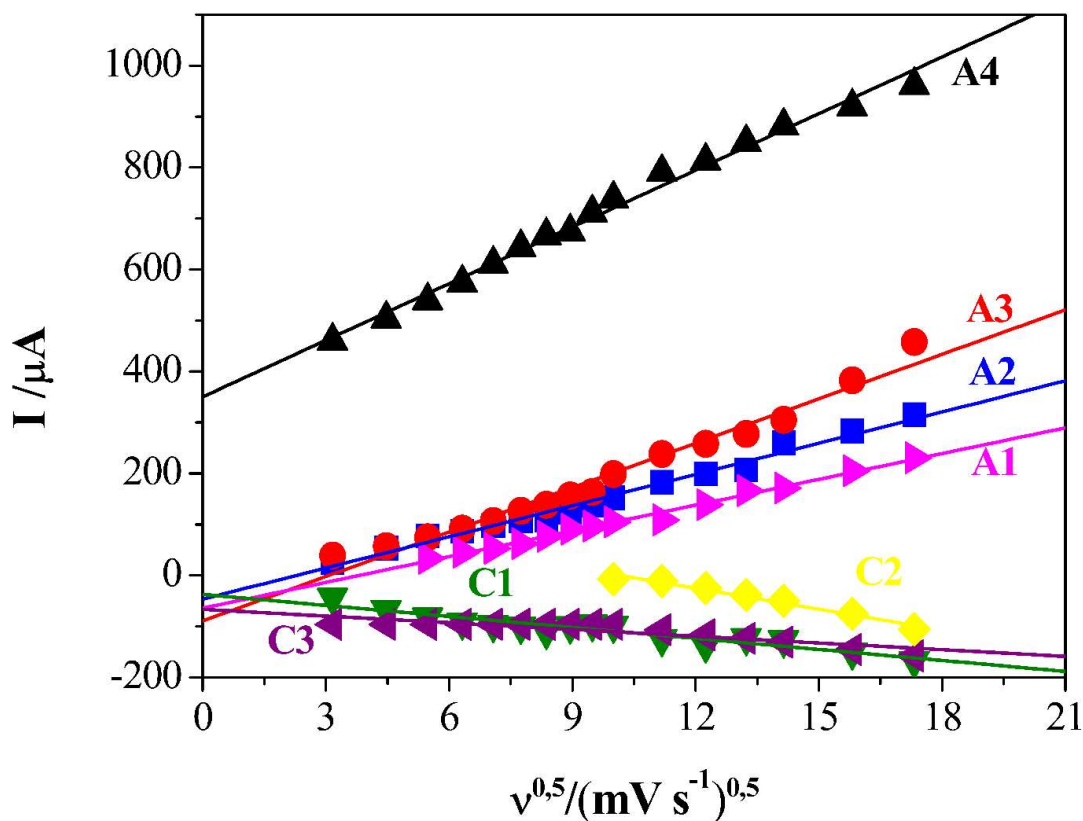


Figura 37 – Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$) nas correntes de picos anódicos e catódicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹.

Tabela 9 – Parâmetros obtidos a partir das correlações lineares obtidas na Figura 37.

Pico	Faixa Linear (mV s ⁻¹) ^{0,5}	Equação da Regressão Linear	Coefficiente de Correlação
A1	5,5 a 17,3	$y = -6,4 \times 10^{-5} + 1,7 \times 10^{-5}x$	0,996
A2	3,2 a 17,3	$y = -4,7 \times 10^{-5} + 2,0 \times 10^{-5}x$	0,993
A3	3,2 a 17,3	$y = -8,9 \times 10^{-5} + 2,9 \times 10^{-5}x$	0,987
A4	3,2 a 17,3	$y = 3,5 \times 10^{-4} + 3,7 \times 10^{-5}x$	0,995
C1	3,2 a 17,3	$y = -3,7 \times 10^{-5} - 7,2 \times 10^{-6}x$	0,951
C2	10 a 17,3	$y = 1,4 \times 10^{-4} - 1,4 \times 10^{-5}x$	0,986
C3	3,2 a 17,3	$y = -6,6 \times 10^{-5} + 4,4 \times 10^{-6}x$	0,985

As expressões gerais derivadas por Laviron para as respostas de velocidades de varredura lineares para o caso das espécies eletrorreativas em pequenas concentrações confinadas em superfícies (91,110) são utilizadas para determinar o coeficiente de transferência eletrônica (α_s) e velocidade de transferência de carga aparente (k_s), os quais foram determinados através do estudo da velocidade de varredura (v) do eletrodo modificado com RGO. Para a separação pico-a-pico (ΔE_p) > 200/n mV, em que n é o número de elétrons transferidos, as equações abaixo são utilizadas:

$$E_{pc} = E^0 + \left(\frac{2.3RT}{\alpha_s nF}\right) \log\left(\frac{\alpha_s nF}{RTk_s}\right) + \left(\frac{2.3RT}{\alpha_s nF}\right) \log v \quad \text{Equação (9)}$$

$$E_{pa} = E^0 + \left(\frac{2.3RT}{(1 - \alpha_s)nF}\right) \log\left(\frac{(1 - \alpha_s)nF}{k_s RT}\right) + \left(\frac{2.3RT}{(1 - \alpha_s)nF}\right) \log v \quad \text{Equação (10)}$$

$$\text{Ln}k_s = \alpha_s \text{Ln}(1 - \alpha_s) + (1 - \alpha_s) \text{Ln}\alpha_s - \text{Ln}\left(\frac{RT}{nFv}\right) - \frac{\alpha_s(1 - \alpha_s)nF\Delta E_p}{RT} \quad \text{Equação (11)}$$

em que E_{pa} e E_{pc} representam os potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente; α_s , k_s e v representam coeficientes de transferência eletrônica, velocidade de transferência de carga aparente, e velocidade de varredura, respectivamente. O α_s pode ser determinado a partir da variação do potencial de pico em relação à velocidade de varredura. E o valor de k_s pode ser determinado a partir da transferência eletrônica entre o eletrodo e a camada depositada sobre a superfície através dos valores de E_p medidos.

A Figura 38 apresenta a curva do potencial de A4 em função do logaritmo v obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ em velocidades de varredura entre 10 e 700 mV s⁻¹. Foi observado que os valores dos potenciais de pico A4 são proporcionais ao logaritmo das velocidades de varredura (Figura 38). Baseados nestes resultados e aplicando a equação de Laviron (Equação 11), os valores de α_s e k_s foram determinados como $0,51 \pm 0,002$ e $0,61 \pm 0,002$ s⁻¹ para α_s e k_s no pico A4, respectivamente.

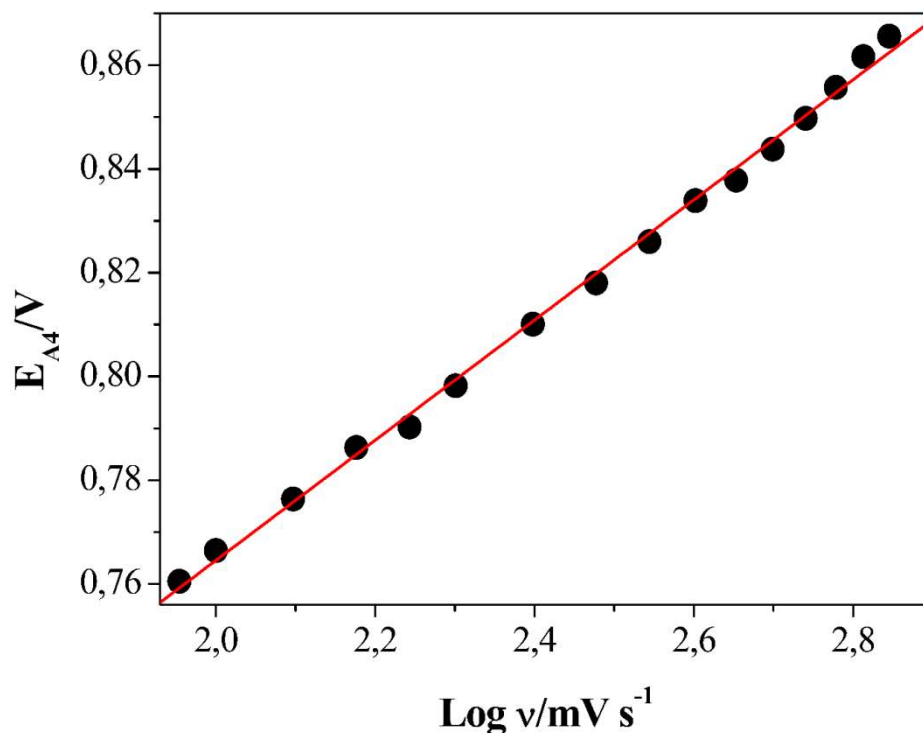


Figura 38 – Correlação correspondente do potencial de pico (E_{A4}) em função do logaritmo da velocidade de varredura ($\text{Log } v$) em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹.

4.3.4 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata

O comportamento eletroquímico do GCE sem modificação e do AgNPs-RGO/GCE foi investigado por EIS em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹ contendo K₃[Fe(CN)₆] 1,0×10⁻² mol L⁻¹, o qual foi empregado como sonda redox no intervalo de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz, sob amplitude de 5,0 mV e potencial aplicado de 0,22 V. Os gráficos EIS dos AgNPs-RGO/GCE e GCE sem modificação são apresentados na Figura 39. As curvas observadas são compostas de semicírculo e uma linha reta que representam processos de transferência de carga e o controle de difusão, respectivamente, e podem ser usadas para descrever as propriedades de interface do eletrodo.

A transferência de elétrons nas interfaces não é muito rápida, além disso, a geração do semicírculo e a baixa região linear mostram que existe uma resistência Warburg limitando a difusão no processo eletroquímico. O diagrama de EIS do AgNPs-RGO/GCE (Figura 39, curva b) mostrou um pequeno semicírculo em altas frequências, indicando que a transferência de carga é muito baixa, em comparação com GCE sem modificação (Figura 39, curva a). Claramente, isso sugere que o eletrodo modificado proposto é um excelente material condutor elétrico que poderia facilitar a transferência de elétrons.

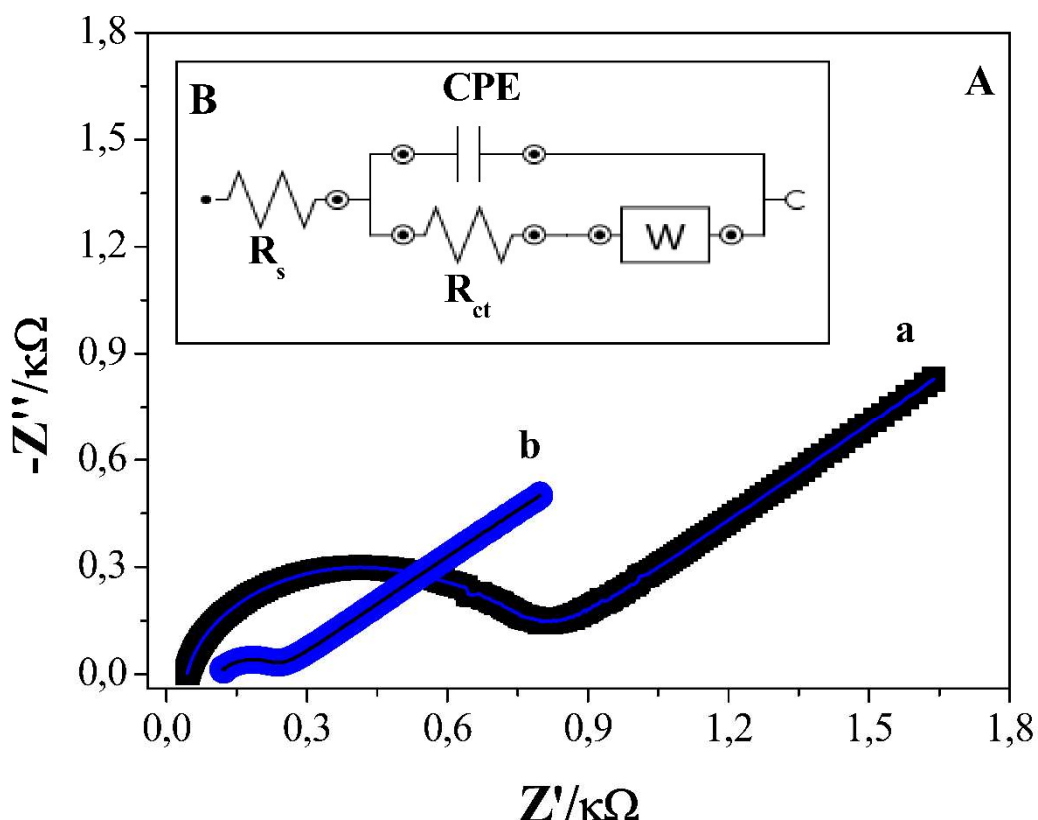


Figura 39 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e AgNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas azul (a) e preta (b) correspondentes às simulações dos dados experimentais (A). (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de EIS.

O circuito equivalente para o GCE sem modificação e AgNPs-RGO/GCE é descrito com base no modelo de Randles, devido à transferência heterogênea de elétrons, Figura 39 (B). O circuito equivalente para os eletrodos inclui a resistência ôhmica da solução do eletrólito (R_s), a resistência de transferência de elétrons (R_{ct}), elemento de fase constante (CPE) e a impedância de Warburg (W) em paralelo.

Para o AgNPs-RGO/GCE, a R_{ct} encontrada foi de 148 Ω , sendo quase cinco vezes menor que a do GCE (710 Ω). Este resultado pode ser atribuído à presença das AgNPs altamente condutoras e nanofolhas de RGO que podem melhorar a transferência de elétrons da sonda redox com a superfície do eletrodo modificado. Portanto, os resultados indicam que as nanopartículas de prata e o óxido de grafeno reduzido modificaram com sucesso a superfície do GCE e contribuíram significativamente para melhorar a condutividade do eletrodo preparado.

4.3.5 Caracterização da superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata

As morfologias do GCE não modificado, RGO/GCE e AgNPs-RGO/GCE foram caracterizadas por SEM, EDX, Raman e XPS. Na Figura 40, são apresentadas as imagens de SEM dos eletrodos modificados e sem modificação. Na Figura 40 (A), foi observada uma superfície plana bidimensional que representa a superfície uniforme do GCE sem modificação. Essa superfície é diferente da observada na Figura 40 (B), a qual apresenta uma superfície enrugada tridimensional atribuída à modificação da superfície GCE com RGO. E essa modificação com RGO dá origem a uma área de contato muito maior vista na Figura 40 (B) em comparação com a da GCE sem modificação na Figura 40 (A).

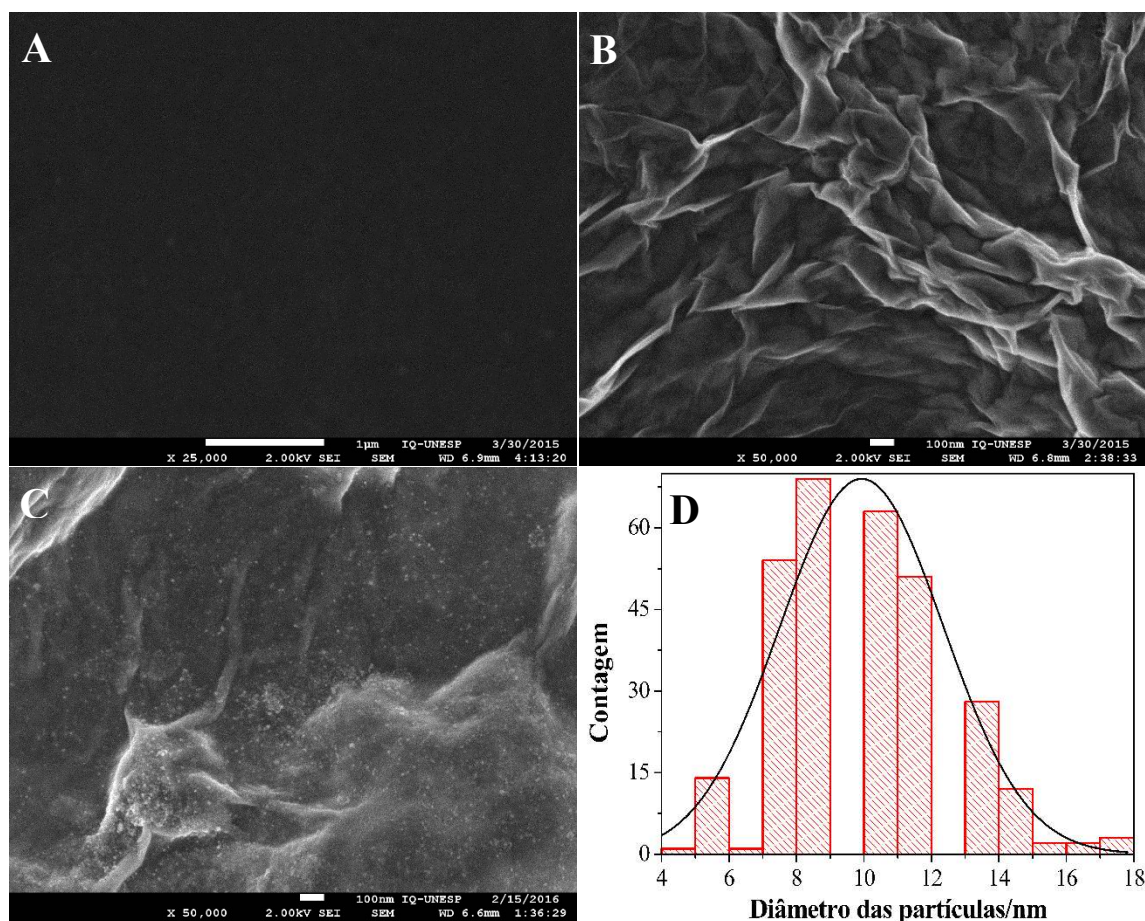


Figura 40 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE e (C) AgNPs-RGO/GCE. Histograma da distribuição das AgNPs na superfície do RGO/GCE (D).

A Figura 40 (C) apresenta a modificação do RGO/GCE modificado com AgNPs com forma esférica altamente dispersas sobre sua superfície. A partir da Figura 40 (C), foi obtido

um histograma das AgNPs sobre o eletrodo modificado. Os diâmetros das AgNPs variaram de 4 a 18 nm (300 nanopartículas foram contadas) e apresentaram um diâmetro médio de 10 ± 2 nm, Figura 40 (D).

Foi empregada análise de EDX para investigar a composição elementar da superfície do AgNPs-RGO/GCE. O espectro obtido é apresentado na Figura 41. O espectro EDX confirma a presença de picos de carbono, prata e oxigênio na superfície do eletrodo modificado, como pode ser observado na Figura 41. Este resultado indica que a modificação do eletrodo foi realizada com sucesso.

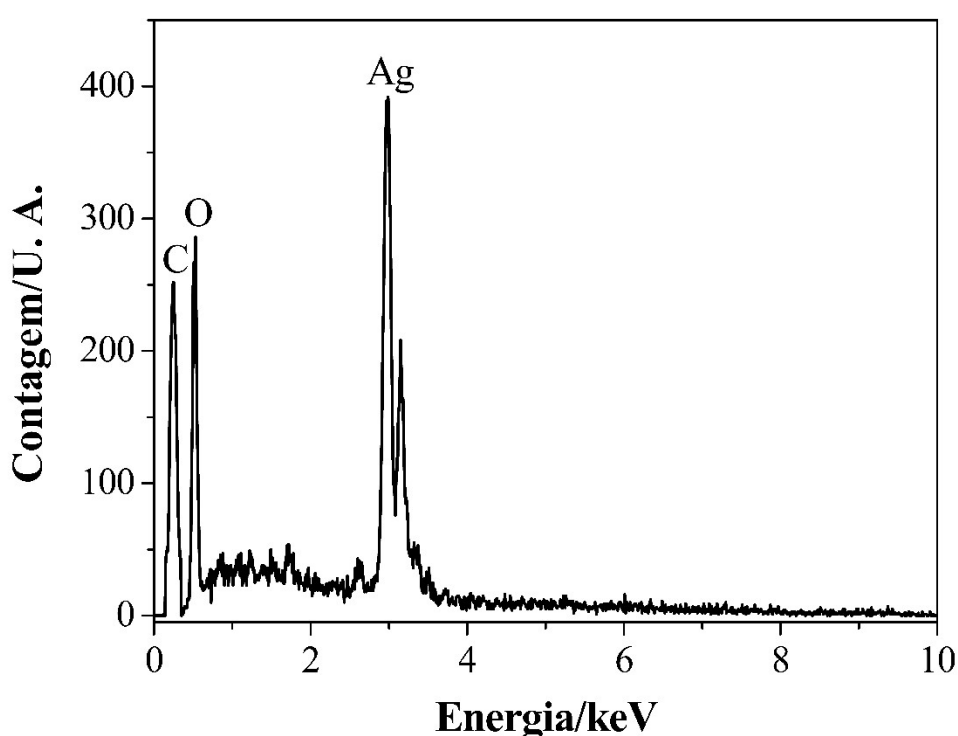


Figura 41 – Espectro de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata (AgNPs-RGO/GCE).

A superfície do eletrodo modificado também foi caracterizada por espectroscopia Raman. O espectro de espalhamento Raman para o AgNPs-RGO/GCE é apresentado na Figura 42. No espectro, foram observadas quatro bandas em ~ 1328 , ~ 1600 , 2677 e 2922 cm^{-1} que correspondem às bandas D (defeito devido à dispersão intervalley), G (decorrentes do modo respiração devido aos defeitos nas bordas), bandas 2D (processo de dupla ressonância que conecta fônons a estrutura da banda eletrônica) e D+G (defeitos pontuais plano basal das arestas do grafeno), respectivamente (82,99).

Quando o RGO/GCE é modificado com nanopartículas de prata (AgNPs-RGO/GCE) é observado que a razão ID/IG aumenta de 1,1 (RGO/GCE) para 1,4 (AgNPs-RGO/GCE). Essa

mudança na razão ID/IG é atribuída ao aumento dos defeitos na superfície do eletrodo modificado devido ao crescimento da rugosidade superficial provocado pelas nanopartículas.

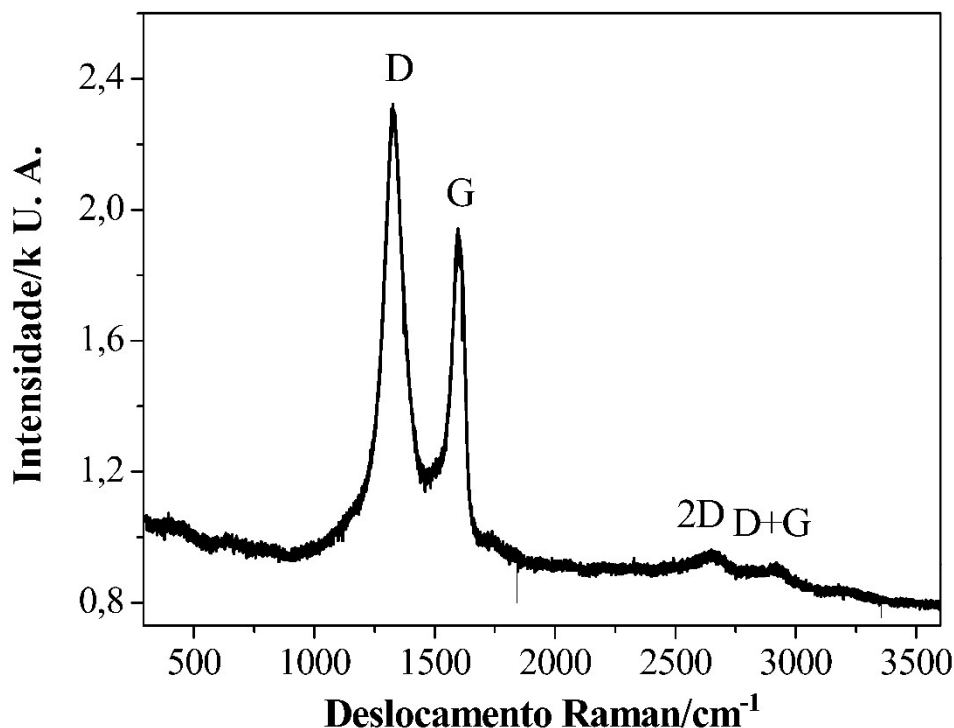


Figura 42 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata (AgNPs-RGO/GCE).

A composição química da superfície do AgNPs-RGO/GCE foi caracterizada por XPS. O espectro exploratório de XPS (0 a 1490 eV) da análise é apresentado na Figura 43. No espectro exploratório de XPS do eletrodo modificado, foram observados sinais de carbono, oxigênio, prata e sódio com energias de ligações em 284,9 (C 1s), 532,9 (O 1s), 368,4 (Ag 3d) e 1071,4 (Na 1s) eV. A análise de XPS mostrou a presença Ag 3d, C 1s e O 1s com proporções atômicas de 4,4, 68,9 e 19,2 %, respectivamente, confirmando a modificação da superfície do GCE com RGO e AgNPs. No decorrer deste estudo, as regiões de Ag 3d, O 1s e C 1s foram coletadas individualmente e analisadas.

O espectro de alta resolução da região de C 1s pôde ser deconvoluído em seis componentes. As componentes localizadas foram associadas a diferentes formas de oxidação e hibridizações do carbono com energias de ligações em 284,6 (C_{aromático}; 68,3 %), 285,6 (C-H; 5,0 %), 286,7 (C-O; 16,6 %), 288,1 (C=O; 2,6 %), 288,8 (O-C=O; 5,1 %) e 291,0 (pico satélite *shake-up* $\pi \rightarrow \pi^*$; 2,4 %) eV com suas respectivas proporções atômicas (82,88).

O espectro de alta resolução da região de O 1s pode ser deconvoluído em quatro componentes correspondentes aos átomos de oxigênio com energias de ligações em 531,0 (O-

Ag; 7,4%), 531,9 (C=O; 13,4 %), 532,6 (C-O; 29,4%) e 533,7 (O-C=O; 16,1 %) eV, e duas componentes Auger Na sobrepostas com O 1s em 535,9 (Na KLL; 28,5 %) e 539,0 eV (Na KLL; 5,2 %) que podem ser do NaOH utilizado na oxidação das AgNPs. O espectro de alta resolução da região de Ag 3d pode ser deconvoluído em duas componentes correspondentes aos átomos de prata com energias de ligações em 368,3 (Ag 3d_{5/2}) e 374,3 (Ag 3d_{3/2}) eV (125–129). Isso indica que Ag é encontrado principalmente na forma de óxido no eletrodo modificado. Além disso, a diferença entre as energias de ligações do duplete 3d da Ag foi de 6,0 eV (125,126), confirmando a formação de AgNPs na superfície do RGO/GCE.

Portanto, com baseado nos resultados obtidos através das análises de caracterização de superfície que incluem SEM, EDX, Raman e XPS, é possível afirmar que a superfície GCE foi modificada com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata com sucesso.

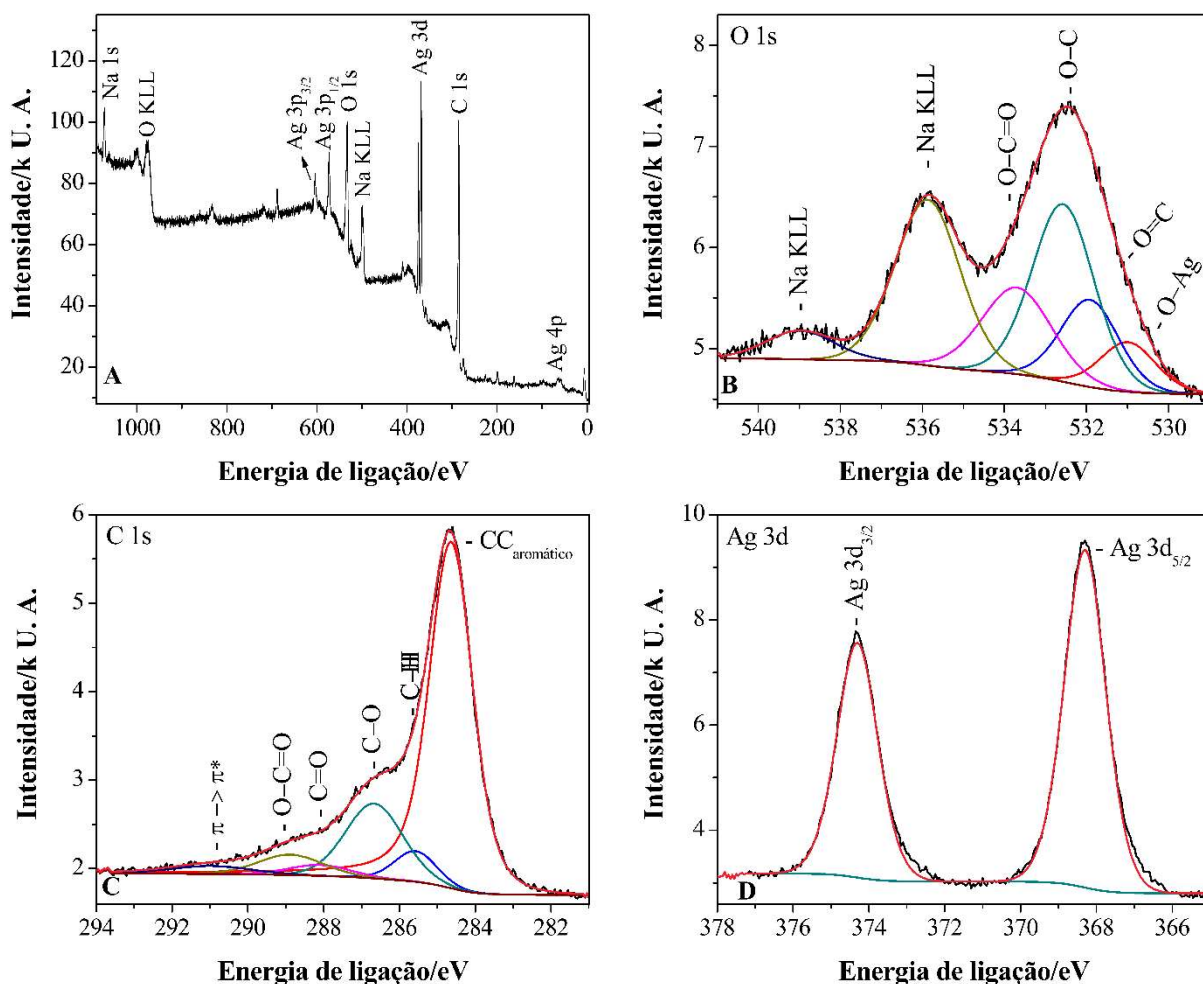
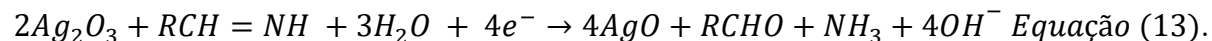
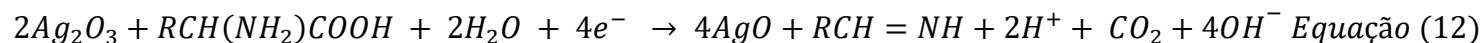
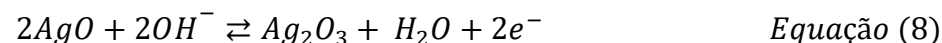


Figura 43 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Ag 3d com suas deconvoluções para o AgNPs-RGO/GCE.

4.3.6 Oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos na superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata

A atividade eletrocatalítica do AgNPs-RGO/GCE na presença de 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ aminoácidos em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ foi investigada por CV. São apresentados na Figura 44 os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado na ausência e presença de aminoácidos em meio alcalino obtidos no intervalo de potencial de 0,55 a 1,0 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

Nos voltamogramas, foi observado um aumento na corrente de pico anódico do AgNPs-RGO/GCE na presença dos aminoácidos em relação ao observado para a superfície modificada na ausência desses aminoácidos. Este resultado aponta para um processo típico de oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos através do estado de alta valência de Ag₂O₃. Essencialmente, isso implica afirmar que o possível mecanismo envolvendo a oxidação eletroquímica dos aminoácidos por espécies de Ag(III) ativas ocorre através de processos redox de mediação cíclica que podem ser expressos como segue (31,32,34,108,130):



Enquanto os três processos eletroquímicos acima ocorreram simultaneamente, foi observado um ombro em cerca de 0,75 V, como pode ser visto nas Figuras 44 (B-D), o que foi atribuído à oxidação de AgO em Ag₂O₃.

Isso significa que a corrente catalítica resultante do processo de oxidação dos aminoácidos na superfície das AgNPs otimizadas em RGO pode ser atribuída ao aumento da área superficial específica das AgNPs. E esse aumento na área superficial específica das nanopartículas proporciona maior oportunidade de os aminoácidos serem oxidados. Além disso, o RGO atua como um excelente substrato e, em virtude de sua grande área superficial, contribui para o aumento da quantidade de nanopartículas eletrodepositadas na superfície, ao mesmo tempo em que diminui o tamanho dessas nanopartículas.

O mecanismo proposto para o comportamento observado dos aminoácidos é do tipo eletroquímico seguido de uma reação química (EC'), o qual já foi relatado na literatura (104,108–110,122). Em outras palavras, as espécies de Ag(II) são oxidadas a Ag(III), enquanto a Ag(III), por sua vez, oxida os aminoácidos, seguido da regeneração das espécies de Ag(II) na superfície do eletrodo.

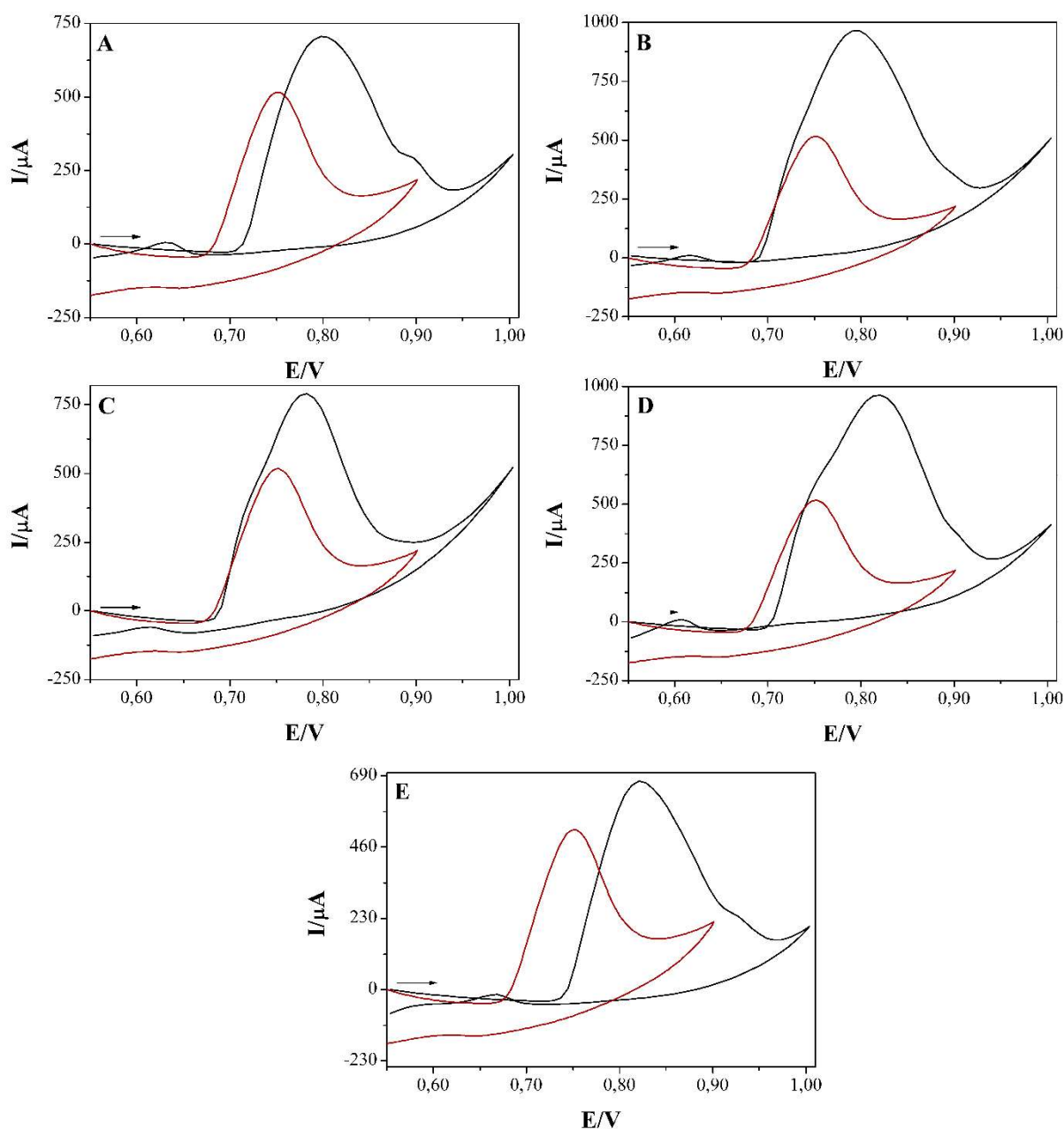


Figura 44 – Voltamogramas cíclicos de (A) alanina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, (B) ácido aspártico $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, (C) ácido glutâmico $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, (D) glicina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e leucina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ (curvas vermelhas) sobre a superfície do AgNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

A Figura 45 apresenta os voltamogramas cíclicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência e presença de diferentes concentrações de solução de glicina na faixa de potencial de $0,65$ a $0,90 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Conforme apresentado na Figura 45, um aumento na concentração de glicina provoca um aumento gradual da corrente de pico anódico associada à oxidação das espécies de prata de baixa valência. Além disso, qualquer aumento na concentração de glicina provocou um aumento proporcional da corrente de pico anódico (inserção da Figura 45). Os mesmos resultados foram obtidos para aminoácidos alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina, embora não sejam mostrados.

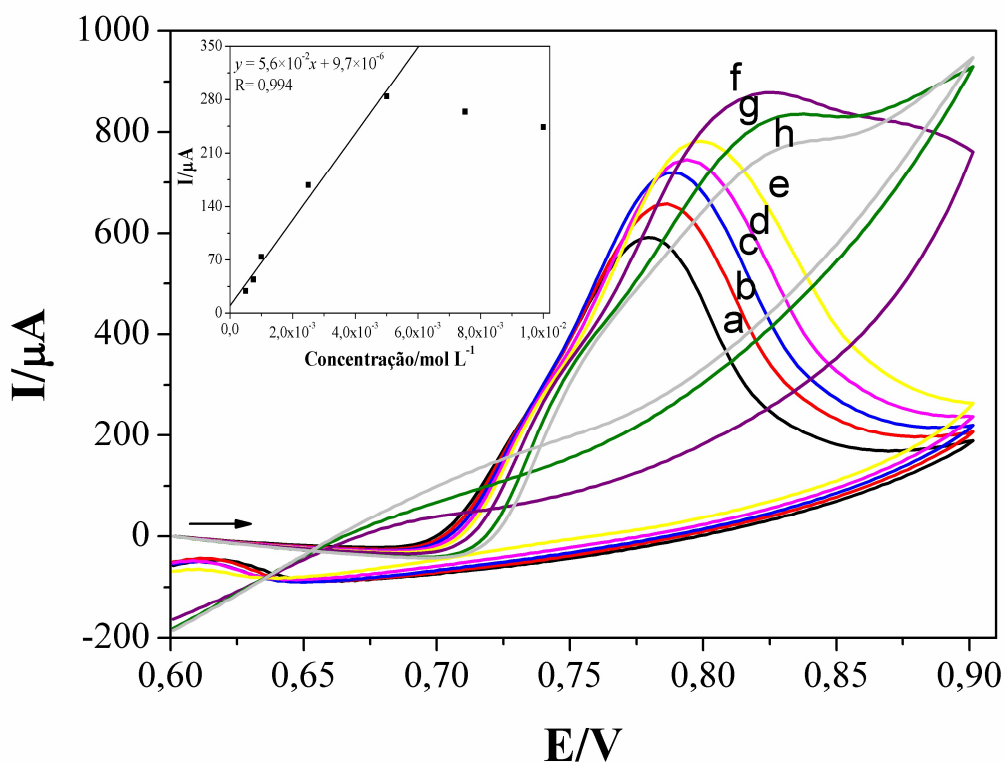


Figura 45 – Voltamogramas cíclicos do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na (a) ausência e presença de glicina $5,0 \times 10^{-4}$ (b), $7,5 \times 10^{-4}$ (c), $1,0 \times 10^{-3}$ (d), $2,5 \times 10^{-3}$ (e), $5,0 \times 10^{-3}$ (f), (g) $7,5 \times 10^{-3}$ (g) e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (h) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Inserido: Dependência da corrente de pico anódico em função da concentração de glicina.

A Figura 46 apresenta curva típica de Tafel para a oxidação eletrocatalítica de glicina sobre a superfície do AgNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . O coeficiente de transferência de elétrons (α) dos aminoácidos foi obtido através de gráficos do potencial (E) em função do logaritmo da densidade de corrente (Log j). O coeficiente angular obtido para cada curva é igual a $2,3RT/\alpha F$. Os valores de α calculados ficou entre $0,39$ e $0,45$

para a eletro-oxidação da alanina e ácido glutâmico, respectivamente. Na Tabela 10, são apresentados os valores de α calculados para os aminoácidos estudados.

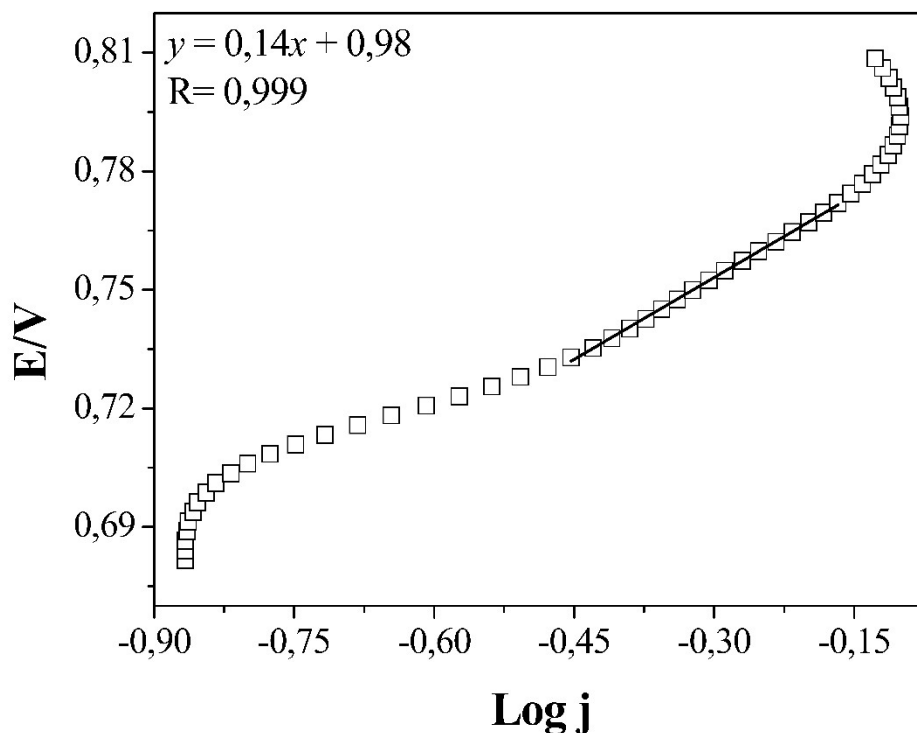


Figura 46 – Curva de Tafel do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} .

Tabela 10 – Valores do coeficiente de transferência eletrônica (α), constante de velocidade eletrocatalítica (k_{cat}) e coeficiente de difusão (D) para os aminoácidos estudados com o AgNPs-RGO/GCE.

Aminoácidos	Coefficiente angular de Tafel (mV)	α	D ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	k_{cat} ($\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Ácido aspártico	138	0,43	$7,7 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^8$
Ácido glutâmico	152	0,39	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^8$
Alanina	162	0,37	$2,9 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^8$
Glicina	133	0,44	$1,7 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^8$
Leucina	130	0,45	$2,1 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^8$

Os valores do coeficiente de difusão para os aminoácidos foram determinados a partir da equação de Randles-Sevcik para sistemas irreversíveis através do estudo da velocidade com concentrações dos aminoácidos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de acordo com a equação a seguir:

$$I_p = 2,99 \times 10^5 \alpha^{0,5} A_e C^* D^{0,5} \nu^{0,5} \quad \text{Equação (14)}$$

em que: A é a área superficial efetiva do eletrodo em cm^2 , C é a concentração dos aminoácidos em mol cm^{-3} , D é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ e v é a velocidade de varredura em mV s^{-1} .

O efeito da velocidade de varredura foi avaliado no intervalo de 10 a 700 mV s^{-1} . A partir do coeficiente angular da corrente de pico anódico (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$), foi calculado o coeficiente de difusão dos aminoácidos. Na Figura 47 foi observado uma relação linear entre a $v^{0,5}$ e a I_{pa} , o que demonstra que um processo controlado por difusão é predominante durante a oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos na faixa de 10 a 300 mV s^{-1} .

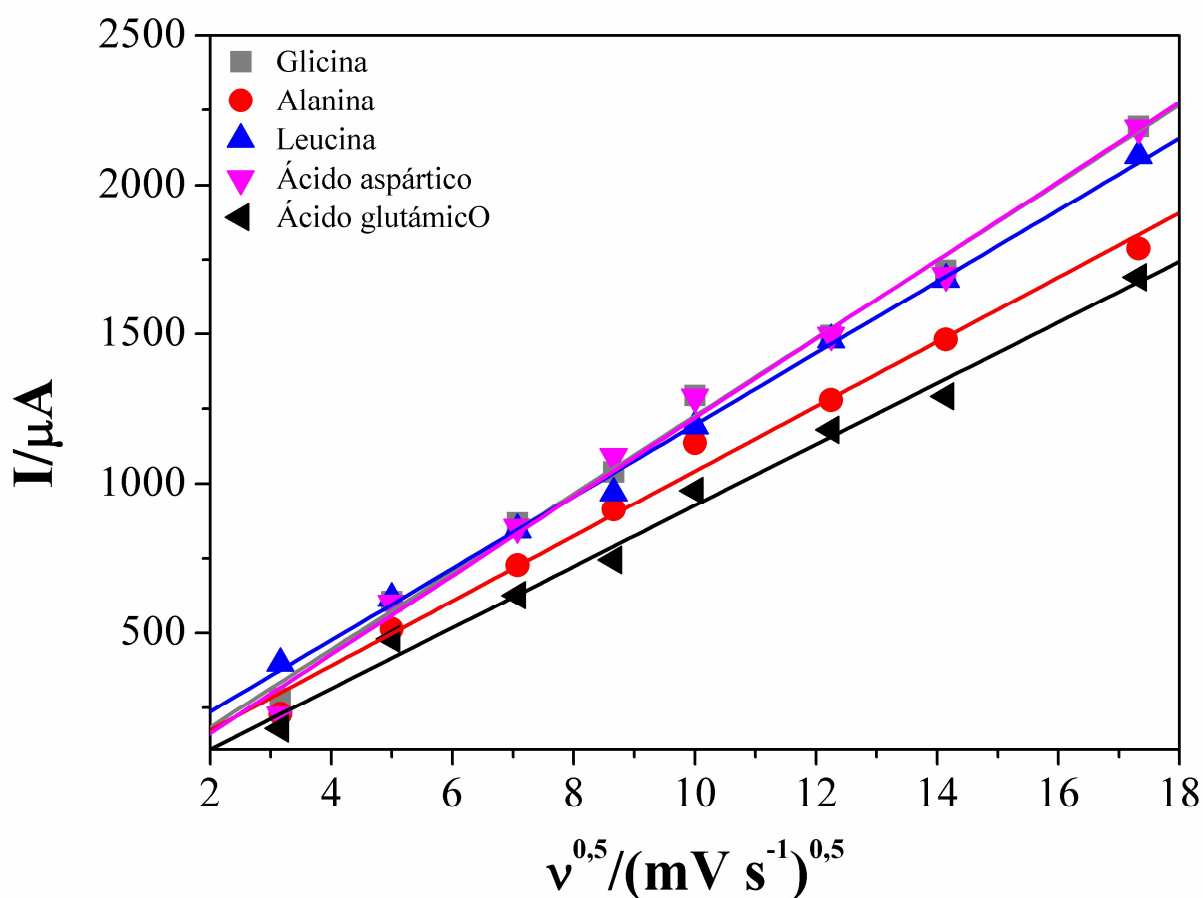


Figura 47 – Efeito da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$) nas correntes de picos anódicos dos aminoácidos $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

As equações lineares e os coeficientes de correlação linear para os aminoácidos estudados são apresentados na Tabela 11. Na Tabela 10, são apresentados os valores dos coeficientes de difusão calculados a partir da equação de Randles-Sevcik; tais coeficientes variaram de $1,1 \times 10^{-7}$ (alanina) a $7,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (glicina).

Tabela 11 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre a corrente de pico anódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$).

Aminoácidos	Faixa linear ($mV^{0,5} s^{0,5}$)	Equação da regressão linear	Coefficiente de correlação linear
Ácido aspártico		$y = 1,3 \times 10^{-4}x + 9,9 \times 10^{-5}$	0,996
Ácido glutâmico		$y = 1,0 \times 10^{-4}x + 9,4 \times 10^{-5}$	0,995
Alanina	3,2 a 17,3	$y = 1,1 \times 10^{-4}x + 4,2 \times 10^{-5}$	0,995
Glicina		$y = 1,3 \times 10^{-4}x + 7,6 \times 10^{-5}$	0,998
Leucina		$y = 1,2 \times 10^{-4}x + 3,0 \times 10^{-5}$	0,999

As constantes de velocidade eletrocatalítica (k_{cat}) em mecanismos EC' da eletro-oxidação dos aminoácidos sobre a superfície do AgNPs-RGO/GCE foram determinadas por amperometria sob um potencial de eletrodo de trabalho fixo adequado. A Figura 48 apresenta amperogramas de duplo salto do AgNPs-RGO/GCE na ausência (curva a) e na presença (curvas b-e) de leucina no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Os saltos de potenciais aplicados foram 0,90 e 0,50 V, respectivamente. Os resultados mostram claramente que o processo de oxidação eletrocatalítica da leucina é irreversível. O mesmo resultado foi encontrado para os outros aminoácidos estudados. A amperometria foi utilizada para avaliar a constante catalítica da oxidação dos aminoácidos de acordo com a equação (110):

$$\frac{I_{cat}}{I_d} = \lambda^{0,5} \left[\pi^{0,5} \operatorname{erf}(\lambda^{0,5}) + \frac{\exp(-\lambda)}{\lambda^{0,5}} \right] \quad \text{Equação (15)}$$

na qual I_{cat} e I_d são as correntes na presença e ausência dos aminoácidos; $\lambda = k_{cat}Ct$ é o argumento da função erro; k_{cat} é a constante de velocidade eletrocatalítica; C é a concentração dos aminoácidos; e t é o tempo decorrido. Nos casos em que $\lambda > 1,5$, $\operatorname{erf}(\lambda^{0,5})$ é praticamente igual à unidade, e a equação acima pode ser reduzida para:

$$\frac{I_{cat}}{I_d} = \lambda^{0,5} \pi^{0,5} = \lambda^{0,5} (k_{cat}Ct)^{0,5} \quad \text{Equação (16)}.$$

A partir do coeficiente angular da reta obtido através da linearidade observada entre I_{cat}/I_d em função do $t^{0,5}$, foi calculado a k_{cat} para os aminoácidos (Fig. 48 (B)). Amperogramas similares foram obtidos para alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico e glicina. Na Tabela 10, são apresentados os valores das constantes de velocidades catalíticas para os aminoácidos. Os resultados obtidos ficaram entre $1,4 \times 10^8$ (ácido glutâmico) e $5,5 \times 10^8$ cm³ mol⁻¹ s⁻¹ (ácido aspártico).

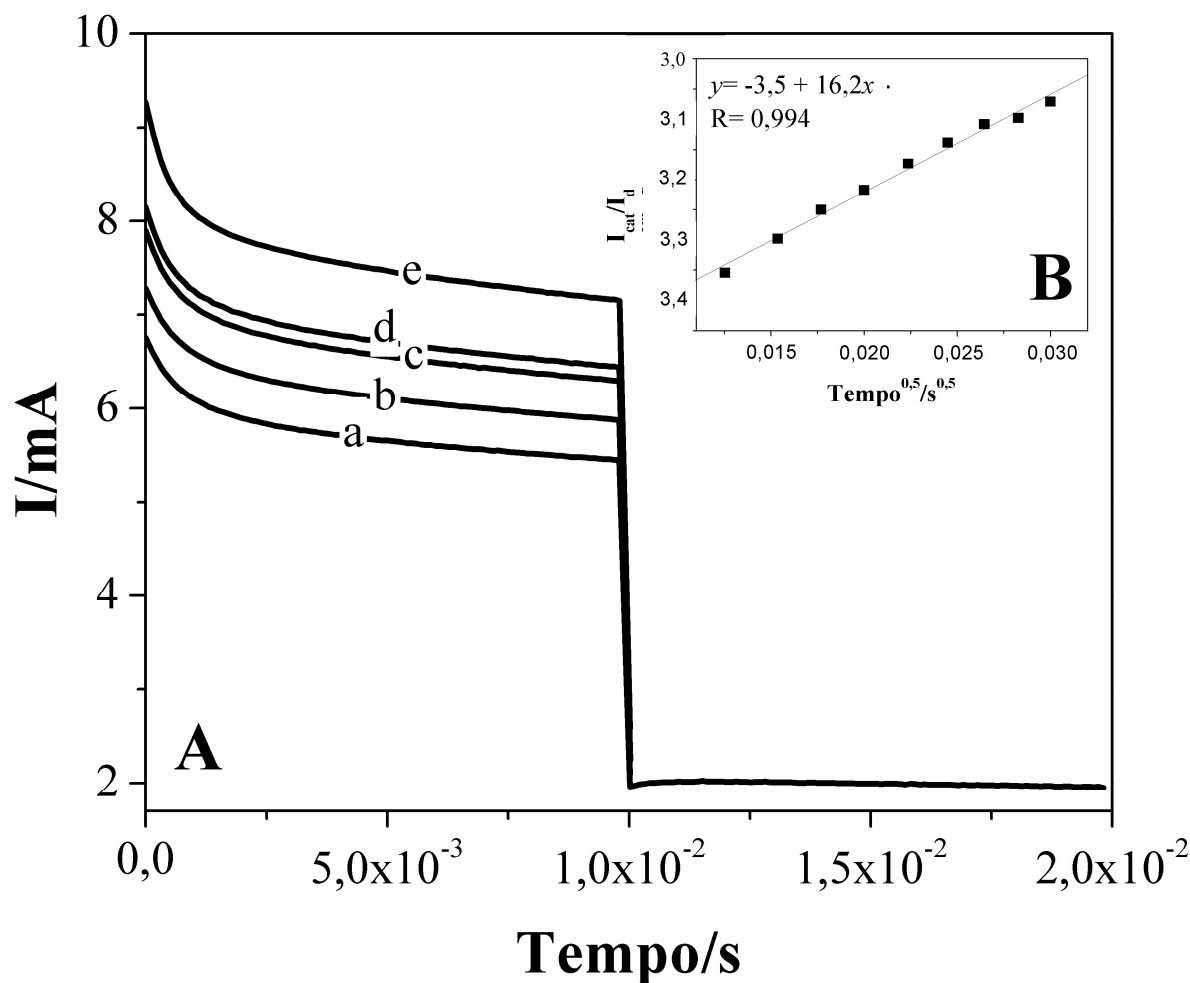


Figura 48 – (A) Amperogramas de duplo salto do AgNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com diferentes concentrações de leucina: (a) 0,0, (b) $5,0 \times 10^{-4}$ (c) $7,5 \times 10^{-4}$, (d) $1,0 \times 10^{-3}$ e (e) $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Os saltos de potencial foram 0,90 V para oxidação e 0,50 V para redução. (B) Inserido: Dependência da I_{cat}/I_d em função do $Tempo^{0,5}$ derivado a partir dos dados da curva b.

4.3.7 Respostas amperométricas dos aminoácidos sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de prata

Inicialmente, os efeitos dos potenciais aplicados na oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos foram investigados usando amperometria sob agitação, pois essa técnica é muito mais sensível em comparação com a CV. A atividade eletrocatalítica realizada pelo AgNPs-RGO/GCE foi estudada na faixa potencial de 0,60 a 1,0 V por injeção sucessiva de aminoácidos em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ sob agitação constante. A Figura 49 apresenta as respostas amperométricas do sensor a três incrementos sucessivos de soluções de aminoácidos $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em potenciais aplicados na faixa estudada.

Como pode ser observado, o eletrodo modificado apresentou bom desempenho eletrocatalítico para a eletro-oxidação dos aminoácidos em meio alcalino. Além disso, foi

observado que todos os analitos examinados exibiram aproximadamente o mesmo comportamento em função do potencial de detecção. A oxidação dos aminoácidos no eletrodo modificado iniciou-se a cerca de 0,70 V, passando por um aumento acentuado a potenciais mais positivos, com exceção do ácido aspártico submetido à oxidação a 0,80 V. Com base nesses resultados, foi selecionado 0,90 V como potencial de trabalho.

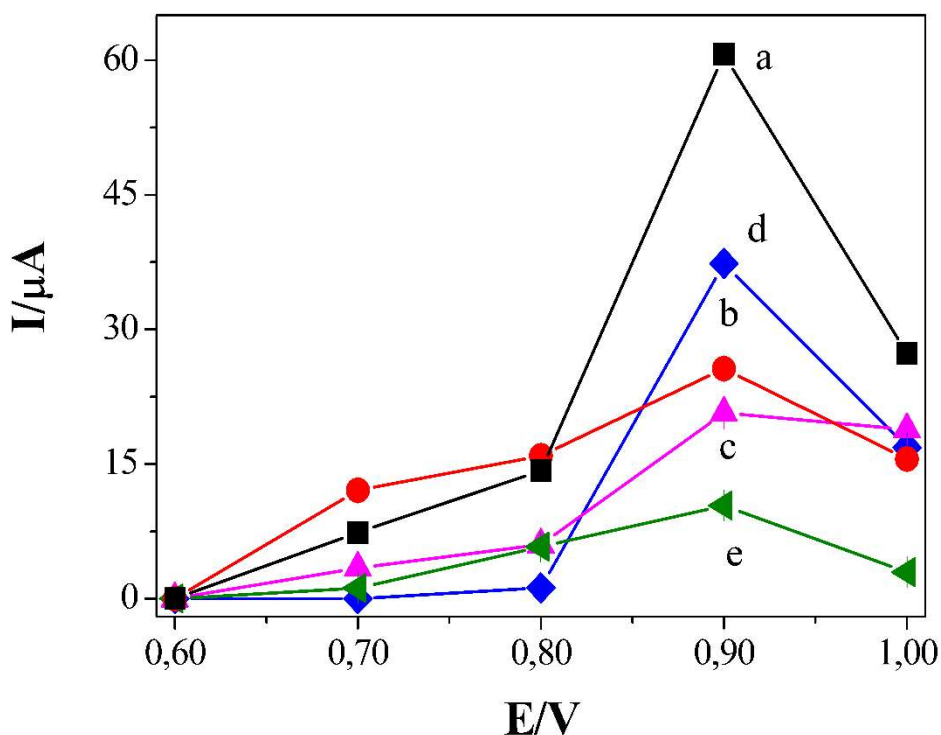


Figura 49 – Estudo do potencial de oxidação dos aminoácidos glicina (a), alanina (b), ácido aspártico (c), ácido glutâmico (d) e leucina (e) em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ através da amperometria utilizando o AgNPs-RGO/GCE (n= 3).

Medidas amperométricas foram realizadas aplicando potencial de detecção de 0,90 V utilizando o AgNPs-RGO/GCE por injeção sucessiva de aminoácidos (glicina, alanina, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico) em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ sob agitação. A Figura 50 apresenta amperogramas das adições consecutivas de glicina e alanina em meio alcalino obtidos a partir da utilização de sensor desenvolvido. Foi observado que as correntes de oxidação dos aminoácidos aumentaram rapidamente, atingindo 97% da corrente estacionária nos tempos de 2,2 (glicina), 2,0 (alanina), 3,1 (leucina), 1,6 (ácido aspártico) e 1,3 s (ácido glutâmico).

A resposta do eletrodo modificado é bastante rápida e proporcional à concentração dos aminoácidos. As curvas analíticas para alanina e glicina são ilustradas na inserção da Figura 50. Como pode ser visto na Tabela 12, para os aminoácidos investigados, as correntes de

oxidação foram proporcionais às concentrações dos aminoácidos no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Foi observada uma boa dependência linear com coeficiente de correlação de 0,999 para todos os analitos.

O AgNPs-RGO/GCE pode ser utilizado como sensor amperométrico, uma vez que apresenta elevada sensibilidade para os aminoácidos variando entre $0,8 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ (leucina) e $2,4 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ (alanina). Os limites de detecção (LOD, $3 \times \text{SD}/b$) e quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantitation*, $10 \times \text{SD}/b$) foram calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão (SD) da equação da regressão linear dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração(b), respectivamente. Os LODs calculados variaram de $7,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o ácido glutâmico a $8,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para alanina e ácido aspártico, Tabela 12.

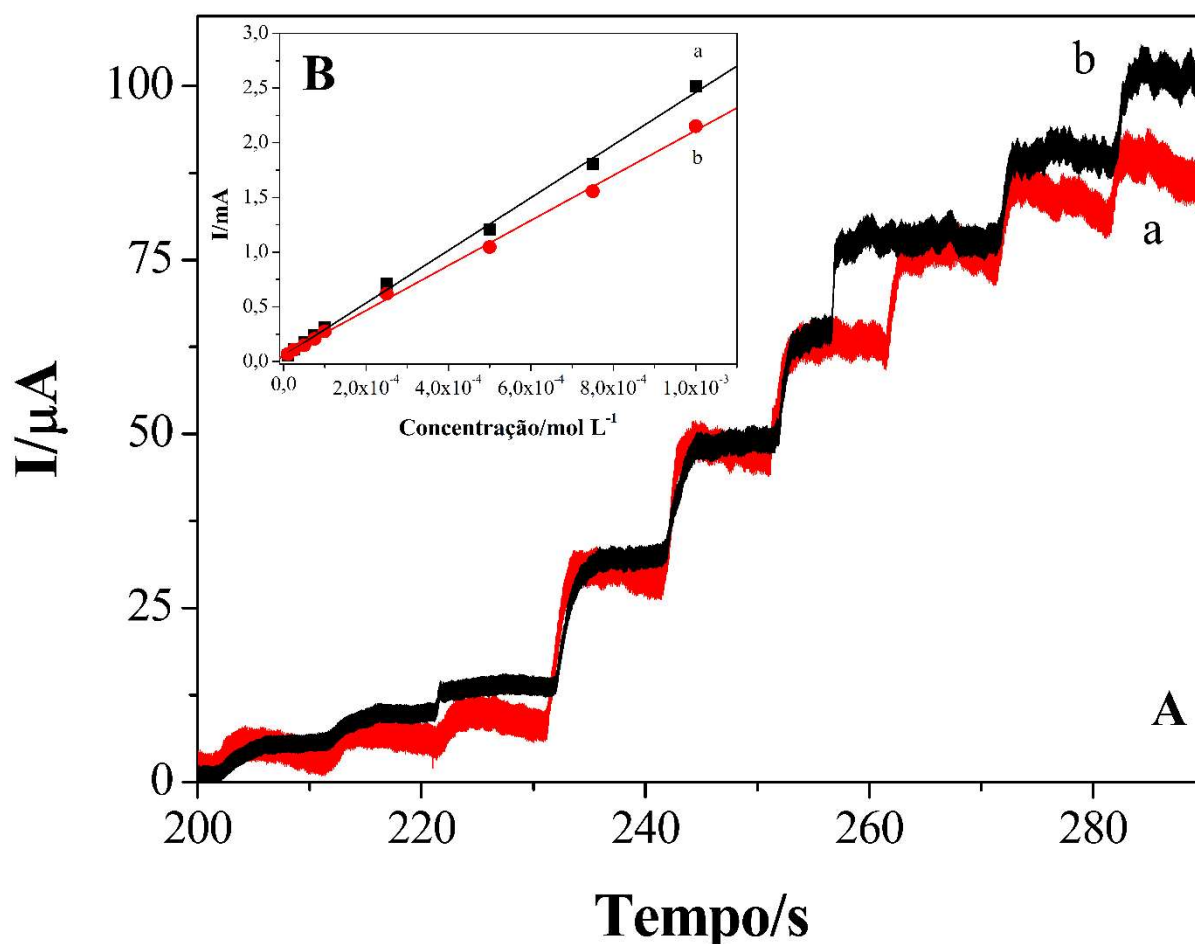


Figura 50 – (A) Amperogramas obtidos para adições sucessivas de alanina (a) e glicina (b) em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação utilizando o AgNPs-RGO/GCE com potencial de detecção de $0,90 \text{ V}$. (B) Inserido: Curvas analíticas de alanina (a) e glicina (b) obtidas a partir dos amperogramas (A).

Tabela 12 – Parâmetros analíticos obtidos para a oxidação electrocatalítica dos aminoácidos em uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ sob agitação a partir da técnica de amperometria utilizando o AgNPs-RGO/GCE com potencial de detecção de 0,90 V.

Aminoácidos	Faixa linear (mol L⁻¹)	Equação da regressão linear	LOD (mol L⁻¹)	LOQ (mol L⁻¹)	Sensibilidade (A mol⁻¹ L)	Coefficiente de correlação linear	RSD% (n= 6)
Glicina		$y = 2,1x + 5,4 \times 10^{-5}$	$7,9 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^{-5}$	2,1	0,999	2,8
Alanina	$1,0 \times 10^{-5}$	$y = 2,4x + 5,2 \times 10^{-5}$	$8,7 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-5}$	2,4	0,999	3,0
Leucina	a	$y = 0,8x + 1,9 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^{-5}$	0,8	0,999	2,1
Ácido aspártico	$1,0 \times 10^{-3}$	$y = 1,1x + 2,4 \times 10^{-5}$	$8,7 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-5}$	1,1	0,999	0,9
Ácido glutâmico		$y = 0,9x + 2,8 \times 10^{-5}$	$7,1 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-5}$	0,9	0,999	1,7

A repetibilidade das respostas de corrente no AgNPs-RGO/GCE foi estimada por meio do desvio padrão relativo (RSD%) usando medidas amperométricas sextuplicadas de aminoácidos $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ sob agitação, Tabela 12. O RSD encontrado variou entre 0,90% (ácido aspártico) e 3,0 (alanina) para as seis medidas realizadas, indicando excelente repetibilidade e precisão. A estabilidade do sensor desenvolvido também foi investigada. Após manter o sensor armazenado à temperatura ambiente durante 15 dias, a resposta de corrente da solução de glicina $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ apresentou uma diminuição de 3,6% em relação à corrente original.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de óxido de prata foi realizada com sucesso. O eletrodo modificado foi utilizado com o objetivo de investigar a oxidação eletrocatalítica de aminoácidos incluindo glicina, alanina, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico em meio alcalino. O AgNPs-RGO/GCE exibiu atividade eletrocatalítica através da mediação de Ag(III) como espécies ativas para todos os aminoácidos estudados. A elevada atividade catalítica, sensibilidade e estabilidade obtidas para o AgNPs-RGO/GCE nessa investigação tornam este eletrodo efetivamente promissor e adequado para a detecção confiável de aminoácidos.

CAPÍTULO V. DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM VINHAÇA DE CANA- DE-AÇÚCAR POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE NÍQUEL

5.1 INTRODUÇÃO

Os aminoácidos podem ser facilmente separados por HPLC, cromatografia de troca aniônica de alta eficiência (HPAEC, do inglês *High Performance Anion-Exchange Chromatography*) e eletroforese capilar (16,24–27,130–140). No entanto, a detecção destes analitos através de métodos tradicionais como espectrofotometria de absorção UV-VIS ou fluorescência, por exemplo, nem sempre é simples de se alcançar, dada a ausência de cromóforos e fluoróforos naturais em muitos aminoácidos, respectivamente. Como resultado, os métodos mais avançados exigem essencialmente algum tipo de derivatização pré ou pós-coluna (16,25,26). A derivação é, contudo, muitas vezes afetada pela natureza da complexidade da matriz, o que tende a tornar o processo incompleto.

Os métodos de detecção sem derivatização são conhecidos por usar condutividade, índice de refração, espalhamento de luz, nitrogênio quimioluminescente, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa (16). A detecção de condutividade não é seletiva, como tal, qualquer espécie pode gerar um sinal incluindo o eluente, embora alguns casos exijam o uso de supressão química (20). Os detectores índice de refração e dispersão de luz possuem menor sensibilidade de detecção, o que explica o uso limitado (16,141). O detector de quimioluminescência de nitrogênio inclui alta sensibilidade e especificidade, além disso, apresenta pouca seletividade (16).

A ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas requerem uma preparação de amostra mais complexa, além de serem relativamente de alto custo para se realizar em comparação às outras técnicas. A detecção eletroquímica (ECD), geralmente operada em modo amperométrico, é combinada com HPAEC para determinação de aminoácidos sem derivatização (24–27,130–135). É importante ressaltar que os grupos amino dos aminoácidos podem ser desprotonados em meio básico. Assim, a aplicação de HPAEC com o uso direto de uma solução alcalina forte como fase móvel pode atender simultaneamente os requisitos de ECD e separação cromatográfica.

Os eletrodos convencionais, tais como platina e ouro, geralmente são empregados na detecção eletroquímica (24,131–135). No entanto, esses eletrodos podem ser lixiviados pela fase móvel e perder a atividade catalítica devido às espécies de adsorção na superfície. Alternativamente, eletrodos quimicamente modificados (CMEs) surgiram para superar essas falhas. Geralmente, os CMEs possuem maior área superficial, sensibilidade, seletividade e, o mais importante, estabilidade em comparação com eletrodos convencionais de metais quando se trata de análise HPAEC de aminoácidos em meio alcalino (25,26,31,130).

Os metais de transição não nobres e seus óxidos, tais como cobalto (104,110), ferro (103), cobre (26,30) e níquel (25,31,130) têm atraído considerável interesse como materiais modificadores como resultado de suas propriedades eletrocatalíticas em meio alcalino em relação à oxidação de aminoácidos.

Entre os vários materiais utilizados na modificação de eletrodos, o grafeno tem gerado uma maior atenção devido às suas propriedades ópticas, químicas e eletrônicas, além de sua ampla gama de aplicações em nanomateriais, nanotecnologia e sensores eletroquímicos (52,53). O grafeno é essencialmente uma monocamada bidimensional de átomos de carbono num favo de mel bem embalado. É dotado de muitas vantagens, incluindo propriedades térmicas e mecânicas excepcionais, excelente condutividade elétrica, capacidade rápida de transporte de elétrons e uma área de superfície grande que permite a imobilização de grandes quantidades de substâncias e nanopartículas (53–55,141).

Além disso, as nanopartículas metálicas e seus óxidos foram amplamente estudados, devido às suas propriedades químicas e físicas, como melhor transporte de massa, catálise, maior área de superfície e controle efetivo do microambiente do eletrodo em comparação com eletrodos metálicos tradicionais (56–59).

Em virtude de suas propriedades únicas, grafeno e nanopartículas de metais de transição não nobres têm sido considerados atraentes como novos materiais para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos visando à detecção de aminoácidos. Até o momento, vários tipos de materiais funcionais, como nanopartículas de cobalto (CoNPs) (110), CoNPs em GO (104) e nanopartículas de ferro em GO (103) foram aplicados para a determinação de aminoácidos. As nanopartículas de níquel (NiNPs) combinadas com eletrodos modificados com RGO podem fornecer um meio de melhorar a detecção de aminoácidos, e contribuir para aprimorar nosso conhecimento sobre este assunto no campo dos sensores e detectores.

No presente estudo, foi investigado o desempenho analítico do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel (NiNPs-RGO/GCE) para a detecção de aminoácidos sem derivatização por HPAEC. A aplicação do novo método estabelecido usando a eletro-oxidação direta de aminoácidos sem derivatização na vinhaça de cana-de-açúcar foi realizada com NiNPs-RGO/GCE.

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas nos experimentos eletroquímicos foram preparadas com reagentes de alto grau de pureza analítico e água deionizada ultrapura (MILLI-Q). Óxido de grafeno (GO, 4 mg mL⁻¹), sulfato de níquel (II) hexahidratado (NiSO₄.6H₂O, 99%), ácido L-aspártico (C₄H₇NO₄, ≥ 98%), ácido L-glutâmico (C₅H₉NO₄, ≥ 99%), L-alanina (C₃H₇NO₂, ≥ 98%), glicina (C₂H₅NO₂, ≥ 99%), L-leucina (C₆H₁₃NO₂, ≥ 98%), hidróxido de sódio (NaOH, ≥ 98%) e sulfato de sódio (Na₂SO₄, ≥ 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e ácido nítrico (HNO₃, ≥ 65%) da Merck.

5.2.2 Instrumentação

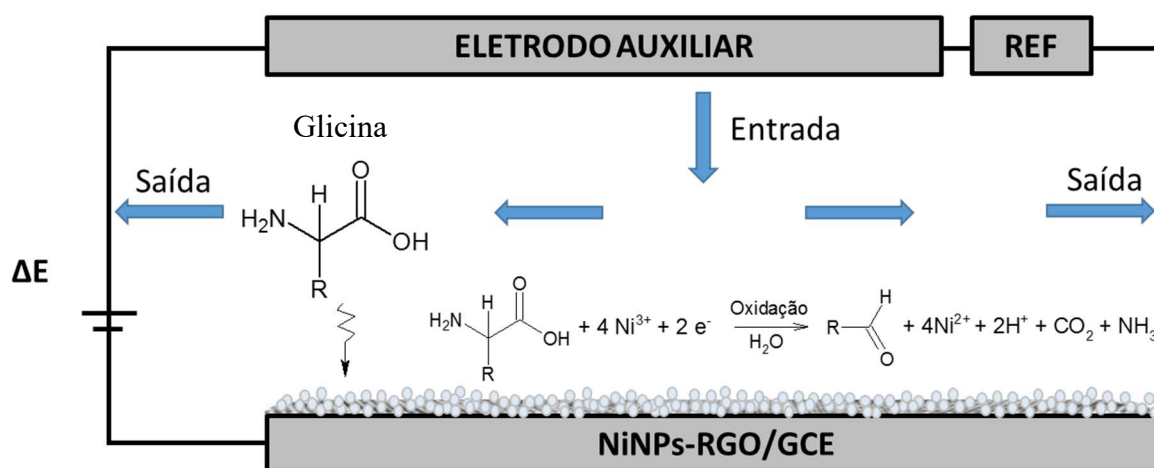
Um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 controlado pelo software NOVA 1.11 foi utilizado para as medidas eletroquímicas, e as medidas de IES foram realizadas usando o módulo FRA. Os experimentos de CV e EIS foram realizados com uma célula eletroquímica convencional empregando o eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência, um fio de platina (0,3 mm × 4,0 cm) como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo com 3,0 mm de diâmetro (GCE, área geométrica de 0,07 cm²) modificado com RGO contendo NiNPs (NiNPs-RGO/GCE) como eletrodo de trabalho.

As espectroscopias Raman, XPS e EDX, e a SEM foram realizadas de acordo com a Seção 3.2.2 do Capítulo III. As análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*) e TEM de alta resolução (HRTEM, do inglês *High-Resolution Transmission Electron Microscopy*) foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão (PHILIPS; modelo CM 200 SUPER TWIN).

As medidas amperométricas pulsadas em fluxo contínuo foram realizadas utilizando um detector amperométrico Modelo IC (Metrohm) e uma célula eletroquímica Wall-Jet composta de um NiNPs-RGO/GCE (3,0 mm de diâmetro), eletrodo de referência (REF) de paládio (Pd) e um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar (Esquema 3). Um microcomputador equipado com um software MagIC Net™, versão 3.1, possibilitou a aquisição e processamento dos cromatogramas.

Experimentos cromatográficos foram realizados por um cromatógrafo de íons 850 Professional IC Cation-HP-Gradient (Metrohm) com modulo extensor 872 (bomba C, pós-

coluna) com um loop de 20 μL e um amostrador Compact Autosampler 863 (Metrohm). As separações cromatográficas dos aminoácidos foram realizadas em uma coluna de troca iônica Dionex®™ CarboPac™ PA1 (250 \times 4 mm I. D., 10 μm , 10 \AA) acoplada com uma pré-coluna CarboPac™ PA1 (50 \times 4 mm I. D., 10 μm , 10 \AA). A temperatura utilizada no forno da coluna foi de 32 $^{\circ}\text{C}$ e no detector 36 $^{\circ}\text{C}$.



Esquema 3 – Célula eletroquímica Wall-Jet utilizada nas medidas cromatográficas.

5.2.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo

O GCE modificado foi imerso em ácido nítrico 20% por 5 min. Posteriormente, a superfície do GCE foi polida em uma suspensão de pó de alumina 0,3 μm e lavada abundantemente com água ultrapura.

5.2.4 Modificação eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo contendo óxido de grafeno com nanopartículas de níquel

O GCE foi modificado com RGO a partir de uma suspensão de GO 0,50 mg mL^{-1} em Na_2SO_4 0,10 mol L^{-1} aplicando potencial de -1,4 V por 500 s. O eletrodo modificado obtido foi lavado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, a eletrodeposição das NiNPs sobre a superfície do RGO/GCE foi otimizada.

As NiNPs foram formadas em duas etapas. Na primeira, as NiNPs foram eletrodepositadas utilizando a técnica de amperometria a partir de uma solução de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em Na_2SO_4 0,10 mol L^{-1} . O potencial, o tempo e a concentração da solução de níquel utilizados na eletrodeposição foram otimizados.

Após a eletrodeposição, os eletrodos foram lavados com água ultrapura, secos e submetidos a varreduras sucessivas em uma solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de $0,10$ a $0,75 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} durante 30 ciclos. A resposta eletrocatalítica das modificações do RGO/GCE com NiNPs (NiNPs-RGO/GCE) foi avaliada com uma solução de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ por CV.

5.2.5 Condições cromatográficas

As fases móveis foram preparadas a partir da mistura das soluções de NaOH e CH_3COONa com água ultrapura. A força da eluição isocrática dos solventes e a velocidade do fluxo foram investigadas. As soluções estoques dos aminoácidos ($1,3 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas nas concentrações das fases móveis otimizadas, e as curvas analíticas foram construídas. O LOD foi avaliado como uma relação sinal/ruído igual a 3 ($S/N = 3$) da menor concentração injetada. A faixa linear, sensibilidade amperométrica, coeficiente de correlação e repetibilidade dos analitos também foram avaliadas. A validação do método foi realizada através do método de adição padrão conforme descrito na *Seção 5.2.6*.

5.2.6 Preparação da amostra

A amostra de vinhaça de cana-de-açúcar foi obtida a partir de uma indústria de açúcar e álcool. Inicialmente, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm durante 20 min visando à remoção das partículas sólidas presentes na mesma. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e filtrado (filtros $5,0$, $0,47$ e $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ da Millipore).

Antes de ser injetada na coluna, a amostra foi diluída com água ultrapura nas proporções de $1:100$ para a determinação de alanina, leucina e glicina, e de $1:10$ para a quantificação dos ácidos aspártico e glutâmico. O método de adição padrão foi utilizado para determinar a concentração dos aminoácidos presentes nas amostras. Três concentrações diferentes de alanina, glicina, leucina ($2,5 \times 10^{-4}$, $5,0 \times 10^{-4}$ e $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), ácido aspártico e ácido glutâmico ($2,5 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-5}$ e $7,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram injetadas nas amostras.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Comportamento eletroquímico do níquel sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido

Inicialmente, foi realizado um estudo acerca do comportamento do níquel sobre a superfície do RGO/GCE. O eletrodo modificado foi imerso em uma solução de sulfato de níquel $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Uma varredura cíclica foi realizada na faixa de potencial entre $-1,6$ e $0,75 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . O voltamograma resultante é apresentado na Figura 51.

No voltamograma cíclico, foram observados dois picos, um catódico na varredura direta (P1) e um anódico na varredura reversa (P2), Figura 51. O pico catódico é referente à eletrodeposição do níquel metálico na superfície do RGO/GCE em $-1,0 \text{ V}$ com corrente de pico de $159,9 \mu\text{A}$, Equação 17. O pico anódico em aproximadamente $-0,52 \text{ V}$ com corrente de pico anódico de $8,6 \mu\text{A}$ é referente à oxidação do níquel (0) metálico em oxidação de níquel (II) na superfície do eletrodo em meio de sulfato de sódio, Equação 18 (142).

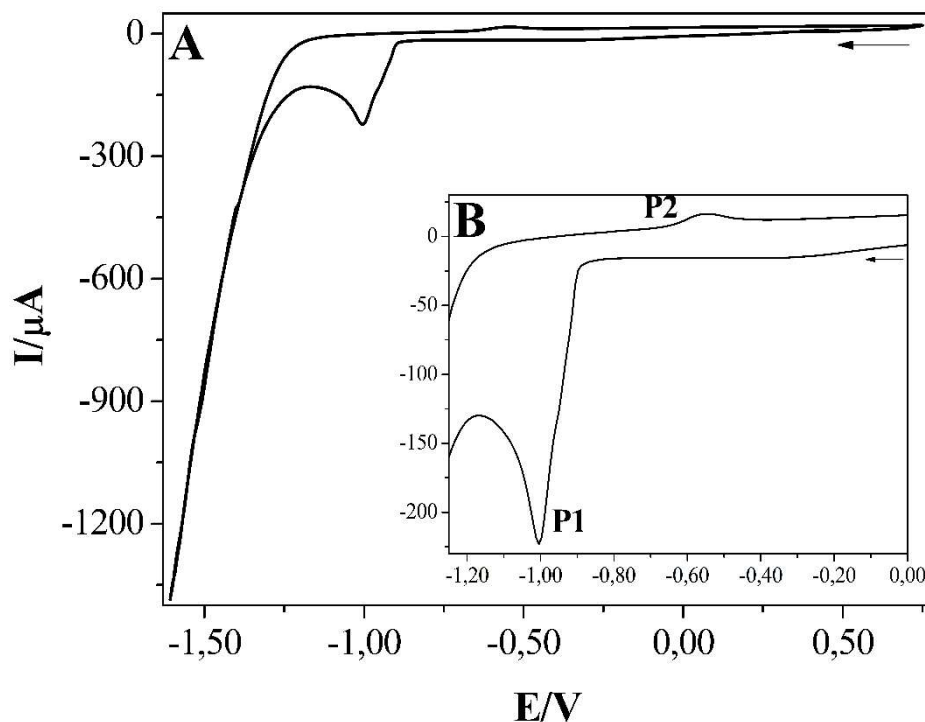
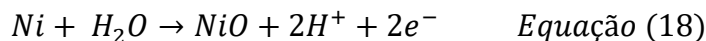


Figura 51 – (A) Voltamograma cíclico de uma solução de sulfato de níquel $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . (B) Inserido: Ampliação do voltamograma.

5.3.2 Otimização da eletrodeposição de níquel

A formação das NiNPs na superfície do eletrodo é influenciada diretamente pelo potencial (E), tempo e concentração do sal (C_{NiSO_4}) utilizados na eletrodeposição. Estes fatores influenciam diretamente no tamanho, características morfológicas, atividade eletrocatalítica das nanopartículas e propriedades físico-químicas das NPs. O potencial de redução afeta a forma das nanopartículas preparadas. O tempo permite a possibilidade de controlar o tamanho e a cobertura de nanoestruturas eletrodepositadas. A concentração do sal de níquel na solução influencia diretamente o tamanho, assim como o tempo e a quantidade de NPs eletrodepositadas na superfície do eletrodo (56,121). Além disso, para conduzir a nucleação homogênea das NPs em solução após a eletrodeposição é importante produzi-las em uma elevada concentração de hidroxilas, evitando, assim, a agregação das NPs durante a etapa de conversão (oxidação) das NPs metálica em NPs oxidadas.

A quantidade de NiNPs na superfície do RGO/GCE pode ser estimada através do excesso superficial (Γ) calculado a partir do amperograma da carga (Q) eletrodepositada de níquel sobre a superfície do RGO/GCE, Equação 19.

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA_e} \quad \text{Equação (19)}$$

em que o excesso superficial (Γ) foi calculado como uma concentração em mol cm^{-2} , o número de elétrons (n) envolvidos na reação é 2 (Equação 17), área superficial efetiva (A_e) do RGO/GCE de 1,2 cm^2 (Cálculo apresentado na *Seção 3.3.5*), constante de Faraday (F) 96485 (C mol⁻¹), e a carga (Q) em Coulomb (C) foi obtida a partir do amperograma da carga eletrodepositada de níquel.

A Figura 52 apresenta a otimização do processo de eletrodeposição das NiNPs na superfície do RGO/GCE. Nas Figuras 52 (A-C), são apresentados os Γ (-■-) na superfície do RGO/GCE e as respostas eletrocatalíticas (ΔI = corrente do pico anódico na presença de glicina – corrente de pico anódico na ausência de glicina) das modificações (-●-) em função do potencial de eletrodeposição (E), tempo de eletrodeposição e concentração do sulfato de níquel (C_{NiSO_4}).

Na Figura 52 (A), foi avaliado o efeito do potencial de eletrodeposição sobre a quantidade de nanopartículas de níquel depositadas na superfície do RGO/GCE. As nanopartículas foram eletrodepositadas na superfície do RGO/GCE a partir de uma solução precursora de $NiSO_4$ $2,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} em Na_2SO_4 0,10 mol L^{-1} , tempo de eletrodeposição de 120 s e os potenciais estudados foram de -1,0 a -1,6 V. A Figura 52 (A – Curva a) mostra a

variação do Γ com o potencial de redução. Foi observado que à medida que o potencial de eletrodeposição aumenta de -1,0 a -1,6 V, a quantidade de NiNPs depositado na superfície do RGO/GCE aumenta de $4,3 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-3}$ mol cm^{-2} , ou seja, há um aumento na espessura do filme de NiNPs eletrodepositado na superfície do RGO/GCE.

A fim de elucidar a relação entre a atividade eletroquímica das NiNPs e a eletro-oxidação dos aminoácidos, foi investigada a oxidação eletroquímica da glicina na superfície NiNPs-RGO/GCE preparados nos diferentes potenciais avaliados. A CV foi utilizada para estudar a oxidação da glicina no intervalo de potencial entre 0,20 a 0,75 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Primeiro, foi registrado um voltamograma do NiNPs-RGO/GCE na solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (eletrólito suporte); posteriormente, foi registrado outro voltamograma em uma solução de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A diferença da corrente (ΔI) entre o pico anódico na ausência e na presença de glicina foi considerada a resposta das modificações, Figura 53.

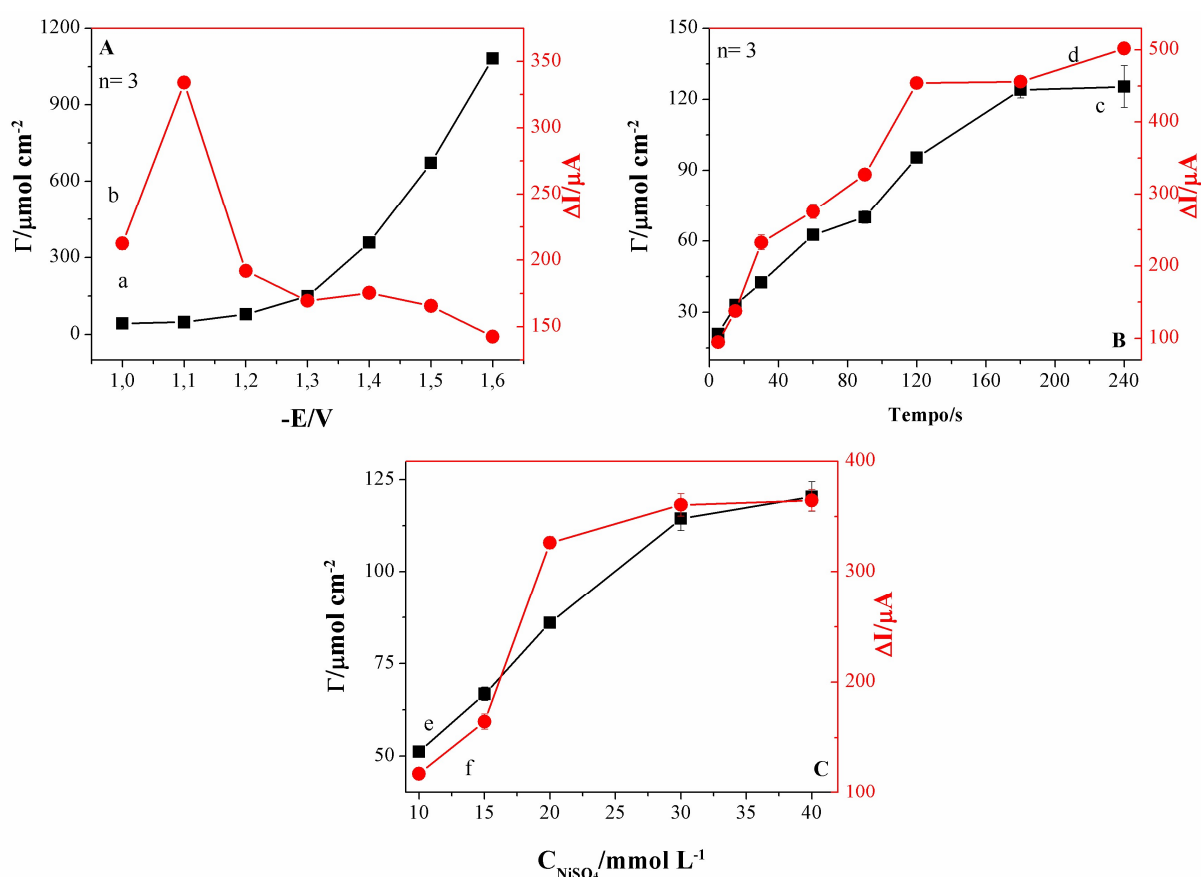


Figura 52 – Otimização da eletrodeposição das NiNPs na superfície do RGO/GCE ($n=3$). Curvas do excesso superficial (Γ , -■-) e as respostas eletrocatalíticas (ΔI , -●-) das modificações na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição, (B) tempo de eletrodeposição e (C) concentração de sulfato de níquel (C_{NiSO_4}).

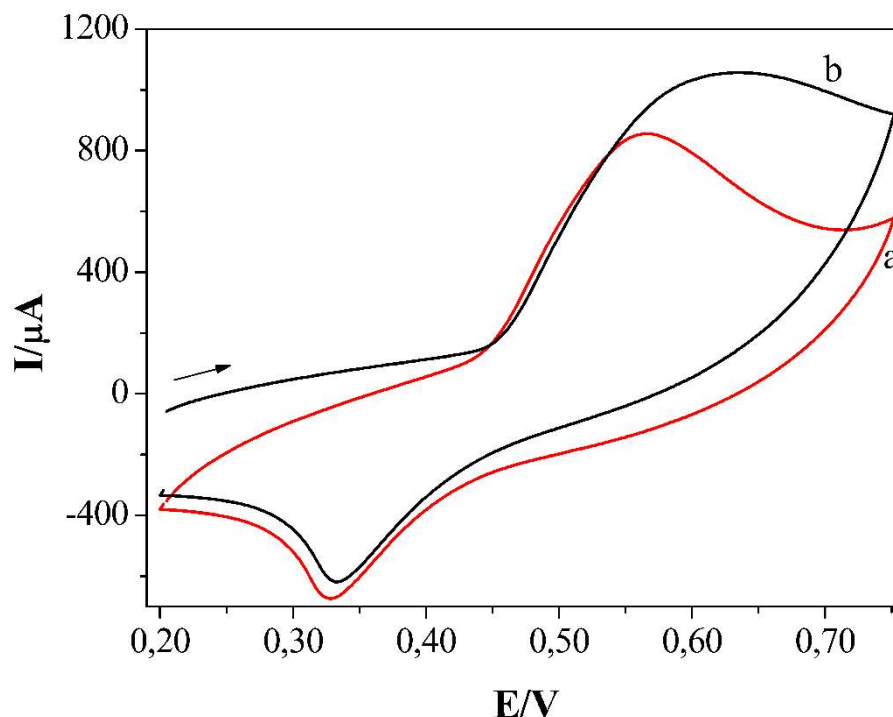


Figura 53 – Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o NiNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

A Figura 52 (A – Curva b) mostra a variação da resposta dos eletrodos modificados em função do potencial de redução. Diferentemente do que ocorre na superfície do RGO/GCE, onde a glicina não apresenta nenhuma resposta, na superfície do NiNPs-RGO/GCE a glicina foi facilmente oxidada, e uma corrente de oxidação foi observada, indicando que as NiNPs exibem atividade eletrocatalítica para a oxidação da glicina. Foi observado que a corrente de oxidação da glicina aumenta consideravelmente quando os potenciais mudam de $-1,0$ a $-1,1 \text{ V}$. Quando os potenciais são reduzidos ainda mais de $-1,2$ a $-1,6 \text{ V}$, a corrente de oxidação da glicina diminuí drasticamente e permanece praticamente estável. Assim, o potencial de $-1,1 \text{ V}$ utilizado para a eletrodeposição das NiNPs apresentou a melhor performance para oxidação da glicina devido, provavelmente, ao menor tamanho e ao melhor arranjo espacial das NiNPs na superfície do RGO/GCE.

A influência do tempo de eletrodeposição sobre a quantidade das NiNPs depositadas na superfície do RGO/GCE e a resposta da atividade eletroquímica dos eletrodos modificados são apresentadas na Figura 52 (B). As modificações foram realizadas a partir de uma solução precursora de NiSO_4 $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, potencial de $-1,1 \text{ V}$ e os tempos de eletrodeposição estudados foram de 5 a 240 s. A Figura 52 (B – Curva c) apresenta o Γ em função do tempo de eletrodeposição. Foi observada uma linearidade na quantidade de NiNPs depositada com o tempo de eletrodeposição de 5 a 180 s, indicando o aumento da

quantidade de NiNPs de $2,1 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ mol cm^{-2} , respectivamente. A partir de 180 s, a quantidade de NiNPs eletrodepositada na superfície do RGO/GCE permanece constante.

A corrente de oxidação da glicina em função do tempo de eletrodeposição das NiNPs na superfície do RGO/GCE é apresentada na Figura 52 (B – Curva d). Foi observado que a corrente de oxidação da glicina tem um ganho considerável quando o tempo de eletrodeposição aumenta de 5 a 120 s. Estes resultados indicam uma elevada atividade eletroquímica dos eletrodos modificados nesses tempos de eletrodeposição. A partir de 120 s, a corrente de oxidação da glicina na superfície do NiNPs-RGO/GCE permanece praticamente constante até 240 s. Isso ocorre porque as NiNPs formadas a partir de 120 s aumentam de tamanho e começam a perder as propriedades de NPs. Conseqüentemente, a atividade eletroquímica das NiNPs na oxidação da glicina deixa de ser evidente, podendo até diminuir a atividade eletroquímica a partir de 240 s (56). As NiNPs formadas em 120 s apresentaram a melhor atividade eletroquímica para oxidação da glicina. Contudo, as NPs formadas nesse tempo de eletrodeposição podem estar no limite de formação das NPs e deixando de ser NPs. Sendo assim, foi selecionado o tempo de eletrodeposição de 90 s para garantir que haja a formação das NiNPs na superfície do RGO/GCE.

O efeito da concentração da solução de NiSO_4 utilizada como solução precursora das NiNPs e a resposta da corrente de oxidação da glicina nos eletrodos modificados são apresentados na Figura 52 (C). As modificações foram realizadas aplicando potencial de -1,1 V, tempo de eletrodeposição de 90 s, e as concentrações de NiSO_4 utilizadas foram de $1,0 \times 10^{-2}$ a $4,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} em Na_2SO_4 0,10 mol L^{-1} . O Γ em função da concentração da solução de NiSO_4 são apresentadas na Figura 52 (C – Curva e). Foi observado que o aumento da concentração da solução de NiSO_4 de $1,0 \times 10^{-2}$ a $3,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} proporcionou um crescimento linear do Γ de $5,1 \times 10^{-5}$ a $1,1 \times 10^{-4}$ mol cm^{-2} , respectivamente. Após a concentração de $3,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} , o crescimento das NiNPs permaneceu praticamente estável sobre a superfície do RGO/GCE.

A resposta da oxidação da glicina para as NiNPs eletrodepositadas em diferentes concentrações de NiSO_4 é apresentada na Figura 52 (C – Curva f). A corrente de oxidação da glicina aumenta significativamente com o aumento da concentração de NiSO_4 de $1,0 \times 10^{-2}$ a $2,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} ; a partir de $3,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} , a resposta do analito permanece constante. Esses resultados indicam que as NiNPs preparadas sobre a superfície do RGO/GCE até a concentração de NiSO_4 $2,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} possuem alta atividade eletroquímica sobre a oxidação da glicina devido às propriedades de nanomaterial. Concentrações acima $2,0 \times 10^{-2}$

mol L⁻¹ propiciam a formação de NiNPs maiores, o que provoca a diminuição das propriedades do nanomaterial. Portanto, a solução de NiSO₄ 2,0×10⁻² mol L⁻¹ foi selecionada como a melhor solução precursora para o preparo das NiNPs na superfície do RGO/GCE.

Após a determinação das melhores condições para a eletrodeposição das NiNPs sobre a superfície do RGO/GCE, um voltamograma cíclico do NiNPs-RGO/GCE em NaOH 0,10 mol L⁻¹ foi registrado no intervalo de potencial entre 0,75 e -1,6 V com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹, Figura 54. No voltamograma, foram observados um pico anódico (PA) e dois picos catódicos (PC) no intervalo de potencial estudado. Os PC1 e PC2 são atribuídos à redução das espécies de Ni(III) a Ni(II) em 0,42 V e de Ni(II) a Ni(0) em -0,42 V, respectivamente. O PA1 é atribuído à oxidação das espécies de Ni(II) a Ni(III) em 0,54 V, Figura 54.

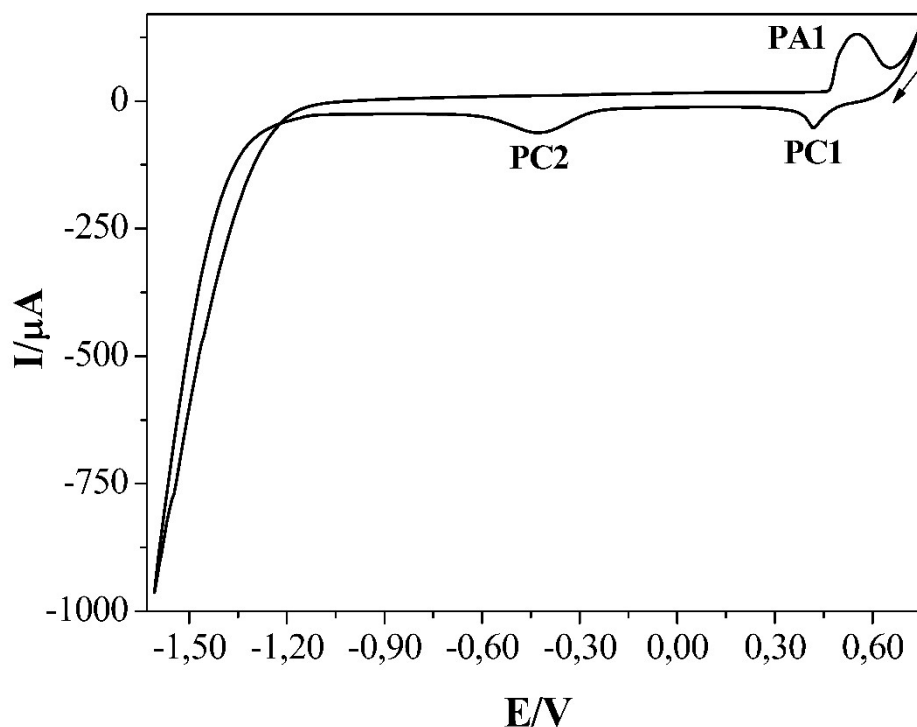


Figura 54 – Voltamograma cíclico do NiNPs-RGO/GCE em NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹.

O NiNPs-RGO/GCE otimizado foi submetido a sucessivos voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial entre 0,10 e 0,75 V com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ a fim de investigar a oxidação das NPs metálicas de níquel sobre a superfície do RGO/GCE, Figura 55. No primeiro voltamograma cíclico, inicia-se o processo de oxidação das nanopartículas, Figura 55 (Curva a). O pico observado em 0,62 V é referente à oxidação de Ni (II) a Ni (III) e o pico em 0,38 V é da redução de Ni (III) a Ni (II).

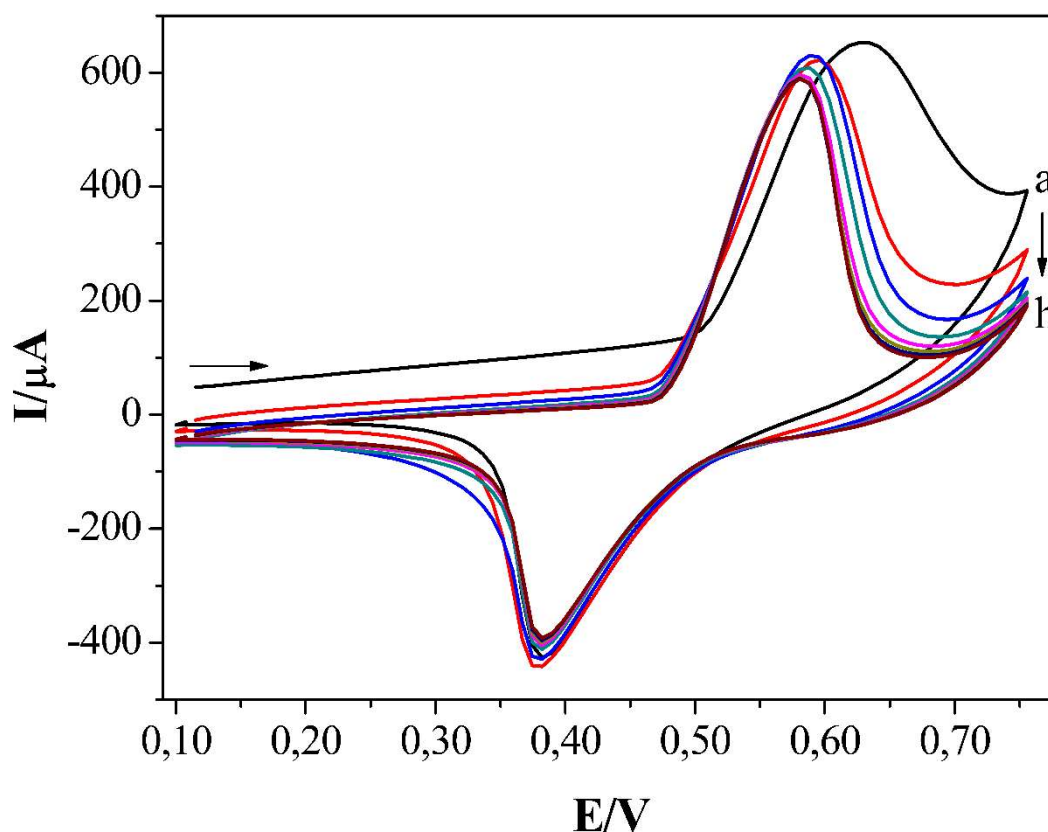


Figura 55 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da passivação do NiNPs-RGO/GCE em NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹: (a) 1º Ciclo; (b) 2º Ciclo; (c) 5º Ciclo; (d) 10º Ciclo; (e) 15º Ciclo; (f) 20º Ciclo; (g) 25º Ciclo; e (h) 30º Ciclo.

O crescimento do óxido/hidróxido de níquel continua nos ciclos subsequentes, e os picos anódicos e catódicos se estabilizam em 0,58 e 0,38 V, respectivamente. Além disso, as intensidades das correntes dos picos anódico e catódico foram se estabilizando com a realização dos ciclos sucessivos de potencial, sendo necessários 30 ciclos até atingir a estabilização das correntes. Foi observado, também, que a razão entre as correntes de pico anódico e pico catódico (I_{pa}/I_{pc}) aumenta com o número de cíclicos realizados, e a variação dos potenciais (ΔE_p) catódicos (E_{pc}) e anódicos (E_{pa}) fica estável a partir do décimo ciclo, Tabela 13.

Assim, é possível concluir que as melhores condições para a modificação do RGO/GCE com NiNPs foram potencial de -1,1 V, tempo de eletrodeposição de 90 s, concentração de NiSO₄ de $2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em Na₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ e 30 voltamogramas ciclos sucessivos no intervalo de potencial entre 0,10 e 0,75 V em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, uma vez que são necessários para oxidação e para estabilizar as NiNPs na superfície do RGO/GCE.

Tabela 13 – Parâmetros eletroquímicos dos voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das NiNPs-RGO/GCE em NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

<i>Voltamograma</i>	E_{pa}/V	$I_{pa}/\mu A$	E_{pc}/V	$I_{pc}/\mu A$	I_{pa}/I_{pc}	ΔE_P
1°	0,62	395,9	0,38	-422,2	0,94	0,24
2°	0,59	472,3	0,38	-415,1	1,1	0,21
5°	0,59	521,9	0,38	-388,9	1,3	0,21
10°	0,58	520,5	0,38	-366,4	1,4	0,20
15°	0,58	521,4	0,38	-361,6	1,4	0,20
20°	0,58	521,8	0,38	-358,1	1,5	0,20
25°	0,58	524,6	0,38	-355,2	1,5	0,20
30°	0,58	525,9	0,38	-351,8	1,5	0,20

5.3.3 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel

A EIS é amplamente utilizada para obter informações sobre a transferência de elétrons entre o eletrólito e a superfície do eletrodo. A caracterização por EIS foi realizada com uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em KCl 0,10 mol L⁻¹, que foi empregado como sonda redox no intervalo de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz, sob amplitude de 5,0 mV e potencial aplicado de 0,22 V, Figura 56.

A Figura 56 (A) apresenta os diagramas EIS dos GCE sem modificação e NiNPs-RGO/GCE. Os diagramas apresentam uma região linear na região de baixa frequência, indicando que há resistência Warburg limitando a difusão no processo eletroquímico, e um semicírculo de transferência de elétrons na região de alta frequência que podem ser usados para descrever as propriedades de interface do eletrodo.

O circuito de Randles foi utilizado como circuito equivalente para os dados de EIS. O circuito consiste em uma resistência à solução (R_s), resistência à transferência de carga (R_{ct}), elemento de fase constante (CPE) e impedância de Warburg (W) em paralelo, Figura 56 (B).

Na Figura 56 (A), foi observado que a resistência à transferência de elétrons na superfície do NiNPs-RGO/GCE ($R_{ct} = 153 \Omega$) diminuiu aproximadamente 4,8 vezes em comparação com o GCE não modificado ($R_{ct} = 738 \Omega$). Os resultados obtidos confirmam o sucesso da modificação do eletrodo com RGO e NiNPs, além da melhoria observada na transferência de elétrons.

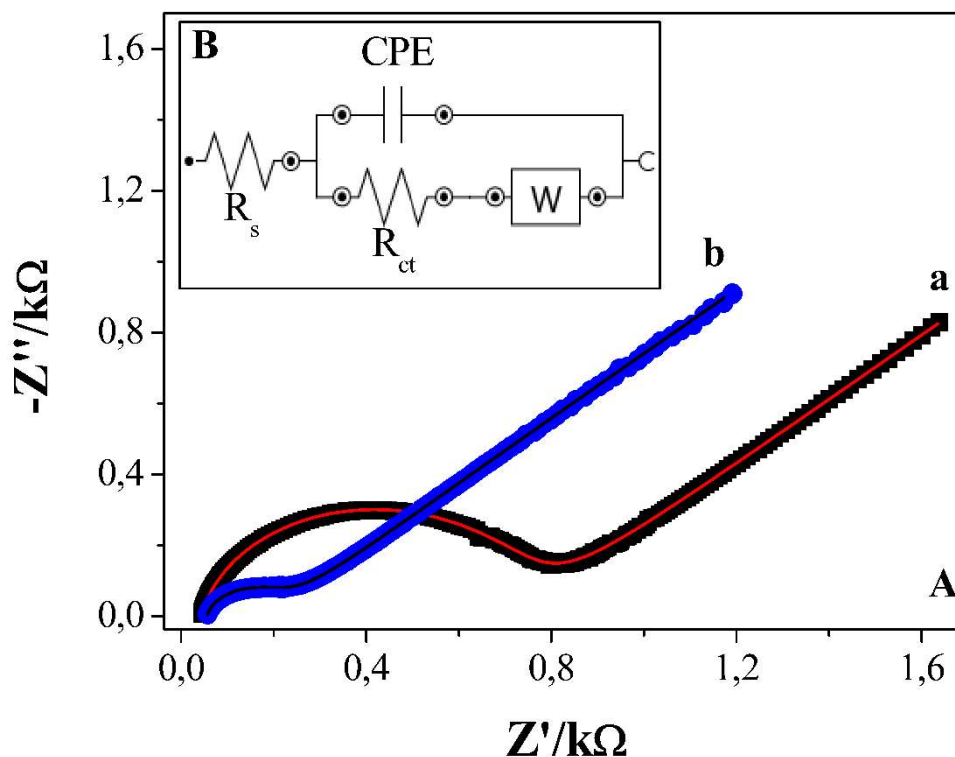


Figura 56 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e NiNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas vermelha (a) e preta (b) correspondentes as simulações dos dados experimentais. (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de EIS.

5.3.4 Caracterização superficial do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel

As morfologias do GCE sem modificação, RGO/GCE e NiNPs-RGO/GCE foram caracterizadas por SEM, EDX, Raman, XPS, TEM e HRTEM. Na Figura 57, são apresentadas as imagens de SEM dos eletrodos sem modificação e modificados. A modificação do GCE com RGO e NiNPs foi confirmada por imagens de SEM, como mostrado na Figura 57.

A Figura 57 (A) apresenta o GCE sem modificação, e as Figuras 57 (B-F) apresentam a modificação da superfície do GCE com RGO (Figura 57, C), NiNPs metálicas (NiMNPs, Figura 57, C e D) e nanopartículas de níquel oxidadas (NiNPs, Figura 57, E e F) nas condições otimizadas em baixa e alta resolução. Na Figura 57 (B), é observada a natureza rugosa das folhas de RGO em uma distribuição aleatória que é altamente favorável a modificações com as NiNPs, além de contribuir com o aumento da área superficial do GCE. Ainda, nas Figuras 57 (C-F), são observados pontos claros sobre a superfície do RGO, indicando que as NiMNPs e as NiNPs estão dispersas de forma homogênea sobre toda a superfície e ocupam densamente as folhas de RGO.

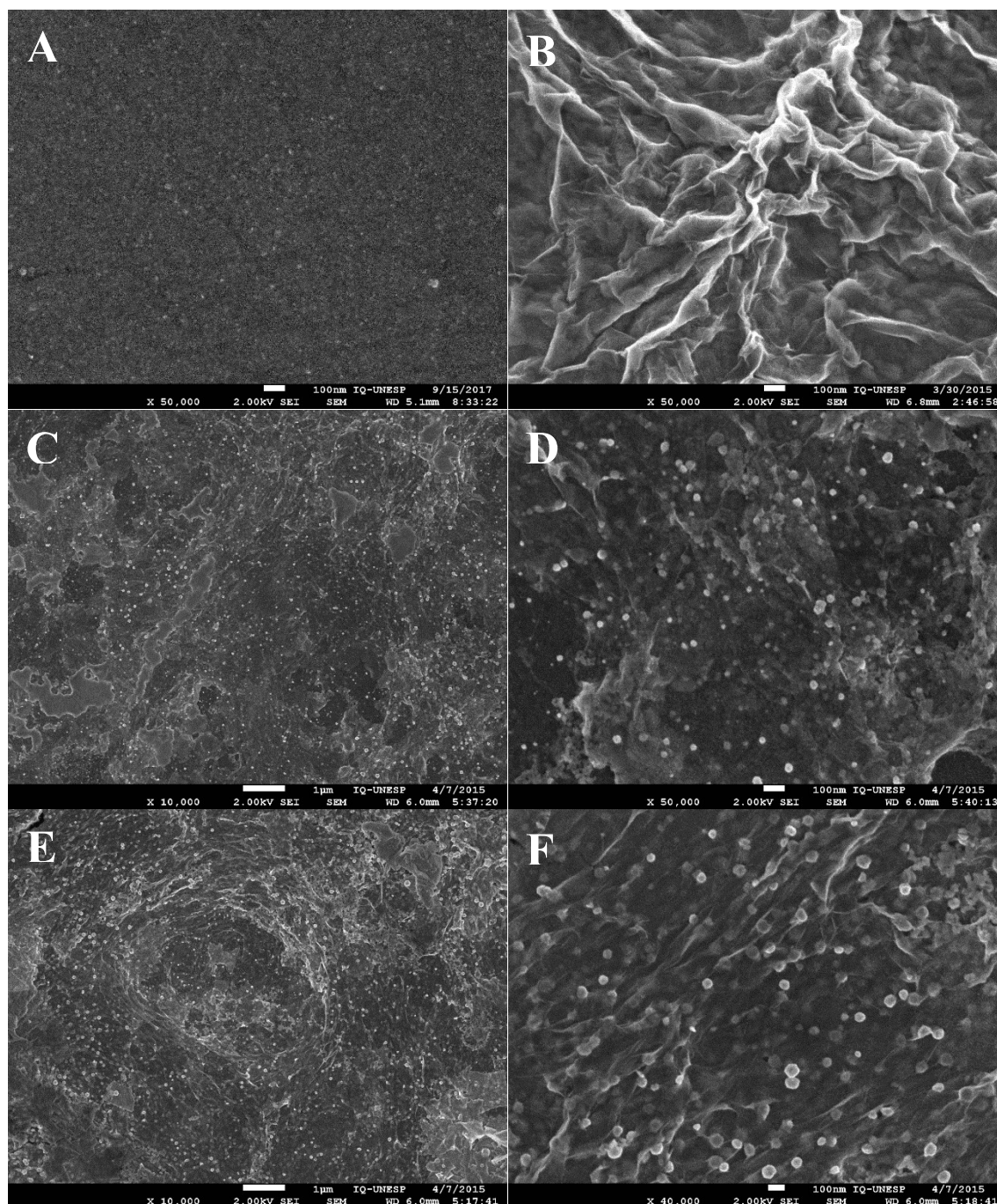


Figura 57 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE, RGO/GCE modificado com nanopartículas metálicas (NiMNP) de níquel em (D) baixa e (E) alta resolução, e RGO/GCE modificado com nanopartículas de níquel oxidadas (NiNP) em (F) baixa e (G) alta resolução.

A partir das imagens de SEM (Figura 57, D e E), foram obtidos histogramas das NiMNP e NiNP sobre a superfície do eletrodo modificado com RGO, os quais são apresentados na Figura 58. As NiMNP eletrodepositadas sobre a superfície do RGO/GCE exibem tamanhos entre 1 e 76 nm (300 nanopartículas foram contadas), e diâmetro médio de

32 ± 16 nm, Figura 58 (A). Foi observado que as nanopartículas aumentaram de tamanho após passarem pelo processo de oxidação em meio alcalino e apresentaram tamanhos de 11 a 121 nm, com tamanho médio de 46 ± 20 nm (300 nanopartículas foram contadas), Figura 58 (B).

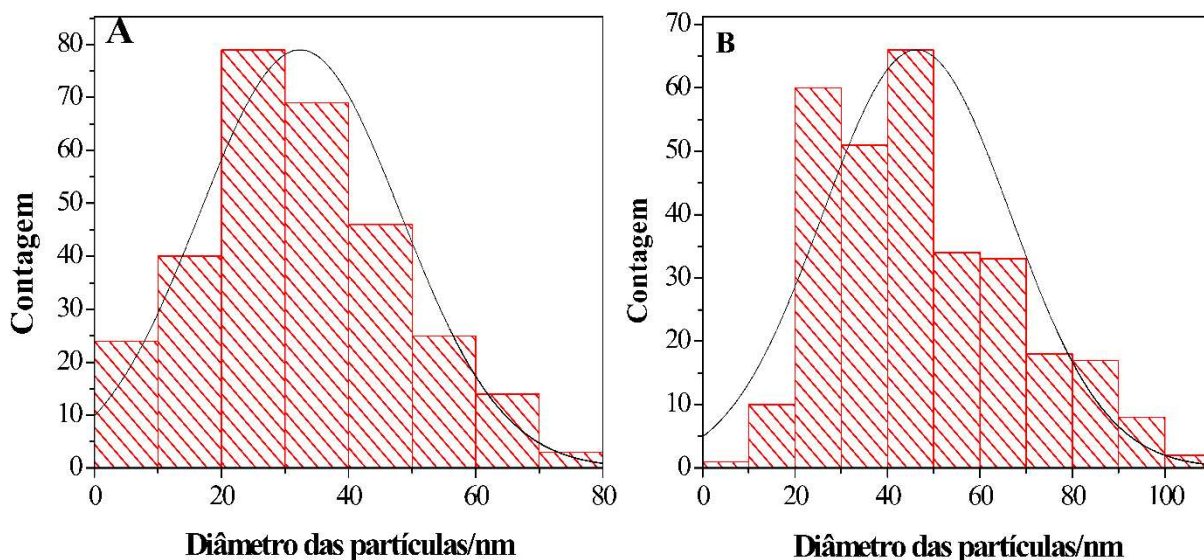


Figura 58 – Histogramas apresentando as destruições das (A) NiMNPs e (B) NiNPs sobre a superfície do RGO/GCE.

Foram realizadas análises de EDX para verificar a composição do RGO/GCE modificado com NiMNPs e NiNPs. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 59. Picos de carbono (C), oxigênio (O) e níquel (Ni) foram observados nas superfícies dos eletrodos modificados. Esses resultados confirmam a modificação do RGO/GCE com NiNPs.

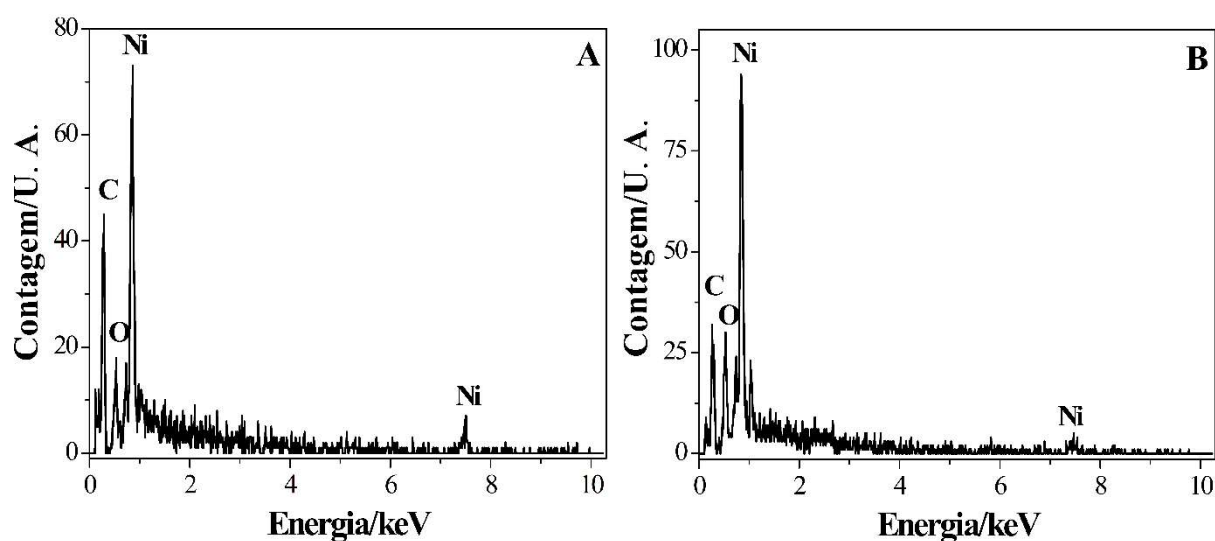


Figura 59 – Espectros de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo (A) NiMNPs e (D) NiNPs.

A superfície do RGO/GCE modificado com NiMNP e NiNP foi caracterizada por espectroscopia Raman para demonstrar o efeito das modificações na superfície do eletrodo. Os espectros de espalhamento Raman para os eletrodos modificado com NiMNP e NiNP são apresentados na Figura 60. Os espectros dos eletrodos modificados apresentam um pico de banda D em $\sim 1328 \text{ cm}^{-1}$ correspondente à presença de defeitos, tais como a ruptura na ligação sp^2 , a formação de rugas e a presença de grupos funcionais, e outro pico de banda G em $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ atribuída à desordem no sistema de carbono hibridizado sp^2 .

Outras bandas menos intensas em ~ 2659 e ~ 2930 correspondentes às bandas 2D (processo de dupla ressonância que conecta fônons a estrutura da banda eletrônica) e D+G (defeitos pontuais plano basal das arestas do grafeno), respectivamente (82,99,143).

A razão ID/IG do eletrodo modificado com NiMNP foi de 1,3, quando as nanopartículas foram oxidadas. A razão ID/IG aumentou para 1,5 devido ao aumento do tamanho das nanopartículas que provocam maior rugosidade superficial ao eletrodo modificado, as quais são maiores do que no RGO/GCE (1,1).

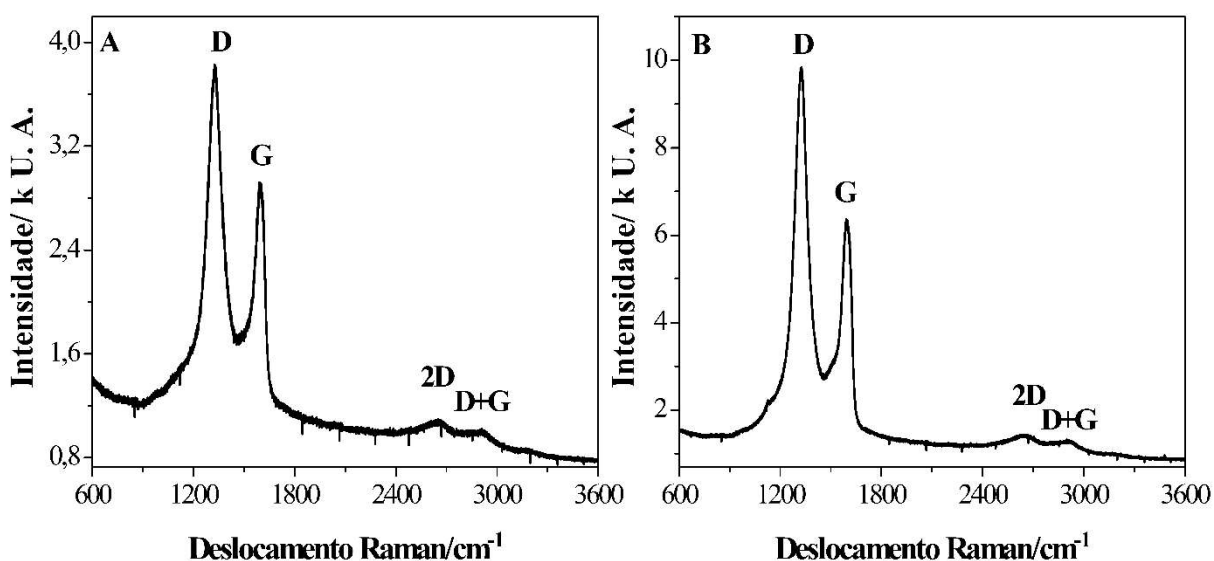


Figura 60 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo (A) NiMNP e (D) NiNP.

A modificação do RGO/GCE com NiNP foi caracterizada por XPS para estudar a oxidação do níquel nessa superfície, Figura 61. O espectro exploratório (0 a 1490 eV) da análise é apresentado na Figura 61 (A). No espectro exploratório do NiNP-RGO/GCE, foram observados sinais de oxigênio, carbono e níquel com energias de ligações em 25,6 (O 2s), 70,1 (Ni 3p), 144,9 (Ni 2s), 285,1 (C 1s), (O 1s), 858,2 (Ni 2p_{3/2}) e 879,0 (Ni 2p_{1/2}) eV.

A análise de XPS mostrou a presença Ni 3p, C 1s e O 1s com proporções atômicas de 8,4, 60,6 e 29,9 %, respectivamente, confirmando a modificação da superfície do GCE com

RGO e NiNPs. No decorrer deste estudo, as regiões de Ni 2p_{3/2}, O 1s e C 1s foram coletadas e analisadas individualmente.

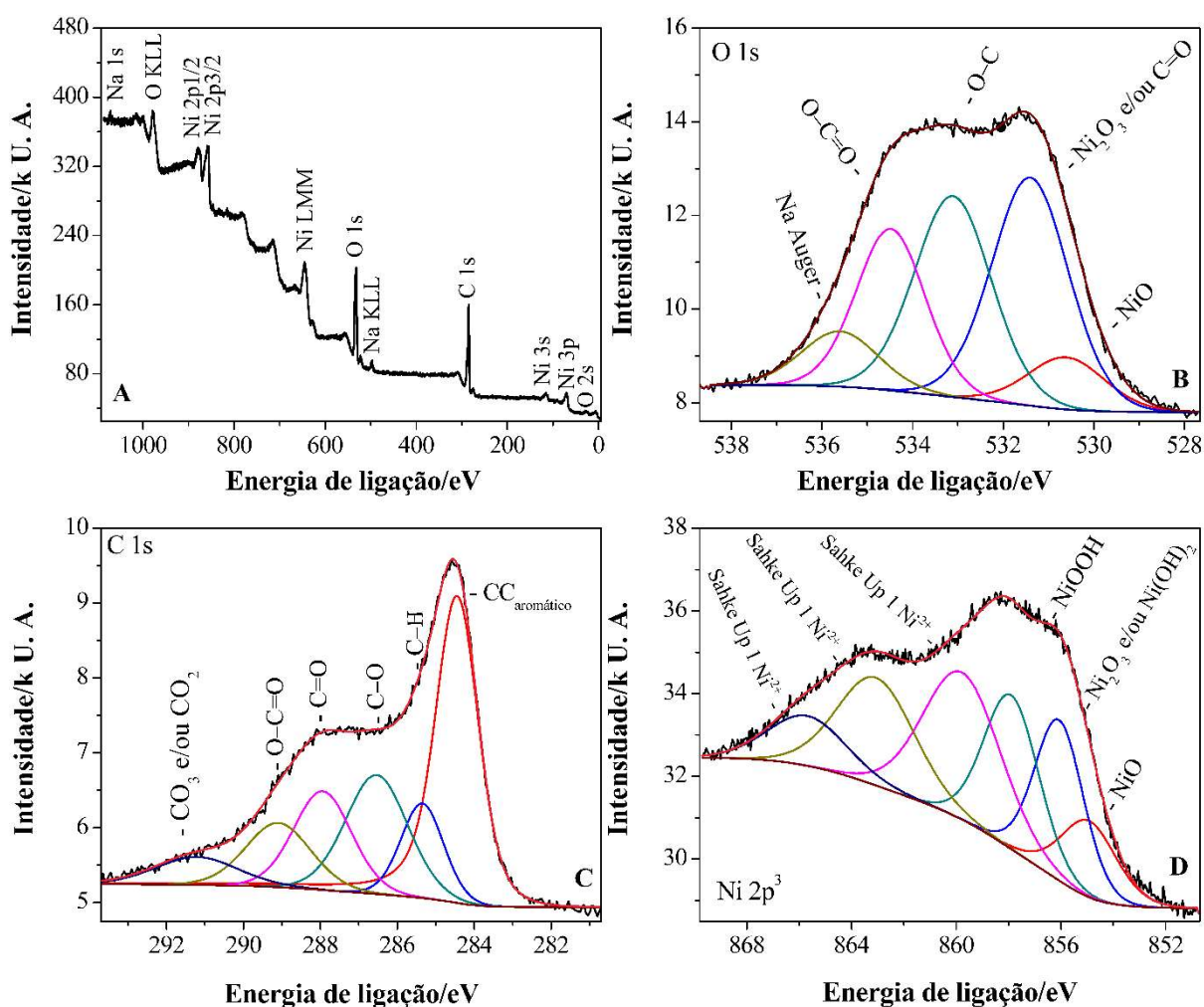


Figura 61 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Ni 2p₃ com suas deconvoluções para o NiNPs-RGO/GCE.

O espectro de alta resolução da região de O 1s pôde ser deconvoluído em quatro componentes correspondentes aos átomos de oxigênio com energias de ligações em 530,6 (C-O-Ni), 531,4 (C=O/Ni-O), 533,1 (C-O) e 534,5 (O-C=O) eV, e uma componente Auger Na sobreposta com O 1s em 535,6 (Na KLL) eV que pode ser do NaOH utilizado na oxidação das NiNPs, Figura 61(B). O pico localizado em 530,6 eV é atribuído à formação da ligação de C-O-Ni a partir da quebra das ligações dos grupos epóxi (C-O-C) e hidroxila (C-OH) para formar uma ligação entre as NiNPs e o RGO (144).

O espectro de alta resolução da região de C 1s foi deconvoluído em seis componentes, Figura 61 (C), que foram associadas a diferentes formas de oxidação e hibridizações do carbono com energias de ligações em 284,4 (CC_{aromático}; 39,4 %), 285,4 (C-H; 10,4 %), 286,5

(C-O, 19,0 %), 287,9 (C=O; 14,7 %), 289,1 (O-C=O; 10,7 %) e 291,2 (pico satélite *shake-up* $\pi \rightarrow \pi^*$; 5,9 %) eV com suas respectivas proporções atômicas (82,88).

A energia de ligação do pico Ni 2p_{3/2} (858,2 eV) é diferente de outras reportadas para Ni(OH)₂ (855,6 eV), NiO (853,7 eV), NiS (853,1 eV) e Ni (852,6 eV) (99,145). A deconvolução do espectro de alta resolução da região de Ni 2p_{3/2} apresentou uma estrutura complexa e gerou três picos com energias de ligações em 854,9, 856,1 e 857,9 eV, e picos satélites com altas energias de ligações em 859,8, 863,1 e 865,7 eV, respectivamente, Figura 61 (D). Esses picos satélites podem ser atribuídos a excitações multieletrons (picos *shake-up*). O espectro não apresentou um pico ombro em 852,6 eV, atribuído a níquel metálico (99,145,146), logo, esta espécie não está presente na superfície do eletrodo modificado. Os picos com energias de ligações em 854,9 eV são atribuídos, respectivamente, a NiO (145) e NiOOH (147). O pico com energia de ligação em 856,1 eV possui energia de ligação diferente do que em níquel metálico (855,3 eV) (145), filme de níquel (855,7 eV) (147), níquel em GO (855,5 e 855,7 eV) (101,148), níquel em esferas de GO (854,2 eV) (146) e níquel em RGO (855,2 eV) (99). Portanto, esse resultado sugere que as nanopartículas de níquel sobre a superfície do eletrodo modificado podem ser de Ni₂O₃ (856,1 eV) (149,150).

A análise quantitativa de XPS a partir dos espectros de alta resolução na região de C1s do NiNPs-RGO/GCE mostrou que a concentração de oxigênio aumentou de 21,2 at.% (RGO/GCE) para 44,4 at.% (NiNPs-RGO/GCE), e a concentração de carbono diminuiu de 78,8 at.% (RGO/GCE) para 55,6 at.% (NiNPs-RGO/GCE). A razão atômica O/C do NiNPs-RGO/GCE (0,80 %) aumentou aproximadamente três vezes em comparação com RGO/GCE (0,27 %) após a modificação do RGO/GCE com as NiNPs. Esses resultados indicam que o aumento da concentração de oxigênio na superfície do RGO/GCE deve provir, principalmente, da mistura dos óxidos NiO e Ni₂O₃.

Para elucidar a estrutura e morfologia da superfície do NiNPs-RGO/GCE, foram realizadas análises de TEM e HRTEM, Figura 62. A partir da imagem de TEM, foi observado que as nanopartículas de níquel estão ancoradas no RGO, Figura 62 (A). Além disso, a imagem de HRTEM indica claramente que as NiNPs estão envolvidas pelo RGO formando uma espécie de nanopartículas *core-shell*, Figura 62 (B). A natureza cristalina das NiNPs foi confirmada utilizando padrões de difração de elétrons da área selecionada, Figura 62 (C). A imagem ampliada da Figura 62 (C) revela franjas de rede cristalina com espaçamento interplanar de 0,19 nm correspondente aos planos (112) do Ni₂O₃(151). Esses resultados

indicam que as nanopartículas formadas na superfície do RGO/GCE é predominantemente formada por NPs de Ni_2O_3 corroborando com os resultados obtidos nas análises de XPS.

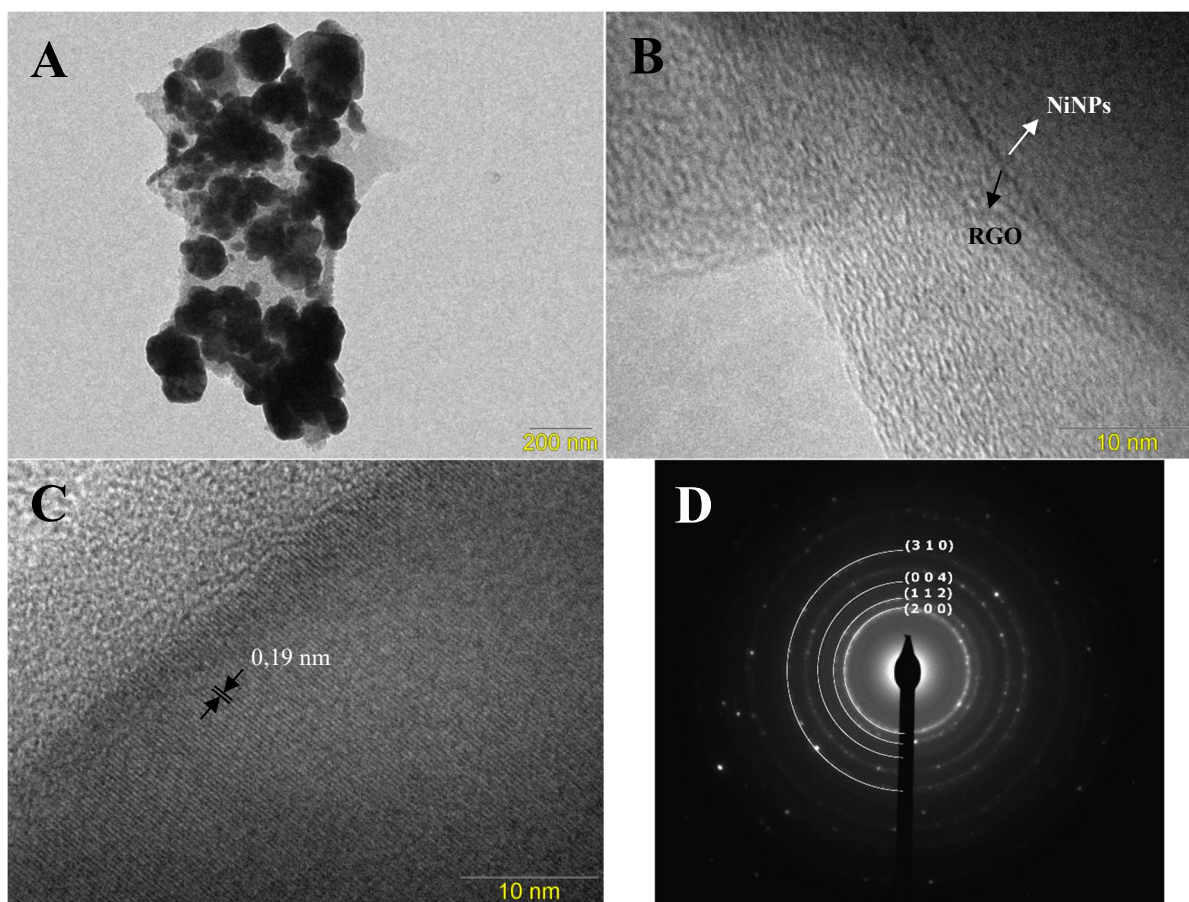


Figura 62 – Imagens de (A) TEM e (B) imagens HRTEM do composto NiNPs/RGO, (C) imagem ampliada da área quadrada e (D) padrão de difração cristalina de uma NiNPs.

5.3.5 Estudo do comportamento dos aminoácidos em solução alcalina

Um estudo comparativo sobre o comportamento eletroquímico de diferentes eletrodos foi realizado, usando CV, em solução aquosa de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de $0,10$ a $0,80 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos resultantes são apresentados na Figura 63.

Na Figura 63, não foram observados picos redox na GCE sem modificação (Curva a) e RGO/GCE (Curva c). No entanto, RGO/GCE apresentou maior corrente de fundo, indicando que a área superfície ativa aumentou devido ao RGO. Quando GCE (Figura 63, curva b) e RGO/GCE (Figura 63, curva d) foram modificados com NiNPs, um par de picos redox bem definidos foi obtido nos voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados.

O potencial do pico anódico (E_{pa}) observado em aproximadamente $0,49 \text{ V}$, e o potencial de pico catódico (E_{pc}) em torno de $0,38 \text{ V}$ são atribuídos ao par redox Ni(II)/Ni(III)

no NiNPs/GCE em meio alcalino. O par de picos redox apresentou separação de picos (ΔE_p) de aproximadamente 0,11 V no NiNPs/GCE, Figura 63 (Curva b).

O NiNPs-RGO/GCE apresentou um par de picos redox com E_{pa} de 0,57 V, E_{pc} de 0,32 V, ΔE_p de 0,25. Os picos apresentaram maiores correntes de pico anódico e catódico, e são mais largos do que no NiNPs/GCE, Figura 63 (curva d). A I_{pa} do NiNPs-RGO/CGE foi 3,2 vezes mais elevada do que a do NiNPs/GCE, um ganho de corrente que pode ser atribuído a maior área superficial, condutividade, uma quantidade de carga aumentada do electrocatalisador (NiNPs) no suporte de RGO e melhores propriedades electrocatalíticas em NiNPs-RGO/GCE. O mecanismo de formação das nanopartículas com as reações químicas e electroquímicas em condições alcalinas foi resumido no esquema a seguir (152,153):

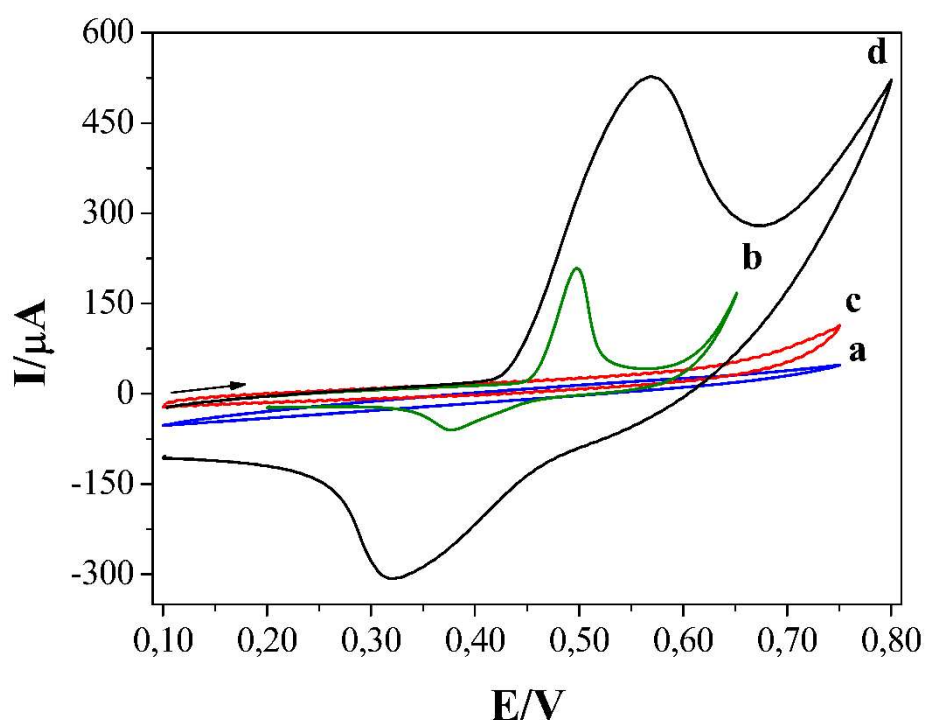
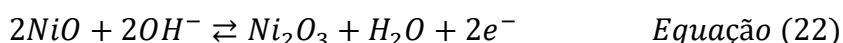
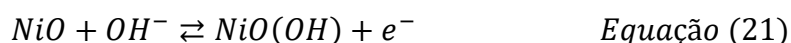
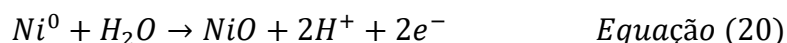


Figura 63 – Voltamogramas cíclicos obtidos dos (a) GCE sem modificação, (b) NiNPs/GCE, (c) RGO/GCE e (d) NiNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

A eletro-oxidação de aminoácidos foi investigada por CV utilizando o NiNPs-RGO/GCE em NaOH 0,10 mol L⁻¹. Foi observado que o RGO/CGE modificado com NiNPs na presença dos aminoácidos 5,0×10⁻³ mol L⁻¹ apresentou um ganho de corrente significativo no pico anódico em comparação com eletrodo modificado na ausência dos aminoácidos

(NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$). Tal ganho de corrente ocorre devido às NiNPs em meio alcalino gerarem eletroquimicamente as espécies NiOOH que apresentam uma elevada atividade electrocatalítica para a oxidação de compostos orgânicos (25,66). Os voltamogramas cíclicos típicos para a eletro-oxidação dos aminoácidos alanina, leucina, glicina, ácido glutâmico e ácido aspártico em meio alcalino obtidos no intervalo de potencial entre 0,10 e 0,80 V são apresentados na Figura 64.

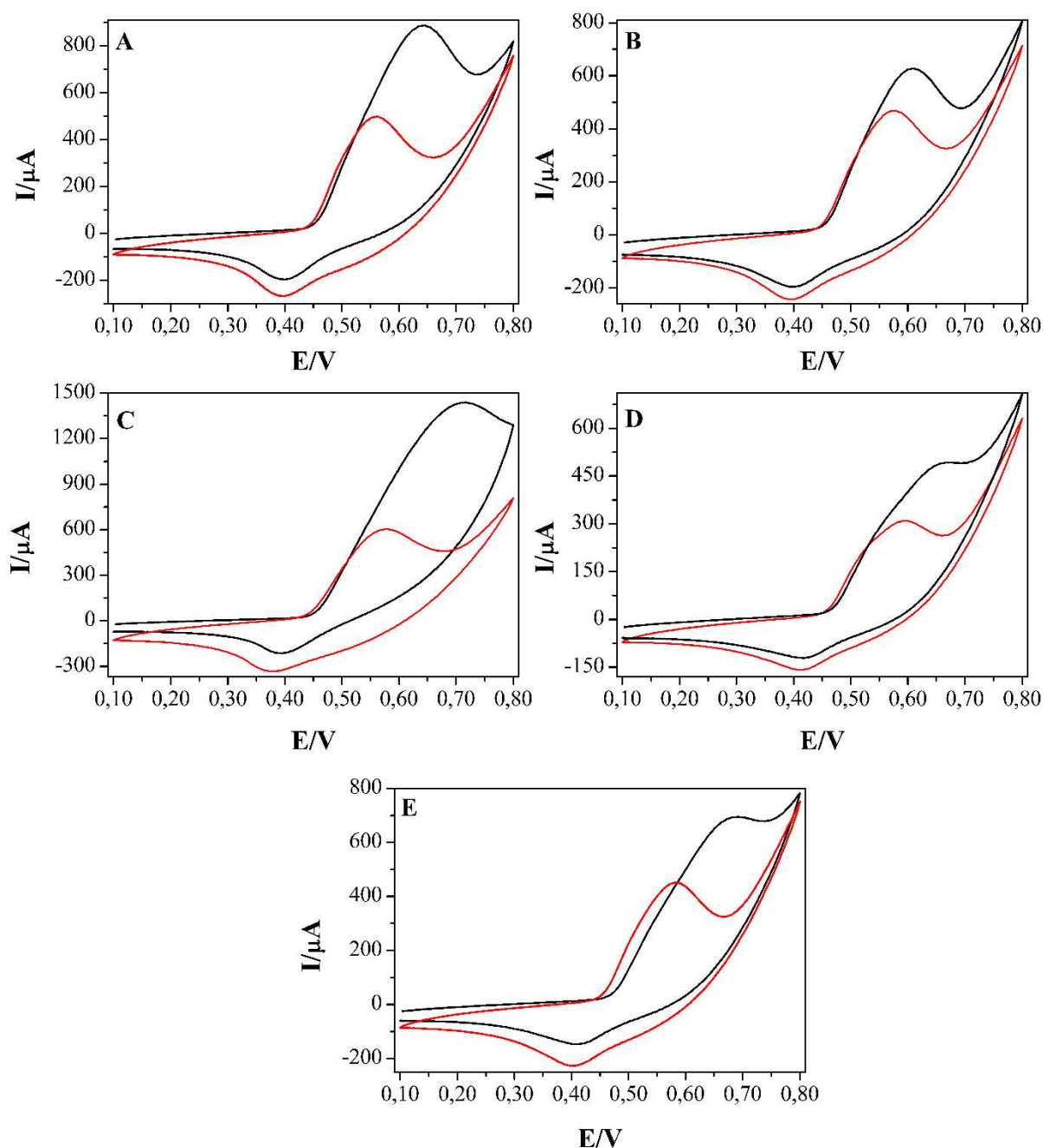
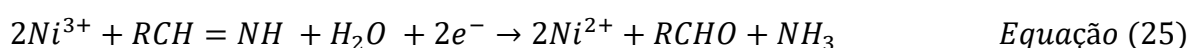
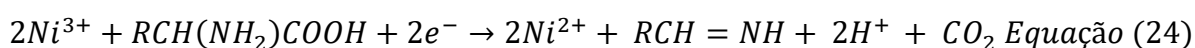


Figura 64 – Voltamogramas cíclicos na ausência (curvas vermelhas) e na presença de alanina (A), leucina (B), glicina (C), ácido glutâmico (D) e ácido aspártico (E) em soluções de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do NiNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e aminoácidos nas concentrações de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 64 (A) mostra o voltamograma cíclico do NiNPs-RGO/GCE na ausência e na presença de alanina em solução alcalina. Na ausência de alanina, um par de picos redox bem definido foi obtido no NiNPs-RGO/GCE. Após a adição de alanina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a I_{pa} do NiNPs-RGO/GCE aumentou significativamente, enquanto a I_{pc} diminuiu. Esse comportamento, de fato, evidencia a oxidação catalítica dos aminoácidos pelas espécies de Ni(III). A I_{pa} de alanina aumenta linearmente com o aumento da concentração até $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ na região compreendida entre 0,44 e 0,73 V durante a varredura anódica, e os potenciais de pico são deslocados para regiões mais positivas.

Comportamento eletroquímico semelhante foi observado para os aminoácidos leucina, glicina e ácido glutâmico, Figura 64 (B), (C) e (D), respectivamente. Na presença de ácido aspártico, foi observado que a I_{pa} apresenta um pico de oxidação na região de potencial de 0,45 a 0,74V, e a I_{pa} aumenta linearmente com a concentração do analito até $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, Figura 64 (E).

As espécies de Ni(II)/Ni(III) na superfície do eletrodo atuam como um catalisador para a oxidação de aminoácidos. Quando os aminoácidos atingem a superfície do eletrodo, eles são rapidamente oxidados em aldeído, dióxido de carbono e amônia pelas espécies de Ni(III) sobre o eletrodo modificado. O mecanismo de oxidação eletrocatalítico dos aminoácidos na superfície do NiNPs-RGO/GCE pode ser representado através das seguintes reações em solução alcalina (31,32,34,130):



Foram realizados estudos de velocidade de varredura a fim de compreender o comportamento eletroquímico dos aminoácidos em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do NiNPs-RGO/GCE. As velocidades de varredura estudadas foram de 10 a 350 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos, efeito da velocidade de varredura e da raiz quadrada da velocidade de varredura sobre as correntes de pico anódico e catódico do ácido aspártico em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 65.

Foi observado que as correntes do picos anódico e catódico são proporcionais às velocidades de varredura no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} com coeficiente de correlação maior do que 0,992, indicando a atividade eletroquímica do par redox na superfície do eletrodo modificado, Tabela 14. As I_{pa} e I_{pc} aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 350 mV s^{-1} com coeficiente de relação maior que

0,996, Tabela 15. Esse fato indica que as reações de transferência de elétrons dos aminoácidos alanina, glicina, leucina, ácido aspártico e ácido glutâmico podem ser controladas pelo processo difusional.

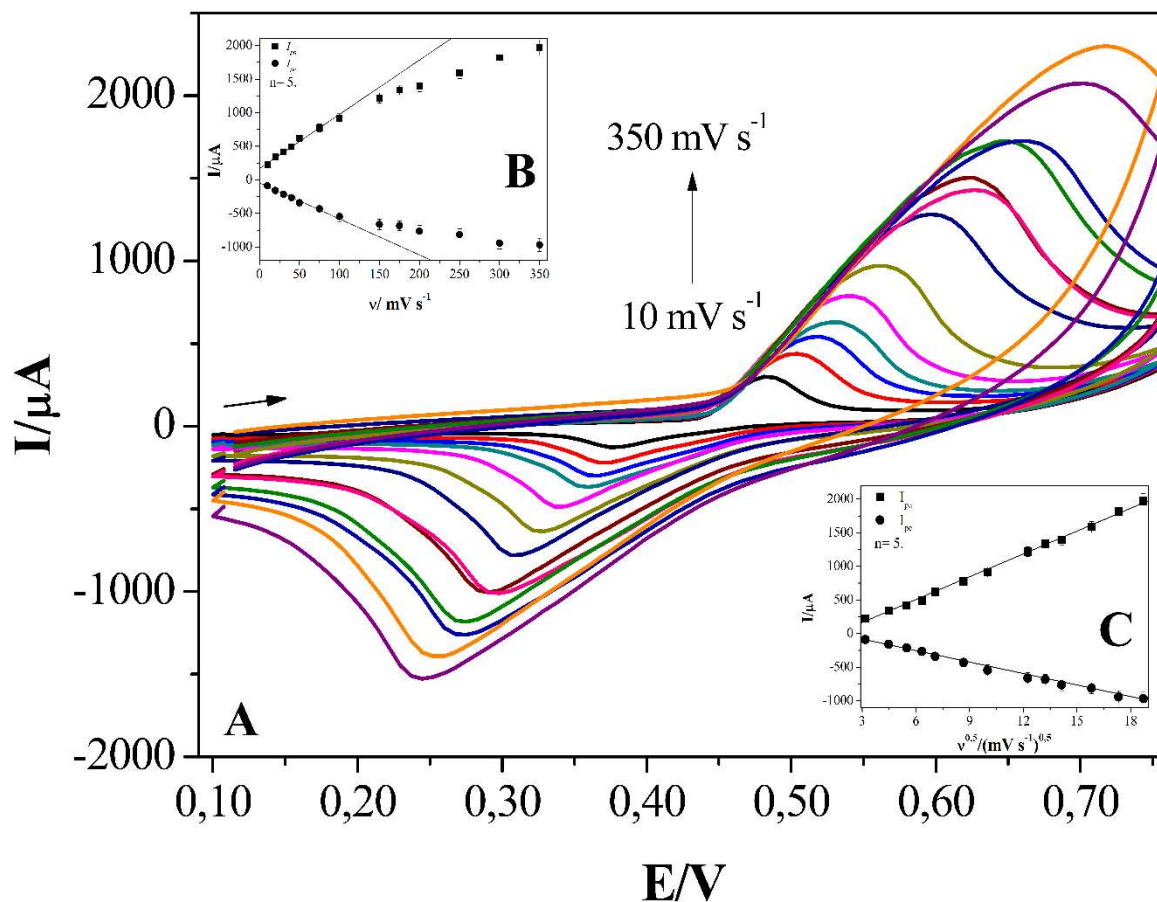


Figura 65 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura do ácido aspártico em NaOH 0,10 mol L⁻¹. Efeito da (B) velocidade de varredura (v) e (C) raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0.5}$) nas correntes de pico anódico e catódico.

Tabela 14 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) com a velocidade de varredura (v).

Aminoácido	Faixa Linear/ mV s ⁻¹	Equação Linear	Coefficiente de correlação linear
Alanina		$I_{pa} = -1,7 \times 10^{-4} + 8,3 \times 10^{-6} v$	0,995
		$I_{pc} = -5,4 \times 10^{-5} - 5,3 \times 10^{-6} v$	0,995
Glicina	10	$I_{pa} = 2,0 \times 10^{-4} + 8,1 \times 10^{-6} v$	0,997
		$I_{pc} = -5,4 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-6} v$	0,993
Leucina	a	$I_{pa} = 1,6 \times 10^{-4} + 7,6 \times 10^{-6} v$	0,999
		$I_{pc} = -5,4 \times 10^{-5} - 5,1 \times 10^{-6} v$	0,996
Ácido aspártico	100	$I_{pa} = 1,7 \times 10^{-4} + 8,1 \times 10^{-6} v$	0,992
		$I_{pc} = -4,5 \times 10^{-5} - 5,4 \times 10^{-6} v$	0,994
Ácido glutâmico		$I_{pa} = 1,5 \times 10^{-4} + 8,4 \times 10^{-6} v$	0,996
		$I_{pc} = -5,1 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-6} v$	0,994

Tabela 15 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$).

Aminoácido	Faixa Linear/ mV ^{0,5} s ^{-0,5}	Equação Linear	Coefficiente de correlação linear
Alanina		$I_{pa} = -1,3 \times 10^{-4} + 1,1 \times 10^{-4} v^{0,5}$	0,999
		$I_{pc} = -8,9 \times 10^{-5} - 5,9 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,998
Glicina	3,2	$I_{pa} = -7,2 \times 10^{-5} + 1,0 \times 10^{-4} v^{0,5}$	0,999
		$I_{pc} = 7,4 \times 10^{-5} - 5,4 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,997
Leucina	a	$I_{pa} = -1,3 \times 10^{-4} + 1,0 \times 10^{-4} v^{0,5}$	0,999
		$I_{pc} = 8,8 \times 10^{-5} - 5,7 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,998
Ácido aspártico	18,7	$I_{pa} = -1,7 \times 10^{-4} + 1,1 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,998
		$I_{pc} = 8,9 \times 10^{-5} - 5,7 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,996
Ácido glutâmico		$I_{pa} = -9,8 \times 10^{-5} + 9,8 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,998
		$I_{pc} = 7,7 \times 10^{-5} - 5,5 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,998

5.3.6 Efeito do potencial aplicado e estabilidade do eletrodo

Inicialmente, foi feita uma investigação acerca do potencial de detecção dos ácidos aminados. O estudo do potencial aplicado utilizando o NiNPs-RGO/GCE como detector amperométrico foi realizado por amperometria. Análises amperométricas foram executadas no intervalo de potencial de 0,45 a 0,70 V, em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com agitação de 1000 rpm, Figura 66.

A Figura 66 apresenta a resposta do NiNPs-RGO/GCE em solução alcalina contendo os aminoácidos. Após um período de 100 s para estabilizar a corrente, 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ de amino ácido foi adicionado à solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹. Pode ser observado que as respostas de corrente dos ácidos aspártico e glutâmico aumentaram no intervalo de potencial de 0,45 a 0,50 V. Quando os valores de potencial aumentaram acima de 0,50 V, os sinais analíticos desses aminoácidos diminuíram, afetando negativamente a detecção mais sensível dos analitos. As respostas de corrente máxima dos aminoácidos alanina, glicina e leucina foram observadas em 0,55 V. Após esse potencial, as respostas de corrente dos aminoácidos diminuíram com o aumento do potencial de detecção. Portanto, um potencial aplicado de 0,55 V foi selecionado como o potencial de detecção ótimo por ser mais sensível a um número maior de analitos.

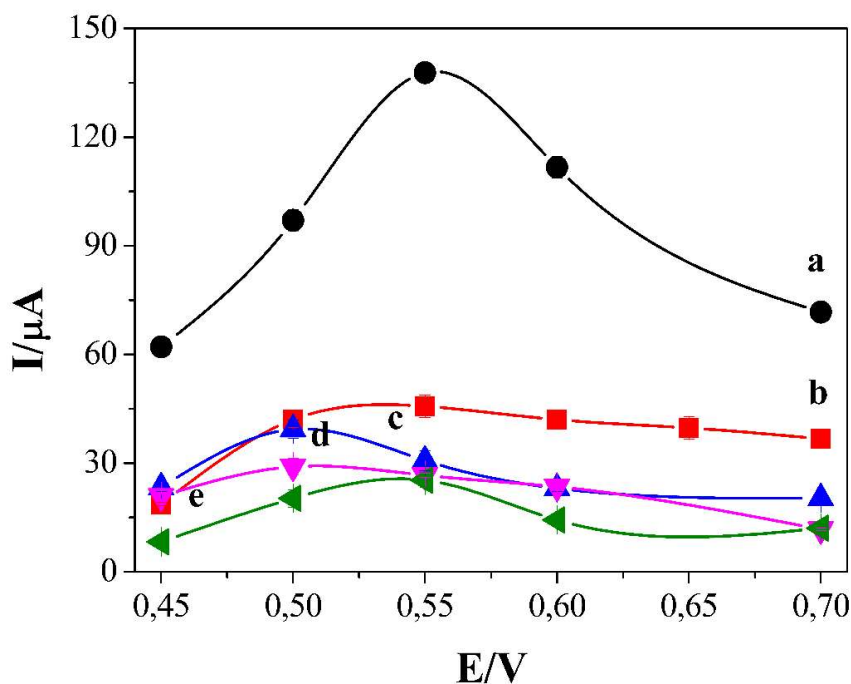


Figura 66 – Efeito do potencial aplicado (n= 3) na resposta amperométrica dos aminoácidos (a) glicina (b) alanina (c) ácido aspártico (d) ácido glutâmico e (e) leucina em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹. Condições: Concentração adicionada do analito de 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ e agitação de 1000 rpm.

A estabilidade do NiNPs-RGO/CGE foi investigada através do registro da resposta de corrente amperométrica da glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Inicialmente, esperou-se a corrente ser estabilizada por um período de 300 s. Após esse período, foi adicionada glicina na solução alcalina sob agitação. A Figura 67 apresenta a resposta amperométrica para adição de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na superfície do NiNPs-RGO/GCE com potencial de detecção de 0,55 V, a partir do qual a resposta rápida (dentro de 0,38 s) para a adição de glicina foi obtida.

Os tempos de resposta para os aminoácidos alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina foram de 0,92 s, 0,84 s, 0,61 s e 0,57 s, respectivamente. Além disso, foi verificado que a resposta amperométrica do eletrodo modificado manteve-se praticamente inalterada e diminuiu aproximadamente 0,06%, após 700 s. Os resultados indicam a excelente estabilidade desse eletrodo modificado, o NiNPs-RGO/GCE.

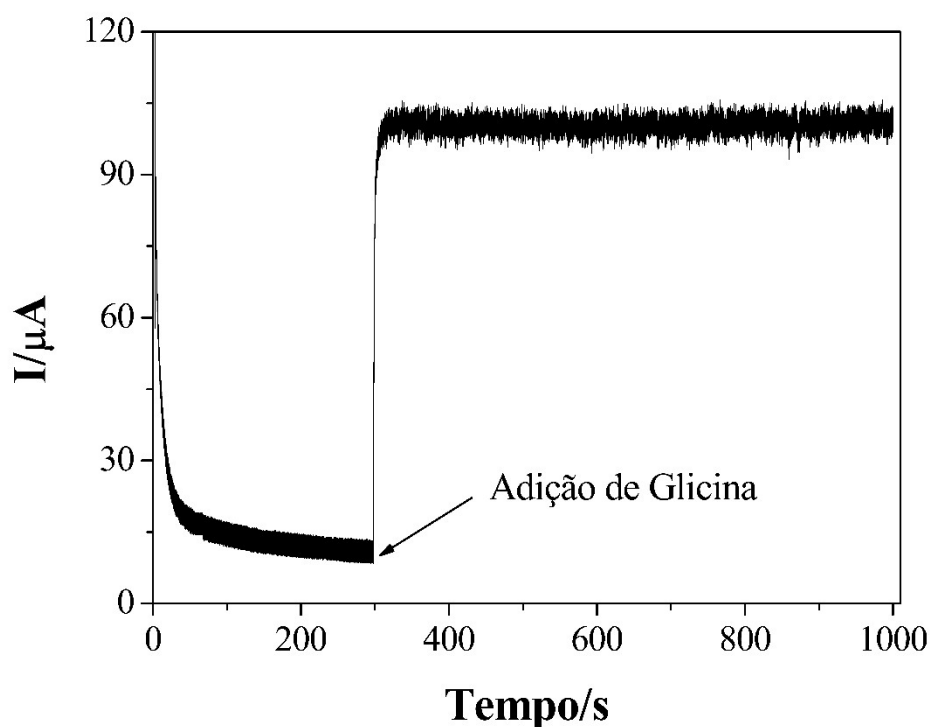


Figura 67 – Resposta amperométrica da glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ por um período de 1000 s com potencial de detecção de 0,55 V e agitação de 1000 rpm.

5.3.7 Otimização da separação cromatográfica

Utilizando o NiNPs-RGO/GCE como detector na detecção amperométrica pulsada (PAD), investigou-se a melhor sequência de pulsos aplicada na determinação dos aminoácidos. A PAD foi selecionada para análise de aminoácidos, porque evita a contaminação da superfície de eletrodo modificado por produtos adsorvidos que podem ser

gerados a partir da reação de oxidação do analito e também interferir no sinal eletroquímico de interesse e afetar a velocidade de transferência de carga entre o eletrodo modificado e os analitos. Essa técnica permite que a resposta do eletrodo apresente estabilidade por um longo período de tempo devido à limpeza eletroquímica periódica realizada durante as corridas cromatográficas, prevenindo ou reduzindo a contaminação da superfície do NiNPs-RGO/GCE (154).

Na PAD, foi utilizada uma sequência de quatro potenciais. O primeiro pulso de potencial (E_1) é aplicado para condicionar o NiNPs-RGO/GCE e detectar a oxidação dos aminoácidos. O segundo potencial (E_2) é empregado para reduzir as espécies orgânicas que possuem um potencial de oxidação menor do que os aminoácidos. O terceiro potencial (E_3) é utilizado para oxidar as espécies presentes na superfície do eletrodo modificado que tenham potencial de oxidação maior do que o potencial dos analitos. A oxidação das espécies de níquel sobre a superfície do eletrodo modificado ocorre no quarto pulso (E_4), além disso, serve para estabilizar a linha de base do cromatograma. Portanto, os potenciais e períodos de tempo para a detecção amperométrica pulsada foram: E_1 , 0,55 (alanina, glicina e leucina) ou 0,50 V (ácidos glutâmico e aspártico) por 300 ms; E_2 , 0,05 V por 30 ms; E_3 , 0,75 V por 30 ms e E_4 , 0,50 V por 100 ms (Figura 68).

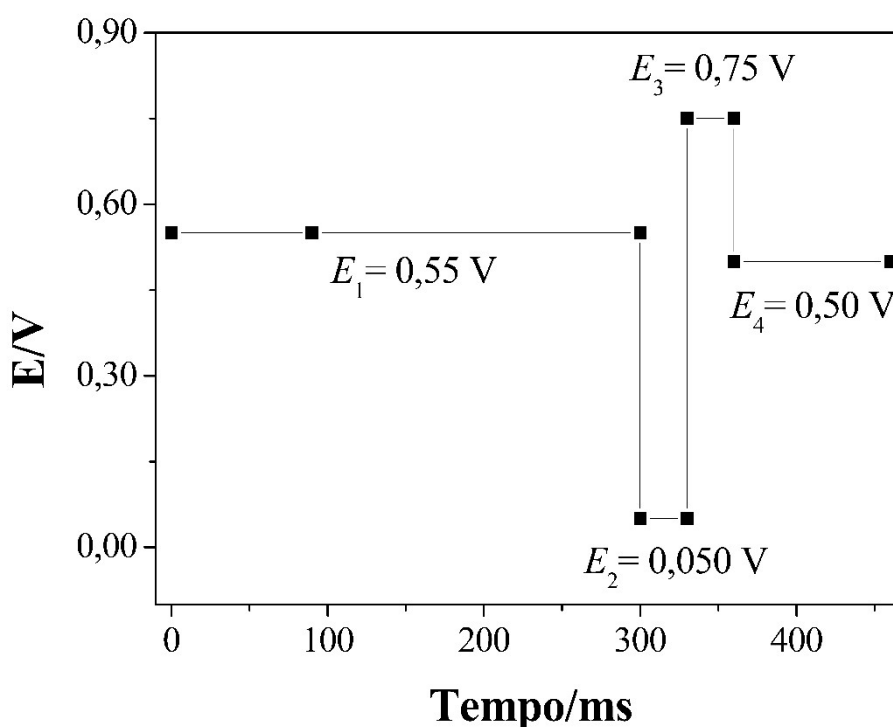


Figura 68 – Sequência de pulso aplicada na detecção amperométrica pulsada de aminoácidos.

O efeito das concentrações do eluentes sobre os tempos de retenções e resoluções de separação dos aminoácidos também foram investigados. Foi observado que os aminoácidos possuem uma elevada resposta eletrocatalítica sobre a superfície do NiNPs-RGO/GCE em meio alcalino. Tal resultado indica que uma elevada concentração de solução alcalina é necessária para ionizar e oxidar o grupo amino dos aminoácidos. Além disso, eluentes alcalinos são necessários para separação e detecção dos analitos por meio de cromatografia iônica.

Soluções de NaOH são capazes de atender esses requisitos para os aminoácidos alanina, glicina e leucina, Figura 69. A concentração de NaOH foi investigada para avaliar o comportamento do tempo de retenção dos aminoácidos dependentes da concentração desse eluente. Com o aumento da concentração de NaOH, o tempo de retenção dos aminoácidos diminuiu, e as respostas de corrente ficaram mais intensas, pois esses aminoácidos são mais facilmente oxidados em pH elevado devido aos grupos α -amino estarem completamente em suas formas ionizadas.

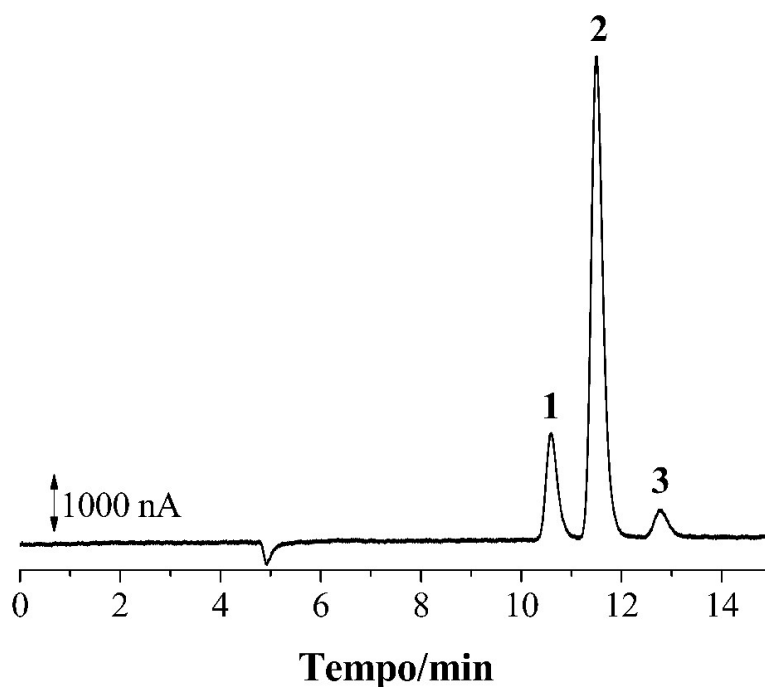


Figura 69 – Cromatograma de uma mistura de alanina (1), glicina (2) e leucina (3) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Condições: Eluição isocrática com NaOH 0,18 mol L⁻¹ como fase móvel, potencial de detecção de 0,55 V *versus* Pd e velocidade da fase móvel de 0,30 mL min⁻¹.

A separação cromatográfica isocrática dos aminoácidos alanina, glicina e leucina foi completada em 15 min utilizando uma solução de NaOH 0,18 mol L⁻¹. Um cromatograma típico de uma mistura de solução padrão dos aminoácidos detectados no NiNPs-RGO/GCE é apresentado na Figura 69. Foi obtida uma boa separação cromatográfica dos três aminoácidos

com picos simétricos em um curto tempo de análise. No entanto, para a eluição mais rápida dos ácidos aspártico e glutâmico, a adição de CH_3COONa na fase móvel é necessária, uma vez que esses aminoácidos interagem mais fortemente com a fase estacionária da coluna.

O efeito da concentração de CH_3COONa sobre os tempos de retenções dos aminoácidos (ácidos aspártico e glutâmico) foi investigado no intervalo de 0,10 a 0,30 mol L^{-1} em NaOH 0,10 mol L^{-1} , Tabela 16. Observou-se que os tempos de retenção dos analitos diminuíram com o aumento da concentração de íons de acetato, pois esses íons interagem preferencialmente com a fase estacionária, e a ordem de eluição dos analitos permaneceu a mesma do que utilizando eluição isocrática.

Tabela 16 – Efeito do hidróxido e acetato de sódio no tempo de retenção (t_r) e fator de retenção (k) dos ácidos aspártico e glutâmico.^a

Analito		Acetato de sódio/ mol L^{-1}					Acetato de sódio em hidróxido de sódio/ mol L^{-1} (1:1)				
		0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,12	0,16	0,20	0,30	0,40
Ácido aspártico	t_r	65,5	39,8	26,5	19,1	15,2	51,0	29,9	20,3	11,3	8,64
	k	12,2	6,98	4,35	2,83	1,93	9,30	5,00	3,08	1,23	0,71
Ácido glutâmico	t_r	70,6	42,2	27,7	19,5	15,2	48,0	28,5	19,9	11,3	8,64
	k	13,3	7,51	4,58	2,91	1,93	8,68	4,72	3,00	1,23	0,71

^a Condições experimentais: potencial de detecção de 0,55 V *versus* Pd, velocidade da fase móvel de 0,20 mL min^{-1} e ácidos aspártico e glutâmico $1,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} cada.

Contudo, verificou-se que a adição de CH_3COONa na fase móvel provoca a coeluição dos analitos. A concentração de NaOH e CH_3COONa na proporção de 1:1 foi avaliada com uma mistura de solução padrão de ácidos aspártico e glutâmico $1,2 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} preparada com a composição da fase móvel para a eluição isocrática no intervalo de 0,12 a 0,40 mol L^{-1} . Foi observado que a concentração da fase móvel provoca a redução dos tempos de retenção e coeluição dos analitos devido a uma maior interação entre a fase móvel e a fase estacionária, além de contribuir com o aumento do ruído da linha base.

Os resultados, resumidos na Tabela 16, indicaram que a melhor separação dos ácidos aspártico e glutâmico é promovida pela fase móvel composta de CH_3COONa 0,10 mol L^{-1} em NaOH 0,10 mol L^{-1} na proporção de 1:1. O efeito da velocidade do fluxo nos tempos de retenção dos analitos foi avaliado, verificando-se que a diminuição da velocidade do fluxo da fase móvel provoca o aumento dos tempos de retenção sem inverter a ordem de eluição. A

Figura 18 apresenta o cromatograma da separação dos ácidos aspártico e glutâmico obtido utilizando CH_3COONa $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH como fase móvel.

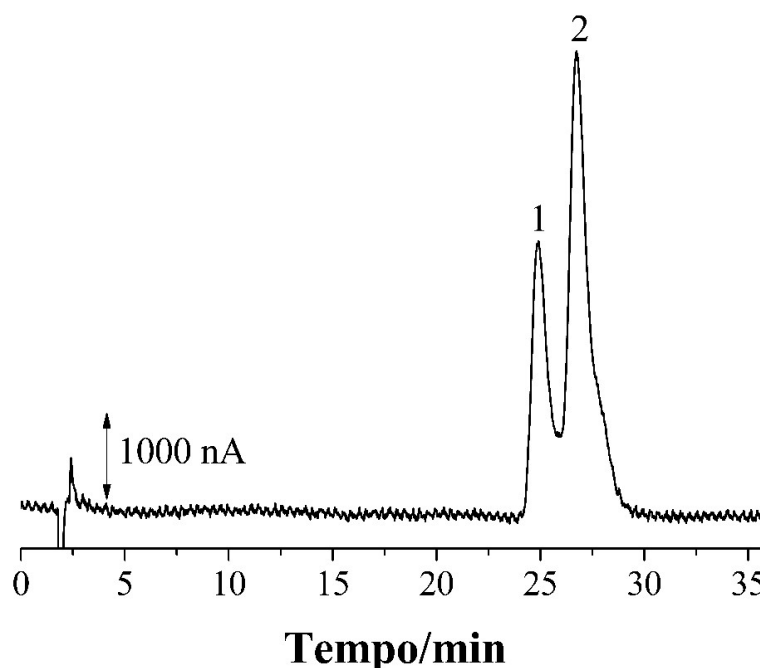


Figura 70 – Cromatograma de uma mistura de ácido glutâmico (1) e ácido aspártico (2) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Condições: Eluição isocrática com CH_3COONa $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ como fase móvel, potencial de detecção de $0,50 \text{ V}$ versus Pd e velocidade da fase móvel de $0,80 \text{ mL min}^{-1}$.

A fim de avaliar o potencial de separação da coluna, alguns parâmetros cromatográficos foram determinados a partir de dados experimentais obtidos em um cromatograma típico, como os apresentados nas Figuras 69 e 70. O tempo de retenção do analito, t_r , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção máxima da banda cromatográfica. O tempo de retenção de um composto não retido ou tempo morto, t_m , é o tempo gasto por ele para percorrer todo o sistema cromatográfico desde a injeção até a saída da coluna e representa o tempo gasto para a fase móvel fazer o percurso.

Esses valores são obtidos diretamente do cromatograma quando se tem um integrador ou softwares apropriados. O tempo de retenção ajustado, t_r' , é o tempo real que as moléculas ou íons do analito ficam retidas na fase estacionária, calculado através da equação $t_r' = t_r - t_m$. O fator de retenção, k , é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas ou íons do analito ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna através da fase móvel. Valores de $2 < k < 10$ são considerados ideais, mas valores de $1 < k < 20$ também podem ser considerados.

A resolução, R_s , é a medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a equação $R_s = 1,177 [t_{r1} - t_{r2}/W_{h1} + W_{h2}]$, na

qual W_{h1} e W_{h2} são as larguras dos picos à meia altura, com a largura medida em unidades de tempo. Quanto maior o valor de R_s , melhor será a separação entre picos de substâncias adjacentes. O fator de separação, α , entre dois picos adjacentes é calculado pela razão entre k_2 (do soluto mais retido) e k_1 (do soluto menos retido) e deve ser sempre superior a 1, $\alpha = k_2/k_1$. A eficiência, medida pelo número de pratos teóricos, N , representa o número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, calculada por meio da equação $N = 5,545 [t_r/W_h]^2$ (20,155).

Os parâmetros cromatográficos, tais como t_m , t_r , t_r' , R_s , N , α e k , foram todos encontrados dentro dos resultados esperados para um bom desempenho cromatográfico, como pode ser visto na Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros cromatográficos para a separação de aminoácidos.

Analito	t_m	t_r	t_r'	R_s	N	k	α
Alanina^a	4,97	10,6	5,62	2,13	10182	1,13	1,16
Glicina^a	4,97	11,5	6,53	2,85	11548	1,31	1,20
Leucina^a	4,97	12,8	7,80	3,82	11986	1,57	-
Ácido glutâmico^b	1,86	24,9	23,0	1,86	10111	12,4	1,08
Ácido aspártico^b	1,86	26,7	24,8	4,41	10550	13,3	-

^a Condições experimentais como na Figura 69.

^b Condições experimentais como na Figura 70.

O desempenho analítico para o NiNPs-RGO/GCE usado como detector amperométrico foi avaliado de acordo com as condições cromatográficas e PAD ótimas descritas anteriormente. As soluções padrão foram preparadas com concentrações na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. As curvas analíticas foram avaliadas através da análise das concentrações das soluções padrão (x , mol L⁻¹) com as respectivas áreas de pico (y , nA min). O intervalo linear, LOD, sensibilidade amperométrica, coeficiente de correlação e o desvio padrão relativo (RSD) estão resumidos na Tabela 18.

As áreas dos picos variam linearmente com a concentração ao longo de um intervalo com aproximadamente 2 a 3 ordens de grandeza para estes cinco aminoácidos e um coeficiente mínimo de correlação de 0,9997. O LOD foi determinado através da razão sinal/ruído ($S/N = 3$) a partir da menor concentração injetada. Os limites de determinação variaram de $8,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o ácido aspártico a $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para leucina, Tabela 18.

O NiNPs-RGO/GCE utilizado como detector amperométrico apresentou elevada sensibilidade para os analitos variando de $3,3 \times 10^5$ a $5,3 \times 10^6$ para leucina e glicina, respectivamente. A repetibilidade foi expressa como uma porcentagem de RSD% de doze injeções cromatográficas sucessivas com uma concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de cada analito. O RSD encontrado foi de 1,1 (leucina) a 2,6% (ácido aspártico) para as doze medidas sucessivas realizadas, indicando excelente repetibilidade, Tabela 18.

Tabela 18 – Desempenho analítico do NiNPs-RGO/GCE utilizado como detector amperométrico na detecção dos aminoácidos (n= 3).

Analito	Faixa linear (mol L⁻¹)	Equação linear da regressão	LOD (mol L⁻¹)	Sensibilidade (nA mol⁻¹ L)	Coefficiente de correlação	RSD (%)
Alanina ^a	$1,0 \times 10^{-5}$ a $7,5 \times 10^{-4}$	$y = 1,1 \times 10^6 x + 4,2$	$4,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^3$	0,9999	1.8
Glicina ^a	$1,0 \times 10^{-5}$ a $7,5 \times 10^{-4}$	$y = 5,3 \times 10^6 x + 3,6$	$1,9 \times 10^{-6}$	$5,3 \times 10^6 \pm 4,3 \times 10^4$	0,9998	1.4
Leucina ^a	$5,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$	$y = 3,3 \times 10^5 x + 9,6$	$2,0 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$	0,9997	1.1
Ácido aspártico ^b	$2,5 \times 10^{-6}$ a $7,5 \times 10^{-4}$	$y = 2,9 \times 10^6 x + 2,6$	$8,7 \times 10^{-7}$	$2,9 \times 10^6 \pm 9,2 \times 10^3$	0,9999	2.6
Ácido glutâmico ^b	$5,0 \times 10^{-6}$ a $7,5 \times 10^{-4}$	$y = 1,3 \times 10^6 x + 4,1$	$3,0 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^4$	0,9997	1.5

^a Condições experimentais como na Figura 69.

^b Condições experimentais como na Figura 70.

A estabilidade do NiNPs-RGO/GCE foi investigada utilizando o método desenvolvido ao longo de um período de 24 h, empregando um único eléctrodo modificado e soluções de aminoácidos $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os resultados mostraram que a resposta inicial poderia ser mantida em $98 \pm 1,3\%$ (alanina, glicina e leucina) e $93 \pm 2,0\%$ (ácidos aspártico e glutâmico) mesmo após 24 h de detecção contínua, sendo assim, o NiNPs-RGO/GCE apresenta uma boa estabilidade a longo prazo.

5.3.8 Determinação de aminoácidos em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar

Para demonstrar a aplicabilidade do NiNPs-RGO/GCE como sensor amperométrico na cromatográfica iônica com detecção amperométrica pulsada, foi realizada a determinação de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar de uma usina de açúcar e álcool. Primeiramente, a amostra foi centrifugada a 4000rpm durante 20 min, devido à grande quantidade de impurezas minerais presentes nela. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e filtrado (filtros de 5,0, 0,47 e 0,22 μm da Millipore). Antes de ser injetada na coluna, a amostra foi diluída com água ultrapura na proporção de 1:100 para a determinação de alanina, leucina e glicina, e 1:10, para a quantificação dos ácidos aspártico e glutâmico.

A identificação dos picos foi baseada no tempo de retenção específico dos analitos, sendo confirmada pela adição de padrões dos analitos nas amostras diluídas. Cromatogramas representativos das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar são apresentados nas Figuras 71 e 72.

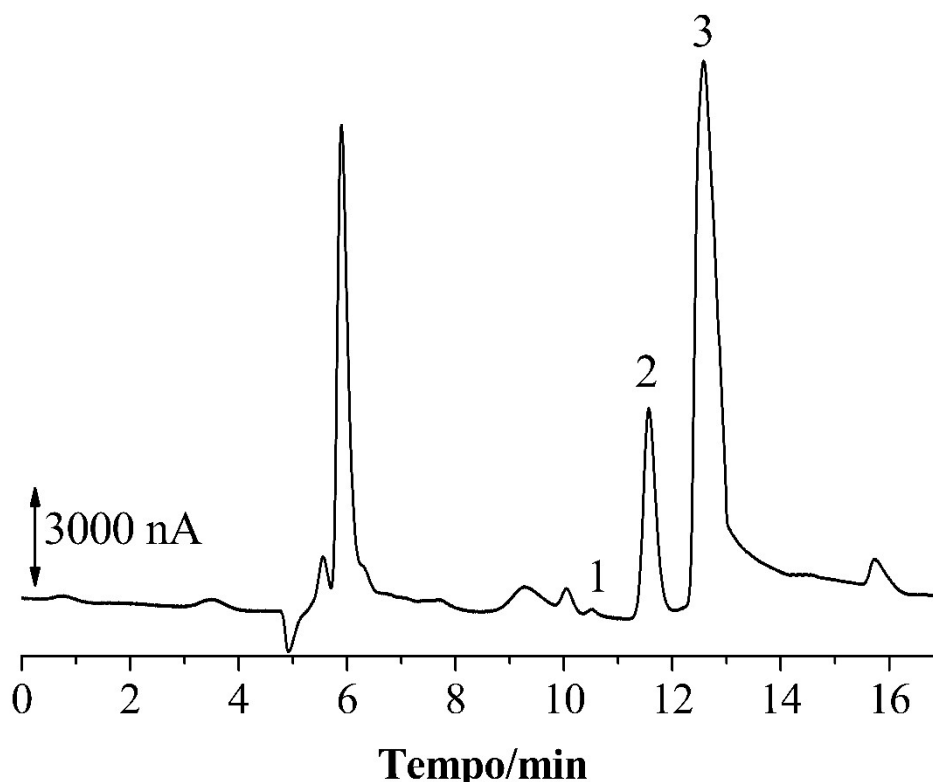


Figura 71 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:100 com água ultrapura. Picos: alanina (1), glicina (2) e leucina (3). Condições: Eluição isocrática com NaOH 0,18 mol L⁻¹ como fase móvel, potencial de detecção de 0,55 V *versus* Pd e velocidade da fase móvel de 0,30 mL min⁻¹.

Os aminoácidos foram quantificados na amostra utilizando o método de adição de padrão. Três concentrações diferentes de soluções padrão dos aminoácidos foram adicionadas à amostra. A análise foi efetuada em triplicata, e a curva analítica foi obtida pela área do pico de cada aminoácido em função da concentração adicionada relacionada. Os resultados quantitativos são expostos na Tabela 19. Como pode ser visto, a amostra de vinhaça cana-de-açúcar contém na sua composição alanina, glicina, leucina e ácido aspártico. O ácido glutâmico não foi detectado, e a leucina apresentou a concentração mais elevada na amostra analisada. Os bons coeficientes de correlação (≥ 0.993) das curvas analíticas confirmam a ausência de produtos absorvidos que podem afetar o desempenho catalítico do NiNPs-RGO/GCE.

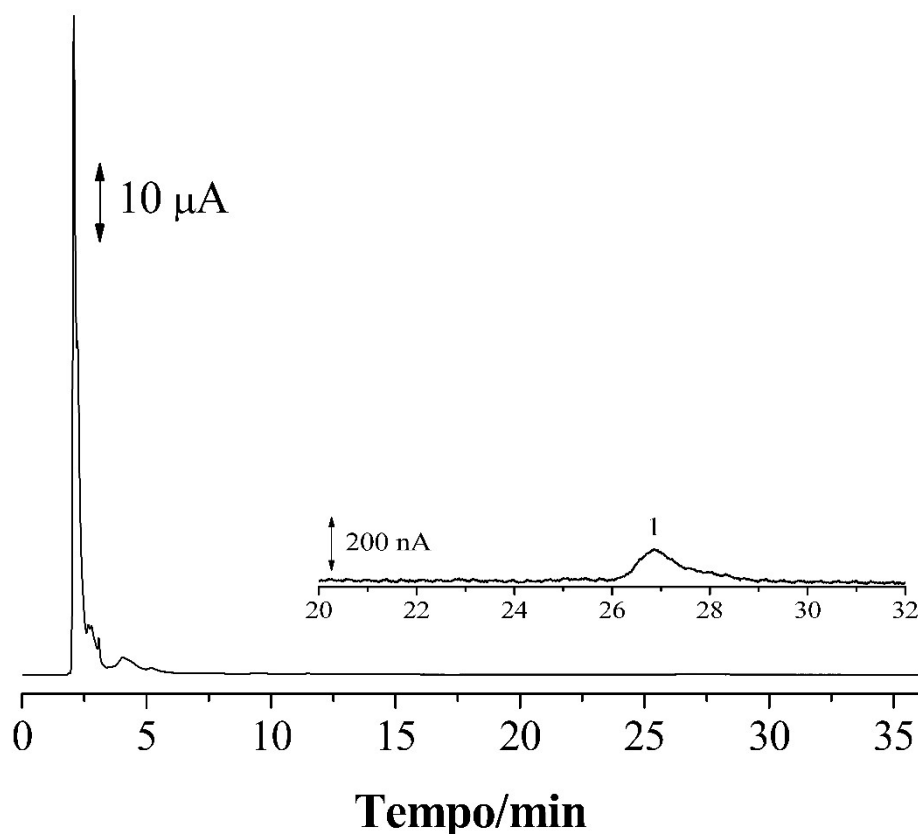


Figura 72 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:10 com água ultrapura. Pico: ácido aspártico (1). Condições: Eluição isocrática com CH_3COONa $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ como fase móvel, potencial de detecção de $0,50 \text{ V}$ versus Pd e velocidade da fase móvel de $0,80 \text{ mL min}^{-1}$.

As recuperações médias obtidas por três injeções cromatográficas de cada amostra enriquecida variaram de 94,8% para alanina a 99,6% para glicina, indicando a exatidão do método desenvolvido. A precisão foi estimada a partir do RSD através dos experimentos cromatográficos realizados em triplicata das amostras enriquecidas em três níveis de

concentração e foi compreendida entre 1,7% e 4,9% para todos os compostos determinados. As concentrações encontradas foram comparadas estatisticamente com as concentrações nominais usando o test- t de Student não pareado. Os resultados com nível de confiança de 95% apresentaram t_{valor} menor do que $t_{\text{teórico}}$ para os aminoácidos analisados, indicando que o NiNPs-RGO/GCE pode ser utilizado como detector amperométrico para a determinação de aminoácidos.

Tabela 19 – Teores de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar.

Analito	Determinado (mol L⁻¹)	Recuperação (%)	RSD (n= 3)	t_{valor}^c
Alanina ^a	$1,5 \times 10^{-3} \pm 2,3 \times 10^{-5}$	95 ± 5	4,9	1,9
Glicina ^a	$1,4 \times 10^{-2} \pm 4,0 \times 10^{-4}$	100 ± 2	1,7	1,1
Leucina ^a	$2,4 \times 10^{-2} \pm 4,5 \times 10^{-4}$	98 ± 5	4,9	0,9
Ácido aspártico ^b	$3,2 \times 10^{-4} \pm 3,3 \times 10^{-6}$	99 ± 2	1,9	1,1
Ácido glutâmico ^b	Não detectado	99 ± 4	3,7	0,6

^a Condições experimentais como na Figura 71.

^b Condições experimentais como na Figura 72.

^c $t_{\text{teórico}} = 4,3$ com nível de confiança de 95%.

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel apresentou atividade eletrocatalítica para a oxidação de aminoácidos com reprodutibilidade, precisão e estabilidade. O emprego de fase móvel composta de CH_3COONa $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção de 1:1 como eluente permitiu a separação isocrática dos ácidos aspártico e glutâmico em menos de 30 min com boa resolução de pico e sensibilidade analítica. O eletrodo modificado foi aplicado com sucesso como um detector amperométrico para a determinação de alguns aminoácidos utilizando cromatografia iônica combinada com detecção amperométrica pulsada, com elevada sensibilidade, boas recuperações, livre de interferentes e precisão na amostra de vinhaça de cana-de-açúcar. O método proposto foi eficaz para a determinação prática de rotina dos aminoácidos comuns em matrizes reais complexas sem qualquer processo de derivatização ou extração. Além disso, a boa estabilidade confirmou a potencial utilização desse eletrodo modificado como sensor amperométrico em aplicações analíticas.

CAPÍTULO VI. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE COBRE

6.1 INTRODUÇÃO

A análise de aminoácidos é de interesse contínuo devido à grande importância biotecnológica, industrial, nutricional e clínica desses compostos. Além disso, exercem importantes papéis em diversos processos biológicos, tais como síntese de proteínas e vias metabólicas (16,26,31). Essas moléculas estão presentes em alimentos, bebidas, remédios e suplementos alimentares. A sua determinação indica possíveis adulterações e transformações que ocorrem durante os procedimentos de processamento e armazenamento de alimentos (26).

A determinação de aminoácidos através de métodos cromatográficos está disponível na literatura há muitos anos (24). Todavia, o progresso recente em tais determinações pode ser atribuído a vantagens tecnológicas com cromatografia líquida e detectores diversos (26). Nestes esforços, diferentes técnicas instrumentais, como absorção UV-VIS, fluorescência e espectrometria de massa, por exemplo, foram utilizadas para a detecção desses compostos após a separação cromatográfica empregando HPLC (25,27,156). Apesar disso, ainda há carência de detectores simples e sensíveis que não requerem formação prévia de derivados para aumentar a absorvidade, a volatilidade, etc. dos aminoácidos originais (27,156).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de detectores amperométricos para identificação direta de compostos alifáticos empregando FIA e HPLC com detecção eletroquímica tem atraído bastante atenção devido a sua elevada sensibilidade, ampla faixa linear de trabalho e seletividade (130,156,157). No entanto, o número de aminoácidos sem derivatização que podem ser detectados por eletrodos de carbono clássicos é limitado, visto que muitas espécies não são eletroativas nessas superfícies (156,158,159).

Eletrodos de metais nobres, como ouro (24,131–134,157), prata (157) e platina (135,157) foram empregados para detecção dos aminoácidos, porém esses eletrodos possuem a tendência de perda do sinal analítico devido à adsorção de intermediários ou produtos das reações eletroquímicas que bloqueiam a superfície dos eletrodos (130,159). Como alternativa, vários eletrodos baseados em metais de transição, como cobre (27,157,160) e níquel (130,157,161) foram propostos como sensores amperométricos para determinação

direta de aminoácidos não derivatizados aplicando potencial constante devido à oxidação electrocatalítica desses analitos em solução alcalina (158).

Recentemente, o desenvolvimento de novos materiais de eletrodos baseados em metais de transição com par redox reversíveis fornece uma via que permite a detecção amperométrica direta desses compostos alifáticos electroativos (25,159). A esse respeito, a modificação da superfície dos eletrodos tradicionais (CMEs) proporciona uma maneira atrativa de confinar espécies catalíticas ativas à região espacial efetiva, tornando esses eletrodos mais competitivos em relação aos eletrodos metálicos nobres e não nobres convencionais (25,141).

CMEs baseados em metais de transição e seus óxidos, tais como cobre (26,30,108,156), níquel (25,31,102,130,162), cobalto (104,109,110,157) e ferro (103,118), têm sido empregados para detecção de aminoácidos devido às suas propriedades electrocatalíticas em meio alcalino para a oxidação de aminoácidos. Atualmente, materiais à base de grafeno atraíram um interesse considerável em virtude de suas características inovadoras, como grande área superficial específica, propriedades térmicas e mecânicas elevadas (53,54) para o desenvolvimento de sensores e detectores electroquímicos.

Eletrodos modificados com grafeno contendo nanopartículas metálicas e seus óxidos, a saber cobalto (104), ferro (103) (118), níquel (162), ouro (120) e titânio (119) foram utilizados para detecção de aminoácidos sem derivação devido às suas atividades electrocatalíticas. Assim, no presente estudo, foi investigado o desempenho analítico do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de cobre (CuNPs-RGO/GCE) para a detecção de aminoácidos sem derivatização por HPAEC. A aplicação do novo método usando a eletro-oxidação direta de aminoácidos sem derivatização na vinhaça de cana-de-açúcar foi realizada com o CuNPs-RGO/GCE.

6.2 PARTE EXPERIMENTAL

6.2.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas nos experimentos eletroquímicos foram preparadas com reagentes de alto grau de pureza analítico e água deionizada ultrapura (MILLI-Q). Óxido de grafeno (GO, 4 mg mL⁻¹), sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄.5H₂O, ≥ 98 %), L-alanina (C₃H₇NO₂, ≥ 98%), glicina (C₂H₅NO₂, ≥ 99%), L-leucina (C₆H₁₃NO₂, ≥ 98%), L-lisina hidratada (C₆H₁₄N₂O₂, ≥ 97%), L-serina C₃H₇NO₂, ≥ 99%), hidróxido de sódio (NaOH, ≥ 98%) e sulfato de sódio (Na₂SO₄, ≥ 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e ácido nítrico (HNO₃, ≥ 65%) da Merck.

6.2.2 Instrumentação

Um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 controlado pelo software NOVA 1.11 foi utilizado para as medidas eletroquímicas, e as medidas de IES foram realizadas usando o módulo FRA. Os experimentos de CV e IES foram realizados com uma célula eletroquímica convencional empregando o eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar, e um eletrodo de carbono vítreo com 3,0 mm de diâmetro (GCE, área geométrica de 0,07 cm²) modificado com RGO contendo CuNPs (CuNPs-RGO/GCE) como eletrodo de trabalho.

As espectroscopias Raman, XPS e EDX, e a SEM foram realizadas de acordo com a Seção 3.2.2 do Capítulo III. As análises de TEM e HRTEM foram realizadas de acordo com a Seção 5.2.2 do Capítulo V.

Os experimentos cromatográficos foram realizados utilizando o cromatógrafo de íons com detecção amperométrica de acordo com a Seção 5.2.2 do Capítulo V. O CuNPs-RGO/GCE foi empregado como eletrodo de trabalho.

6.2.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo

O GCE modificado foi imerso em ácido nítrico 20% por 5 min. Posteriormente, a superfície do GCE foi polida em uma suspensão de pó de alumina 0,3 μm e lavada abundantemente com água ultrapura, sendo, em seguida, ultrassonicado em água por 3 min.

6.2.4 Modificação eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo contendo óxido de grafeno com nanopartículas de cobre

O GCE foi modificado com RGO a partir de uma suspensão de GO $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando potencial de $-1,4 \text{ V}$ por 500 s . O eletrodo obtido foi lavado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente por 10 min . Em seguida, foi otimizada a eletrodeposição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE.

As CuNPs foram formadas em duas etapas. Na primeira etapa, as CuNPs foram eletrodepositadas utilizando a técnica de amperometria a partir de uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O potencial, o tempo e a concentração da solução de cobre utilizados na eletrodeposição foram otimizados.

Após a eletrodeposição, os eletrodos foram lavados com água ultrapura, secos e submetidos a varreduras sucessivas em uma solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial de $-0,40$ a $0,30 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} durante 25 ciclos. A resposta eletrocatalítica das modificações do CuNPs (CuNPs-RGO/GCE) foi avaliada com uma solução de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ por CV.

6.2.5 Condições cromatográficas

As fases móveis foram preparadas a partir da mistura das soluções de NaOH com água ultrapura. Foi realizado o estudo da força da eluição isocrática dos solventes e da velocidade do fluxo. As soluções estoques dos aminoácidos ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas nas concentrações das fases móveis otimizadas, e curvas analíticas foram construídas. O LOD foi avaliado como uma relação $S/N=3$ da menor concentração injetada. Foram estudadas a faixa linear, a sensibilidade amperométrica, o coeficiente de correlação e a repetibilidade dos analitos. A validação do método foi realizada através do método de adição padrão, conforme descrito na *Seção 6.2.6*.

6.2.6 Preparação da amostra

A amostra de vinhaça de cana-de-açúcar foi obtida a partir de uma indústria de açúcar e álcool da região de Araraquara. Inicialmente, essa amostra foi centrifugada a 4000 rpm

durante 20 min visando à remoção das partículas sólidas presentes. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e filtrado (filtros 5,0, 0,47 e 0,22 μm da Millipore).

Antes de ser injetado na coluna, a amostra foi diluída com água ultrapura nas proporções de 1:1000 para a determinação da alanina e de 1:100 para a quantificação dos aminoácidos lisina, glicina, leucina e serina. O método de adição padrão foi utilizado para determinar a concentração dos aminoácidos presentes nas amostras. Três concentrações diferentes de lisina, alanina, glicina, serina ($1,0 \times 10^{-6}$, $2,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e leucina ($5,0 \times 10^{-6}$, $7,5 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram injetadas.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Comportamento eletroquímico do cobre sobre a superfície do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido

O comportamento eletroquímico do cobre sobre a superfície do RGO/GCE foi investigado por CV. O eletrodo modificado foi imerso em uma solução de Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo sulfato de cobre $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A varredura cíclica foi realizada no intervalo de potencial de $-1,0$ a $1,0$ com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . O voltamograma do comportamento eletroquímico é apresentado na Figura 73.

No voltamograma cíclico, foram observados três picos: um catódico na varredura direta (PC1) e dois anódicos na varredura reversa (PA1 e PA2), Figura 73. O pico catódico (PC1) em $-0,018 \text{ V}$ com corrente de pico de $17,6 \mu\text{A}$ é referente à redução de cobre (II) a cobre (0), Equação 26. O pico anódico (PA1) em aproximadamente $-0,083 \text{ V}$ com corrente de pico de $32,3 \mu\text{A}$ corresponde à oxidação do cobre (0) metálico em cobre (I), Equação 27. O pico anódico em $0,28$ com corrente de pico de $41,8 \mu\text{A}$ corresponde à oxidação de cobre (I) a cobre (II) na superfície do RGO/GCE em meio de sulfato de sódio, Equação 28.

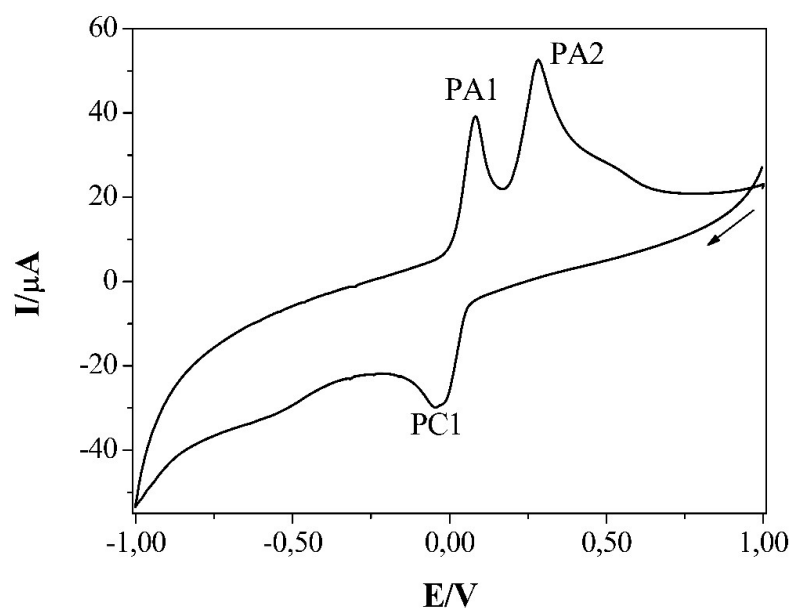


Figura 73 – Voltamograma cíclico de uma solução de sulfato de cobre $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em sulfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do RGO/GCE com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} .

6.3.2 Otimização da eletrodeposição de cobre

O tempo de eletrodeposição juntamente com o potencial de redução aplicado ao metal e a concentração do sal metálico precursor das NPs são de extrema importância na formação das nanopartículas (56,121), visto que abrem a possibilidade de controlar o tamanho, a extensão da cobertura e a nucleação homogênea das nanoestruturas eletrodepositadas sobre a superfície do RGO/GCE.

A Figura 74 exibe a otimização do método de eletrodeposição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE. A quantidade de CuNPs na superfície do RGO/GCE foi estimada através do excesso superficial (Γ) calculado a partir do amperograma da carga (Q) eletrodepositada de cobre sobre a superfície do RGO/GCE, Equação 19 (apresentada no Capítulo V, Seção 5.3.2).

Nas Figuras 74 (A-C), são apresentados os valores dos Γ (-■-) calculados na superfície do RGO/GCE e as respostas eletrocatalíticas das modificações (-●-) em função do potencial de eletrodeposição (E), tempo de eletrodeposição e concentração do sulfato de cobre (C_{CuSO_4}). A otimização de tais parâmetros buscou encontrar as melhores condições para a eletrodeposição das CuNPs e, conseqüentemente, a melhor resposta para oxidação da glicina na superfície do CuNPs-RGO/GCE.

O potencial de eletrodeposição do cobre foi o primeiro parâmetro avaliado na formação das NPs. Os potenciais empregados para eletrodepositar as NPs foram definidos a partir do potencial de redução do cobre (II) a cobre (0) obtido na Figura 73. A eletrodeposição desse metal se inicia em -0,018 V (Figura 73), logo, o potencial aplicado para a eletrodeposição das NPs Cu deve ser inferior a -0,018 V. Além disso, quanto mais negativo for o potencial de eletrodeposição, maior a taxa de eletrodeposição das NPs, o que definitivamente influencia na atividade eletrocatalítica do eletrodo modificado com CuNPs.

As nanopartículas foram eletrodepositadas na superfície do RGO/GCE a partir de uma solução precursora de $CuSO_4$ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em Na_2SO_4 $0,10$ mol L^{-1} , tempo de eletrodeposição de 90 s, e os potenciais estudados foram de -0,10 a -0,70 V. A Figura 74 (A – Curva a) apresenta a variação do Γ com o potencial de redução. Foi observado o aumento da extensão da cobertura da superfície do RGO/GCE com CuNPs em função do aumento do potencial de eletrodeposição de -0,10 ($2,1 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2}) a -0,60 V ($6,0 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2}). A partir de -0,60 V, a cobertura da superfície com NPs permaneceu constante, indicando que a superfície foi saturada com CuNPs.

Na Figura 74 (A – Curva b), pode ser observada a resposta voltamétrica da glicina em função do potencial de eletrodeposição. Os resultados foram obtidos a partir da oxidação da glicina nos diferentes eletrodos preparados por CV no intervalo de potencial de 0,050 a 0,90 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos na ausência e na presença de glicina em $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 75. Na região anódica, não foi observado pico de oxidação ausência de glicina. No entanto, na presença de glicina, foi constatado um pico anódico, e a sua corrente foi monitorada nos diferentes eletrodos.

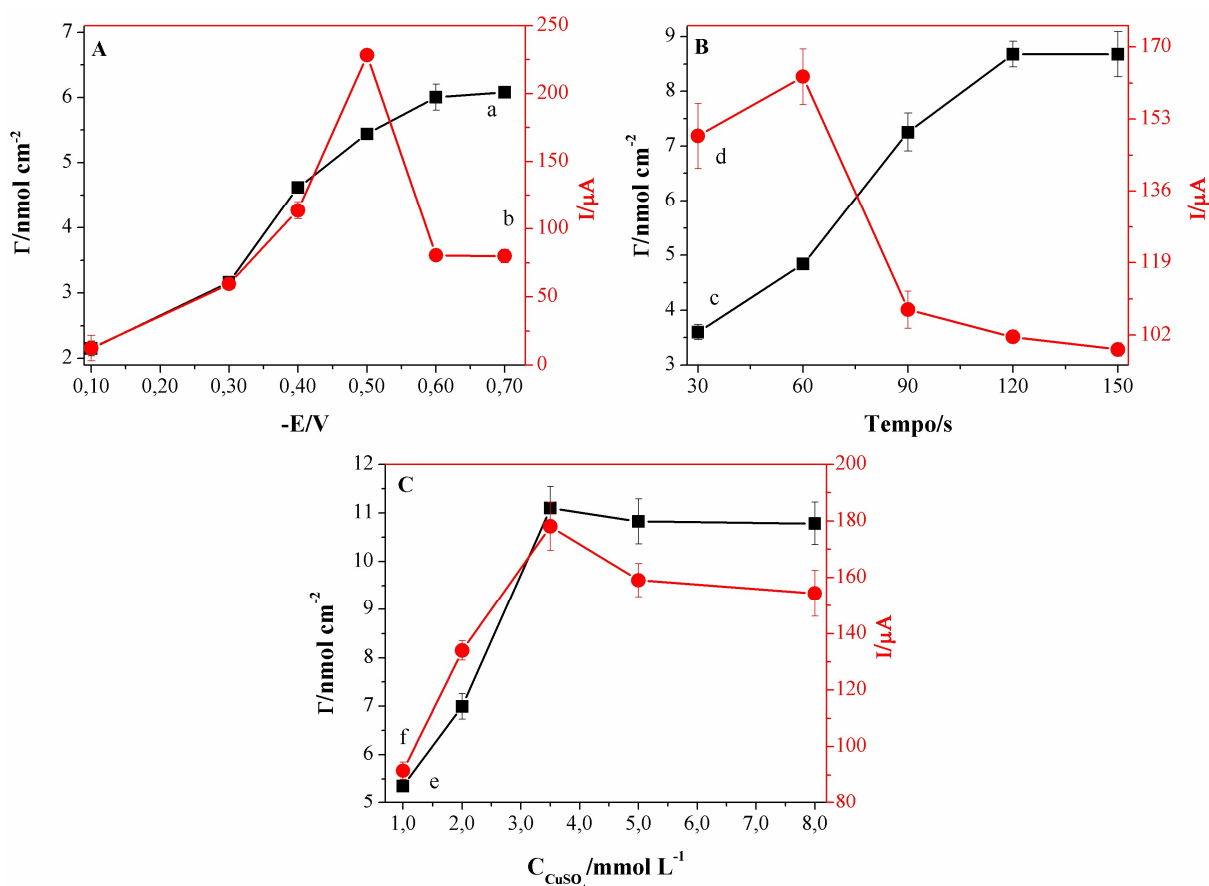


Figura 74 – Otimização da eletrodeposição das CuNPs na superfície do RGO/GCE ($n=3$). Curvas do excesso superficial (Γ , -■-) e das respostas electrocatalíticas (ΔI , -●-) das modificações na presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em função do (A) potencial de eletrodeposição, (B) tempo de eletrodeposição e (C) concentração de sulfato de cobre (C_{CuSO_4}).

Os resultados obtidos indicam que o número de sítios ativos das CuNPs na superfície do RGO/GCE exerce papel fundamental na electrocatálise, Figura 74 (A – Curva b). Contudo, a atividade electrocatalítica é reduzida após atingir o potencial de eletrodeposição de -0,50 V. Esse resultado pode ser atribuído ao aumento na resistência do transporte de íons para o equilíbrio de carga no processo de oxidação e redução das nanopartículas (163). Sendo assim, o potencial de eletrodeposição selecionado foi de -0,50 V.

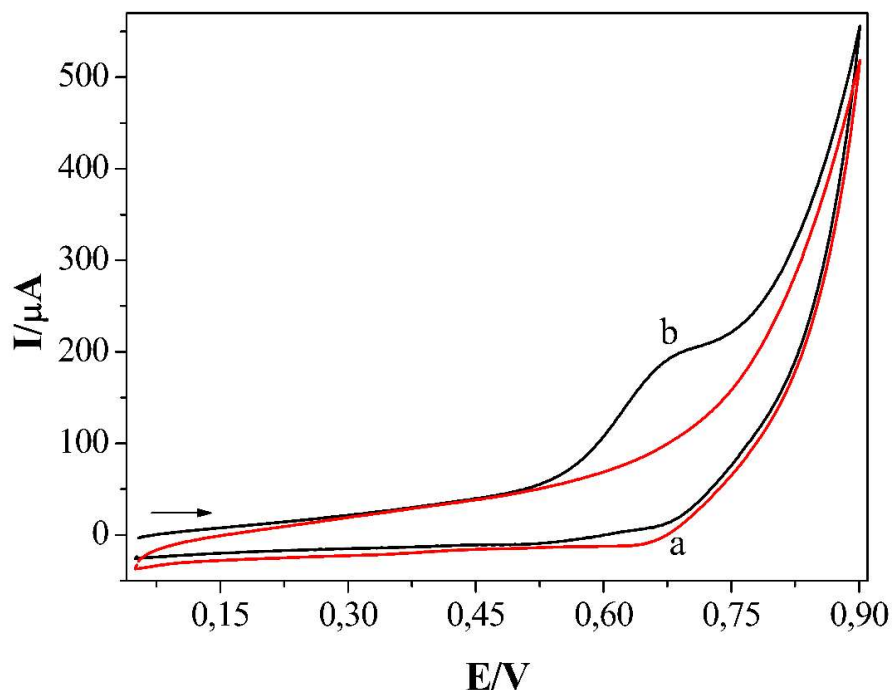


Figura 75 – Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de glicina $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o CuNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

O efeito do tempo de eletrodeposição na atividade electrocatalítica do CuNPs-RGO/GCE é apresentado na Figura 74 (B). As modificações foram realizadas a partir de uma solução precursora de CuSO_4 $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em Na_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, potencial de $-0,50 \text{ V}$ com tempos de eletrodeposição de 30 a 150 s. A Figura 74 (B – Curva c) apresenta o Γ em função do tempo de eletrodeposição. Foi observado que a quantidade de CuNPs eletrodepositadas na superfície do RGO/GCE é inversamente proporcional à resposta electrocatalítica da glicina. Além disso, é possível perceber que as NPs crescem na superfície do RGO/GCE até 120 s; após esse tempo, o crescimento das NPs permanece constante na superfície do eletrodo, Figura 74 (B – Curva c).

A resposta voltamétrica da glicina alcançou o seu valor máximo em 60 s e, em tempos maiores, a corrente diminuiu em função do tempo de eletrodeposição das CuNPs, Figura 74 (B – Curva d). Em tempos de eletrodeposição menores do que 60 s, a superfície do RGO não seria completamente recoberta com as CuNPs, causando insuficiência de sítios ativos para a electrocatálise da glicina. Entretanto, tempos maiores de eletrodeposição favorecem o crescimento das NPs, podendo formar partículas maiores e aglomeradas, reduzindo o efeito electrocatalítico das CuNPs. Consequentemente, exclui a vantagem da elevada área superficial electroativa que possuem as nanopartículas. Assim, o tempo de 60 s foi selecionado para a modificação do RGO/GCE com CuNPs.

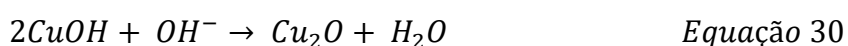
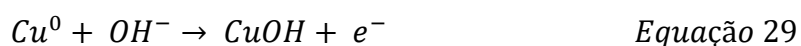
A Figura 74 (C) exibe o efeito da concentração da solução de CuSO_4 na eletrocatalise da glicina. As modificações foram realizadas aplicando potencial de $-0,50$ V, tempo de eletrodeposição de 60 s, e a concentração da solução precursora de CuSO_4 foi estudada no intervalo de $1,0 \times 10^{-3}$ a $8,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em Na_2SO_4 $0,10$ mol L^{-1} . A Figura 74 (C – Curva e) apresenta o Γ em função da concentração de CuSO_4 . Foi observado que a camada de cobertura das NPs sobre o RGO/GCE aumenta até a concentração de $3,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . Posteriormente, a superfície do eletrodo é saturada com a concentração das CuNPs, permanecendo constante em valores maiores do que $3,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .

O efeito da concentração de CuSO_4 sobre a corrente catalítica da glicina é apresentado na Figura 74 (C – Curva f). Foi observado o aumento da corrente de pico anódico até $3,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . Tal resultado revela que a interação combinada entre o número de sítios ativos das CuNPs geradas e a resistência do transporte de íons atingiram seu valor máximo. A partir de $3,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , notou-se uma diminuição da corrente de pico da glicina, indicando que as CuNPs perdem as propriedades nanoeletrocatalíticas. Portanto, as condições ótimas de eletrodeposição selecionadas para formação das nanopartículas de cobre sobre a superfície do RGO/GCE foram: potencial de eletrodeposição de $-0,50$ V, tempo de eletrodeposição de 60 s e concentração de CuSO_4 de $3,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .

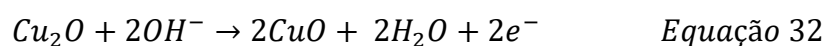
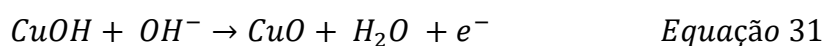
Após a determinação das melhores condições para a eletrodeposição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE, um voltamograma cíclico do CuNPs-RGO/GCE em NaOH $0,10$ mol L^{-1} foi registrado no intervalo de potencial de $-1,0$ a $1,0$ V com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} , Figura 76. Nesse voltamograma, foram observados quatro picos anódicos e três picos catódicos (PC) no intervalo de potencial estudado. Os picos P1, P2 e P3 são atribuídos à oxidação do Cu^0 em Cu_2O e $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuOH}$ e desse para CuO , respectivamente. Os picos P6 e P7 demonstram a redução do CuO em $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuOH}$ e desse novamente para Cu^0 .

O possível mecanismo envolvido nas diferentes etapas do processo redox na superfície do eletrodo pode ser expresso pelas seguintes equações (164):

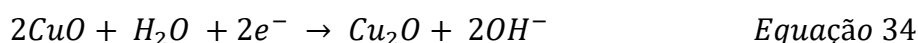
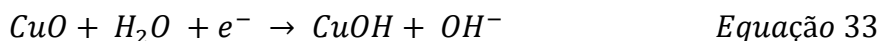
Pico P1



Picos P2/P3



Pico P6



Pico P7

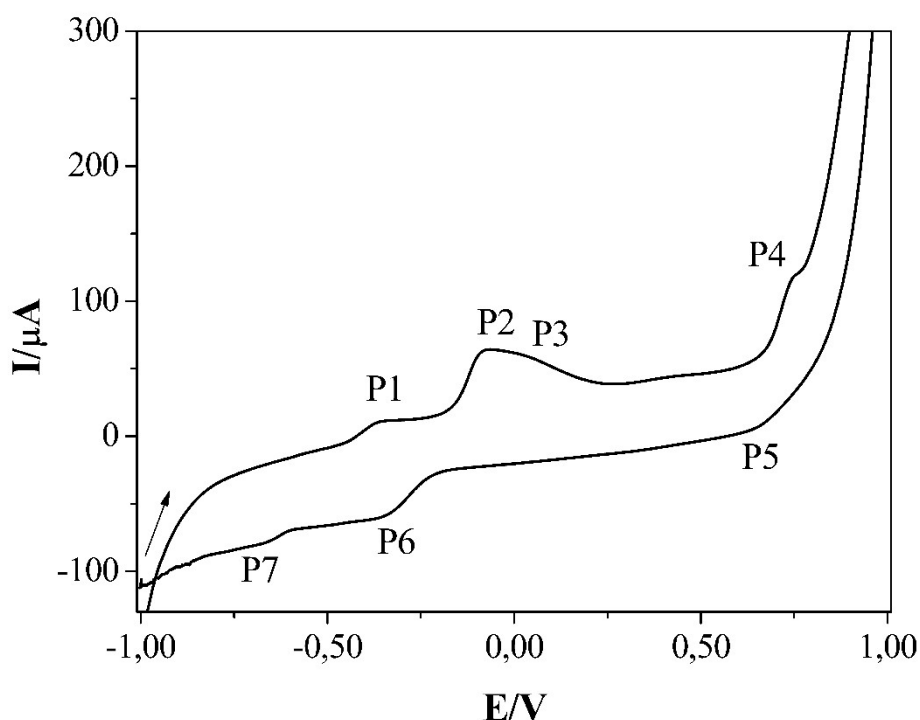
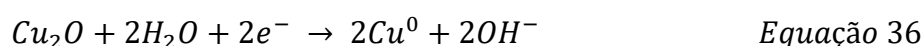
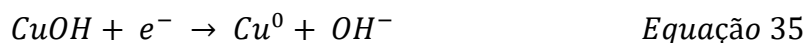
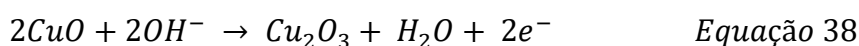
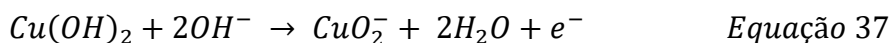


Figura 76 – Voltamograma cíclico do CuNPs-RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹.

O pico P4 no potencial de 0,74 V mostra a oxidação de Cu(II)/Cu(III); já o pico P5 em 0,66 V indica a redução. Esses resultados são coerentes com a literatura que indica que tais reações de oxirredução ocorrem no intervalo de potencial de 0,40 V e 0,80 V (108). Nesta janela de potencial, também ocorre a oxidação da glicina (Figura 75), mostrando que o cobre na forma de Cu(III) promove a eletro-oxidação dos aminoácidos na superfície do eletrodo modificado. O mecanismo envolvido na conversão de Cu(II)/Cu(III) é apresentado a seguir:



Na Figura 77, são apresentados os voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de -0,40 a 0,40 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ durante 25 ciclos de potencial. No primeiro voltamograma cíclico, foram observados três picos característicos das reações de oxirredução do cobre, como já apresentados na Figura 76. Conforme foram realizadas as varreduras sucessivas, as intensidades das correntes dos picos diminuíram, indicando a estabilização da oxidação e formação de óxido de cobre sobre a superfície do eletrodo modificado. Os pares redox P1/P7 e P4/P5 não foram observados durante a oxidação das NPs no intervalo de potencial utilizado. Além disso, foram necessários 25 ciclos de potenciais para atingir a estabilização das correntes dos picos.

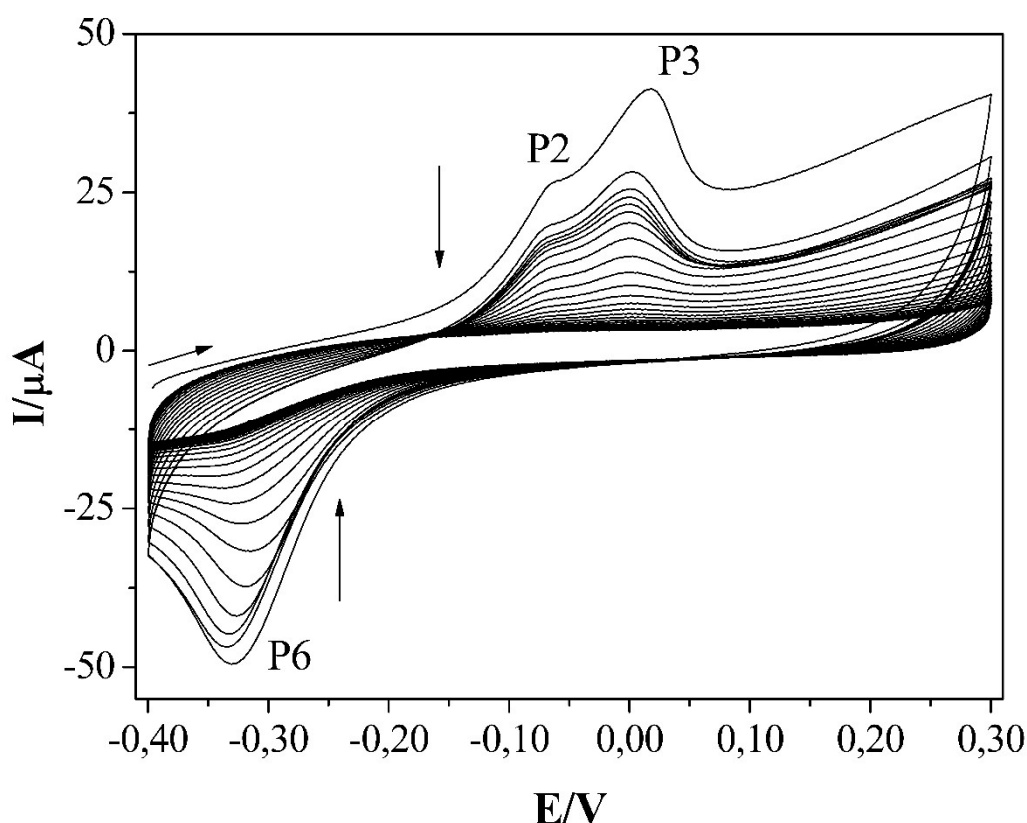


Figura 77 – Voltamogramas cíclicos sucessivos da oxidação das nanopartículas de cobre na superfície do RGO/GCE em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

6.3.3 Caracterização eletroquímica do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de níquel

Para obter informações sobre a transferência de elétrons entre o eletrólito e a superfície do eletrodo foi empregada a EIS. A caracterização por EIS foi realizada com uma solução de

$K_3[Fe(CN)_6]$ $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em KCl 0,10 mol L⁻¹, a qual foi empregada como sonda redox no intervalo de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz, sob amplitude de 5,0 mV e potencial aplicado de 0,22 V, Figura 78.

A Figura 78 (A) retrata os diagramas EIS dos GCE sem modificação e CuNPs-RGO/GCE. Os diagramas apresentam uma região linear na região de baixa frequência, indicando que há uma resistência Warburg limitando a difusão no processo eletroquímico, e um semicírculo de transferência de elétrons na região de alta frequência que podem ser usados para descrever as propriedades de interface do eletrodo; o diâmetro equivale à resistência à transferência de elétrons (R_{ct}).

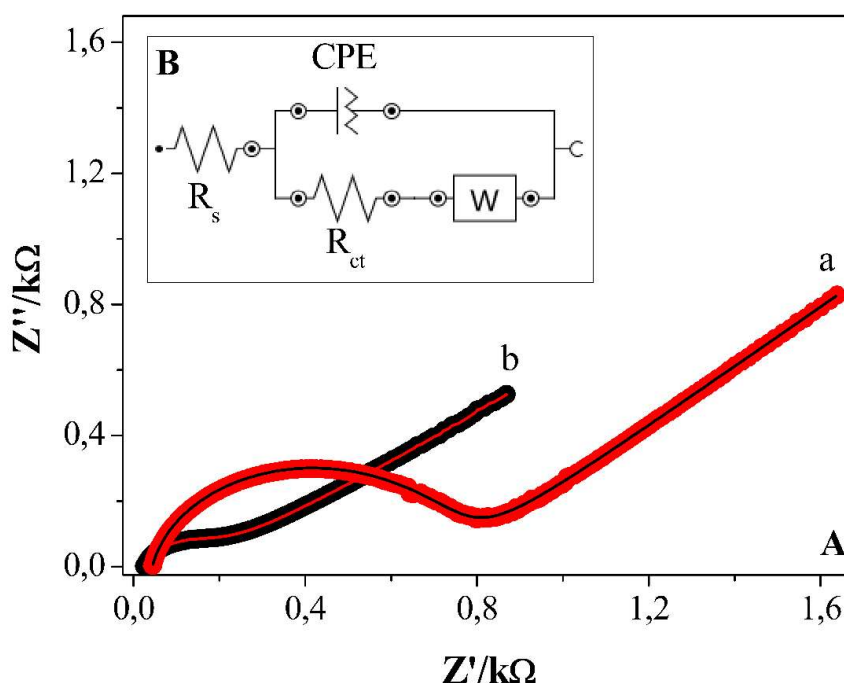


Figura 78 – (A) Diagramas de EIS dos GCE sem modificação (a) e CuNPs-RGO/GCE (b) com as linhas solidas preta (a) e vermelha (b) correspondentes às simulações dos dados experimentais. (B) Circuito eletroquímico equivalente utilizado para ajustar os diagramas de EIS.

O circuito equivalente para os dados de EIS foi baseado no circuito de Randles. O circuito consiste em resistência à solução (R_s), resistência à transferência de carga (R_{ct}), elemento de fase constante (CPE) e impedância de Warburg (W) em paralelo, Figura 78 (B).

Na Figura 78 (A), foi observado que a resistência à transferência de elétrons na superfície do CuNPs-RGO/GCE ($R_{ct}= 223 \Omega$) é cerca de 3,3 vezes menor em comparação com o GCE não modificado ($R_{ct}= 738 \Omega$). A partir dessas observações, pode-se concluir que o GCE modificado com RGO e CuNPs pode ser uma plataforma promissora para detecção dos aminoácidos.

6.3.4 Caracterização superficial do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de cobre

As superfícies morfológicas do GCE modificado com RGO e CuNPs foram caracterizadas por SEM, EDX, Raman, XPS, TEM e HRTEM. Na Figura 79 são, apresentadas as imagens de SEM dos eletrodos sem modificação e modificados com RGO e CuNPs. Comparando com a imagem do GCE sem modificação (Figura 79A), o RGO possui característica de folhas amassadas e enrugadas, provocando uma mudança na topografia superficial do GCE (Figura 79B) e, conseqüentemente, proporcionando um aumento da área superficial.

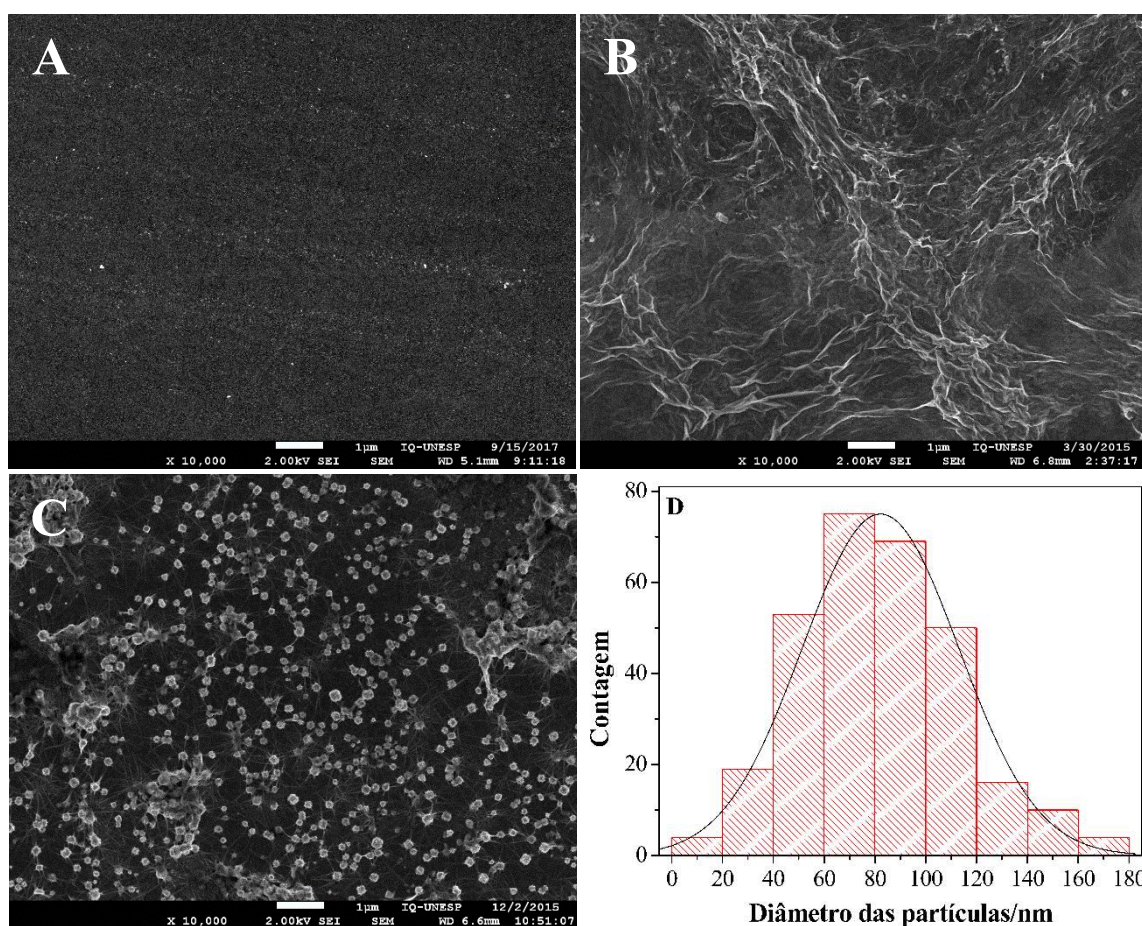


Figura 79 – Imagens de SEM do (A) GCE sem modificação, (B) RGO/GCE e (C) CuNPs-RGO/GCE. Histograma da distribuição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE (D).

Na Figura 79 (C), pode ser observado que as CuNPs estão uniformemente distribuídas sobre a superfície do RGO/GCE. O histograma da distribuição das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE é retratado na Figura 79 (D). As CuNPs produzidas apresentaram diâmetros de 15 a 180 nm (300 nanopartículas foram contadas) e diâmetro médio de 82 ± 31 nm.

A superfície do RGO/GCE modificado com CuNPs foi analisada através de EDX para verificar sua composição. O espectro de EDX do eletrodo modificado com RGO e CuNPs é apresentado na Figura 80. No espectro superficial do CuNPs-RGO/GCE, foram observados picos correspondentes aos elementos carbono (C), oxigênio (O) e cobre (Cu). Esses resultados confirmam a presença das CuNPs sobre a superfície do RGO/GCE.

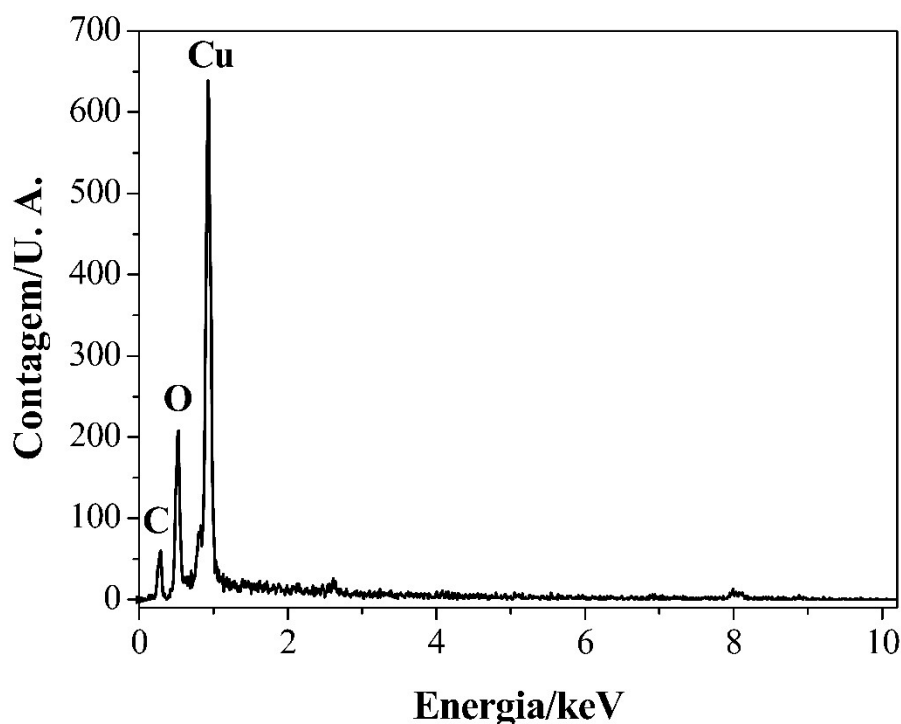


Figura 80 – Espectros de EDX do eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo CuNPs.

A espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar a superfície do CuNPs-RGO/GCE e demonstrar o efeito da modificação nela. O espectro de espalhamento Raman para o eletrodo modificado com CuNPs no intervalo de 600 a 3600 cm^{-1} é apresentado na Figura 81.

O espectro apresentou picos de bandas D ($\sim 1325 \text{ cm}^{-1}$) e G ($\sim 1594 \text{ cm}^{-1}$) correspondentes à presença de defeitos (tais como a ruptura na ligação sp^2 , a formação de rugas e a presença de grupos funcionais), e à respiração dos fônons de ponto K da simetria A_{1g} devido aos defeitos nas bordas, respectivamente, Figura 81. Além disso, notou-se o deslocamento da banda G em 10 cm^{-1} de ~ 1584 (RGO, Figura 29C) para 1584 cm^{-1} (CuNPs-RGO/GCE, Figura 81). Essa mudança é referente ao transporte de carga entre o carbono e outros compostos presentes (144), indicando a presença de uma transferência de carga do RGO para as CuNPs.

Além dos dois picos observados, existem dois picos de menor intensidade em ~ 2643 cm^{-1} e ~ 2896 cm^{-1} correspondentes às bandas 2D (processo de dupla ressonância que conecta fônons a estrutura da banda eletrônica) e D+G (defeitos pontuais plano basal das arestas do grafeno), respectivamente (82,99,143).

A razão ID/IG calculada para o RGO/GCE foi de 1,1, quando esse eletrodo é modificado com CuNPs, aumenta para 1,8. Essa razão ID/IG reflete o grau de grafitação dos materiais carbonosos e a densidade do defeito. Assim, o aumento do valor de ID/IG pode ser atribuído à modificação do RGO/GCE com CuNPs que provoca o aumento da rugosidade superficial do eletrodo.

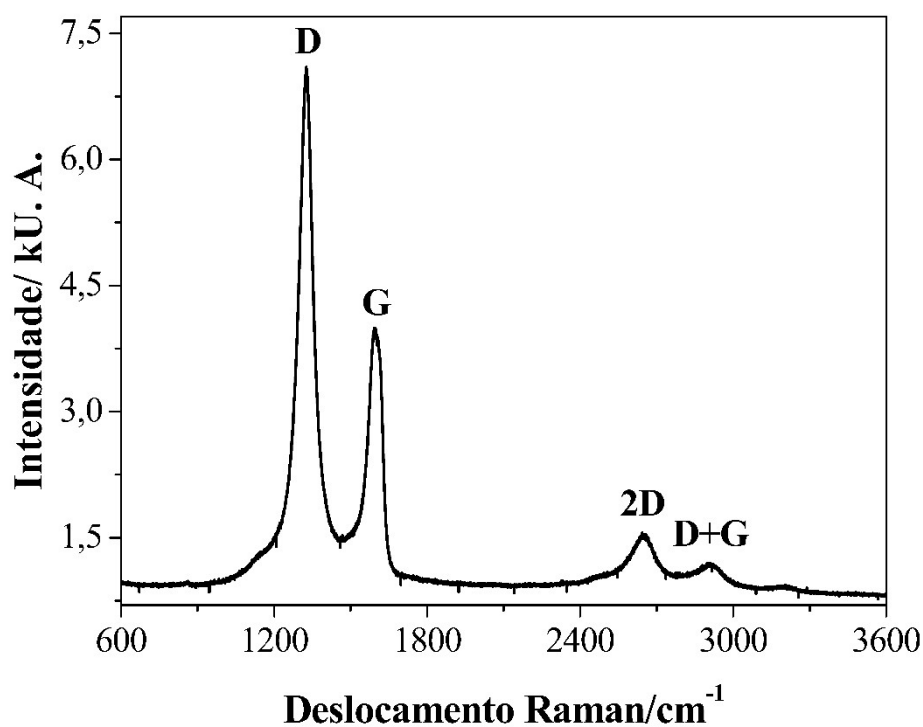


Figura 81 – Espectro RAMAN do eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido contendo CuNPs.

A análise de XPS do CuNPs-RGO/GCE foi realizada para investigar o nível de oxidação e a natureza de ligação química da superfície do eletrodo modificado, Figura 61. O espectro exploratório (0 a 1490 eV) da análise é apresentado na Figura 82 (A). No espectro exploratório, podem ser observados sinais de oxigênio, carbono e cobre com energias de ligações em 25,6 (O 2s), 77,9 (Cu 3p), 134,9 (Cu 2s), 285,1 (C 1s), 532,6 (O 1s), 934,7 (Cu 2p_{3/2}) e 954,8 (Cu 2p_{1/2}) eV. O espectro não demonstrou pico na região de 918,8 eV, atribuído a cobre metálico(165). Sendo assim, é possível concluir que todo o cobre eletrodepositado foi oxidado sobre a superfície do RGO/GCE.

A análise de XPS mostrou picos predominantes de Cu 3p, C 1s e O 1s com proporções atômicas de 3,0, 75,3 e 19,6 %, respectivamente. A presença desses picos confirma a modificação bem-sucedida da superfície do GCE com RGO e CuNPs. A partir deste estudo, as regiões de Cu 2p_{3/2}, O 1s e C 1s foram coletadas e analisadas individualmente.

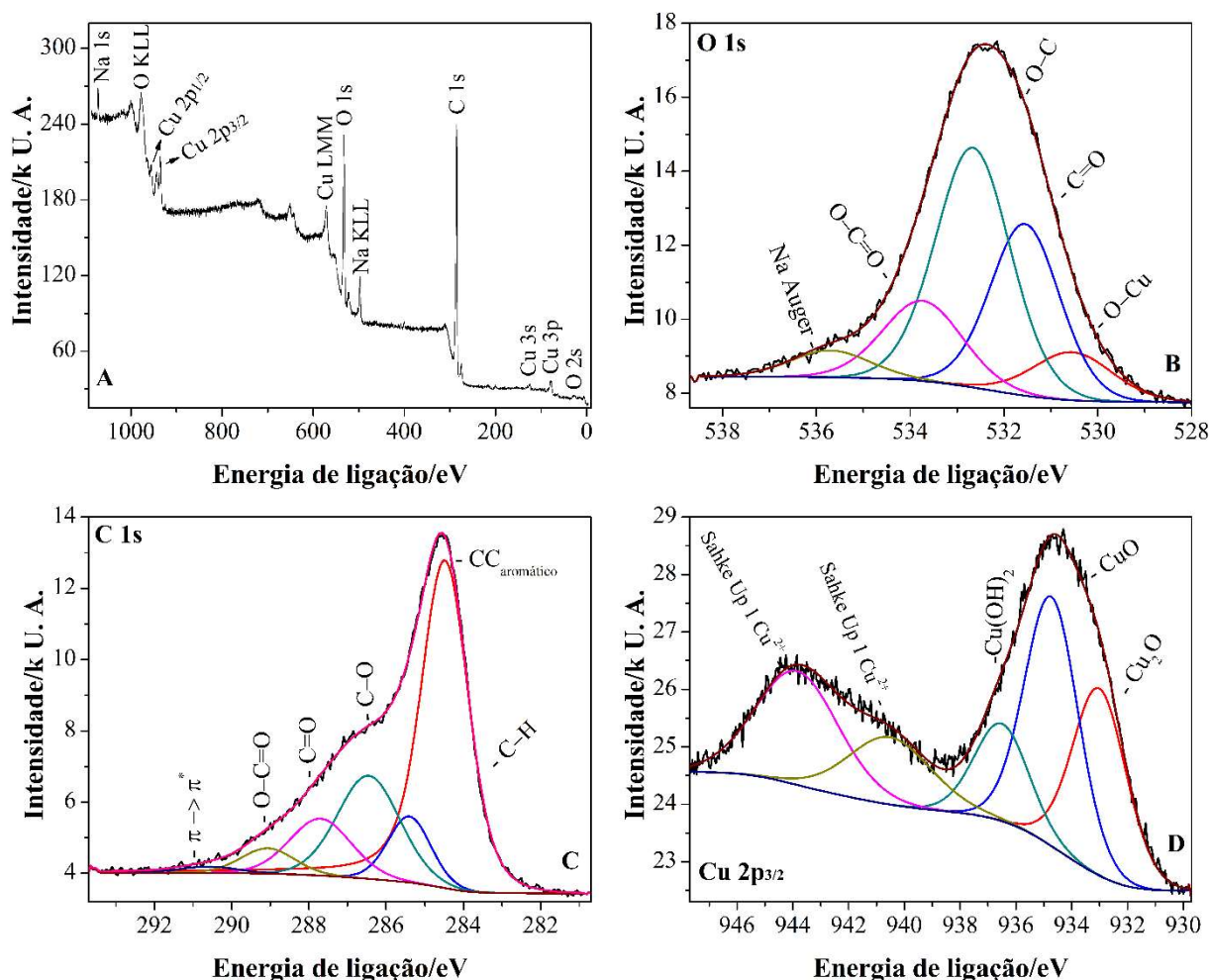


Figura 82 – (A) Espectros exploratório e de alta resolução de XPS das regiões de (B) O 1s, (C) C 1s e (D) Cu 2p_{3/2} com suas deconvoluções para o CuNPs-RGO/GCE.

O espectro de alta resolução da região de O 1s pode ser claramente deconvolvido em quatro componentes correspondentes aos átomos de oxigênio em diferentes grupos funcionais com energias de ligações em 530,5 (O-Cu; 9,1 %), 531,6 (C=O; 28,2 %), 532,7 (C-O; 42,5 %) e 533,7 (O-C=O; 15,1 %) eV com suas respectivas proporções atômicas, e uma componente Auger Na sobreposta com O 1s em 535,6 (Auger Na; 5,1 %) eV que poder ser do NaOH utilizado na oxidação das CuNPs, Figura 82(B). O pico localizado em 530,5 eV é atribuído à presença do Cu₂O na superfície do eletrodo modificado (166).

O espectro de alta resolução da região de C 1s foi deconvoluído em cinco componentes, Figura 82 (C). As componentes identificadas foram associadas a diferentes formas de oxidação e hibridizações do carbono com energias de ligações em 284,5 (C_{aromático}; 55,4 %), 285,4 (C-H; 8,7 %), 286,4 (C-O, 19,8 %), 287,7 (C=O; 10,8 %), 289,1 (O-C=O; 4,2 %) e 290,6 (pico satélite *shake-up* $\pi \rightarrow \pi^*$; 5,9 %) eV com suas respectivas proporções atômicas (82,88).

Na Figura 82 (D), é apresentado o espectro de alta resolução da região de Cu 2p_{3/2}. A deconvolução do espectro gerou três picos associados a diferentes espécies de cobre com energias de ligações em 933,0 eV, 934,7 e 936,5 eV e dois picos satélites (pico *shake-up*) com energias de ligações em 940,5 e 943,9 eV. O pico com energia de ligação em 833,0 eV é atribuído ao Cu₂O, e o pico em 934,7 eV corresponde ao CuO, sendo esse pico confirmado pela presença dos picos satélites característicos desse composto em 943,9 eV (167). O pico com energia de ligação em 936,5 eV diz respeito ao Cu(OH)₂ (168).

O pico satélite em 940,5 eV confirma a predominância do CuO sobre a superfície do eletrodo modificado. A diferença de 20,1 eV entre os picos de Cu 2p_{3/2} (934,7 eV) e Cu 2p_{1/2} (954,8 eV) está de acordo com o espectro padrão de CuO, Figura 82 (A) (169–171). Portanto, esses resultados confirmam que o CuO existe como fase principal no material híbrido entre duas formas de óxido de cobre.

A análise quantitativa de XPS a partir dos espectros de alta resolução na região de C1s do CuNPs-RGO/GCE mostrou que a concentração de oxigênio aumentou de 21,2 at.% (RGO/GCE) para 34,8 at.% (CuNPs-RGO/GCE), e a concentração de carbono diminuiu de 78,8 at.% (RGO/GCE) para 64,1 at.% (CuNPs-RGO/GCE). A razão atômica O/C do NiNPs-RGO/GCE (0,54 %) aumentou cerca de duas vezes em comparação com RGO/GCE (0,27 %) após a modificação com as CuNPs. Os resultados indicam que o aumento da concentração de oxigênio na superfície do RGO/GCE deve resultar, principalmente, da mistura dos óxidos Cu₂O e CuO.

Foram realizadas análises de TEM e HRTEM para esclarecer a estrutura e a morfologia da superfície do CuNPs-RGO/GCE, Figura 83. Na Figura 83 (A), foi observado que as CuNPs estão ancoradas no RGO. Além disso, a imagem de HRTEM indica que as CuNPs estão envolvidas pelo RGO, Figura 83 (B). A natureza cristalina das CuNPs foi confirmada utilizando padrões de difração de elétrons da área selecionada, Figura 83 (C). A imagem ampliada da Figura 83 (C) revela franjas de rede cristalina com espaçamento interplanar de 0,25 nm correspondente aos planos (002) do CuO (172). A partir do padrão de

difração, foi observado que os anéis de difração podem ser indexados à fase monoclinica do CuO que possui pontos de difração ao longo do eixo da zona, tais como (200), (011) e (110), nos planos do cristal (172). Esses resultados indicam que as nanopartículas formadas na superfície do RGO/GCE são predominantemente formadas por NPs de CuO, concordando com os resultados obtidos nas análises de XPS.

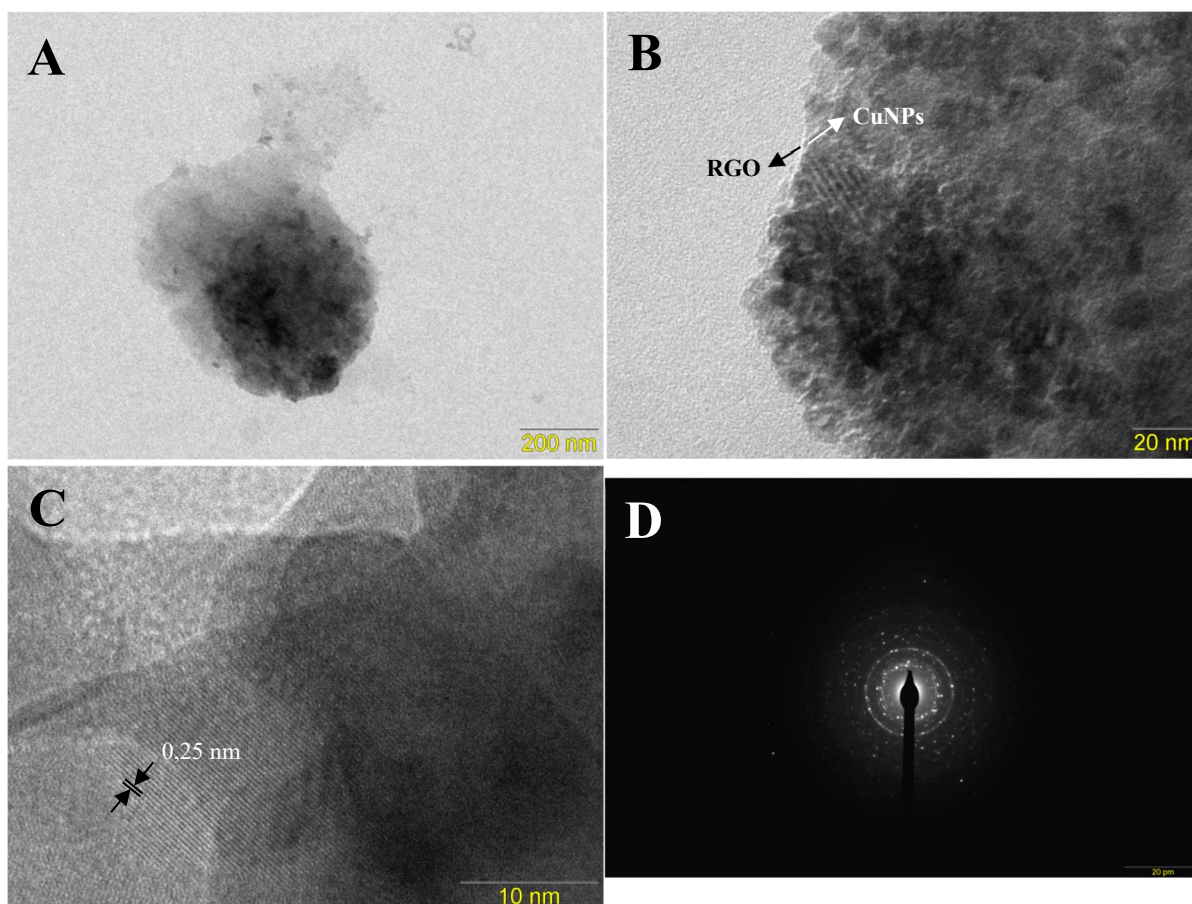


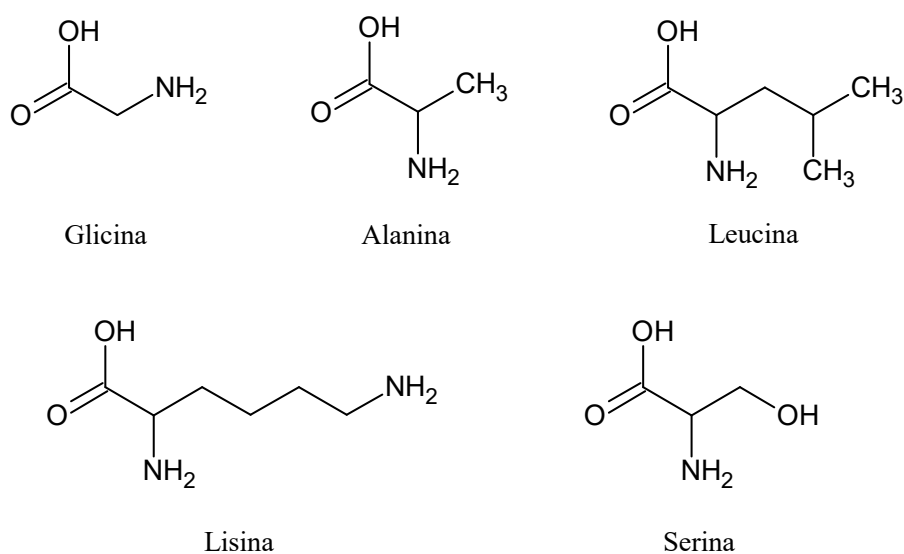
Figura 83 – Imagens de (A) TEM e (B) imagens HRTEM do composto CuNPs/RGO, (C) imagem ampliada da área quadrada e (D) padrão de difração cristalina de uma CuNPs.

6.3.5 Estudo do comportamento dos aminoácidos em solução alcalina

A eletro-oxidação dos aminoácidos (Esquema 4) sobre a superfície do CuNPs-RGO/GCE foi investigada por CV em meio alcalino no intervalo de potencial de 0,30 a 1,1 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos na ausência e na presença dos aminoácidos são apresentados na Figura 84.

Nos voltamogramas, foi observado um aumento na corrente de pico anódico na presença dos aminoácidos $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ na superfície do CuNPs-RGO/GCE em relação ao observado para a superfície modificada na ausência desses aminoácidos. Tal resultado aponta

para um processo típico de eletro-oxidação catalítica dos aminoácidos através do estado de alta valência do $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Equação 37) e CuO (Equação 38) que, em meio alcalino, geram as espécies CuOO^- e Cu_2O_3 . Cabe ressaltar, entretanto que, nas análises de TEM e HRTEM, foi encontrado apenas o CuO . Sendo assim, pode-se concluir que o processo de oxidação electrocatalítico é realizado predominantemente por Cu_2O_3 . Os voltamogramas cíclicos típicos para a eletro-oxidação dos aminoácidos alanina, glicina, leucina, lisina e serina em meio alcalino são apresentados na Figura 84.



Esquema 4 – Estrutura molecular dos aminoácidos estudados utilizando o CuNPs-RGO/GCE.

A Figura 84 (A) apresenta o voltamograma cíclico do CuNPs-RGO/GCE na ausência e na presença de alanina em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Na ausência da alanina, não foi observado nenhum pico de oxidação ou redução na superfície do eletrodo modificado com RGO e CuNPs. Após a adição de alanina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, notou-se o aumento significativo da corrente de pico ($380,8 \mu\text{A}$) na região de potencial de $0,52$ a $0,95 \text{ V}$ durante a varredura anódica, evidenciando a oxidação electrocatalítica dos aminoácidos pelas espécies de $\text{Cu}(\text{III})$. O ganho de corrente de pico anódico foi observado até $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, foi observado o deslocamento de potencial para regiões mais positivas com o aumento da concentração do aminoácido de $0,66$ ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) para $0,87 \text{ V}$ ($2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).

Comportamento electroquímico similar ao da alanina foi percebido para os aminoácidos glicina, leucina, lisina e serina, Figura 84 (B-E), respectivamente. Foi observado o deslocamento dos potenciais de oxidação da lisina ($0,89 \text{ V}$), serina ($0,87 \text{ V}$), glicina ($0,86 \text{ V}$) e leucina ($0,90 \text{ V}$) em comparação com a alanina ($0,87$).

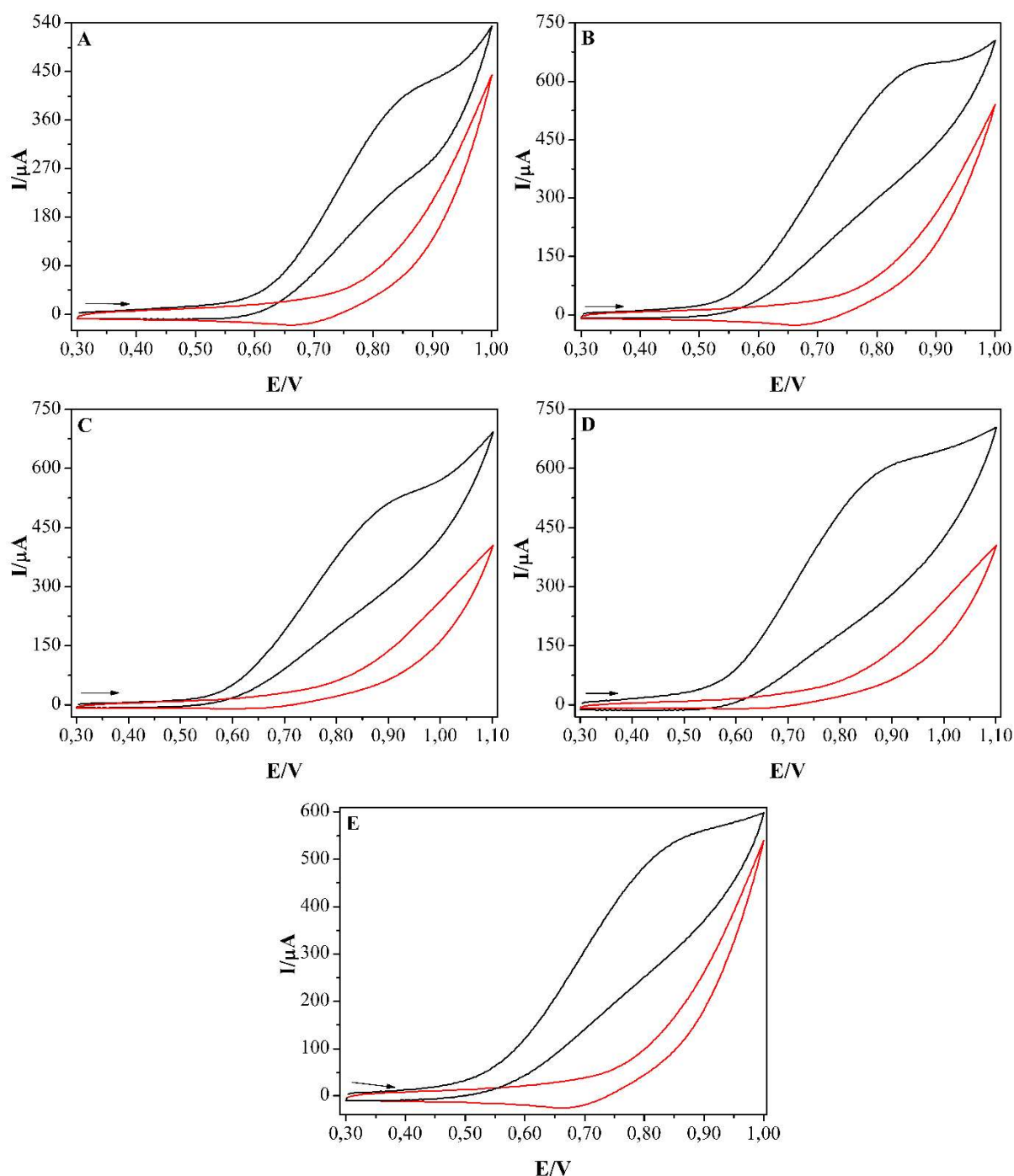
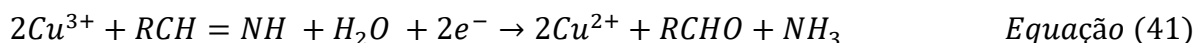
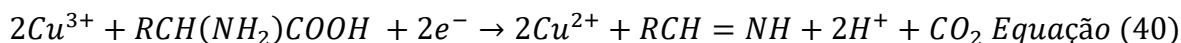


Figura 84 – Voltamogramas cíclicos na ausência (curvas vermelhas) e na presença de alanina (A), glicina (B), leucina (C), lisina (D) e serina (E) em soluções de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície do CuNPs-RGO/GCE com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e aminoácidos nas concentrações de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

As espécies de Cu(II)/Cu(III) presentes na superfície do eletrodo modificado atuam como eletrocatalisador para a oxidação de aminoácidos. Quando os aminoácidos atingem a superfície do eletrodo, são rapidamente oxidados em aldeído, dióxido de carbono e amônia pelas espécies de Cu(III). O mecanismo de oxidação eletrocatalítica dos aminoácidos na

superfície do CuNPs-RGO/GCE pode ser representado através das seguintes reações em meio alcalino (31,32,34,130):



Foram realizados estudos de velocidade de varredura para compreender o comportamento eletroquímico dos aminoácidos sobre a superfície do CuNPs-RGO/GCE em solução alcalina. As velocidades de varredura estudadas foram de 10 a 500 mV s^{-1} . Os voltamogramas cíclicos e o efeito da velocidade de varredura sobre as correntes de pico anódico e catódico da alanina em $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 85.

Notou-se que as correntes do pico anódico aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 300 mV s^{-1} com coeficiente de relação maior que 0,999, Tabela 20. Estes resultados indicam que as reações de transferência de elétrons dos aminoácidos alanina, glicina, leucina, lisina e serina em meio alcalino podem ser controladas pelo processo difusional.

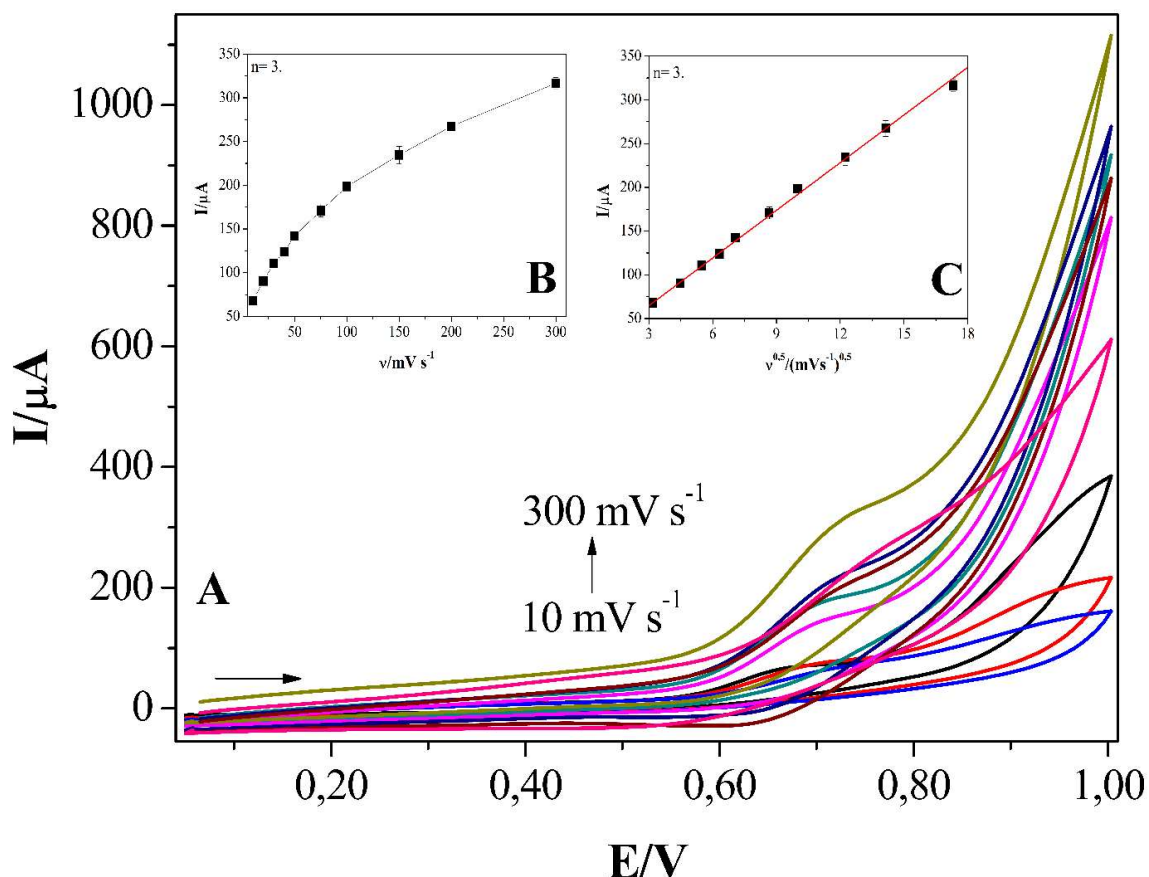


Figura 85 – (A) Voltamogramas cíclicos do estudo da velocidade de varredura da alanina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Efeito da (B) velocidade de varredura (v) e (C) raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$) nas correntes de pico anódico.

Tabela 20 – Parâmetros obtidos a partir da relação linear entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{0,5}$).

Aminoácido	Faixa Linear/ $mV^{0,5} s^{-0,5}$	Equação Linear	Coefficiente de Correlação Linear
Alanina		$I_{pa} = 1,0 \times 10^{-5} + 1,8 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,999
Glicina	3,2	$I_{pa} = 3,7 \times 10^{-6} + 1,0 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,999
Leucina	a	$I_{pa} = 4,3 \times 10^{-5} + 1,1 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,998
Lisina	18,7	$I_{pa} = -4,4 \times 10^{-5} + 2,7 \times 10^{-5} v^{0,5}$	0,999
Serina		$I_{pa} = 3,2 \times 10^{-4} + 1,1 \times 10^{-4} v^{0,5}$	0,998

6.3.6 Otimização da separação cromatográfica

Os aminoácidos podem ser detectados a partir da corrente gerada pela sua oxidação na superfície do CuNPs-RGO/GCE. Assim, inicialmente foram investigados o potencial de detecção e a melhor sequência de pulsos aplicada na determinação dos aminoácidos. Os produtos dessa reação de oxidação podem contaminar a superfície do eletrodo modificado através da adsorção e, como tal, devem ser limpos entre as medidas para não interferir no sinal analítico. A técnica de PAD resolve esse problema e permite que a resposta do eletrodo modificado apresente estabilidade por um período longo, devido à limpeza eletroquímica periódica realizada durante as corridas cromatográficas durante a aplicação dos pulsos (154,173).

Para a PAD dos aminoácidos foi aplicada uma sequência de três pulsos baseada em relatos da literatura (173,174). No primeiro pulso de potencial (E_1), ocorre a ativação da superfície do CuNPs-RGO/GCE nos primeiros 100 ms, e nos outros 200 ms sucede a detecção da oxidação dos aminoácidos. O segundo potencial (E_2) é utilizado para oxidar todas as espécies orgânicas presentes na superfície do eletrodo modificado e impedir que sejam adsorvidas. O terceiro potencial (E_3) é aplicado para reduzir a superfície oxidada do eletrodo e aumentar a estabilidade do sinal eletroquímico, além disso, esse potencial não deve ser menor do que -0,05 V devido às espécies de óxido de cobre presente na superfície do eletrodo, que podem ser reduzidas a cobre (0). Portanto, os potenciais e períodos de tempo para a PAD foram: E_1 , 0,45 V por 300 ms; E_2 , 0,65 V por 30 ms; e E_3 , -0,05 V por 50 ms (Figura 86).

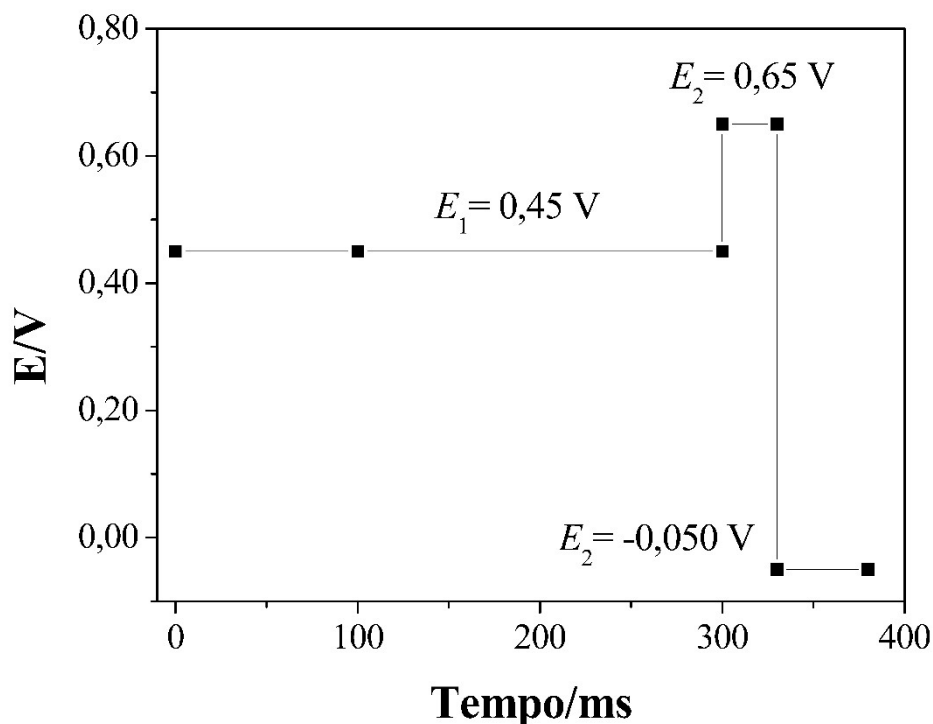


Figura 86 – Sequência de pulso aplicada na detecção amperométrica pulsada dos aminoácidos.

O estudo do potencial aplicado empregando o CuNPs-RGO/GCE como detector amperométrico foi realizado após a separação cromatografia dos aminoácidos com fase móvel alcalina no intervalo de potencial de 0,0 a 0,60 V. A Figura 87 apresenta a resposta amperométrica do CuNPs-RGO/GCE. Pode ser observado que as respostas de corrente dos aminoácidos aumentaram no intervalo de potencial de 0,0 a 0,45 V. Potenciais acima de 0,45 V provocaram a diminuição das correntes de oxidação dos aminoácidos, pois esses potenciais estavam em valores maiores do que os potenciais máximos de oxidação do cobre (III) no sistema em fluxo, causando uma diminuição na sensibilidade da detecção dos analitos. A lisina apresentou maior sensibilidade ao eletrodo modificado em comparação com os outros aminoácidos. Desse modo, o potencial aplicado de 0,45 V foi selecionado como o potencial de detecção ótimo devido a maior sensibilidade dos aminoácidos sobre a superfície do CuNPs-RGO/GCE.

O efeito das concentrações do eluentes sobre os tempos de retenções e resoluções de separação dos aminoácidos também foi investigado. Foi observado que os aminoácidos possuem uma elevada resposta eletrocatalítica sobre a superfície do NiNPs-RGO/GCE em meio alcalino. Tal resultado indica que é necessária uma elevada concentração de solução alcalina para ionizar e oxidar o grupo amino dos aminoácidos. Em geral, eluentes alcalinos são necessários para separação e detecção dos analitos por meio de cromatografia iônica.

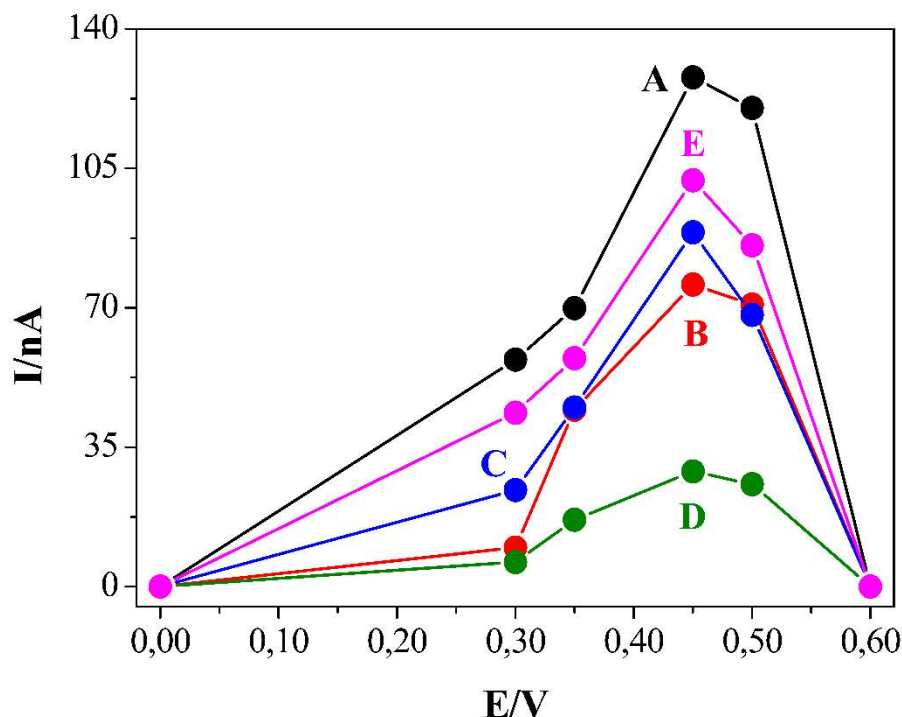


Figura 87 – Efeito do potencial aplicado ($n=3$) na resposta amperométrica dos aminoácidos (a) lisina, (b) alanina, (c) glicina, (d) leucina e (e) serina em solução alcalina. Condições: Eluição isocrática com NaOH $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ como fase móvel, velocidade da fase móvel de $0,30 \text{ mL min}^{-1}$ e aminoácidos $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ cada.

O efeito das concentrações dos eluentes sobre os tempos de retenções e resoluções de separação dos aminoácidos foi investigado com base nos resultados apresentados na *Seção 5.3.7 (Capítulo V)*, os quais indicam que é necessária uma elevada concentração de solução alcalina para ionizar e oxidar o grupo amino dos aminoácidos devido à elevada resposta electrocatalítica dos aminoácidos sobre a superfície do CuNPs-RGO/GCE em meio alcalino.

Eluentes alcalinos são necessários para separação e detecção dos analitos por meio de cromatografia iônica, portanto, soluções de NaOH são capazes de atender a esses requisitos para a separação e detecção dos aminoácidos. Na tabela 21, são apresentados os resultados do efeito do hidróxido no tempo de retenção (t_r) e fator de retenção (k) dos aminoácidos. Foi observado que o aumento da concentração de NaOH promove a diminuição do tempo de retenção dos aminoácidos. As respostas de corrente ficaram mais intensas, porque esses aminoácidos são mais facilmente oxidados em pH elevado em virtude de os grupos α -amino estarem completamente em suas formas ionizadas (162).

Além disso, pode ser verificado que os picos da alanina e glicina, e leucina e serina coeluem quando soluções alcalinas muito concentradas são empregadas na separação cromatográfica. O aumento da concentração de NaOH também provoca a diminuição dos

fatores de retenção, principalmente, para a lisina, que é mais afetada. No entanto, fatores de retenções ideais devem ficar entre 1 e 20. Por conseguinte, os resultados indicaram que a melhor separação dos aminoácidos lisina, alanina, glicina, leucina e serina é promovida pela fase móvel composta de NaOH $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹; os resultados são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Efeito do hidróxido no tempo de retenção (t_r) e fator de retenção (k) dos aminoácidos.^a

Analito		Hidróxido de sódio/ $\times 10^{-2}$ mol L ⁻¹							
		4,0	5,0	5,6	6,0	6,6	7,0	8,0	10,0
Lisina	t_r (min)	10,7	9,1	8,7	8,3	8,0	7,9	7,9	6,7
	k	1,1	1,2	1,1	1,0	0,97	0,94	0,92	0,64
Alanina	t_r (min)	17,1	14,4	13,9	12,8	12,3	12,0	11,7	10,7
	k	2,4	2,6	2,4	2,2	2,0	1,9	1,9	1,4
Glicina	t_r (min)	19,4	16,3	15,8	14,3	13,8	13,4	12,9	10,7
	k	2,9	3,0	2,8	2,5	2,4	2,3	2,1	1,6
Leucina	t_r (min)	21,6	18,0	17,1	15,9	15,2	14,8	14,1	11,7
	k	3,3	3,5	3,2	2,9	2,7	2,6	2,4	1,9
Serina	t_r (min)	23,0	19,2	18,8	16,8	16,4	15,6	15,2	12,4
	k	3,6	3,7	3,6	3,1	3,0	2,8	2,7	2,0

^a Condições experimentais: potencial de detecção de 0,45 V *versus* Pd, velocidade da fase móvel de 0,40 mL min⁻¹ e aminoácidos $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ cada.

O efeito da velocidade da fase móvel nos tempos de retenção dos analitos foi investigado, Figura 88. Verificou-se que o aumento da velocidade da fase móvel provoca a diminuição dos tempos de retenções dos aminoácidos e também a coeluição dos aminoácidos leucina e serina. Desse modo, a velocidade de 0,40 mL min⁻¹ foi selecionada como ótima para a separação dos aminoácidos.

A Figura 89 apresenta o cromatograma da separação dos aminoácidos lisina, alanina, glicina, leucina e serina obtidos utilizando potencial de detecção de 0,45 V, velocidade da fase móvel de 0,40 mL min⁻¹, eluição isocrática com NaOH $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ como fase móvel e aminoácidos $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ cada.

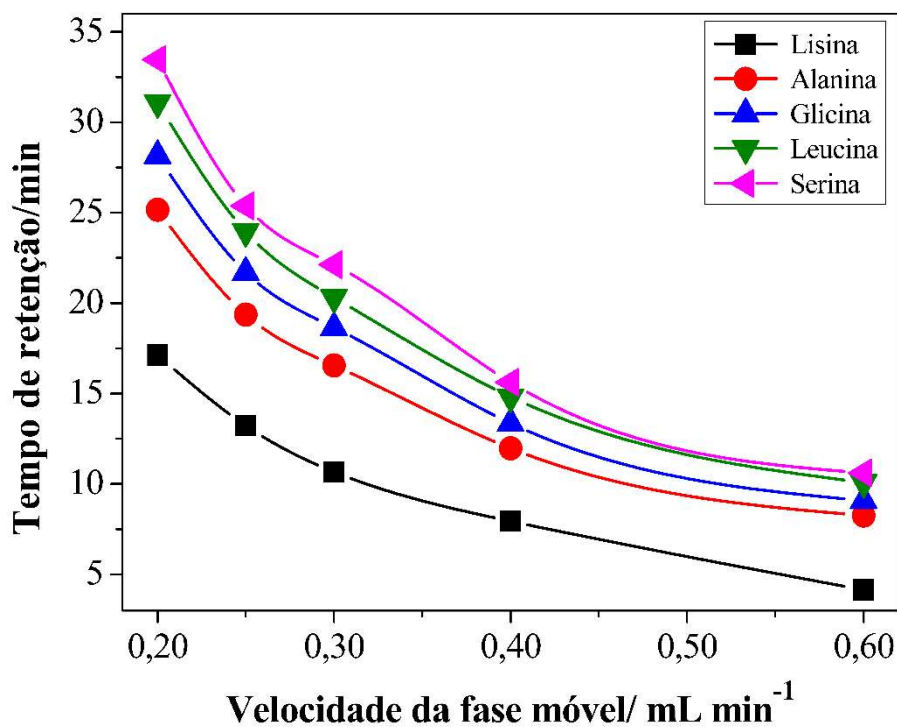


Figura 88 – Efeito da velocidade da fase móvel sobre os tempos de retenções dos aminoácidos. Condições experimentais: Potencial de detecção de 0,45 V *versus* Pd, eluição isocrática com NaOH $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ como fase móvel e aminoácidos $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ cada.

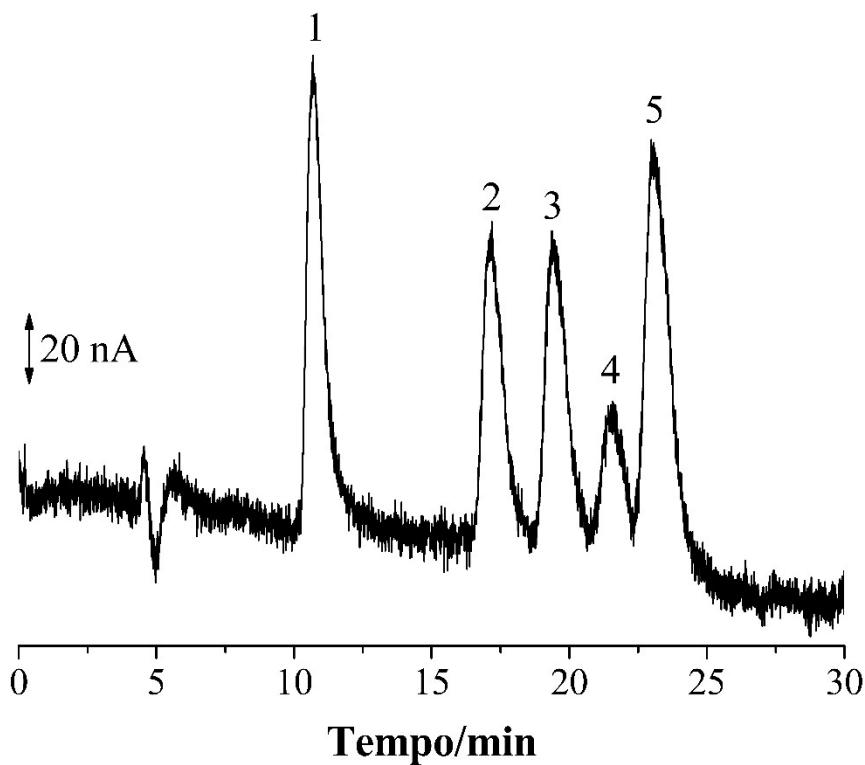


Figura 89 – Cromatograma de uma mistura $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de lisina (1), alanina (2), glicina (3), leucina (4) e serina (5). Condições: Eluição isocrática com NaOH $4,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ como fase móvel, potencial de detecção de 0,45 V *versus* Pd e velocidade da fase móvel de 0,40 mL min⁻¹.

Alguns parâmetros cromatográficos, tais como, t_m , t_r , t_r' , R_s , N , α e k (definições e formulas apresentadas na *Seção 5.3.7*, Capítulo V) foram determinados afim de avaliar o potencial de separação da coluna, . Os cálculos foram realizados a partir de dados experimentais obtidos na separação cromatográfica apresentada na Figura 89. Os parâmetros cromatográficos encontrados estão dentro dos resultados esperados para um bom desempenho cromatográfico, como pode ser visto na Tabela 22.

Tabela 22 – Parâmetros cromatográficos para a separação de aminoácidos.^a

Analito	t_m (min)	t_r (min)	t_r' (min)	R_s	N	k	α
Lisina	4.95	10.7	5.75	7.45	2636	1.16	2.16
Alanina	4.95	17.4	12.4	1.85	5221	2.50	1.17
Glicina	4.95	19.4	14.5	1.70	2752	2.93	1.49
Leucina	4.95	21.6	16.7	1.17	6176	4.36	0.84
Serina	4.95	23.0	18.1	0.88	5662	3.66	-

^a Condições experimentais como na Figura 89.

O desempenho analítico do CuNPs-RGO/GCE foi avaliado como detector amperométricos após a otimização dos parâmetros de separação e detecção dos aminoácidos. Soluções padrões contendo os aminoácidos lisina, alanina, glicina, leucina e serina foram preparadas com concentrações no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. As curvas analíticas foram avaliadas através da análise das concentrações das soluções padrões (x , mol L⁻¹) com as respectivas correntes de pico anódico (y , nA min). O intervalo linear, LOD, sensibilidade amperométrica, coeficiente de correlação e o RSD estão apresentados na Tabela 23.

As áreas dos picos dos aminoácidos variam linearmente com as concentrações no intervalo de $5,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um coeficiente de correlação $\geq 0,9990$, Figura 90. O LOD foi determinado através da razão $S/N=3$ a partir da concentração mais baixa injetada. Os limites de determinação variaram de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para a lisina a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para leucina, Tabela 23. O CuNPs-RGO/GCE empregado como detector amperométrico apresentou alta sensibilidade para os analitos que variaram de $6,1 \times 10^6$ (Leucina) a $2,1 \times 10^7$ nA mol⁻¹ L (Serina).

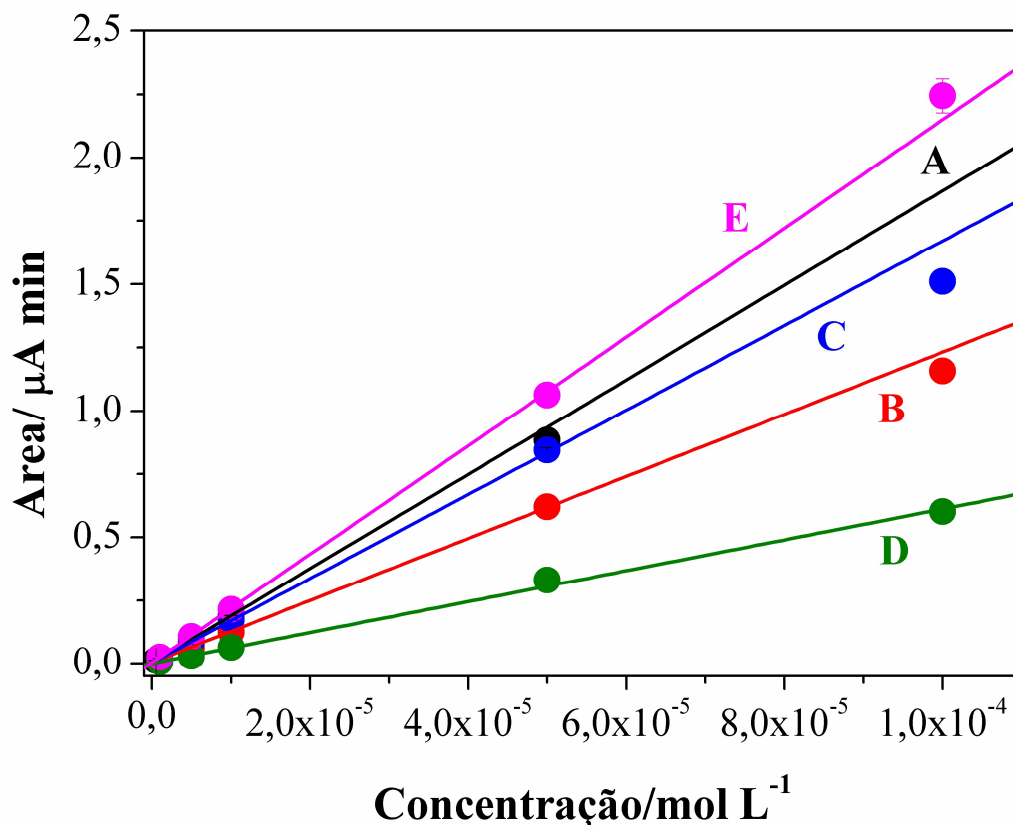


Figura 90 – Curvas analíticas para detecção dos aminoácidos lisina (A), alanina (B), glicina (C), leucina (D) e serina (E) utilizando o CuNPs-RGO/GCE. Condições experimentais como na Figura 89.

A repetibilidade expressa como porcentagem de RSD% de nove injeções cromatográficas sucessivas com uma concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, de cada analito resultou no RSD encontrado que variou de 0,80% para a lisina e 3,9% para a leucina para as nove medidas sucessivas realizadas, indicando excelente repetibilidade, Tabela 23.

A estabilidade do CuNPs-RGO/GCE foi investigada utilizando o método desenvolvido ao longo de um período de 24 h, empregando um único eletrodo modificado e soluções de aminoácidos $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os resultados mostraram que a resposta inicial pode ser mantida em $93 \pm 3,3$ após 24 h de detecção contínua, logo, o CuNPs-RGO/GCE possui boa estabilidade a longo prazo.

Tabela 23 – Desempenho analítico do CuNPs-RGO/GCE empregado como detector amperométrico na detecção dos aminoácidos (n= 3).^a

Analito	Faixa linear (mol L⁻¹)	Equação linear da regressão	LOD (mol L⁻¹)	Sensibilidade (nA mol⁻¹ L)	Coefficiente de correlação linear	RSD (%)
Lisina	5,0×10 ⁻⁷ a 5,0×10 ⁻⁵	y= 1,9×10 ⁷ x + 2,6	1,0×10 ⁻⁷	1,9×10 ⁷ ± 1,5×10 ⁵	0,9999	0,80
Alanina	1,0×10 ⁻⁶ a 1,0×10 ⁻⁴	y= 1,2×10 ⁷ x + 4,1	5,0×10 ⁻⁷	1,2×10 ⁷ ± 9,7×10 ⁴	0,9999	2,4
Glicina	1,0×10 ⁻⁶ a 1,0×10 ⁻⁴	y= 1,7×10 ⁷ x + 2,6	5,0×10 ⁻⁷	1,7×10 ⁷ ± 4,1×10 ⁵	0,9991	0,96
Leucina	5,0×10 ⁻⁶ a 1,0×10 ⁻⁴	y= 6,1×10 ⁶ x + 0,12	1,0×10 ⁻⁶	6,1×10 ⁶ ± 2,3×10 ⁵	0,9990	3,9
Serina	1,0×10 ⁻⁶ a 1,0×10 ⁻⁴	y= 2,1×10 ⁷ x + 3,3	5,0×10 ⁻⁷	2,1×10 ⁷ ± 3,3×10 ⁵	0,9997	3,0

^a Condições experimentais como na Figura 89.

6.3.7 Determinação de aminoácidos em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar

A aplicabilidade do CuNPs-RGO/GCE como detector amperométrico na cromatográfica iônica com PAD foi demonstrada através da quantificação de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar de uma usina de açúcar e álcool. O preparo da amostra foi realizado conforme o apresentado na *Seção 5.3.8* (Capítulo V). A amostra foi diluída com água ultrapura na proporção de 1:1000 para a determinação de alanina e 1:100 para quantificar lisina, glicina, leucina e serina, antes de ser injetada na coluna.

A identificação dos picos foi baseada no tempo de retenção específico dos analitos e foi confirmada pela adição de padrões dos analitos nas amostras diluídas. Cromatogramas representativos das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar são apresentados nas Figuras 91 e 92.

Os aminoácidos foram quantificados na amostra utilizando o método de adição de padrão. Três concentrações diferentes de soluções padrão dos aminoácidos foram adicionados à amostra. A análise foi efetuada em triplicata, e a curva de calibração foi obtida através da área do pico de cada aminoácido em função das concentrações adicionadas e relacionadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24.

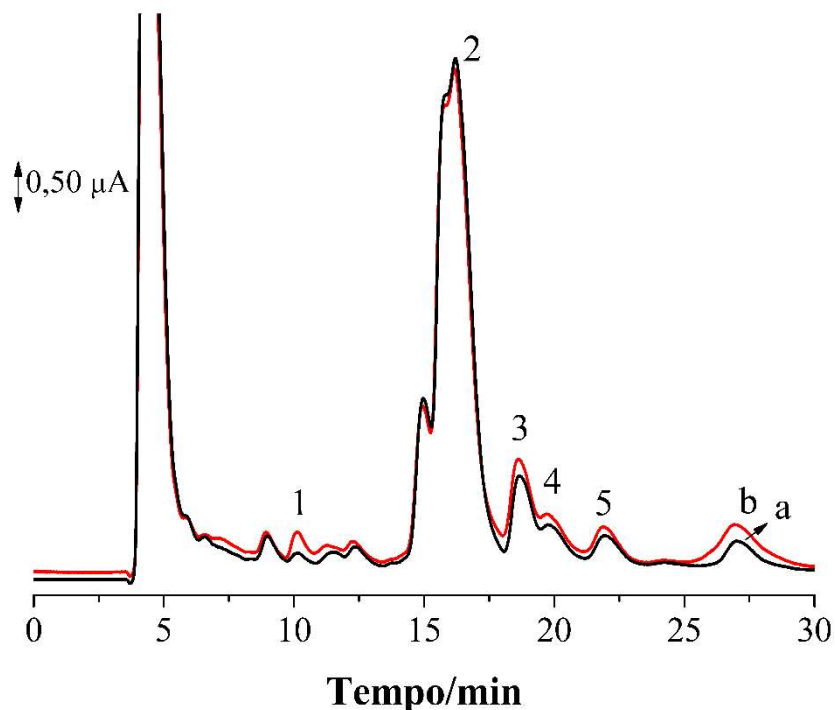


Figura 91 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:100 com água ultrapura (a) e padrões de aminoácidos $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (b). Picos: lisina (1), alanina (2), glicina (3), leucina (4) e serina (5). Condições experimentais como na Figura 89.

Através dos resultados obtidos, a amostra de vinhaça de cana-de-açúcar contém em sua composição lisina, alanina, glicina, leucina e serina. Os aminoácidos alanina e lisina foram encontrados em maior quantidade na amostra analisada em comparação com os aminoácidos glicina, leucina e serina. Os coeficientes de correlação (≥ 0.997) das curvas de calibração confirmam a ausência de produtos absorvidos que poderiam afetar o desempenho catalítico do NiNPs-RGO/GCE.

Tabela 24 – Teores de aminoácidos em vinhaça de cana-de-açúcar.

Analito	Determinado (mol L^{-1})	Recuperação (%)	RSD (n= 3)
Lisina ^a	$1,1 \times 10^{-5} \pm 3,5 \times 10^{-7}$	98 ± 4	3,7
Alanina ^b	$1,2 \times 10^{-5} \pm 2,1 \times 10^{-8}$	98 ± 4	4,3
Glicina ^a	$7,0 \times 10^{-6} \pm 8,8 \times 10^{-9}$	97 ± 3	3,0
Leucina ^a	$1,8 \times 10^{-6} \pm 6,7 \times 10^{-8}$	102 ± 5	4,5
Serina ^a	$5,6 \times 10^{-6} \pm 9,7 \times 10^{-8}$	102 ± 3	3,2

^a Condições experimentais como na Figura 91.

^b Condições experimentais como na Figura 92.

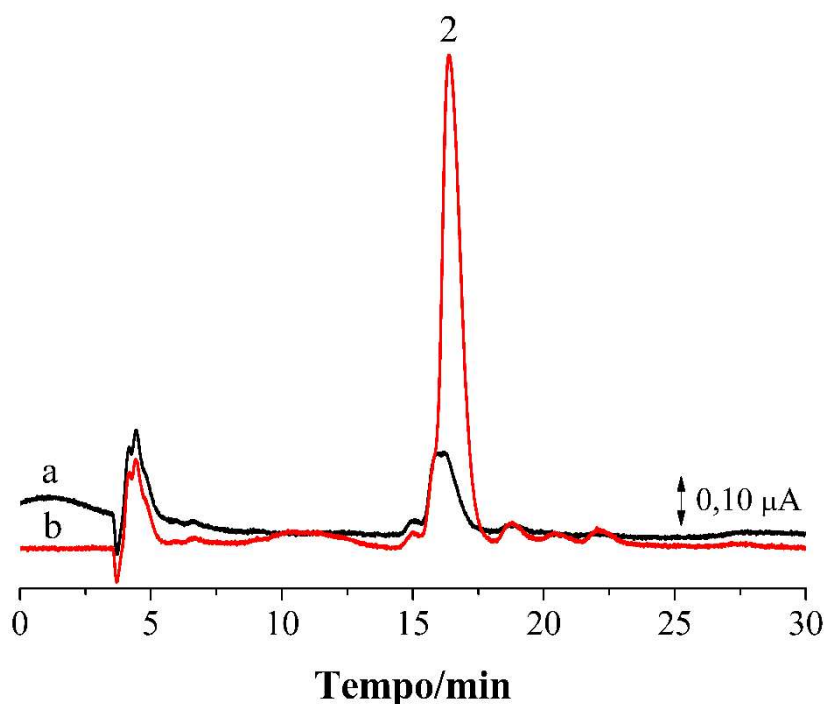


Figura 92 – Separação cromatográfica da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar diluída 1:1000 com água ultrapura (a) e padrão de alanina $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (b). Pico: alanina (1). Condições experimentais como na Figura 89.

As recuperações médias obtidas por três injeções cromatográficas de cada amostra enriquecida variam de 97% para glicina a 102% para leucina e serina, indicando a exatidão do método desenvolvido. A precisão foi estimada a partir do RSD, através dos experimentos cromatográficos realizados em triplicado das amostras enriquecidas com três níveis de concentrações e está compreendida entre 3,0% (glicina) e 4,5% (leucina). Os resultados indicam que o CuNPs-RGO/GCE pode ser utilizado como detector amperométrico para a determinação de aminoácidos.

6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Um detector amperométrico foi desenvolvido através da modificação de um eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido contendo nanopartículas de cobre a partir de um método eletroquímico. O eletrodo modificado apresentou elevada atividade eletrocatalítica para a oxidação dos aminoácidos estudados em meio alcalino. O eletrodo modificado foi aplicado com sucesso como detector amperométrico acoplado à cromatografia iônica para detecção de aminoácidos. O método descrito é simples de realizar, não envolve preparação complexa da amostra e é altamente eficiente para a separação e quantificação simultânea dos aminoácidos lisina, alanina, glicina, leucina e serina em amostra de vinhaça de cana-de-açúcar. O desempenho analítico do método foi demonstrado através da linearidade, sensibilidade, precisão, seletividade, especificidade em uma ampla faixa de concentração, e limites de detecção e quantificação. A análise de vinhaça de cana-de-açúcar demonstra a aplicabilidade do método em matriz complexa para a separação e determinação de aminoácidos.

CAPÍTULO VII. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 51 BALDWIN, R. P.; THOMSEN, K. N. Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection: a review. **Talanta**, v. 38, n. 1, p. 1-16, 1991.
- 52 NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, p. 666-669, 2004.
- 53 ZHOU, M.; ZHAI, Y.; DONG, S. Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 14, p. 5603-5613, 2009.
- 54 ROCHEFORT, A.; WUEST, J. D. Interaction of substituted aromatic compounds with graphene. **Langmuir**, v. 25, n. 1, p. 210-215, 2009.
- 55 LU, J. et al. Nanometal-decorated exfoliated graphite nanoplatelet based glucose biosensors with high sensitivity and fast response. **ACS Nano**, v. 2, n. 9, p. 1825-1832, 2008.
- 56 CHENG, Q. et al. Electrochemical tuning the activity of nickel nanoparticle and application in sensitive detection of chemical oxygen demand. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 46, p. 22845-22850, 2011.
- 57 WELCH, C. M.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 601-619, 2006.
- 58 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241-259, 2010.
- 59 MOHANTY, U. S. Electrodeposition: a versatile and inexpensive tool for the synthesis of nanoparticles, nanorods, nanowires, and nanoclusters of metals. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 41, n. 3, p. 257-270, 2011.
- 60 BABAEI, A. et al. Simultaneous determination of tryptophan, uric acid and ascorbic acid at iron(III) doped zeolite modified carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 226-232, 2008.
- 61 SHAHROKHIAN, S.; FOTOUHI, L. Carbon paste electrode incorporating multi-walled carbon nanotube/cobalt salophen for sensitive voltammetric determination of tryptophan. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 123, n. 2, p. 942-949, 2007.
- 62 DONG, S. et al. Electrochemical behaviors of amino acids at multiwall carbon nanotubes and Cu₂O modified carbon paste electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 381, n. 2, p. 199-204, 2008.
- 63 LUQUE, G. L.; FERREYRA, N. F.; RIVAS, G. A. Electrochemical sensor for amino acids and albumin based on composites containing carbon nanotubes and copper microparticles. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1282-1287, 2007.
- 64 SAFAVI, A.; MOMENI, S. Electrocatalytic oxidation of tryptophan at gold nanoparticle-modified carbon ionic liquid electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 23, p. 2848-2855, 2010.

- 65 CASELLA, I. G.; GATTA, M. Anodic electrodeposition of copper/oxidehydroxide films by alkaline solutions containing cuprous cyanide ions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 494, n. 1, p. 12-20, 2000.
- 66 ROUSHANI, M.; SHAMSIPUR, M.; POURMORTAZAVI, S. M. Amperometric detection of glycine, L-serine, and L-alanine using glassy carbon electrode modified by NiO nanoparticles. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1005-1011, 2012.
- 67 REZAEI, B.; ZARE, Z. M. Modified glassy carbon electrode with multiwall carbon nanotubes as a voltammetric sensor for determination of leucine in biological and pharmaceutical samples. **Analytical Letters**, v. 41, n. 12, p. 2267-2286, 2008.
- 68 FAN, Y. et al. Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 1/2, p. 241-247, 2011.
- 69 LIU, J. et al. Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 859, p. 1-19, 2015.
- 70 MAO, Y. et al. Electrochemical sensor for dopamine based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite recognition element. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, p. 291-297, 2011.
- 71 LIAN, W. et al. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 38, n. 1, p. 163-169, 2012.
- 72 SILVA, H. et al. MIP-graphene-modified glassy carbon electrode for the determination of trimethoprim. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, p. 56-61, 2014.
- 73 XU, J.; WANG, Y.; HU, S. Nanocomposites of graphene and graphene oxides: synthesis, molecular functionalization and application in electrochemical sensors and biosensors. A review. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 1, p. 1-44, 2017.
- 74 KONG, L. et al. Molecularly imprinted sensor based on electropolymerized poly (o-phenylenediamine) membranes at reduced graphene oxide modified electrode for imidacloprid determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 185, p. 424-431, 2013.
- 75 SALAVAGIONE, H. J. et al. Chemical sensors based on polymer composites with carbon nanotubes and graphene: the role of the polymer. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 35, p. 14289-14328, 2014.
- 76 FITZER, E. et al. Recommended terminology for the description of carbon as a solid. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 473-506, 1995.
- 77 LIU, C. et al. Direct electrodeposition of graphene enabling the one-step synthesis of graphene-metal nanocomposite films. **Small**, v. 7, n. 9, p. 1203-1206, 2011.

- 78 CUI, F.; ZHANG, X. A method based on electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode for sensitive detection of theophylline. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, p. 167-173, 2013.
- 79 LIN, X.; NI, Y.; KOKOT, S. A novel electrochemical sensor for the analysis of β -agonists: the poly(acid chrome blue K)/graphene oxide-nafion/glassy carbon electrode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 508-517, 2013.
- 80 ZENG, Y. et al. A novel composite of SiO₂-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 45, n. 1, p. 25-33, 2013.
- 81 YANG, Y. et al. Sensitive and selective electrochemical determination of quinoxaline-2-carboxylic acid based on bilayer of novel poly(pyrrole) functional composite using one-step electro-polymerization and molecularly imprinted poly(o-phenylenediamine). **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 136-143, 2014.
- 82 HILDER, M. et al. Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, p. 9187-9193, 2011.
- 83 AMBROSI, A. et al. Electrochemistry of graphene and related materials. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 14, p. 7150-7188, 2014.
- 84 LUO, J. et al. Facile one-step electrochemical fabrication of a non-enzymatic glucose-selective glassy carbon electrode modified with copper nanoparticles and graphene. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3/4, p. 485-490, 2012.
- 85 ZHANG, Y. et al. Electrochemical deposition of nickel nanoparticles on reduced graphene oxide film for nonenzymatic glucose sensing. **Electroanalysis**, v. 25, n. 4, p. 959-966, 2013.
- 86 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- 87 VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- 88 ZHANG, X. et al. Electrochemical reduction of graphene oxide films: preparation, characterization and their electrochemical properties. **Chinese Science Bulletin**, v. 57, n. 23, p. 3045-3050, 2012.
- 89 VILIAN, A. T. E. et al. An electrocatalytic oxidation and voltammetric method using a chemically reduced graphene oxide film for the determination of caffeic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 423, p. 33-40, 2014.
- 90 MARINGA, A. et al. Characterization and electrocatalytic behaviour of glassy carbon electrode modified with nickel nanoparticles towards amitrole detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 700, p. 86-92, 2013.
- 91 LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, 1979.

- 92 KANG, X. et al. A sensitive nonenzymatic glucose sensor in alkaline media with a copper nanocluster/multiwall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 143-150, 2007.
- 93 LUO, J. et al. A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 709, p. 47-53, 2012.
- 94 CASERO, E. et al. Differentiation between graphene oxide and reduced graphene by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). **Electrochemistry Communications**, v. 20, p. 63-66, 2012.
- 95 JAIN, R. et al. A polyaniline/graphene oxide nanocomposite as a voltammetric sensor for electroanalytical detection of clonazepam. **Analytical Methods**, v. 8, n. 15, p. 3034-3045, 2016.
- 96 GUAN, H. et al. Polyaniline nanofibers obtained by interfacial polymerization for high-rate supercapacitors. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 964-968, 2010.
- 97 LI, H. et al. Theoretical and experimental specific capacitance of polyaniline in sulfuric acid. **Journal of Power Sources**, v. 190, n. 2, p. 578-586, 2009.
- 98 SABATANI, E. et al. Organized self-assembling monolayers on electrodes: part I. Octadecyl derivatives on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 219, n. 1/2, p. 365-371, 1987.
- 99 LEE, J. W. et al. Non-aqueous approach to the preparation of reduced graphene oxide/ α -Ni(OH)₂ hybrid composites and their high capacitance behavior. **Chemical Communications**, v. 47, n. 22, p. 6305-6307, 2011.
- 100 SILWANA, B.; VAN DER HORST, C.; IWUOHA, E. Synthesis, characterisation and electrochemical evaluation of reduced graphene oxide modified antimony nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 592, p. 124-134, 2015.
- 101 ZHANG, L.-R. et al. Preparation of graphene supported nickel nanoparticles and their application to methanol electrooxidation in alkaline medium. **New Journal of Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 1108-1113, 2012.
- 102 MAJDI, S. et al. Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel-curcumin complex modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 14, p. 4622-4629, 2007.
- 103 SONG, Y. H. et al. Architecture of Fe₃O₄-graphene oxide nanocomposite and its application as a platform for amino acid biosensing. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 58-65, 2012.
- 104 SONG, Y. et al. Electrochemical and electrocatalytic properties of cobalt nanoparticles deposited on graphene modified glassy carbon electrode: application to some amino acids detection. **Electrochimica Acta**, v. 58, n. 1, p. 757-763, 2011.

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

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

119 FAN, Y. et al. Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 241-247, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

156 PEI, J.; LI, X. Determination of underivatized amino acids by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection at an amino acid oxidase immobilized CuPtCl₆ modified electrode. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 367, n. 8, p. 707-713, 2000.

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

- 158 PETRITIS, K.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. **Journal of Chromatography A**, v. 961, p. 9-21, 2002.
- 159 COX, J. A.; DABEK-ZLOTORZYNSKA, E. High-performance liquid chromatography of sulfur- containing amino acids and related compounds with amperometric detection at a modified electrode. **Journal of Chromatography**, v. 543, p. 226-232, 1991.
- 160 STULÍK, K. et al. Amperometric flow detection with a copper working electrode-response mechanism and application to various compounds. **Talanta**, v. 35, n. 6, p. 455-460, 1988.
- 161 KAFIL, J. B.; HUBER, C. O. A nickel oxide amperometric detector in the chromatographic separation of amino acids. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, p. 275-280, 1985.
- 162 SILVA, J. L. et al. Determination of amino acids in sugarcane vinasse by ion chromatographic using nickel nanoparticles on reduced graphene oxide modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 374-382, 2017.
- 163 BARBERO, C.; PLANES, G. A.; MIRAS, M. C. Redox coupled ion exchange in cobalt oxide films. **Electrochemistry Communications**, v. 3, n. 3, p. 113-116, 2001.
- 164 LE, W. Z.; LIU, Y. Q. Preparation of nano-copper oxide modified glassy carbon electrode by a novel film plating/potential cycling method and its characterization. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 141, n. 1, p. 147-153, 2009.
- 165 CHUSUEI, C. C.; BROOKSHIER, M. A.; GOODMAN, D. W. Correlation of relative X-ray photoelectron spectroscopy shake-up intensity with CuO particle size. **Langmuir**, v. 15, n. 8, p. 2806-2808, 1999.
- 166 NISHINO, F. et al. Formation of CuO nano-flowered surfaces via submerged photo-synthesis of crystallites and their antimicrobial activity. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. doi:10.1038/s41598-017-01194-5.
- 167 ALVES, D. C. B. et al. Copper nanoparticles stabilized by reduced graphene oxide for CO₂ reduction reaction. **Materials for Renewable and Sustainable Energy**, v. 4, n. 2, 2015. doi:10.1007/s40243-015-0042-0.
- 168 LI, Y.-F. et al. As-grown graphene/copper nanoparticles hybrid nanostructures for enhanced intensity and stability of surface plasmon resonance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. doi:10.1038/srep37190.
- 169 CHEN, A. et al. Controlled growth and characteristics of single-phase Cu₂O and CuO films by pulsed laser deposition. **Vacuum**, v. 83, n. 6, p. 927-930, 2009.
- 170 PENDASHTEH, A.; MOUSAVI, M. F.; RAHMANIFAR, M. S. Fabrication of anchored copper oxide nanoparticles on graphene oxide nanosheets via an electrostatic coprecipitation and its application as supercapacitor. **Electrochimica Acta**, v. 88, p. 347-357, 2013.

171 KO, J. W. et al. Synthesis of graphene-wrapped CuO hybrid materials by CO₂ mineralization. **Green Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 2391-2394, 2012.

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

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

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