



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUIZA HELENA PONTES DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES
MÚLTIPLAS E ALUMINA PARA A DETERMINAÇÃO DE CLOREXIDINA**

UBERLÂNDIA

2019

LUIZA HELENA PONTES DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES
MÚLTIPLAS E ALUMINA PARA A DETERMINAÇÃO DE CLOREXIDINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz

Coorientadora: Ana Paula de Lima

UBERLÂNDIA

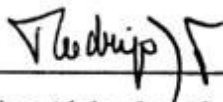
LUIZA HELENA PONTES DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES
MÚLTIPLAS E ALUMINA PARA A DETERMINAÇÃO DE CLOREXIDINA**

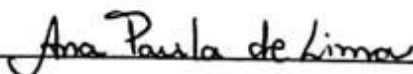
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

Uberlândia, 11 de Julho de 2019.

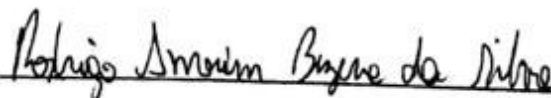
Banca examinadora:



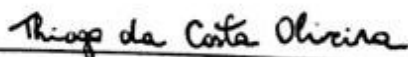
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Orientador - UFU)



Doutoranda Ana Paula de Lima
(Coorientadora - UFU)



Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva
(Examinador - UFU)



Doutorando Thiago da Costa Oliveira
(Examinador - UFU)

RESUMO

Este trabalho apresenta a investigação de eletrodos modificados para a determinação eletroquímica de clorexidina, substância ativa em anti-sépticos comumente usado. Para tal, o eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) de diferentes tamanhos e com alumina foram escolhidos e os resultados comparados com eletrodo não modificado. A voltametria cíclica foi empregada para investigação inicial dos processos eletroquímicos e verificou-se que os eletrodos modificados de forma geral aumentam o sinal de corrente do processo de oxidação da clorexidina. A detecção amperométrica foi acoplada ao sistema de análise por injeção em batelada (BIA) para avaliação da determinação amperométrica da clorexidina. Observou-se que os eletrodos modificados reduziram os efeitos de adsorção do analito, ampliaram a faixa linear de trabalho e diminuíram os limites de detecção em relação ao eletrodo limpo. De forma geral, os resultados mais satisfatórios em relação às características analíticas do método foram obtidos com o eletrodo modificado com MWCNT de menor tamanho e não funcionalizados, porém, os resultados com o eletrodo modificado com alumina, material de baixo custo pouco usado para este fim, também foram satisfatórios.

Palavras-chave: Clorexidina, eletrodo de carbono vítreo, nanotubos de carbono, voltametria, amperometria, análise por injeção em batelada.

ABSTRACT

This work presents the investigation of modified electrodes for the electrochemical determination of chlorhexidine, an active substance in commonly used antiseptics. For this, the modified carbon glassy electrode modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) of different sizes and with alumina were chosen and the results compared with unmodified electrode. Cyclic voltammetry was used for initial investigation of the electrochemical processes and it was found that modified electrodes, in general, increase the current signal of the oxidation process of chlorhexidine. The amperometric detection was coupled to the batch injection system (BIA) to evaluate the amperometric determination of chlorhexidine. It was observed that the modified electrodes reduce the adsorption effects of the analyte, extended the linear range, and decrease detection limits in relation to the clean electrode. In general, the most satisfactory results regarding the analytical characteristics of the method were obtained with the modified MWCNT electrode of smaller size and not functionalized; however, the results with the electrode modified with alumina, a low-cost material not commonly used for this purpose, were also satisfactory.

Keywords: Chlorhexidine, vitreous carbon electrode, carbon nanotubes, voltammetry, amperometry, batch injection analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da clorexidina	13
Figura 2 - Aplicação do potencial para voltametria cíclica.	14
Figura 3 - (A) Perturbação aplicada e (B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.	15
Figura 4 - Diagrama esquemático de uma célula BIA com os três eletrodos.	16
Figura 5 - Etapas de operação de um sistema BIA com detecção amperométrica antes e após a injeção do analito: (A) Antes da injeção; (B) Transporte; (C) Fim da injeção; (D) Dispersão e (E) Equilíbrio final.	17
Figura 6 - Representação: (A) SWCNT e (B) MWCNT.	19
Figura 7 - (A) Imagem da célula BIA com os três eletrodos e (B) Pipeta eletrônica posicionada na célula BIA conforme foi utilizada para as medidas eletroquímicas.	25
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos através da adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de CHX; Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de HClO ₄ ; Faixa de potencial: 0 a 1,5 V; Velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	27
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos através da adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de CHX; Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de HClO ₄ ; Faixa de potencial: 0 a 1,5 V; Velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	28
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos através da adição de 1,0 mmol L ⁻¹ de CHX; Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de HClO ₄ ; Faixa de potencial: 0 a 1,5 V; Velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	29
Figura 11 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos variando o potencial de 0,5 a 1,53 V, para injeções de solução de CHX 50 µmol L ⁻¹ (n=3); Eletrólito suporte: 0,1 mol L ⁻¹ de	

HClO₄; Volume injetado: 100 µL e velocidade de injeção 277 µL s⁻¹ (A) ■ GCE Limpo e ● GCE/Alumina; (B) ■ GCE/LD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/LD-MWCNT não funcionalizado; (C) ■ GCE/SD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/SD-MWCNT não funcionalizado. 30

Figura 12 - Estudo da velocidade de injeção através do sistema BIA (16,5 a 370 µL s⁻¹) para injeções de solução de CHX 50 µmol L⁻¹ (n=3); Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄; Volume injetado: 100 µL (A) ■ GCE/Alumina e ● GCE Limpo; Potencial aplicado: 1,43 V (B) ■ GCE/LD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/LD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,43 V; (C) ■ GCE/SD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/SD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,40 V. 31

Figura 13 - Estudo do volume de injeção através do sistema BIA (10 a 200 µL) para injeções de solução de CHX 50 µmol L⁻¹ (n=3); Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄; Velocidade de injeção: 277 µL s⁻¹ (A) ■ GCE/Alumina e ● GCE Limpo; Potencial aplicado: 1,43 V (B) ■ GCE/LD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/LD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,43 V; (C) ■ GCE/SD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/SD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,40 V. 33

Figura 14 - Estudo da repetibilidade para injeções de uma solução contendo 50 µmol L⁻¹ de CHX; Volume injetado: 70 µL; Velocidade 277µL s⁻¹; Potencial aplicado: 1,43 V; Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄. (A) GCE / Alumina e (B) GCE Limpo. 34

Figura 15 - Estudo da repetibilidade para injeções de uma solução contendo 50 µmol L⁻¹ de CHX; Volume injetado: 100 µL; Velocidade: 277 µL s⁻¹; Potencial aplicado: 1,43 V; Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄. (A) GCE/LD-MWCNT funcionalizado e (B) GCE/LD-MWCNT não funcionalizado. 35

Figura 16 - Estudo da repetibilidade para injeções de uma solução contendo 50 µmol L⁻¹ de CHX; Volume injetado:100 µL; Velocidade 277µL s⁻¹; Potencial aplicado: 1,40 V; Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄. (A) GCE/SD-MWCNT funcionalizado e (B) GCE/SD-MWCNT não funcionalizado. 35

Figura 17 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE Limpo para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3- 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 70 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V. 36

Figura 18 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/Alumina para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 e 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 70 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V. 37

Figura 19 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/LD-MWCNT funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V. 37

Figura 20 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/LD-MWCNT não funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V. 38

Figura 21 - (A) Estudo da faixa linear em GCE/SD-MWCNT funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3 - 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,40 V. 38

Figura 22 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/SD-MWCNT não funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350, 500, 700, 900 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3–350 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,40 V. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados no trabalho e empresas onde foram adquiridos. 23

Tabela 2 - Características referentes à análise das faixas lineares para a CHX no sistema BIA, obtidos no GCE e suas modificações. 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIA – “ Batch-Injection Analysis” – Análise por injeção em batelada

CHX – Clorexidina

CNT – Nanotubos de carbono

DMF – Dimetilformamida

EQM – Eletrodo quimicamente modificado

GCE – Eletrodo de carbono vítreo

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LD – Limite de detecção

LD-MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas – maior diâmetro

LQ – Limite de quantificação

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

SD-MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas – menor diâmetro

SWCNT – Nanotubos de carbono de paredes simples

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Analito estudado	12
1.2	Técnicas eletroanalíticas	13
1.2.1	Voltametria cíclica	14
1.2.2	Amperometria	15
1.3	Análise por Injeção em Batelada	16
1.4	Eletrodos quimicamente modificados	18
1.4.1	Eletrodo de carbono vítreo	18
1.4.2	Nanotubos de carbono	19
1.4.2.1	Funcionalização dos nanotubos de carbono	20
1.4.3	Alumina	20
2	OBJETIVO	22
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1	Reagentes e soluções	23
3.2	Preparação dos eletrodos	24
3.2.1	Modificação com MWCNT	24
3.2.2	Modificação com alumina	24
3.3	Instrumentação	24
3.4	Análise eletroquímica	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Voltamogramas cíclicos comparativos da CHX	27
4.2	Estudo hidrodinâmico comparativo para GCE modificado com MWCNT e Alumina	29
4.3	Estudo da velocidade e volume de injeção	31
4.4	Repetibilidade	34
4.5	Linearidade	36
5	CONCLUSÃO	42
6	REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

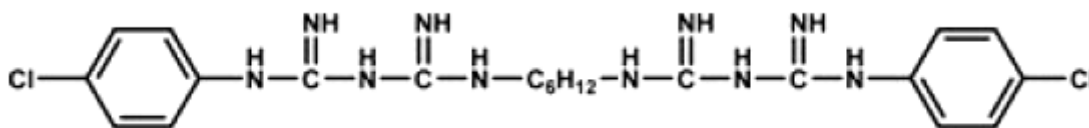
Há alguns anos, ocorreu um avanço na descoberta, síntese e análise de compostos farmacêuticos utilizados para diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças. Análises que requerem pequenas quantidades de amostras são frequentemente solicitadas e os métodos de determinação devem ter baixos limites de detecção. Assim, as técnicas eletroanalíticas podem resolver facilmente muitos problemas de interesse farmacêutico, pois são técnicas poderosas e versáteis, oferecendo análises rápidas, alta sensibilidade, exatidão e precisão, uma ampla faixa linear, através de instrumentação de custo relativamente baixo (USLU; OZKAN, 2011).

Análises por injeção em batelada (BIA) têm sido bastante utilizadas pois permitem o acoplamento a detectores voltamétricos e amperométricos (BRETT, C; BRETT, A; MITOSERIU, 1994). A voltametria consiste na variação de um potencial de forma constante com uma variação de tempo no eletrodo de trabalho, resultando em reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas presentes em solução, enquanto que um detector amperométrico mede a corrente com um potencial fixo aplicado (BRETT, C; BRETT, A, 1993). No eletrodo de trabalho é que ocorre as reações de interesse. Nas técnicas voltamétricas, eletrodos sólidos ou de mercúrio são utilizados como eletrodo de trabalho, mas os materiais que compõe os eletrodos sólidos são mecanicamente estáveis e fornecem uma ampla faixa na região anódica. A modificação desses eletrodos sólidos tornou-se muito comum e com uma vasta aplicação no controle de qualidade nas indústrias de alimentos, na determinação de fármacos e no monitoramento ambiental (USLU; OZKAN, 2011).

1.1 Analito estudado

A clorexidina (CHX) 1,1-bis hexametileno (5-p-Clorofenilbiguanida) (Figura 1) é uma bisguanida constituída por duas cadeias de cloroguanida ligadas a uma cadeia de hexametileno. A CHX é uma base forte e insolúvel em água, porém na presença de ácido glucônico ou acético formam sais de digluconato ou diacetato solúveis em água (LIM; KAM, 2008). A CHX e seus sais possuem ação antisséptica e são utilizados em produtos como soluções para lentes de contato, enxaguante bucal, cremes dentais, desinfetantes de pele (LIMA et al., 2014).

Figura 1 - Fórmula estrutural da clorexidina.



Fonte: Zong e Kirsch (2012).

A CHX também é utilizada em tratamento odontológico como gengivite e periodontite, prevenção de cáries e no tratamento endodôntico, sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (KARPÍŃSKI; SZKARADKIEWICZ, 2015).

Um estudo mostrou que a CHX sofre degradação hidrolítica e o seu principal produto de degradação é a 4-cloroanilina, que é hematotóxico e carcinogênico (ZONG; KIRSCH, 2012). Portanto, é de extrema importância o controle analítico da CHX, principalmente em soluções de enxágue bucal para indicar se os processos de degradação tiveram início através do consumo da CHX (LIMA et al., 2014).

As técnicas eletroanalíticas para a determinação da CHX são bastante vantajosas frente a outros métodos analíticos como cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês HPLC) (HAVLÍKOVÁ et al., 2007; BELOW; LEHAN; KRAMER, 2004), eletroforese capilar (ABAD-VILLAR et al., 2006) e espectrofotometria (ABDELRAHMAN et al., 2016), pois alguns desses métodos exigem equipamentos e reagentes de alto custo, requerem bastante tempo e muitas vezes necessitam de etapa de derivatização pré ou pós coluna. Os métodos eletroanalíticos fornecem uma resposta mais rápida e algumas vezes com melhor sensibilidade do que os métodos usando HPLC (STEFANO et al., 2012).

1.2 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas fornecem limites de detecção baixos e uma grande quantidade de informações úteis para identificar e descrever determinados sistemas. Essas informações incluem a estequiometria e a velocidade de transferência de carga, a velocidade de transferência de massa, a extensão de adsorção e quimissorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As vantagens das técnicas eletroanalíticas comparadas a outras técnicas são que as medidas eletroquímicas são frequentemente específicas para um estado de oxidação particular

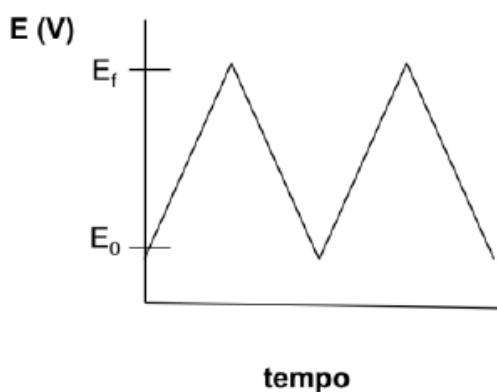
de um elemento. Além disso, possui instrumentação simples e de baixo custo, sendo possível a análise diretamente na amostra sem necessidade de pré-tratamento ou separação, o que é analiticamente favorável (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; GALLI et al., 2006).

1.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma das técnicas utilizadas nesse trabalho, para que se possa obter informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. É uma técnica eficiente e dificilmente utilizada para determinações quantitativas, mas bastante empregada para fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (PACHECO et al., 2013; KOUNAVES, 1997).

Na voltametria cíclica, a varredura de potencial é feita em uma direção e depois na outra enquanto a corrente é medida, podendo empregar um ciclo inteiro, parcial ou vários ciclos (SKOOG et al., 2008). Quando o potencial elétrico é aplicado no eletrodo de trabalho, forma uma onda triangular representado na Figura 2. A medida que o potencial aumenta em regiões mais negativas (catódica), a corrente diminui e ocorre a redução do composto, formando um pico de corrente proporcional a concentração desse composto. Quando o potencial atinge um valor em que não há reação de redução, o potencial é varrido na direção inversa e o produto próximo ao eletrodo é oxidado, dando origem a um pico equivalente a região anódica (HARRIS, 2008; PACHECO et al., 2013). O gráfico da corrente em função do potencial é denominado voltamograma (HARRIS, 2008).

Figura 2- Aplicação do potencial para voltametria cíclica.

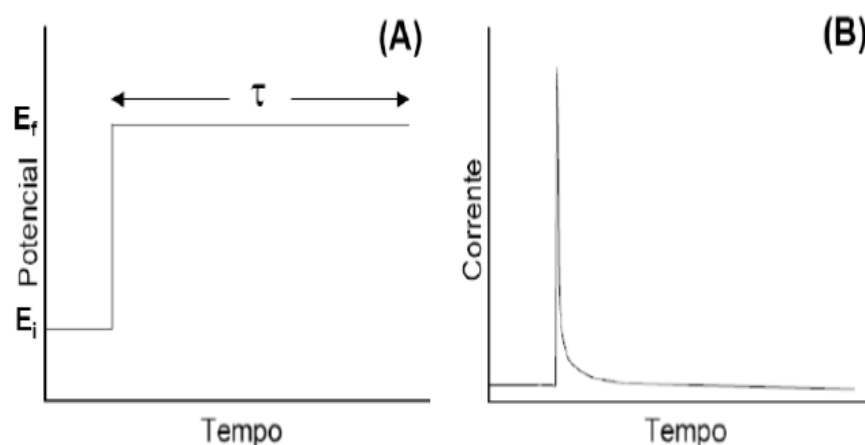


Fonte: Pacheco et al. (2013).

1.2.2 Amperometria

A amperometria é uma técnica na qual ocorre a medida da corrente sob a aplicação de um potencial constante. Nessa técnica, a corrente medida é proporcional concentração do analito (SKOOG et al., 2008; HARRIS, 2008). A amperometria consiste na aplicação de um único degrau de potencial, como pode ser visto na Figura 3-A, originando uma corrente que rapidamente decai com o tempo (Figura 3-B) (QUINTINO, 2003).

Figura 3 - (A) Perturbação aplicada e (B) resposta de corrente para um experimento de degrau único de potencial.



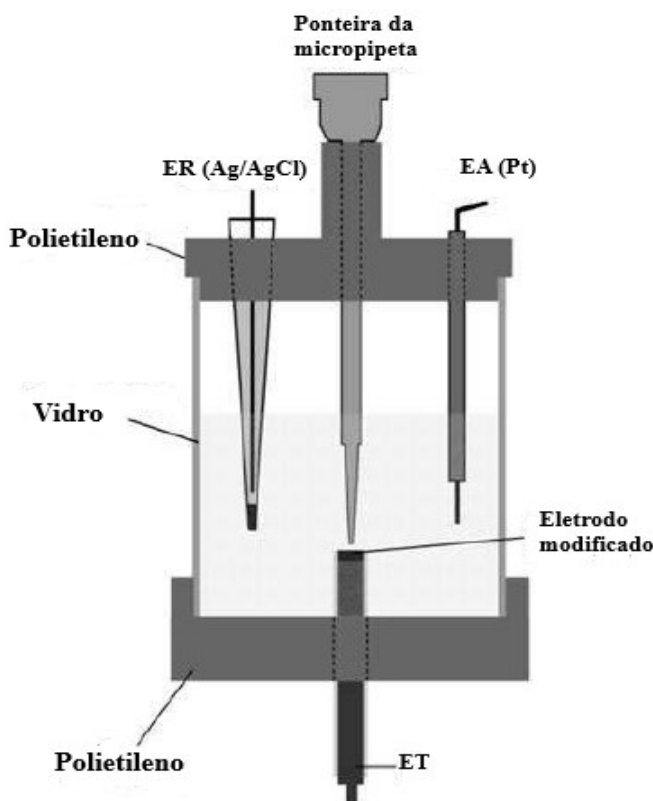
Fonte: Quintino (2003).

A amperometria é uma técnica quantitativa, fornece excelentes limites de detecção, boa faixa linear e boa reprodutibilidade sob condições controladas (HANSON; PAPPAS; HOLLAND, 2005). A amperometria, também pode ser utilizada em eletroanálise e suas aplicações envolve titulações amperométricas, sensores amperométricos e medições em fluxo. Essa técnica se torna mais atrativa em eletroanalítica quando associada a métodos de análise com alta velocidade, como o sistema BIA (QUINTINO, 2003).

1.3 Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Na química analítica, o desenvolvimento de sistemas automatizados, rápidos e precisos tem se tornado essencial. Uma alternativa para a realização de análises rápidas associadas à detecção amperométrica é o sistema BIA, técnica introduzida por Wang e Taha em, 1991 (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Figura 4 - Diagrama esquemático de uma célula BIA com os três eletrodos.

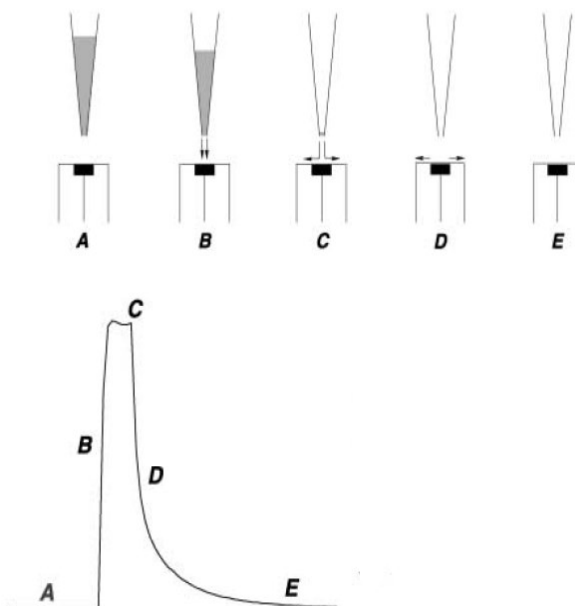


Fonte: Adaptada de Silva et al. (2012).

Esta técnica, consiste na inserção de uma alíquota de amostra que é injetada na célula, através de uma micropipeta diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, imerso em um grande volume de eletrólito suporte. O eletrodo registra uma resposta em forma de pico transiente, que é correspondente ao processo redox que ocorre durante a passagem da amostra pela superfície. Logo em seguida, há uma queda de sinal até a linha base e a magnitude da resposta reflete a concentração do analito injetado (WANG; TAHA, 1991; QUINTINO; ANGNES, 2004).

Na figura 5 são apresentadas as etapas para a aquisição do sinal amperométrico após injeção no sistema BIA.

Figura 5 - Etapas de operação de um sistema BIA com detecção amperométrica antes e após a injeção do analito: (A) Antes da injeção; (B) Transporte; (C) Fim da injeção; (D) Dispersão e (E) Equilíbrio final.



Fonte: Quintino e Angnes (2004).

Pela Figura 5, observa-se que antes da injeção (Figura 5-A), há uma corrente constante referente ao eletrólito suporte. Nessa etapa, não há transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. Quando a amostra é injetada (Figura 5-B), ocorre um aumento acentuado da corrente, devido ao processo redox do analito que está sendo transportado até a superfície do eletrodo. No final da injeção (Figura 5-C), a corrente atinge um valor máximo e após o fim da injeção (Figura 5-D), tem-se uma queda repentina na corrente, resultante da mudança do transporte mecânico gerado pela micropipeta, para o transporte de massa por difusão. Nesta etapa, o analito começa a ser diluído pelo eletrólito suporte através do processo de difusão, até que as condições iniciais do equilíbrio existente sejam restabelecidas (Figura 5-E) (MONTES, 2015).

A técnica BIA, apresenta características como: análises rápidas, sensibilidade, reprodutibilidade e simplicidade (WANG; TAHA, 1991).

1.4 Eletrodos quimicamente modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM), foi introduzido na década de 70 (MOSES; WIER; MURRAY, 1975), para denominar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos, que tem como objetivo principal pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química na interface eletrodo/solução. Na química analítica, a grande parte das aplicações envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

As características mais importantes para o desenvolvimento de sensores são: sensibilidade, seletividade, estabilidade, precisão, facilidade de uso, baixo custo, fornecer resposta rápida e robustez. O desenvolvimento de variados sensores é devido à crescente demanda nas áreas da medicina, industrial e ambiental (NASCIMENTO; ANGNES, 1998).

No preparo de um EQM é muito importante a escolha do material para o eletrodo base, sendo que este material deve apresentar características eletroquímicas adequadas e ser apropriado para o método de imobilização desejado. Entre os materiais convencionais mais empregados, podemos citar: ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio, fibras de carbono e pasta de carbono (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

Os métodos mais utilizados para a introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base, destacam-se: adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou materiais compósitos. Devido a simplicidade e eficiência, a técnica de adsorção é muito empregada, porém a desvantagem está em produzir EQMs com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado limitando a faixa de resposta linear (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

1.4.1 Eletrodo de carbono vítreo

Nos estudos eletroanalíticos, uma boa detecção depende das características materiais, como as propriedades químicas e físicas das superfícies dos eletrodos, os efeitos do potencial aplicado, adsorção e os revestimentos aplicados a superfície do eletrodo. Os eletrodos de carbono, possuem uma estabilidade a longo prazo e uma faixa de potencial mais ampla se comparados com eletrodos metálicos, podendo ser usados de forma satisfatória na determinação de compostos farmacêuticos (USLU; OZKAN, 2007).

O eletrodo de carbono vítreo (GCE) é comumente empregado devido suas propriedades mecânicas e elétricas excelentes, ampla faixa de potencial, quimicamente inerte,

pode ser facilmente polido, compatível com a maioria dos eletrólitos e soluções, e possui desempenho relativamente reprodutível (USLU; OZKAN, 2007).

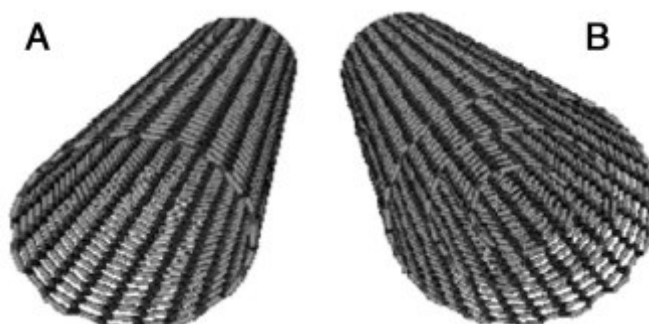
Para um melhor desempenho analítico, deve-se renovar e ativar a superfície do GCE frequentemente durante o uso. Essa renovação pode ser realizada através do polimento da superfície com um material abrasivo, como alumina ou óxido de silício, para minimizar fontes de contaminação (FAGAN; HU; KUWANA, 1985).

1.4.2 Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (CNTs) descobertos por Ijima (1991), são destacados como um importante nanomaterial para a geração de sensores e biossensores eletroquímicos. Os CNTs possuem elevada condutividade, resistência mecânica e estabilidade química (MONTES, 2015).

Grande parte das propriedades físicas dos CNTs é derivada do grafeno. Os CNTs são formados por átomos de carbono arranjados em forma hexagonal com hibridização sp^2 , organizados em formatos cilíndricos de diâmetro na ordem de nanômetro e comprimento na ordem de micrômetro (EATEMADI et al., 2014; TISIS et al., 2006). Existem dois tipos de CNTs, os nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs) que consistem em uma única folha de grafeno enrolada formando um tubo cilíndrico e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) que consistem em dois ou mais tubos concêntricos de grafeno enrolados no próprio eixo (BAUGHMAN; ZAKHIDOV; HEER, 2002).

Figura 6 – Representação: (A) SWCNT e (B) MWCNT.



Fonte: Eatemadi et al. (2014).

Apesar da semelhança estrutural em relação a uma única folha de grafeno, os SWCNTs podem ser condutores ou semicondutores dependendo da direção da folha de

grafeno sobre a qual é enrolado para formar o nanotubo. As propriedades eletrônicas dos MWCNTs são muito semelhantes às dos SWCNTs, pois a ligação entre os cilindros é fraca (BAUGHMAN; ZAKHIDOV; HEER, 2002).

1.4.2.1 Funcionalização dos nanotubos de carbono

A funcionalização dos CNTs tem sido aplicada com sucesso por vários grupos de pesquisa para nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) (SUN et al., 2002). Como os CNTs são difíceis de dispersar e dissolver em água e em solventes orgânicos a funcionalização foi uma estratégia para superar essas barreiras, pois a funcionalização pode melhorar a solubilidade e a processabilidade, e permite a combinação das propriedades únicas dos CNTs com outros tipos de materiais. Um nanotubo funcionalizado pode ter propriedades mecânicas ou elétricas diferentes dos nanotubos não funcionalizados (HIRSCH; VOSTROWSKY, 2005).

Com relação a modificação orgânica dos CNTs, grupos funcionais contendo oxigênio em sua estrutura, pequenas moléculas orgânicas, polímeros e biomoléculas (DNA, proteínas e enzimas) são constantemente empregados. Entre os vários grupos utilizados para funcionalização, a introdução de grupos carboxílicos tem sido bastante utilizada no preparo de eletrodos quimicamente modificados, melhorando as propriedades físicas e químicas, pois facilitam a transferência de elétrons com espécies eletroativas em solução e aliviam os efeitos de incrustação na superfície (GAO et al., 2012).

1.4.3 Alumina

A modificação de eletrodos para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos melhorados tem sido bastante pesquisada. A vantagem na modificação está no aumento da seletividade, sensibilidade e propriedades anti-adsorptivas. Os CNTs destacam-se como preferência na modificação de eletrodos devido às suas propriedades, porém, um estudo mostra resultados satisfatórios para a modificação com alumina, que também é utilizada para polir a superfície do eletrodo (LIMA et al., 2018). A alta estabilidade da superfície do GCE modificado com alumina leva a uma sensibilidade superior se comparados com a modificação com CNTs, desenvolvendo sensores eletroquímicos altamente sensíveis, reprodutíveis e estáveis (LIMA et al., 2018). Devido a alumina não ser condutora, não gera impactos

diretamente a voltametria, sendo possível que o papel da alumina esteja em fornecer locais de adsorção que modifiquem o caminho da reação (POON et al., 2015).

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a melhor forma de detecção da clorexidina, além disso, estudar o comportamento eletroquímico diante de diferentes modificações realizadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo utilizando Al_2O_3 e MWCNTs de diferentes diâmetros, sendo estes funcionalizados e não funcionalizados e também estabelecer uma comparação direta dos resultados obtidos com as diferentes modificações do eletrodo, com eletrodo não modificado.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes que foram utilizados apresentavam grau de pureza analítica e as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade maior que 18 M Ω cm) obtida de um sistema de purificação Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Tabela 1- Reagentes utilizados no trabalho e empresas onde foram adquiridos.

Reagentes	Procedência	Pureza
Ácido perclórico	Reagen	70%
Acetato de clorexidina	Acros Organics	> 98%
Dimetilformamida	Vetec	PA
SD-MWCNT(diâmetro = 6-9 nm e comprimento = 5 μ m)	Sigma-Aldrich	> 95 %
LD-MWCNT(diâmetro = 110-170 nm e comprimento = 5- 9 μ m)	Sigma-Aldrich	> 90%
Alumina (0.3 μ m) – α -Al ₂ O ₃	Buehler	PA

Para o preparo de uma solução estoque de clorexidina com concentração de 10 mmol L⁻¹, foi pesado em um béquer 0,0625 g de acetato de clorexidina e adicionou-se 10 mL de água deionizada. A solução foi colocada no banho ultrassônico para que a clorexidina fosse totalmente dissolvida.

O eletrólito suporte utilizado foi a solução de ácido perclórico, baseado em um trabalho anterior no qual foi utilizado o eletrodo de carbono vítreo, sendo a solução de ácido perclórico que obteve melhores resultados para a determinação da CHX (LIMA et al., 2014).

3.2 Preparação dos Eletrodos

3.2.1 Modificação com MWCNTs

Neste trabalho foi utilizado eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com uma fina camada de MWCNTs de diferentes diâmetros em sua superfície. Antes da modificação foi feita a limpeza na superfície do GCE. A limpeza foi realizada através do polimento da superfície do eletrodo em uma suspensão de alumina 0,3 μm em um feltro de polimento. A superfície foi lavada com água deionizada e a sonicação foi em um banho de ultrassom com 50 % de etanol absoluto e água deionizada durante 15 minutos (MONTES et al., 2016).

Foi adicionado em béqueres diferentes 2 mg de SD-MWCNT e 2 mg de LD-MWCNT em 2 mL de DMF. As soluções foram sonicadas em uma sonda ultrassônica com uma amplitude de 30% durante 20 minutos. Depois foi adicionado na superfície do GCE 10 μL das suspensões e foi colocado na estufa por 30 minutos em uma temperatura de 50 °C para a evaporação do solvente (MONTES et al., 2016).

3.2.2 Modificação com alumina

Primeiramente foi efetuada a limpeza da superfície do eletrodo como descrito anteriormente. Nesse caso, a limpeza foi realizada somente em um feltro de polimento, na ausência de alumina e colocado em banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, a modificação da superfície foi obtida após o polimento da superfície do GCE em um feltro de polimento contendo uma suspensão de alumina por 10 segundos. O eletrodo foi limpo com água deionizada após 30 segundos e seco a temperatura ambiente (LIMA et al., 2018).

3.3 Instrumentação

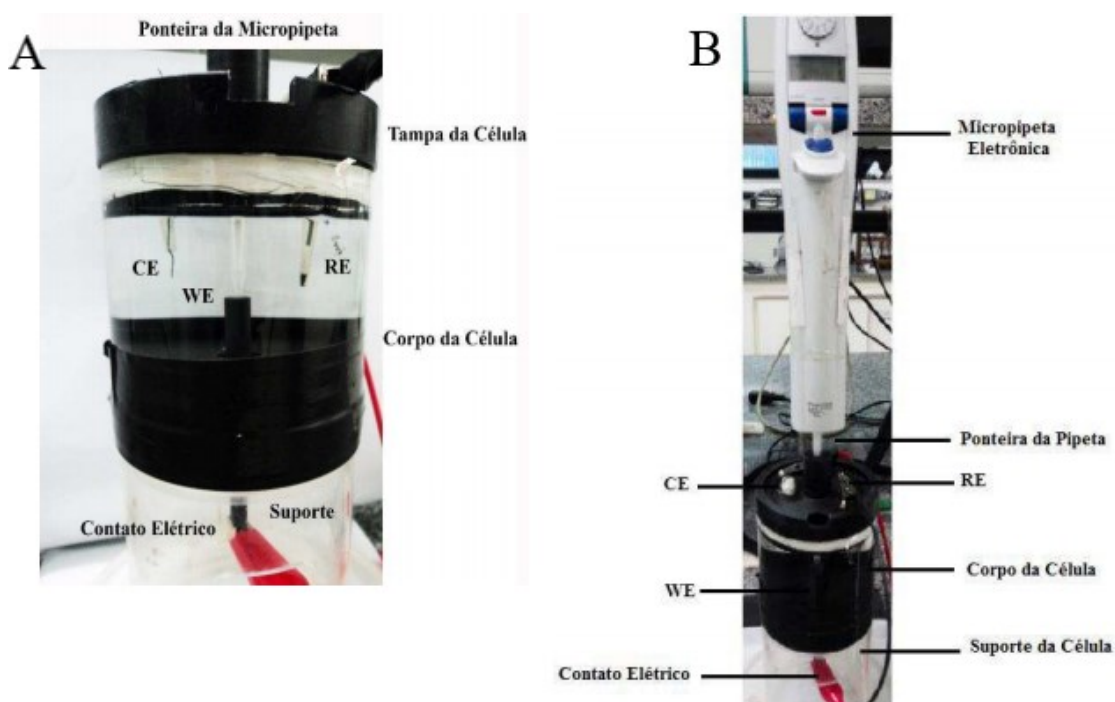
As medidas eletroquímicas foram realizadas através de um potenciostato μ -Autolab Tipo III (Eco Chemie, Utrecht, Holanda), conectado a um computador para a recolhimento e tratamento dos dados e o software utilizado foi o Nova 1.11 para Windows 8 ®. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram voltametria cíclica e a amperometria no sistema BIA. Para a voltametria cíclica foi utilizada uma célula eletroquímica de 10 mL.

O eletrodo de trabalho utilizado em todas as medidas amperométricas e voltamétricas foi o GCE com diâmetro de 1,6 mm e foi adquirido da empresa CH instrument (Austin,

EUA). O eletrodo auxiliar foi um fio de platina e o eletrodo de referência foi um eletrodo miniaturizado Ag/AgCl construído no laboratório como mostra a literatura (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996).

As análises utilizando o sistema BIA (figura 7) foram realizadas em uma célula eletroquímica construída no laboratório, que consiste em um cilindro de vidro com volume de 180 mL com duas tampas fixadas, sendo na parte superior e inferior de polietileno. A tampa superior contém 3 furos para colocar o eletrodo de referência, o eletrodo auxiliar e a ponteira da micropipeta. As soluções foram injetadas através de uma micropipeta eletrônica (Eppendorf Multipette® Stream) na qual o volume de injeção é de 10 a 1000 μL e a ponteira utilizada foi de 1 mL. A velocidade de injeção é de 16,5 a 370 $\mu\text{L s}^{-1}$. A micropipeta é posicionada de forma que a distância entre a ponteira e o eletrodo de carbono vítreo seja aproximadamente de 2 mm em uma configuração “wall-jet” (QUINTINO, 2003).

Figura 7 - (A) Imagem da célula BIA com os três eletrodos e (B) Pipeta eletrônica posicionada na célula BIA conforme foi utilizada para as medidas eletroquímicas.



Fonte: Lima (2017).

3.4 Análise eletroquímica

Primeiramente foram realizados os voltamogramas cíclicos utilizando GCE não modificado e modificado, em ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na presença da clorexidina que é o analito de interesse na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A velocidade de varredura foi de 50 mV s^{-1} e a faixa de potencial que foi utilizada foi de 0 a $1,5 \text{ V}$.

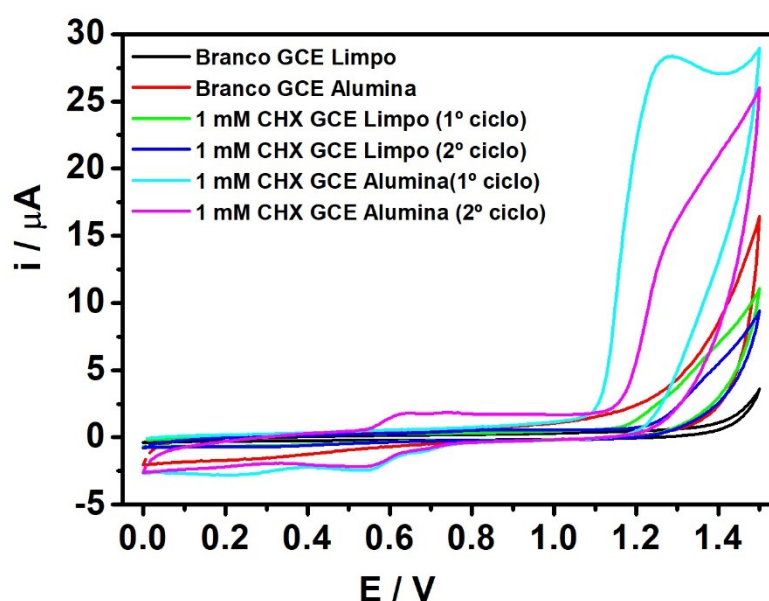
Para o estudo dos potenciais e construção do voltamograma hidrodinâmico foi utilizado o sistema BIA com detecção amperométrica aplicando um potencial de 0,5 a $1,53 \text{ V}$, a corrente foi monitorada através das injeções em triplicata da solução de clorexidina com concentração $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo esta concentração utilizada para a otimização de todos os parâmetros do sistema BIA. Os parâmetros do sistema BIA como velocidade e volume de despejamento da micropipeta eletrônica também foram analisados. Os testes de repetibilidade foram feitos no sistema BIA através de 10 injeções sucessivas. A faixa linear para a clorexidina no sistema BIA foi determinada para as concentrações de 0,3 a $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Voltamogramas cíclicos comparativos da CHX

A oxidação eletroquímica da CHX foi avaliada através da comparação em GCE Limpo, GCE/Alumina, GCE/SD-MWCNT funcionalizado e não funcionalizado e GCE/LD-MWCNT funcionalizado e não funcionalizado. O estudo do pH foi investigado em um trabalho anterior e foi observado que a solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 apresentou melhores resultados relacionados a sensibilidade e estabilidade, sendo esta solução escolhida para todas as análises na determinação da CHX (LIMA et al., 2014).

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos através da adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CHX; Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 ; Faixa de potencial: 0 a 1,5 V; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

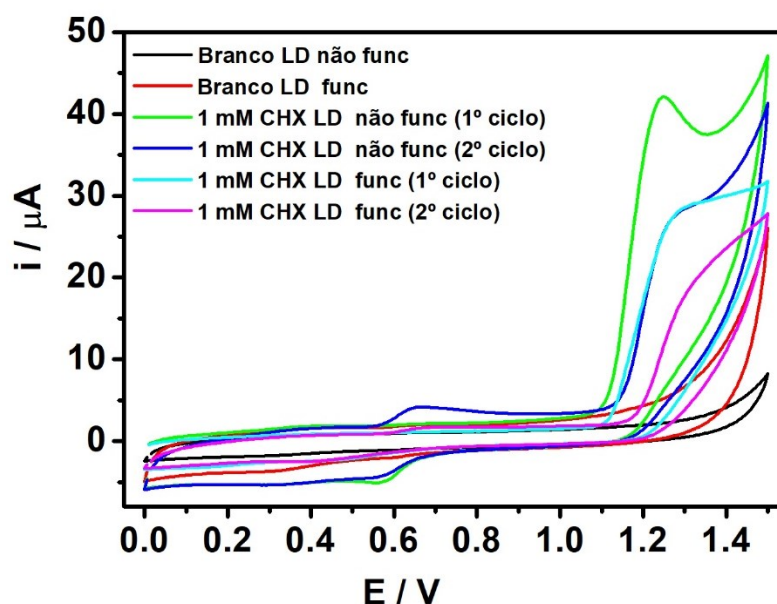


Fonte: A autora.

Através do gráfico, foi possível observar um aumento de corrente para o GCE/Alumina em relação ao GCE Limpo e na literatura foi possível encontrar resultados bastante atraentes para a modificação com alumina (LIMA et al., 2018). Um pico de oxidação irreversível foi observado em 1,2 V no GCE/Alumina no qual a oxidação dá início a partir de 1,1 V. No primeiro e segundo ciclo apresenta um sinal de redução por volta de 0,58 V e o segundo ciclo um sinal de oxidação em 0,63 V. O decréscimo de corrente observada no

segundo ciclo nos dois eletrodos, ocorre devido à elevada massa molecular da CHX que vai adsorvendo facilmente na superfície do eletrodo.

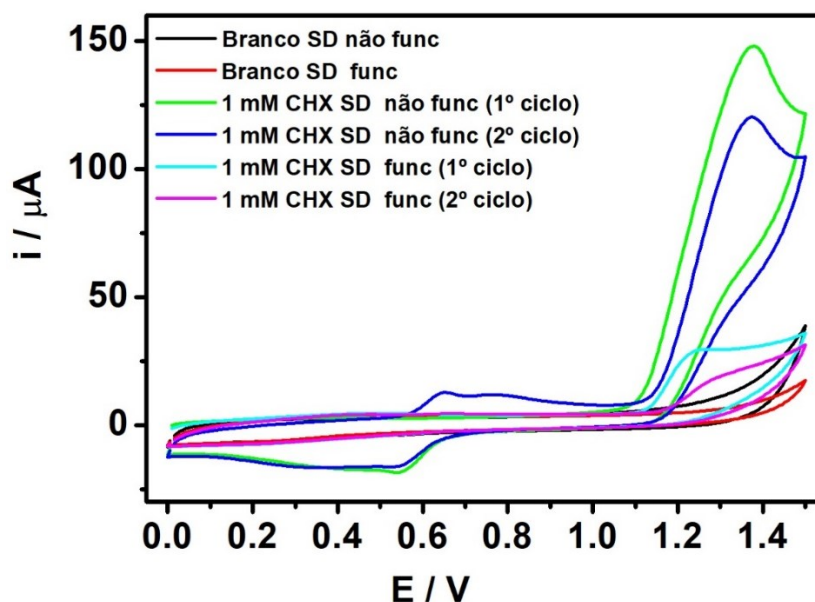
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos através da adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CHX; Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 ; Faixa de potencial: 0 a $1,5 \text{ V}$; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



Fonte: A autora.

O GCE/LD-MWCNT não funcionalizado obteve valor de corrente maior se comparado com GCE/LD-MWCNT funcionalizado, com pico de oxidação irreversível em $1,2 \text{ V}$. Esse resultado foi notado nesse trabalho e também na literatura podendo ser explicado devido a presença de impurezas metálicas nos CNTs não funcionalizados, afetando a eletroquímica das espécies eletroativas (STEFANO et al., 2017). Pode-se verificar também que há um pico de redução em aproximadamente $0,58 \text{ V}$ no primeiro e segundo ciclo e um pico de oxidação em $0,63 \text{ V}$ no segundo ciclo. O mesmo foi observado para a modificação com alumina e isso ocorre devido a formação da 4-cloroanilina ou algum subproduto semelhante, que é o produto de degradação da clorexidina (ZONG; KIRSCH, 2012).

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos através da adição de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CHX; Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 ; Faixa de potencial: 0 a $1,5 \text{ V}$; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



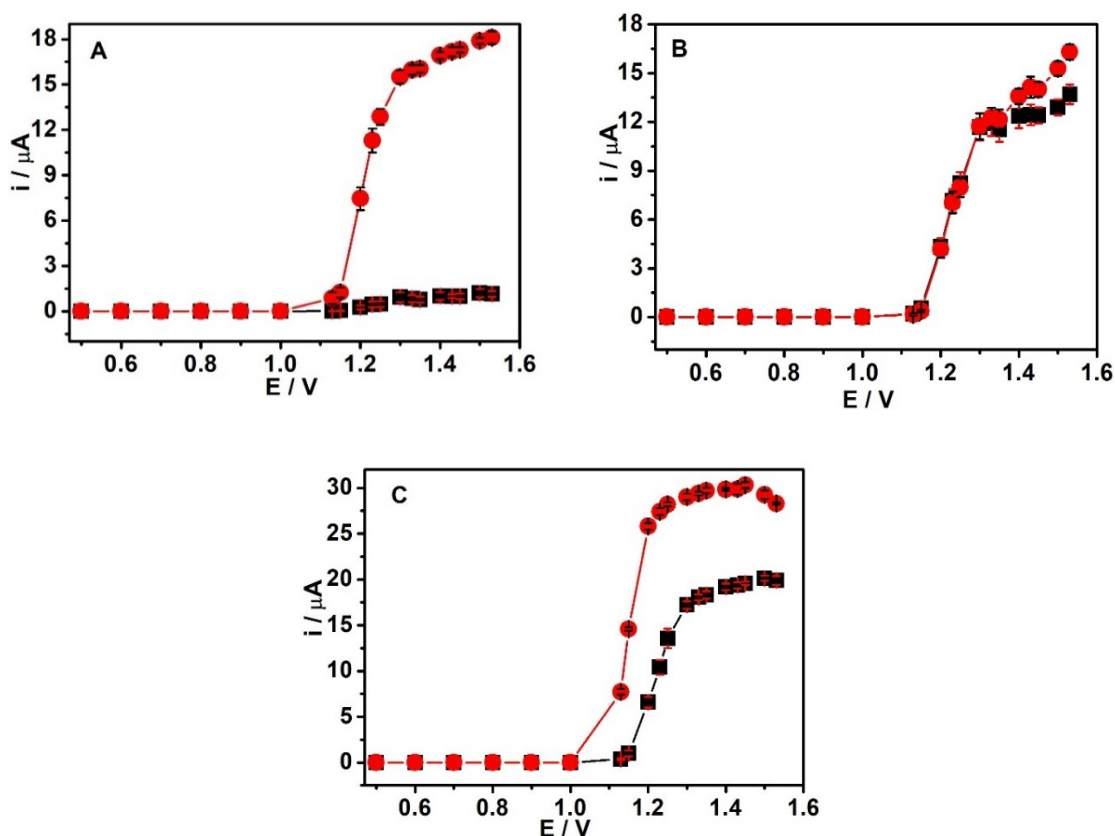
Fonte: A autora.

Para o GCE/SD-MWCNT não funcionalizado os valores de corrente foram maiores em relação ao GCE/SD-MWCNT funcionalizado, por causa das impurezas metálicas presentes nos CNTs não funcionalizados como foi explicado anteriormente. O pico de oxidação irreversível é em $1,3 \text{ V}$. Também foi verificado um pico de redução aproximadamente em $0,58 \text{ V}$ no primeiro e segundo ciclo e um pico de oxidação em $0,63 \text{ V}$ no segundo ciclo, o mesmo foi mostrado nos voltamogramas anteriores. Assim, foi possível constatar que os SD-MWCNT obtiveram melhor desempenho em relação as outras modificações, sendo estes mais sensíveis à oxidação eletroquímica da CHX.

4.2 Estudo hidrodinâmico comparativo para GCE modificado com MWCNT e Alumina

O sistema BIA com detecção amperométrica foi utilizado para selecionar o melhor potencial de detecção da CHX. Diferentes potenciais foram selecionados e as injeções da solução de CHX com concentração de 50 μmol L^{-1} foram realizadas em triplicata. Os voltamogramas hidrodinâmicos foram construídos, com valores de corrente em função do potencial variando na faixa de $+0,5$ a $+1,53 \text{ V}$.

Figura 11 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos variando o potencial de 0,5 a 1,53 V, para injeções de solução de CHX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=3$); Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Volume injetado: 100 μL e velocidade de injeção 277 $\mu\text{L s}^{-1}$ (A) ■ GCE Limpo e ● GCE/Alumina; (B) ■ GCE/LD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/LD-MWCNT não funcionalizado; (C) ■ GCE/SD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/SD-MWCNT não funcionalizado.



Fonte: A autora.

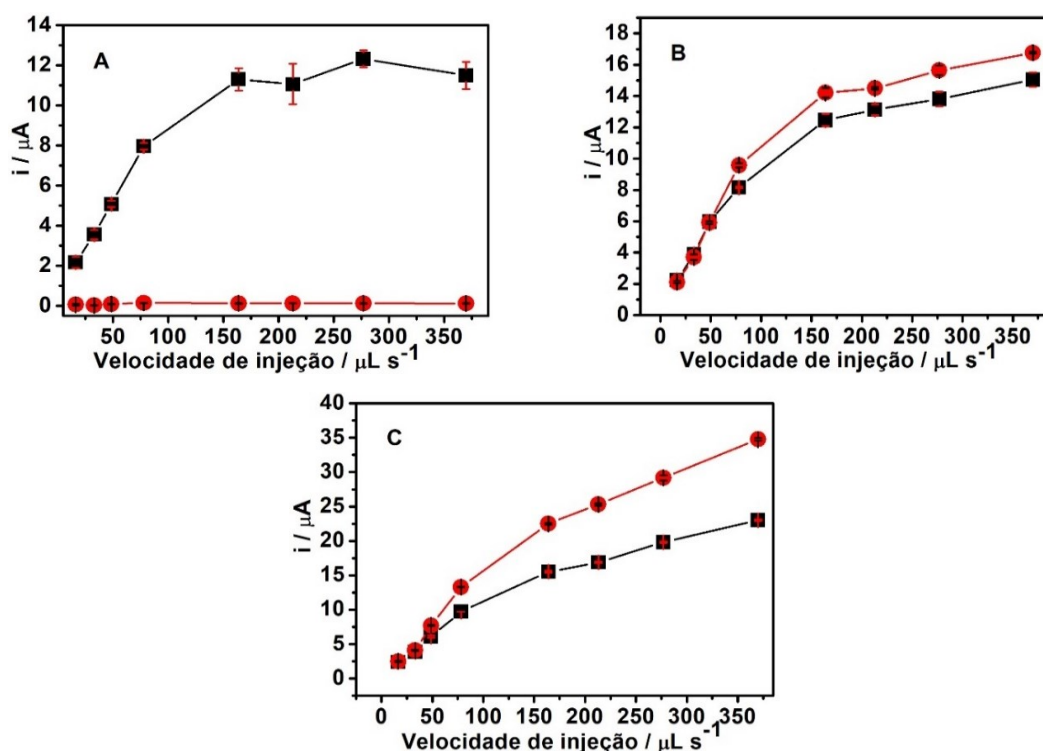
Com base na Figura 11-A, observou-se que para o GCE Limpo a CHX adsorve intensamente na superfície do eletrodo e uma resposta significativa foi observada em 1,13 V. As melhores respostas de oxidação da CHX ocorrem em 1,43 V em ambos eletrodos, sendo este selecionado para experimentos posteriores. Na Figura 11-B, pode-se observar que os dois eletrodos apresentaram potencial de oxidação começando em 1,13 V. O potencial em que ocorre maior sinal de oxidação da CHX é em 1,43 V nos dois eletrodos. Este potencial foi fixado para as outras análises amperométricas. Foi possível verificar também que nos dois eletrodos houve um aumento de corrente até 1,53 V, sendo que no GCE/LD-MWCNT não funcionalizado obteve-se maiores valores de corrente. No voltamograma hidrodinâmico da

Figura 11-C foi verificado que nos dois eletrodos os potenciais de oxidação também começaram em 1,13 V, sendo no GCE/SD-MWCNT não funcionalizado com maior valor de corrente de oxidação. O potencial em que ocorre a maior resposta de oxidação da CHX é em 1,40 V nos dois eletrodos, sendo este fixado para as próximas análises amperométricas. Os potenciais mais altos não foram selecionados pois pode ser a oxidação de outras espécies.

4.3 Estudo da velocidade e volume de injeção

Os parâmetros de otimização do sistema BIA foram avaliados de maneira que se possa obter maior sinal de oxidação da CHX, no qual foram selecionados o potencial de trabalho e como eletrólito suporte a solução de 0,1 mol L⁻¹ HClO₄.

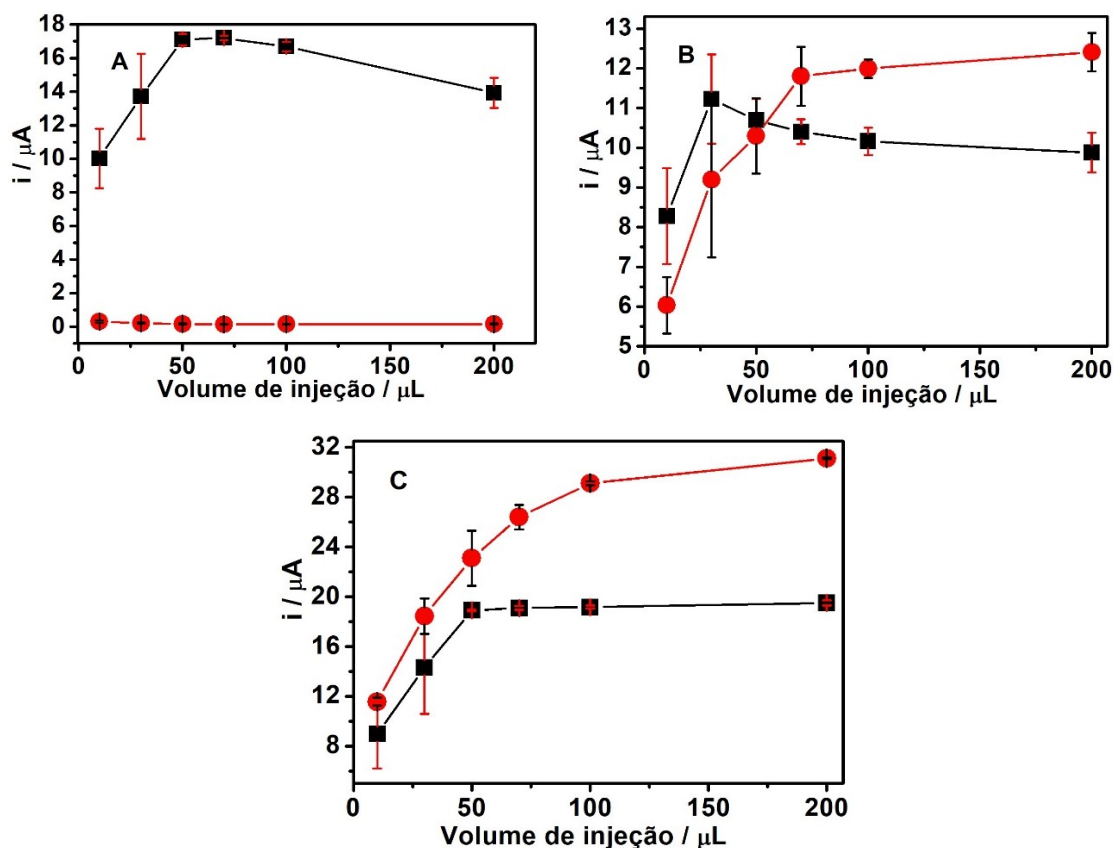
Figura 12 - Estudo da velocidade de injeção através do sistema BIA (16,5 a 370 $\mu\text{L s}^{-1}$) para injeções de solução de CHX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (n=3); Eletrólito suporte: 0,1 mol L⁻¹ de HClO₄; Volume injetado: 100 μL (A) ■ GCE / Alumina e ● GCE Limpo; Potencial aplicado: 1,43 V (B) ■ GCE/LD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/LD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,43 V; (C) ■ GCE/SD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/SD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,40 V.



Fonte: A autora.

Pela Figura 12-A foi possível observar através dos valores de corrente que a modificação do GCE/Alumina foi mais eficaz do que com GCE Limpo. Dessa forma o valor de velocidade selecionado para análises amperométricas posteriores foi $277 \mu\text{L s}^{-1}$ em ambos os casos, devido ao alto valor de corrente e o baixo desvio padrão. Na Figura 12-B o GCE/LD-MWCNT não funcionalizado foram obtidos valores de corrente mais elevados em relação ao GCE/LD-MWCNT funcionalizado sendo selecionada a velocidade $277 \mu\text{L s}^{-1}$ para demais análises. A Figura 12-C mostrou também que com o GCE/SD-MWCNT não funcionalizado foi possível adquirir resultados de corrente mais satisfatórios do que com SD-MWCNT funcionalizado, sendo para as duas modificações a velocidade $277 \mu\text{L s}^{-1}$ utilizada para outras análises com menor desvio padrão e maior valor de corrente. Além disso, em velocidades inferiores, o sinal de corrente é menor devido o transporte de massa mecânico ser mais lento e há também uma maior adsorção na superfície do eletrodo.

Figura 13 - Estudo do volume de injeção através do sistema BIA (10 a 200 μL) para injeções de solução de CHX 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=3$); Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$ (A) ■ GCE/Alumina e ● GCE Limpo; Potencial aplicado: 1,43 V (B) ■ GCE/LD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/LD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,43 V; (C) ■ GCE/SD-MWCNT funcionalizado e ● GCE/SD-MWCNT não funcionalizado; Potencial aplicado: 1,40 V.



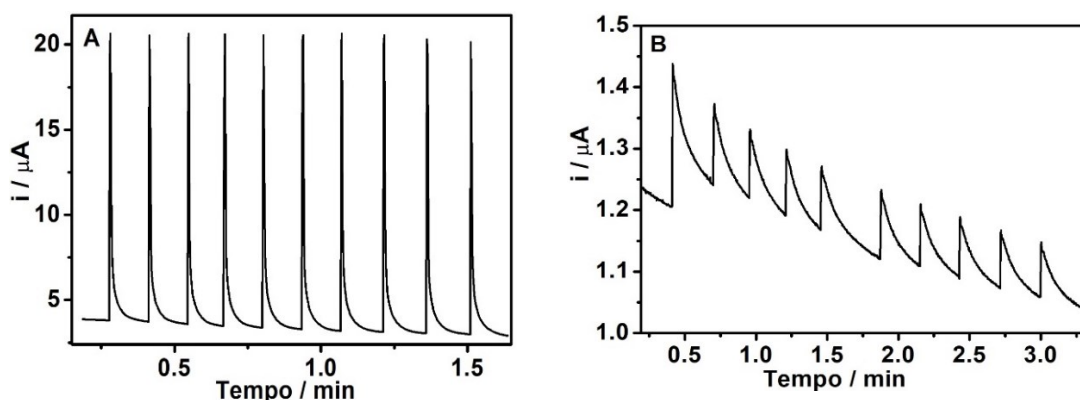
Fonte: A autora.

Pelos gráficos mostrados na Figura 13, foi possível perceber que a corrente aumentou conforme aumentava o volume injetado, exceto para GCE/Alumina e GCE/LD-MWCNT funcionalizado que houve um decréscimo de corrente no volume de 200 μL . A modificação com alumina proporcionou melhores respostas em relação ao eletrodo limpo, sendo o volume 70 μL selecionado para os dois eletrodos para as outras medidas amperométricas. O mesmo ocorreu com LD-MWCNT não funcionalizado e SD-MWCNT não funcionalizado em comparação com LD-MWCNT funcionalizado e SD-MWCNT funcionalizado, visto que apresentaram um elevado valor corrente, sendo o volume 100 μL escolhido por seu baixo desvio e alto valor de corrente, visando a redução do consumo de amostras e reagentes.

4.4 Repetibilidade

O estudo da repetibilidade foi realizado para investigar a precisão entre as medidas de corrente detectadas, após diferentes modificações do eletrodo de carbono vítreo junto ao sistema BIA para a determinação da CHX. O teste foi realizado através de uma sequência de 10 injeções sucessivas de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CHX nas condições que foram otimizadas nos estudos anteriores.

Figura 14 - Estudo da repetibilidade para injeções de uma solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CHX; Volume injetado: $70 \mu\text{L}$; Velocidade $277 \mu\text{L s}^{-1}$; Potencial aplicado: $1,43 \text{ V}$; Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 . (A) GCE/Alumina e (B) GCE Limpo.



Fonte: A autora.

Para averiguar a repetibilidade de detecção do analito, foi realizado o cálculo do desvio padrão relativo (DPR) para o eletrodo limpo e para cada uma das modificações através da Equação 1. Pode-se observar um baixo desvio padrão relativo para a modificação com alumina sendo 1,2%, enquanto para o eletrodo limpo foi 26,3 %. Isso mostra que a modificação com alumina apresenta pequena variação na detecção da CHX, possibilitando a realização de injeções sucessivas sem adsorção da CHX. O analito adsorve facilmente na superfície do eletrodo limpo sendo evidenciado pela queda de sinal em cada sequência das injeções.

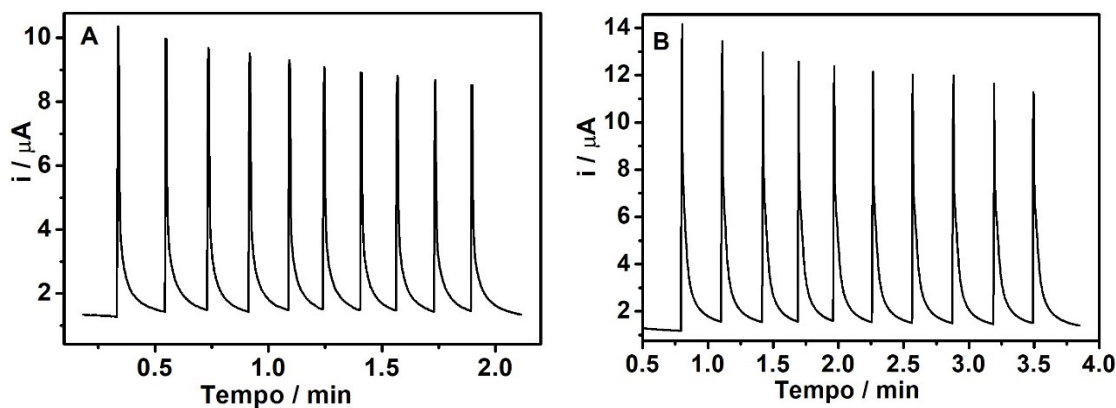
$$\text{DPR} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

S = Desvio padrão das medidas efetuadas;

$\bar{x}$ = Média aritmética das medidas efetuadas.

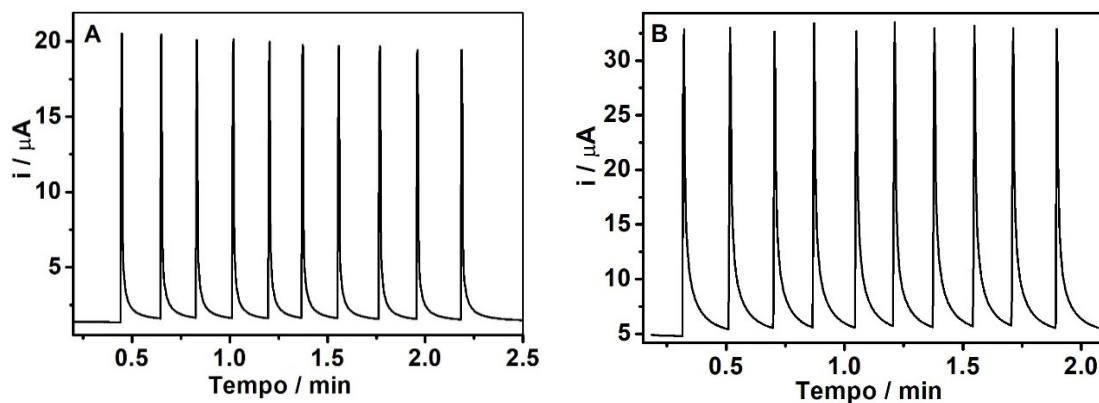
Figura 15 - Estudo da repetibilidade para injeções de uma solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CHX; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$; Velocidade: $277 \mu\text{L s}^{-1}$; Potencial aplicado: $1,43 \text{ V}$; Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 . (A) GCE/LD-MWCNT funcionalizado e (B) GCE/LD-MWCNT não funcionalizado.



Fonte: A autora.

O desvio padrão relativo para o GCE/LD-MWCNT funcionalizado e não funcionalizado foram próximos, sendo 8,2% para LD-MWCNT funcionalizado e 8,8% para LD-MWCNT não funcionalizado o que mostra que ambos foram precisos, porém o LD-MWCNT não funcionalizado foi o que atingiu maior valor de sinal de corrente.

Figura 16 - Estudo da repetibilidade para injeções de uma solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CHX; Volume injetado: $100 \mu\text{L}$; Velocidade $277 \mu\text{L s}^{-1}$; Potencial aplicado: $1,40 \text{ V}$; Eletrólito suporte: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 . (A) GCE/SD-MWCNT funcionalizado e (B) GCE/SD-MWCNT não funcionalizado.



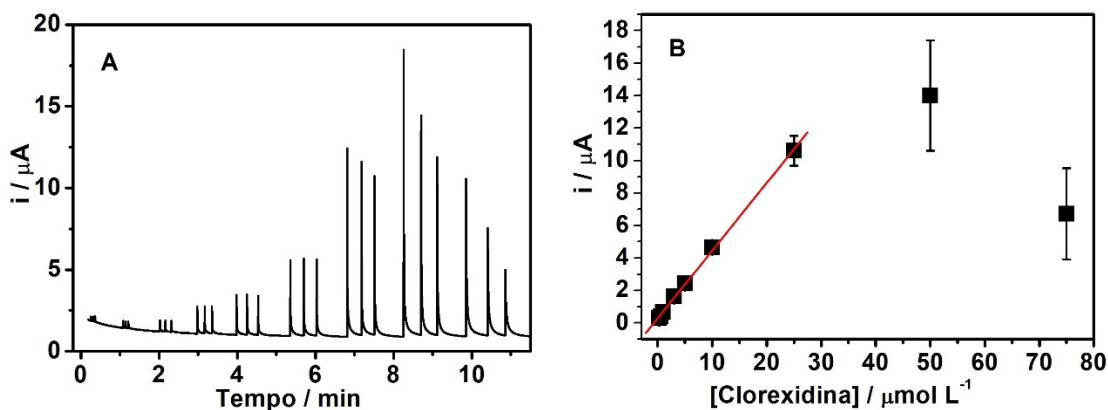
Fonte: A autora.

O desvio padrão relativo para o GCE/SD-MWCNT funcionalizado foi 2% e para SD-MWCNT não funcionalizado foi 1,2%. Isso evidencia que a modificação com SD-MWCNT não funcionalizado possibilita a detecção de corrente de oxidação estável minimizando a adsorção de CHX e também alcançou valores de corrente mais satisfatórios.

4.5 Linearidade

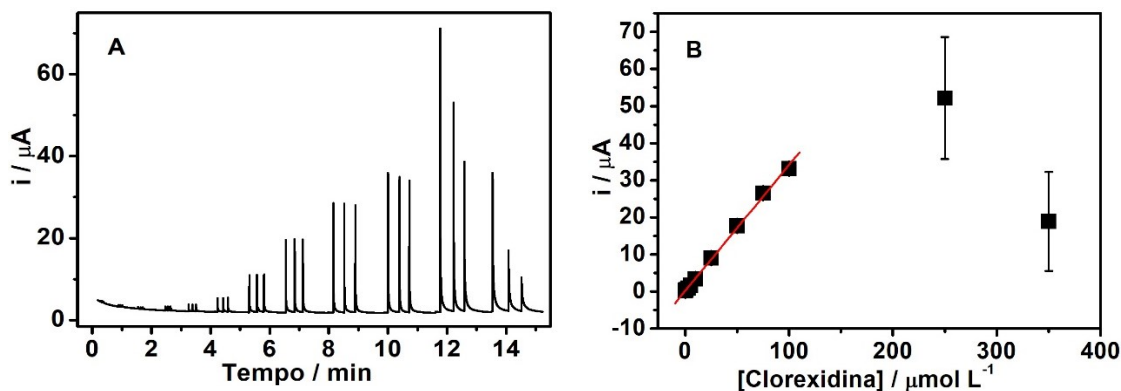
O estudo da linearidade do analito foi realizado por meio da injeção das soluções de clorexidina em diferentes concentrações variando de 0,3 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, nas mesmas condições das otimizações para o sistema BIA que foram estabelecidas anteriormente. Os resultados obtidos são mostrados a seguir nas Figuras de 17 a 22.

Figura 17 – (A) Estudo da faixa Linear em GCE Limpo para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3-25 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 70 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V.



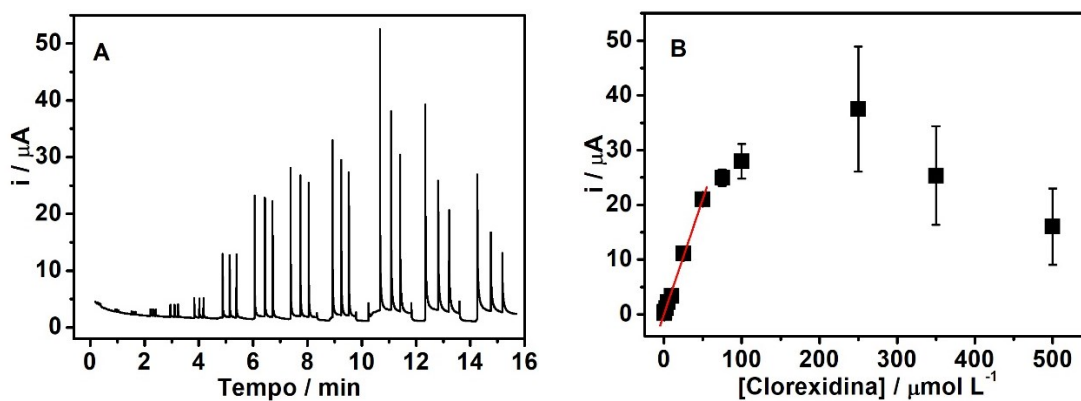
Fonte: A autora.

Figura 18 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/Alumina para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 e 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: $277\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 70 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V.



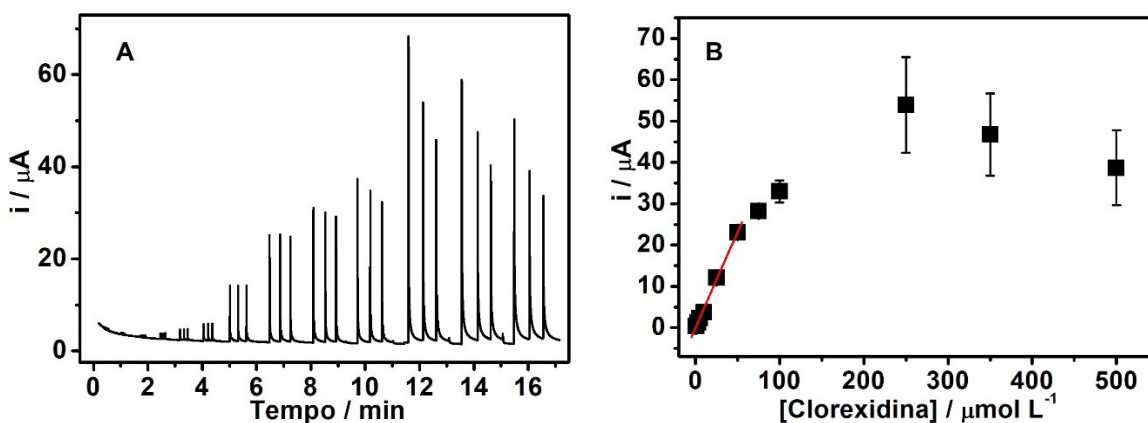
Fonte: A autora.

Figura 19 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/LD-MWCNT funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: $277\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V.



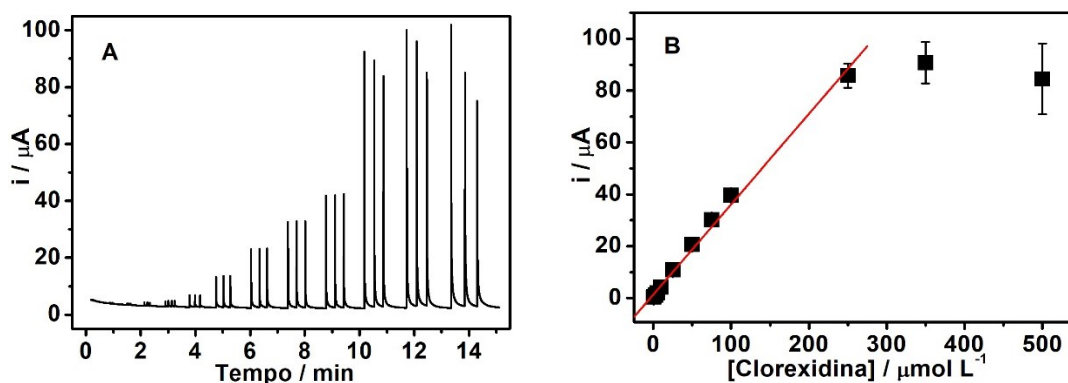
Fonte: A autora.

Figura 20 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/LD-MWCNT não funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,43 V.



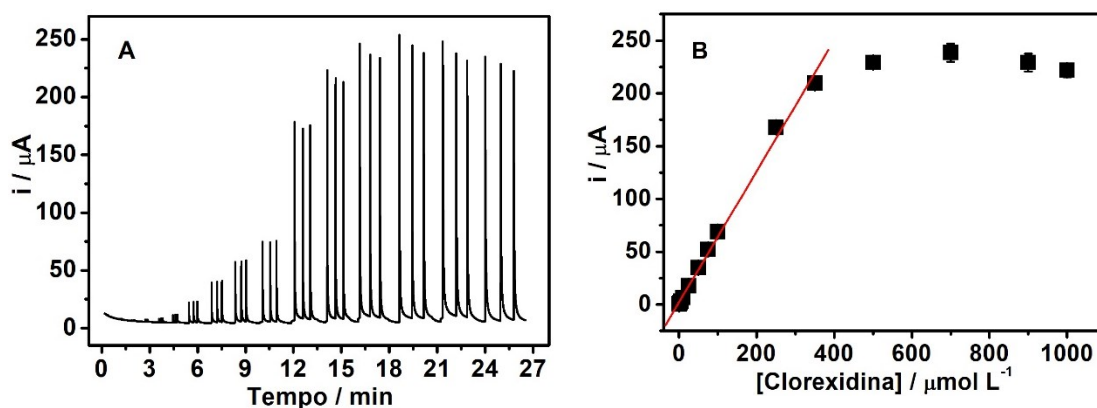
Fonte: A autora.

Figura 21 - (A) Estudo da faixa linear em GCE/SD-MWCNT funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3-250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,40 V.



Fonte: A autora.

Figura 22 - (A) Estudo da faixa Linear em GCE/SD-MWCNT não funcionalizado para injeções em triplicata de CHX nas concentrações: 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 350, 500, 700, 900 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração da CHX de 0,3–350 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: 0,1 mol L^{-1} de HClO_4 ; Velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$; Volume de injeção: 100 μL ; Potencial aplicado: 1,40 V.



Fonte: A autora.

O estudo da faixa linear foi realizado mediante injeções com aumento da concentração de CHX, para investigar o máximo de corrente que corresponde de maneira proporcional a concentração de CHX. Os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) presentes na Tabela 2, foram calculados conforme as equações 2 e 3.

$$\text{LD} = \frac{3 \times \text{SB}}{b} \quad (2)$$

$$\text{LQ} = 3,33 \times \text{LD} \quad (3)$$

Em que:

SB = Desvio padrão do ruído da linha base;

b = Coeficiente angular da curva de calibração.

A Tabela 2 mostra os parâmetros analíticos como a faixa linear, a inclinação da reta (slope), o coeficiente de correlação linear (R) e os limites de detecção e quantificação.

Tabela 2- Características referentes à análise das faixas lineares para a CHX no sistema BIA, obtidos no GCE e suas modificações.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol L}^{-1}$)	R	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
GCE Limpo	0,3 - 25	0,4166	0,9994	0,21	0,69
GCE/Alumina	0,3 - 100	0,3393	0,9991	0,07	0,24
GCE/LD-MWCNT funcionalizado	0,3 - 50	0,4231	0,9986	0,14	0,47
GCE/LD-MWCNT não funcionalizado	0,3 - 50	0,4651	0,9985	0,13	0,43
GCE/SD-MWCNT funcionalizado	0,3 - 250	0,3484	0,9972	0,09	0,30
GCE/SD-MWCNT não funcionalizado	0,3 - 350	0,6211	0,9975	0,05	0,17

Fonte: A autora.

Os amperogramas do estudo da faixa linear mostram que houve um aumento de corrente para as modificações com os CNTs e também com a alumina. É notável que as modificações para os CNTs não funcionalizados, obtiveram melhores resultados, quando comparado aos CNTs funcionalizados e que o nanotubo SD-MWCNT obteve melhores resultados em relação ao LD-MWCNT. Os melhores resultados para os nanotubos SD-MWCNT estão relacionados ao seu menor diâmetro (6-9 nm) em relação ao nanotubos LD-MWCNT de maior diâmetro (110-170 nm) e também devido a maior quantidade de defeitos estruturais presentes em sua superfície, como mostrado na literatura (CARDOSO et al., 2015).

Já os melhores resultados obtidos para os nanotubos não funcionalizados podem ser explicados devido à presença de impurezas metálicas nos CNTs não funcionalizados como foi abordado anteriormente. Essa relação foi estudada em trabalho anterior por (STEFANO et al., 2017), no qual os nanotubos SD-MWCNTs funcionalizados e não funcionalizados foram avaliados frente a diferentes moléculas. Esse trabalho mostrou que o aumento da sensibilidade estava associado à presença de metais (Fe: 2,11 mg/g, Co: 1,15 mg/g e Mo: 0,261 mg/g) na

superfície dos nanotubos e que o processo de funcionalização realizado por meio de tratamento ácido é capaz de remover essas impurezas metálicas dos nanotubos. Após o processo de funcionalização a concentração dos metais diminui drasticamente (Fe: 0,0097 mg/g, Co: <0,002 mg/g e Mo: <0,002 mg/g) justificando assim a diminuição da detectabilidade das diferentes moléculas analisadas. Por esse mesmo motivo, neste trabalho também é observado que os nanotubos funcionalizados diminuem o sinal de resposta para o analito em questão.

No entanto, para o nanotubo LD-MWCNT os resultados obtidos antes e depois do processo de funcionalização foram similares, o que contradiz com os resultados obtidos por (STEFANO et al., 2017), utilizando o nanotubo SD-MWCNT. Alguns resultados obtidos pelo grupo de pesquisa (ainda não publicados) mostram que os mesmos metais presentes no SD-MWCNT também estão presentes no LD-MWCNT (Fe: 2,75 mg/g, Co: 1,52 mg/g e Mo: 0,47 mg/g) e que a remoção das impurezas metálicas para este nanotubo também se mostrou eficaz (Fe: 0,04 mg/g, Co: <0,002 mg/g e Mo: <0,002 mg/g). Porém os efeitos de remoção dos metais não resultaram em mudanças significativas em se tratando da aquisição dos sinais analíticos, sendo assim esses resultados não eram esperados, e demandam de mais testes para serem explicados.

À medida que a concentração aumenta, foi possível observar a queda de resposta analítica por efeito da adsorção, resultante do tamanho da molécula de CHX que possui uma massa molecular elevada podendo ser facilmente adsorvida na superfície do eletrodo. Um estudo que avalia a modificação com alumina, também apresentou resultados similares aqueles obtidos com GCE modificado por MWCNT através do aumento da corrente e foi observado também uma ampla faixa linear em ambos eletrodos (LIMA, et al., 2018).

As curvas de calibração apresentaram um bom coeficiente de correlação linear, os coeficientes angulares também apresentaram resultados aproximados. As modificações apresentaram uma ampla faixa linear exceto o eletrodo limpo e também o GCE modificado com o nanotubo LD funcionalizado e não funcionalizado em consequência da adsorção da CHX na superfície do eletrodo.

Foi possível verificar também baixos limites de detecção e quantificação para as modificações. A modificação com alumina proporcionou um aumento nas correntes de oxidação e as respostas foram melhores em relação ao eletrodo limpo com baixos limites de detecção e uma ampla faixa linear. Isso mostra que as propriedades da alumina ocasionam um aumento de sensibilidade do eletrodo para detecção da CHX (LIMA et al., 2018). Assim, a clorexidina pode ser determinada com maior precisão através dos métodos.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este trabalho, que as modificações com os nanotubos de carbono de diferentes diâmetros e a modificação com alumina foram eficazes em relação ao eletrodo limpo, sendo que foi possível obter picos mais definidos e mais intensos, menores efeitos de adsorção, maior sensibilidade, maior estabilidade na corrente detectada e uma ampla faixa linear. A simplicidade dos métodos, a rapidez e o baixo custo tanto em relação aos equipamentos quanto ao consumo de reagentes, leva a uma redução dos custos das análises pois esses métodos requerem um pequeno consumo de reagentes e amostras. Sendo assim, as modificações com os nanotubos de carbono e a modificação com alumina, foi possível obter resultados mais satisfatórios frente ao eletrodo limpo, com baixos desvios, ampla faixa linear, sendo sensível na determinação da clorexidina.

6. REFERÊNCIAS

- ABAD-VILLAR, E. M.; ETTER, S. F.; THIEL, M. A.; HAUSER, P.C. Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 561, p. 133-137, 2006.
- ABDELRAHMAN, M. M.; NAGUIB, I. A.; ELSAYED, M. A.; ZAAZAA, H. A. Spectrophotometric methods for quantitative determination of chlorhexidine gluconate and its major impurity, metabolite and degradation product: Para- chloro- aniline. **Journal Analytical Chemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 232-248, 2016.
- BAUGHMAN, R. H.; ZAKHIDOV, A. A.; HEER, W. A. Carbon nanotubes – the route toward applications. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 787-792, 2002.
- BELOW, H.; LEHAN, N.; KRAMER, A. HPLC determination of the antiseptic agent chlorhexidine and its degradation products 4-Chloroaniline and 1-Chloro-4- Nitrobenzene in serum and urine. **Microchimica Acta**, v. 146, p. 129-135, 2004.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, methods and applications**. Oxford University, 1993.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric and voltammetric detection in batch injection Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 19, p. 3145-3150, 1994.
- CARDOSO, R. M.; MONTES, R. H. O.; LIMA, A. P.; DORNELLAS, R. M.; NOSSOL, E.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Multi-walled carbon nanotubes: Size dependent electrochemistry of phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 176, p. 36-43, 2015.
- EATEMADI, A.; DARAEI, H.; KARIMKHANLOO, H.; KOUHI, M.; ZARGHAMI, N.; AKBARZADEH, A.; ABASI, M.; HANIFEHPOUR, Y.; JOO, W. S. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification and medical applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 393, 2014.
- FAGAN, D. T.; HU, I-F.; KUWANA, T. Vacuum heat treatment for activation of glassy carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2759-2763, 1985.
- GALLI, A.; D. SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
- GAO, C.; GUO, Z.; LIU, J-H.; HUANG, X-J. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1948-1963, 2012.
- HANSON, K. M.; PAPPAS, T. J.; HOLLAND, L. A. Electrochemical detection in capillary electrophoresis-Amperometry. **Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis**, v. 8, p. 413-440, 2005.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7ª Edição, Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos, 2008.

HAVLÍKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; NOVÁKOVÁ, L.; HÁJKOVÁ, R.; SOLICH, P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1169- 1173, 2007.

HIRSCH, A.; VOSTROWSKY, O. Functionalization of carbon nanotubes. **Functional molecular nanostructures**, Springer, v. 245, p. 193-237, 2005.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

KARPIŃSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Chlorhexidine pharmaco-biological activity and application. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 1321-1326, 2015.

KOUNAVES, S. P. "Voltammetric Techniques", **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**, F. A. Settle (Ed.) Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ, p. 709- 725, 1997.

LIMA, A. P. **Caracterização espectroscópica, microscópica e eletroquímica de eletrodos modificados com diferentes nanotubos de carbono para a detecção de catecol e dopamina**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

LIMA, A. P.; SOUZA, R. C.; SILVA, M. N. T.; GONÇALVES, R. F.; NOSSOL, E.; RICHTER, E. M.; LIMA, R. C.; MUNOZ, R. A. A. Influence of Al₂O₃ nanoparticles structure immobilized upon glassy- carbon electrode on the electrocatalytic oxidation of phenolic compounds. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 262, p. 646-654, 2018.

LIMA, A. P.; STEFANO, J. S.; MONTES, R. H. O.; CUNHA, R. R.; SILVA, L. A. J.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Electrochemical oxidation of chlorhexidine and its amperometric determination by flow-injection analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 448-452, 2014.

LIM, K. S.; KAM, P. C. A. Chlorhexidine pharmacology and clinical applications. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 36, n. 4, p. 502-512, 2008.

MONTES, R. H. O. **Efeito do tamanho de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em sensores eletroquímicos para moléculas de interesse farmacêutico**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

MONTES, R. H. O.; LIMA, A. P.; SANTOS, V. B.; VIDAL, D. T. R.; LAGO, C. L.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Carbon-nanotube amperometric sensor for selective determination of 4-chloroaniline in commercial chlorhexidine solutions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 231, p. 38-44, 2016.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1888, 1975.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “ Silk-Screen”. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, 1998.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673-675, 1996.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

POON, J. C. Y.; LIN, Q.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; SALTER, C.; JOHNSTON, C.; COMPTON, R. G. Altered electrochemistry at graphene or alumina modified electrodes: Catalysis vs electrocatalysis in multistep electrode processes. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 119, n. 24, p. 13777-13784, 2015.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, 2004.

QUINTINO, M. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. **Food Chemistry**, v. 133, p. 200-204, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Edição, Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUNCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª Edição, São Paulo: Cengage Learning, 2008.

STEFANO, J. S.; LIMA, A. P.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1834-1838, 2012.

STEFANO, J. S.; ROCHA, D. P.; DORNELLAS, R. M.; NARCISO, L. C. D.; KRZYZANIAK, S. R.; MELLO, P. A.; NOSSOL, E.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Highly sensitive amperometric detection of drugs and antioxidants on non-functionalized multi-walled carbon nanotubes: Effect of metallic impurities? **Electrochimica Acta**, v. 240, p. 80-89, 2017.

SUN, Y.-P.; FU, K.; LIN, Y.; HUANG, W. Functionalized carbon nanotubes: Properties and applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1096-1104, 2002.

TASIS, D.; TAGMATARCHIS, N.; BIANCO, A.; PRATO, M. Chemistry of carbon nanotubes. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 1105-1136, 2006.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, p. 817-853, 2007.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: A review of recent trends and developments. **Analytical Letters**, v. 44, n.16, p. 2644-2702, 2011.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

ZONG, Z.; KIRSCH, L. E. Studies on the instability of chlorhexidine, Part I: Kinetics and mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n.7, p. 2417-2427, 2012.