

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Utilização de sensores eletroquímicos à base de sílica mesoporosa
contendo grafeno para a análise de bisfenol A**

São Carlos - SP
2015

Anderson Massahiro de Campos

**Utilização de sensores eletroquímicos à base de sílica
mesoporosa contendo grafeno para a análise de bisfenol a**

**Monografia apresentada ao Curso de
Bacharelado em Química do Instituto
de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como
requisito básico para a obtenção do
grau de bacharel em Química sob
orientação do Professor Doutor Sergio
Antonio Spinola Machado.**

**SÃO CARLOS/SP
2015**

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por permitir que superasse todas as adversidades, sendo possível até romper as barreiras das leis da termodinâmica ao produzir mais trabalho do que energia que me foram fornecidas, todos os dias, sempre seguindo em frente, lutando e nunca desistindo.

Agradeço aos meus pais e irmã pela paciência (principalmente pela paciência) e por me ensinarem a ser quem eu sou, sempre me apoiando em todas minhas decisões, me ensinando a ser forte, honesto e justo.

Agradeço à Taisla quem sempre esteve junto comigo nesta etapa da vida e estará nas posteriores, sempre com muita paciência (haja paciência), me ajudando e sempre servindo de exemplo em todos os aspectos possíveis.

Agradeço a todos os meus amigos de faculdade (Tarcício, Eduardo, Lucas, Gabriel, Paulo, Ricardo, Quaresma), pelo convívio diário (ou quase), o que tornou toda essa jornada mais divertida e inesquecível, além da ajuda desde as primeiras matérias até o presente trabalho (obrigado Baiano!).

Agradeço ao Professor Sérgio A. S. Machado, pela orientação e amizade, oferecidas nesses quase três anos e pela confiança em meu trabalho.

Agradeço a todos os membros do grupo GMEME, pela paciência e pela contribuição efetiva para este trabalho, além dos momentos de descontração.

Agradeço ao Thiago C. Canevari e ao Fernando H. Cincotto pelo auxílio inicial na iniciação científica sem os quais este projeto não teria sido viabilizado e pelo reconhecimento no trabalho publicado.

Agradeço ao Paulo Raymundo por toda a ajuda desde o começo e agora nesta etapa final, pela paciência, pela orientação e pela sua confiança, sem as quais não teria sido possível terminar esta etapa.

Agradeço ao Thiago Prado por toda a ajuda, por todas as conversas pela convivência diária.

Agradeço ao João, que sempre está disposto a me ensinar o que sabe e sempre a resolver os problemas no laboratório.

Agradeço ao IQSC pela infra-estrutura e pela formação profissional excelentes e aos funcionários que aqui trabalham e fazem com que o nosso trabalho aconteça.

Agradeço à FAPESP (Porcesso 2014/05197-0) pela bolsa concedida.

“O mediocre é caracterizado pelo ressentimento direcionado às realizações dos outros”.

(Ayn Rand)

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico, constituído por um nanocompósito a base de grafeno oxidado (GO), nanopartículas metálicas de prata (AgNP) e sílica mesoporosa desordenada (SMD). Este sensor foi utilizado na determinação de bisfenol-A em amostras de água de abastecimento e águas de riachos da região de São Luiz do Paraitinga. Inicialmente a síntese direta (*in situ*) de nanopartículas de prata (AgNP) na sílica mesoporosa desordenada (SMD) contendo grafeno oxidado (GO) foi realizada utilizando *N,N*-dimetilformamida (DMF) como agente redutor, por meio dos procedimentos descritos na literatura. A seguir, o nanocompósito obtido foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM), para se determinar tamanho e distribuição de nanopartículas de prata e de folhas de grafeno, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de pulso diferencial. As AgNPs apresentaram formação e distribuição homogênea com tamanho médio de partícula de 20 nm no material híbrido. Os eletrodos modificados com SMD-GO-AgNP foram caracterizados eletroquimicamente em solução aquosa contendo 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 7,0, e em solução contendo 5,0 mmol da sonda redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio e 0,1 mol L⁻¹ de cloreto de potássio utilizando-se a técnica de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, respectivamente. O sensor foi avaliado e otimizado com relação à determinação de bisfenol-A utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial. As características do desempenho eletroanalítico foram: faixa linear entre 1,0 × 10⁻⁷ e 2,8 × 10⁻⁶ mol L⁻¹, limite de detecção de 4,6 × 10⁻⁹ mol L⁻¹ com sensitividade de 1.27 × 10⁻⁷ A mol⁻¹ L. O sensor proposto foi utilizado na análise de amostra de água de torneira contendo Bisfenol A e o erro obtido para o método proposto foi de 4%. Finalmente, o sensor proposto foi comparado estatisticamente com o método padrão para determinação de Bisfenol A em amostra da micro-bacia da região da cidade de São Luiz do Paraitinga.

Palavras Chaves: Sílica Mesoporosa Desordenada (SMD), grafeno, nanopartículas de prata (AgNP), bisfenol A, disruptor endócrino, sensor eletroquímico.

ABSTRACT

The present study describes the synthesis of an electrochemical sensor using a graphene oxide (GO), silver nanoparticles (AgNP) and disordered mesoporous silica (SMD) based nanocomposite. The sensor was used in the determination of bisphenol A in water supply and river water samples, the later obtained from the region of São Luiz do Paraitinga - SP. Initially the silver nanoparticles were synthetized directly on the hybrid material consisted of disordered mesoporous silica and grapheme oxide, using *N,N*-dimethylformamide (DMF) as the reducing agent, as described in literature. Afterwards the nanocomposite was characterized by high resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and scanning electron microscopy (SEM) to determinate size and distribution of silver nanoparticles and grapheme sheets, scanning electron spectroscopy (XPS) and electrochemical techniques like cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and differential pulse voltammetry. The AgNPs presented a homogeneous formation and distribution with average size of 20 nm in the hybrid material. The modified electrodes with SMD-GO-AgNP were electrochemically characterized in a 0.1 mol L⁻¹ aqueous phosphate buffer solution (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), at pH 7.0, and with a redox probe in solution consisted of 5.0 mmol of ferrocyanide/ferricyanide redox couple in a 0.1 mol L⁻¹ potassium chloride solution using the cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy respectively. The sensor was evaluated and optimized toward bisphenol A determination using the differential pulse voltammetry. The characteristics of the electroanalytical performance were: linear work range between 1.0 × 10⁻⁷ and 2.8 × 10⁻⁶ mol L⁻¹, limit of detection of 4.6 × 10⁻⁹ mol L⁻¹ with sensitivity of 1.27 × 10⁻⁷ mol L⁻¹. The proposed sensor was used in water supply samples containing bisphenol A resulting in 4% of error. Lastly, the sensor was statistically compared with a standard method of bisphenol A determination in an river water sample consisted of several rivers from the São Luiz do Paraitinga region.

Keywords: Disordered mesoporous silica (SMD), graphene, silver nanoparticles (AgNP), bisphenol A, endocrine disruptor, electrochemical sensor.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura bidimensional do grafeno (2D).....	11
Figura 2 - Modelo idealizado para a estrutura do grafeno oxidado.....	12
Figura 3 - Esquematização do processo de transferência de elétrons (a) na presença de nanopartículas metálicas e (b) na ausência de nanopartículas metálicas.....	13
Figura 4 - Reação de formação do bisfenol A.	14
Figura 5 – Regressão linear para a comparação de duas metodologias analíticas: (a) mostra perfeita concordância entre as duas metodologias para todas as amostras; (b)-(f) ilustra os resultados de vários tipos de erros sistemáticos.	17
Figura 6 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica utilizada nas medidas voltamétricas: c.e. representa o contra eletrodo (<i>counter electrode</i>), w.e. representa o eletrodo de trabalho (<i>working electrode</i>) e r.e. repreenta o eletrodo de referência (<i>reference electrode</i>).	19
Figura 7 – Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.	24
Figura 8 - a-d Espectro do material SMD/GO/AgNPs: valores de energia de ligação de camadas eletrônicas internas para Ag3d, O1s, C1s e Si2p.	25
Figura 9 - (a) imagens do material SMD/GO/AgNPs, obtidas através da técnica de SEM e (b) o mapeamento correspondente a Ag, C e Si.	27
Figura 10 - (a) micrografias das folhas de grafeno, (b) várias ampliações do material SMD/GO/AgNPs e (c) o EDX correspondente ao material híbrido SMD/GO/AgNPs.....	28
Figura 11 - Voltamogramas obtidos para o carbono vítreo (GCE), SMD/GO/GCE e SMD/GO/AgNPs/GCE em PBS (pH = 7,0); velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	29
Figura 12 – (A) Espectros de plano complexo obtidos para o eletrodo de carbono vítreo não-modificado (a) e modificado com SMD/GO (b) e SMD/GO/AgNP (c), em potencial de circuito aberto. Faixa de	

freqüência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV. (B) <i>Fitting</i> .	30
Figura 13 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ para o carbono vítreo puro e modificado com SMD/GO e SMD/GO/AgNP na presença de 2,0 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Voltamogramas com ajuste de linha de base.....	33
Figura 14 – Curvas analíticas obtidas para o eletrodo de carbono vítreo modificado com 4 (a), 8 (b) e 12 (c) µL, respectivamente, de suspensão SMD/GO/AgNP.	34
Figura 15 –Curvas de calibração para o BPA no carbono vítreo puro (a), no carbono vítreo modificado com SMD/GO (b) e SMD/GO/AgNPs...	35
Figura 16 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com a matriz híbrida SMD/GO/AgNP com a variação da concentração de BPA de 0,1 a 2,3 µmol L ⁻¹	36
Figura 17 – Curva analítica obtida para o eletrodo de carbono vítreo modificado com a matriz híbrida SMD/GO/AgNP variando-se a concentração de BPA em solução entre 0,1 e 28 µ mol L ⁻¹ . Inserto: gráfico dos resíduos para o diagnóstico da regressão linear.....	37
Figura 18 – Efeito da presença de 1,0 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de hidroquinona, catecol, estriol e etinilestradiol no sinal eletroquímico obtido por 1,0 × 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de BPA para o sensor CV/SMD/GO/AgNP.	38
Figura 19 - Regressão linear obtida pela correlação entre as duas técnicas	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Sílica mesoporosa desordenada (SMD).....	10
1.2 Grafeno Oxidado (GO)	11
1.3 Nanopartículas metálicas	12
1.4 Interferentes endócrinos.....	13
1.5 Validação utilizada para comparação.....	15
2. OBJETIVOS	18
3. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	18
3.1 Instrumentação básica	18
3.2 Medidas voltamétricas.....	18
3.3 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica	20
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM).....	20
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão com Alta Resolução (HR-TEM).....	20
3.6 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)	20
3.7 Análise por GC-FID	21
3.8 Preparo de amostra.....	21
3.9 Reagentes e soluções	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Síntese do grafeno oxidado (GO).....	22
4.2 Síntese da matriz híbrida de sílica mesoporosa contendo grafeno SMD/GO	22
4.3 Síntese direta de nanopartículas metálicas de prata AgNP	23
4.4 Caracterização morfológica e estrutural.....	23
4.5 Preparação do sensor.....	23

4.6	Caracterização Eletroquímica e Performance Eletroanalítica	24
5	RESULTADOS & DISCUSSÃO	25
5.1	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).	25
5.2	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG- SEM).....	26
5.3	Microscopia eletrônica de transmissão com alta resolução (HR- TEM).....	28
5.4	Caracterização eletroquímica.....	29
5.5	Impedância Eletroquímica.....	30
5.6	Performance Eletroanalítica.....	32
5.7	Análise em amostras reais.....	39
5.8	Comparação estatística	39
6	CONCLUSÃO	41
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Eletroanalítica é a definição utilizada para caracterizar o uso das técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, pulso diferencial, onda quadrada, associadas a parâmetros analíticos como limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade e seletividade. Estas técnicas têm seu enfoque na interação entre transferência de elétrons e reações químicas, ou seja, entre as medidas elétricas como corrente, potencial ou carga, com os parâmetros químicos.

A pesquisa por novos materiais especiais, que tenham aplicações práticas em diversas áreas, principalmente em eletroanalítica, está cada vez mais intensa, em virtude de poucos materiais, em sua forma simples, apresentarem as características desejadas para serem utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, tais como, alta taxa de transferência de elétrons, alta condutividade elétrica, alto poder catalítico e, consequentemente, altas seletividade e sensibilidade. Para contornar estes problemas, utiliza-se a combinação de mais de um componente para a formação de um novo material. Estes componentes estão intimamente associados, agregando suas características individuais neste único material, o qual é denominado material híbrido. Como apresentam em sua composição mais um material, os materiais híbridos possuem propriedades únicas e desempenho superior aos compostos quando utilizados isoladamente.¹

1.1 Sílica mesoporosa desordenada (SMD)

Dentre as diversas possibilidades de materiais híbridos existentes, os materiais a base de sílica (SiO_2) tem atraído grande interesse por parte dos pesquisadores, visto que apresentam diversificadas propriedades físicas interessantes, como elevadas área superficial, porosidade, resistência mecânica, estabilidades químicas e térmicas, além de fornecer uma superfície reativa onde possa haver a possibilidade de modificação, ancorando diversificados grupamentos de compostos orgânicos e inorgânicos, para detecção de diversos analíticos.²

Uma das principais características da sílica é sua elevada área superficial, devido a presença de alta porosidade, a sílica pode ser classificada de acordo com o tamanho e distribuição poros, sendo denominada, segundo a IUPAC

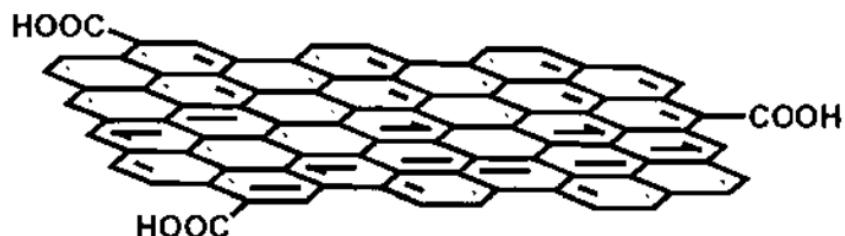
(International Union of Pure and Applied Chemistry), como microporosa, mesoporosa e macroporosa. As mesoporosas, (diâmetros dos seus poros de 2 a 50 nm), apresentam como vantagem a possibilidade de grande funcionalização da matriz.^{3; 4}

Apesar de oferecer diversas características favoráveis, a sílica apresenta grande resistividade elétrica, aspecto altamente indesejável para análises eletroquímicas, sendo necessária a incorporação de um material condutor, no caso grafeno, em sua matriz.⁵

1.2 Grafeno Oxidado (GO)

O grafeno é um dos alótropos do carbono, no qual o grafite, os nanotubos de carbono e os fulerenos fazem parte. Sendo assim, o grafeno é constituído por uma folha de grafite bidimensional com geometria trigonal planar, possui estrutura semelhante a um favo de mel, com uma rede de elétrons deslocalizada, a qual possibilita a condução eletrônica Figura 1.

Figura 1 - Estrutura bidimensional do grafeno (2D).

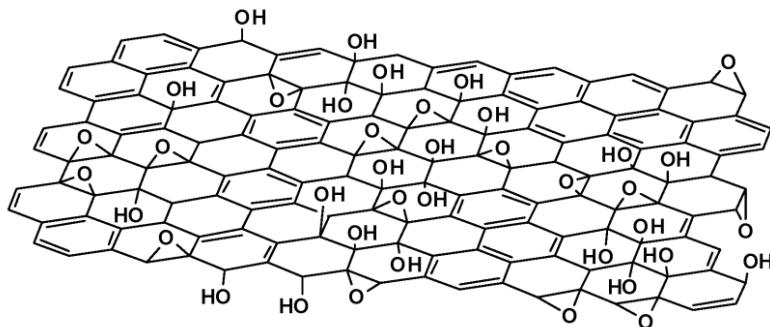


Fonte: Adaptado de LOH, K. P. et al. The chemistry of graphene. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 12, p. 2277-2289, 2010.

Devido sua estrutura planar, o grafeno apresenta diversas propriedades químicas e físicas, como excelente condutividade elétrica, elevada área superficial, elasticidade, band-gap ajustável (apresentando propriedades metálicas ou semicondutoras), biocompatibilidade, robustez e principalmente diversas possibilidades de modificação e funcionalização de sua estrutura, o que o torna muito atrativo para aplicações⁶ na área de desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos.

O grafeno pode apresentar-se nas formas oxidada (grafeno oxidado, GO) e reduzida (grafeno reduzido, rGO), ambas com características físicas e químicas próprias. A forma oxidada (GO), apresenta estrutura em camadas similar à do grafite, porém com diversos grupos oxigenados ligados aos carbonos, os quais, além de expandir o espaço intercamadas, tornam-no hidrofílico.⁷ Esta forma do grafeno constitui um ótimo substrato para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, visto que permitem imobilização de outras espécies, garantindo grande versatilidade ao mesmo, como é representado na Figura 2.

Figura 2 - Modelo idealizado para a estrutura do grafeno oxidado.



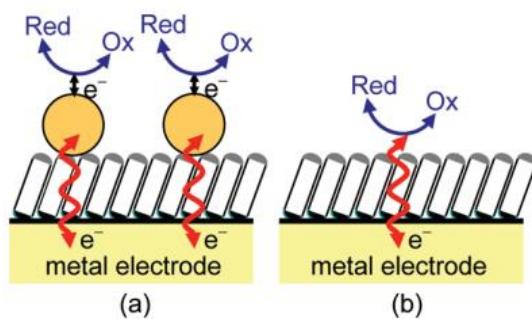
Fonte: Adaptação de DREYER, D. R. et al. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 1, p. 228-240, 2010.

A forma reduzida (rGO), consiste em folhas únicas de grafeno sem grupos oxigenados presentes, ou seja, é constituída de folhas únicas de grafite. Esta é a forma que apresenta as características físicas e químicas citadas acima, e pode ser obtida através da redução do grafeno oxidado (existem diversos métodos, porém não há obtenção do rGO com estrutura ideal, devido aos grupos residuais, ou ocorrerem deformações na estrutura), e através de métodos de esfoliação mecânica direta do grafite (“método fita Scotch”).⁷

1.3 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas (MNPs) têm sido amplamente utilizadas para aumentar a taxa de transferência de elétrons diretamente do analito, para o eletrodo de trabalho em materiais híbridos, aumentando em até doze ordens de magnitude, como representado na figura 3.⁸ Dentre as mais utilizadas, destacam-se as nanopartículas de prata (AgNPs) e as de ouro (AuNPs), devido sua biocompatibilidade e excelentes propriedades condutoras.⁸

Figura 3 - Esquematização do processo de transferência de elétrons (a) na presença de nanopartículas metálicas e (b) na ausência de nanopartículas metálicas.



Fonte: CHAZALVIEL, J. N.; ALLONGUE, P. On the Origin of the Efficient Nanoparticle Mediated Electron Transfer across a Self-Assembled Monolayer. *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, n. 4, p. 762-764, 2011.

1.4 Interferentes endócrinos

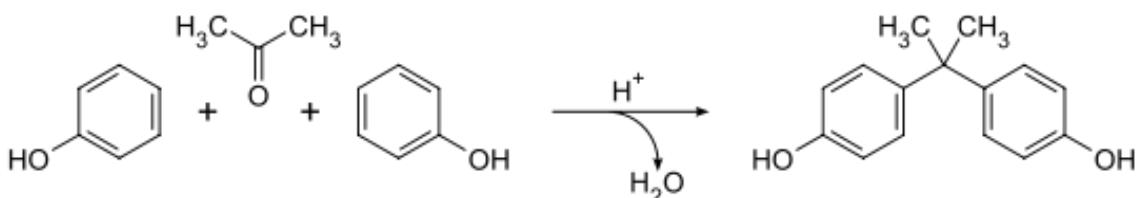
Interferentes endócrinos são compostos orgânicos com propriedades hormonais ativas, os quais provocam alterações no sistema endócrino de seres vivos em baixas concentrações. Como diversos compostos podem atuar como interferentes endócrinos, estes são classificados pelo seu efeito biológico ao invés de sua natureza química. O interesse no estudo destas substâncias é relativamente recente, o qual foi motivado a partir de observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino de animais submetidos à exposição a alguns destes compostos.⁹ Um dos principais interferentes endócrinos é o bisfenol A (BPA), devido a sua grande utilização na indústria. Os grupos hidroxilas são capazes de interagir com os sítios receptores de estrogênio, mimetizando-o e causando uma resposta hormonal, levando a desequilíbrios no sistema endócrino.¹⁰

O BPA ou 4,4-di-hidróxi-2,2-difenilpropano, é amplamente utilizado na indústria, pois apresenta baixo custo de produção, características físicas (como dureza e transparência), utilizado como monômero para diversos polímeros, apresentando grande versatilidade, sendo utilizado para diversas finalidades, desde a produção de resinas epóxi, policarbonatos, brinquedos até na produção de equipamentos médicos, agente fungicida e retardante de chama.¹¹

O BPA apresenta baixa solubilidade em água, 120 a 300 mg L⁻¹, baixa pressão de vapor $5,3 \times 10^{-9}$ kPa, pKa de 9,6-11,3 e fator de bioconcentração ($\log K_{ow}$) de 3,4, indicando que este se acumula no organismo. É produzido através de uma reação de condensação da acetona com o fenol, utilizando ácido clorídrico (HCl) como catalisador, figura 4.¹⁰

Sendo um agente danoso à saúde, órgãos governamentais internacionais como a Agência Nacional de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos e a União Europeia estabeleceram limites de uso para o BPA, o que levou a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão responsável também pelo controle de embalagens de alimentos no Brasil, a seguir os padrões estabelecidos e a restringir o uso do BPA em embalagens para 0,26 mg kg⁻¹, a considerar como 0,1ng mL⁻¹ o limite de BPA em águas fluviais.⁹

Figura 4 - Reação de formação do bisfenol A.



Fonte: UGLEA, C. V., NEGULESCU, I. I. **Synthesis and Characterization of Oligomers**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 384.

Levando em consideração o que foi exposto acima, devido a elevada toxicidade do bisfenol A para seres humanos, torna-se muito atrativo o estudo e desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para a identificação do composto.

Os métodos de detecção adotados pelas agências reguladoras são os métodos cromatográficos, em fase gasosa acoplada a outras técnicas de detecção (GC- MS, GC-FID), ou em fase líquida, também acoplada a outras técnicas (HPLC-UV, HPLC-

FL, HPLC-MS, entre outras). Apesar destas técnicas se mostrarem eficientes, apresentando baixos limites de detecção (da ordem de 0,01 ng L⁻¹¹²), a cromatografia é uma técnica que necessita de tratamento prévio da amostra, operador especializado, equipamentos de alto custo, uso de solventes orgânicos consequentemente geração de resíduos orgânicos, entre outros.

Portanto, devido as dificuldades de se trabalhar com cromatografia, tornam-se atrativos os sensores eletroquímicos, os quais, além de apresentar alta sensibilidade (semelhante aos demais métodos analíticos), seletividade e robustez, também são de fácil manuseio, apresentam custo inferior e não necessitam de extenso tratamento prévio das amostras. Além disso, os sensores eletroquímicos podem ser utilizados *in situ* em estações de tratamento de água e esgoto indicando contaminação por Bisfenol A.

1.5 Validação utilizada para comparação

A validação de um método analítico pode ser realizada sob diversas formas, utilizando uma série de materiais e procedimentos padrão. Qualquer comparação entre duas metodologias analíticas tem como objetivo avaliar os erros sistemáticos e aleatórios, mostrando se os resultados obtidos são significantemente maiores ou menores do que o procedimento padrão. Ademais, os procedimentos de pré-tratamento de amostra e de operação são fatores importantes ao se comparar duas técnicas analíticas¹³

Uma das formas mais comuns de se validar um método experimental é a comparação dos resultados obtidos com aqueles providos por um procedimento analítico padrão, adotado pela agência de controle. Entretanto, esta comparação, muitas vezes, não é óbvia. Como comparar resultados diferentes, como por exemplo, voltametria de pulso diferencial e cromatografia? Muitas vezes esta comparação é feita utilizando rendimento de experimentos de recuperação, o que não apresenta qualquer significado de validação, uma vez que a recuperação é uma das características inerentes das técnicas analíticas, que não interfere na precisão ou exatidão do método.

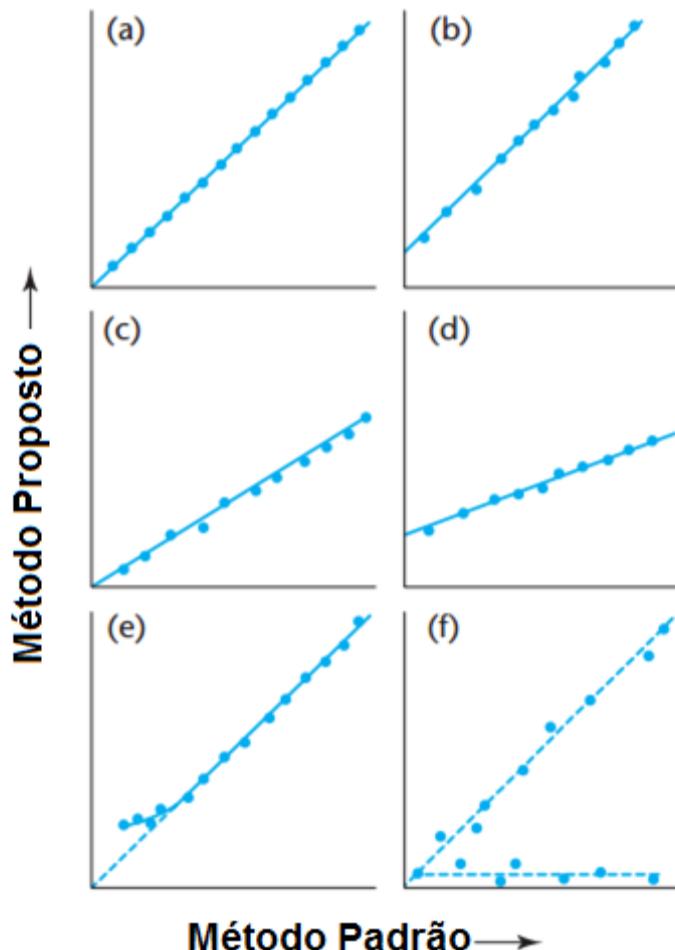
Uma maneira proposta por Miller e Miller e da Silva e Machado¹⁴ para se comparar dois métodos analíticos consiste em elaborar uma relação entre os

resultados obtidos pelo método padrão (eixo X) e o método proposto a ser validado (eixo Y) através da análise de diferentes amostras. Com o conjunto de pontos espera-se obter uma relação linear entre os dois métodos, utilizando ferramentas estatísticas bem definidas e calcular seu coeficiente angular (b), o intercepto (a) e o coeficiente produto-momento (r) da regressão linear. Caso cada amostra resulte em resultados semelhantes para ambas as técnicas, o intercepto será nulo (a curva passa pela origem), o coeficiente angular e o produto-momento valerão 1 (figura 5a). Na prática isto dificilmente ocorre visto que, os erros sistemáticos sejam eliminados, os erros aleatórios não permitem que os resultados sejam os mesmos para todas as amostras. Portanto ocorrem desvios da condição ideal ($a = 0$, $b = r = 1$) de maneiras distintas.

É possível que o coeficiente angular da curva de regressão seja igual a 1, mas com intercepto diferente de zero (figura 5b), o que indica que um dos métodos de análise fornece resultados com valores maiores ou menores do que o outro, por um valor fixo. Isto pode ocorrer quando o ruído (linha de base) não foi corretamente tratado em alguma das técnicas. Este caso é comum quando compara-se técnicas eletroquímicas com as demais, pois no sistema eletroquímico há a corrente capacitiva o que torna a linha de base diferente de zero.

O coeficiente angular pode ser maior ou menor do que 1, o que indica a presença de erros sistemáticos nas medidas dos coeficientes angulares das curvas de calibração individuais de ambos os métodos (figura 5c). O valor do intercepto pode ser diferente de 0 e o coeficiente angular diferente de 1, levando a resultados diferentes. A Figura 5d-f ilustra os resultados de vários tipos de erros sistemáticos.

Figura 5 – Regressão linear para a comparação de duas metodologias analíticas: (a) mostra perfeita concordância entre as duas metodologias para todas as amostras; (b)-(f) ilustra os resultados de vários tipos de erros sistemáticos.



Fonte: Adaptação de MILLER, J. N. M., J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5th ed. Harlow-Essex, UK: Pearson Education Limited, 2005, p 124

No presente estudo será realizada a comparação entre a técnica eletroquímica (Voltametria de pulso diferencial) e a técnica cromatografia gasosa, ou seja, uma das técnicas padrão para a análise de bisfenol A.

Inicialmente serão construídas curvas de calibração para cada uma das técnicas e serão realizadas análises das amostras. Os valores das respostas analíticas obtidas serão interpolados nas respectivas curvas de calibração a fim de obter os valores de concentração de cada amostra medidos para cada técnica. Após obter as respostas analíticas para cada concentração em cada uma das técnicas, e elaborar a relação

proposta por Miller e Miller, será necessário realizar testes estatísticos de significância com um nível de confiança de 95%. O teste t Student para avaliar uma correlação significativa pode ser utilizado para comparar os dados obtidos a fim de provar se os valores das concentrações detectadas diferem significativamente.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver, caracterizar e aplicar um sensor eletroquímico de carbono vítreo modificado com um nano material híbrido a base de sílica, onde serão incorporados o grafeno oxidado e as nanopartículas metálicas de prata, a fim de detectar a presença do interferente endócrino bisfenol-A em amostras de água.

3. SEÇÃO EXPERIMENTAL

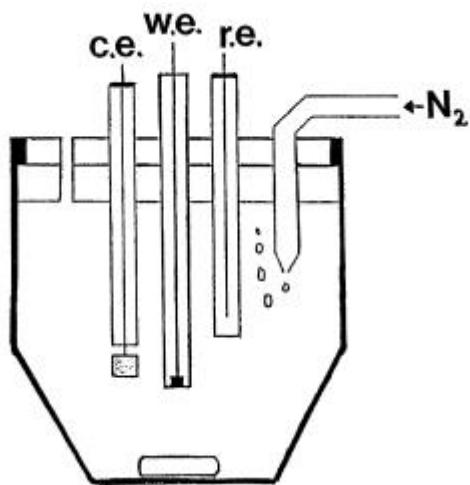
3.1 Instrumentação básica

Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AL 204 com precisão de $\pm 0,1\text{mg}$.

3.2 Medidas voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica de 25 mL contendo três eletrodos (figura 6), sendo um eletrodo de trabalho (eletrodo de carbono vítreo), um eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl 3M)) e um eletrodo auxiliar de platina ($1,0 \text{ cm}^2$) conectados a um Potencistato/Galvanostato PGSTAT302N/Autolab[®] (Ecochimie, Netherlands) acoplado a um microcomputador e gerenciado pelo software NOVA 1.10. Os resultados obtidos foram plotados utilizando o programa Origin[®] 7 e 9 da Microcal Inc.

Figura 6 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica utilizada nas medidas voltamétricas: c.e. representa o contra eletrodo (*conter electrode*), w.e. representa o eletrodo de trabalho (*working electrode*) e r.e. repreenta o eletrodo de referência (*reference electrode*).



Fonte: UGLEA, C. V., NEGULESCU, I. I. **Synthesis and Characterization of Oligomers.** Boca Raton: CRC Press, 1991. 384.

Eletrodo de referência

O eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3M) foi construído embutindo-se um fio de prata, previamente polido com lixas 600, anodizado em solução de HCl 0,3 mol L⁻¹ para obtenção de um filme de cloreto de prata, em um tubo de vidro preenchido com uma solução de KCl 3M contendo cristais de AgNO₃.

Eletrodo auxiliar

Uma placa de platina com 1,0 cm² de área geométrica, soldada a um fio de platina e embutidos em um tubo de vidro. O eletrodo auxiliar foi aquecido em chama redutora utilizando um mini maçarico e lavado em água Mili-Q.

Eletrodo de trabalho

Os eletrodos consistem em um eletrodo de carbono vítreo com 0,3 cm de diâmetro ($7,1\text{ mm}^2$), embutidos em Teflon®.

3.3 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica

Os experimentos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foram realizados com os materiais descritos no ítem 3.1.2. Os experimentos foram realizados em um Potenciómetro/Galvanostato PGSTAT30/Autolab® acoplado a um microcomputador e controlado pelo software FRA. Os espectros de plano complexo foram analisados com o software *Electrochemistry-ZView2*. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FEG-SEM)

As análises de FEG-SEM foram obtidas utilizando-se o equipamento de modelo FEG-Zeiss Supra 35VP (Zeiss, Alemanha), operando a 6,0 kV, equipado com um detector secundário de elétrons de alta resolução.

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão com Alta Resolução (HR-TEM)

As análises de HR-TEM foram obtidas utilizando-se o equipamento FEI TECNAI G· F20 microscópio de transmissão de elétrons operando a 200 kV.

3.6 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)

As análises de XPS foram realizadas em um VSW HA 100 *hemispherical electron analyser* utilizando um anodo de Al como fonte de raios-X, operado a 12 keV e 15mA. As alterações nas energias de ligação foram corrigidas utilizando a linha Si2p da sílica.

3.7 Análise por GC-FID

As medidas cromatográficas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo GC-FID 17-A SHIMADZU equipado com o detector por FID e um modo de injeção splitless. A coluna utilizada foi Restek RTX-XLB (5% divinilbenzeno e 95% de polidimetilsiloxano) de 30 metros, com uma fase estacionária de espessura de 0,5 µm. O gás carreador foi N₂, taxa de 1,13 mL min⁻¹ utilizando um controle de pressão eletrônico. Durante a injeção da fibra, a temperatura do injetor permaneceu a 320 °C e o tempo de amostragem foi de 5 minutos. A temperatura inicial do forno foi de 80 °C, durante 2 minutos, rampa de aquecimento de 40 °C min⁻¹ até 300 °C.

3.8 Preparo de amostra

As amostras de água fluvial superficial foram previamente filtradas para eliminar detritos. A extração do bisfenol A nas amostras de rio foram realizadas através do método de micro-extração em fase sólida (do inglês *Solid-phase microextraction, SPME*) utilizando um *holder* manual e uma fibra sendo ambos disponíveis comercialmente (Supelco). A fibra utilizada apresenta 100 µm de fase de polidimetilsiloxano. Após a otimização dos parâmetros da técnica, foi obtida uma curva analítica com concentrações entre 366 e 639 µg.L⁻¹.

3.9 Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados foram de alto grau de pureza analítica e foram utilizados sem purificação prévia. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada no sistema Nanopure com resistividade de 18 MΩ cm⁻¹ (Barnested Nanopure System).

O grafite em pó, nitrato de sódio (NaNO₃), tetraetilotosilicato (TEOS), *N,N*-Dimetilformamida (DMF), etanol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®. O ácido sulfúrico (H₂SO₄), permanganato de potássio (KMnO₄), ácido clorídrico (HCl) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram adquiridos da empresa Synth®. O nitrato de prata (AgNO₃) foi adquirido da empresa da MERCK®.

A caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados e não modificados bem como as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em solução contendo 5,0 mmol de ferrocianeto de potássio (Mallinckrodt[®]) e ferricianeto de potássio (J.T. Baker[®]) em KCl 0,1 mol L⁻¹ (Sigma-aldrich[®]).

Os estudos voltamétricos com Bisfenol-A (Sigma-aldrich[®]) foram realizados em solução 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato (pH 7.0) dissolvendo-se quantidades apropriadas dos sais fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄) (Sigma-aldrich[®]).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese do grafeno oxidado (GO)

A síntese do grafeno foi realizada utilizando-se o método Hummers¹⁵ com algumas modificações, a saber: 1,0 g de grafite e 1,0 g de NaNO₃ foram dispersos em 46,0 mL de H₂SO₄ concentrado (98% P.A). A mistura resultante foi mantida sob agitação e resfriamento em banho de gelo, até a temperatura de 20 °C. Na sequência, 6,0 g de KMnO₄ foram adicionados lentamente, sob agitação constante. A mistura resultante foi mantida sob resfriamento a 0 °C, por um período de 24h.

Transcorrido o tempo de resfriamento, 240 mL de água foram adicionados à solução sob agitação constante, a temperatura foi elevada a 98 °C durante 60 min. Em seguida, 85 mL de H₂O₂ a 30% (V/V) foram adicionados. A mistura resultante foi filtrada a quente e lavada com uma solução de HCl (5 % V/V). O GO obtido foi seco em estufa a 50 °C, durante 48h.

4.2 Síntese da matriz híbrida de sílica mesoporosa contendo grafeno SMD/GO

A síntese da matriz híbrida de sílica mesoporosa desordenada (SMD) contendo grafeno oxidado (GO) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Canevari e colaboradores¹⁶: uma mistura contendo 5,0 mL de TEOS (0,022 mol) foi adicionado a 5,0 mL de etanol anidro, mantida sob agitação por 60 min para homogeneização e iniciar a pré-hidrólise do TEOS. Transcorrido o tempo, 0,2 mL de ácido clorídrico (37% PA), 0.46 g do grafeno oxidado e 0.8 mL de água (miliQ) foram adicionados e a mistura

resultante foi mantida sob ultrassonicação até que o processo de gelatinização se completasse. O material foi mantido em repouso à temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente e formação da rede mesoporosa de sílica, por um período de sete dias. O xerogel resultante foi macerado em um cadiño de ágata, e o sólido resultante foi lavado com etanol em um sistema Soxleth para remover os resíduos de TEOS e grafeno. O sólido obtido foi seco a vácuo.

4.3 Síntese direta de nanopartículas metálicas de prata AgNP

A síntese das nanopartículas de prata foi realizada *in situ* sobre o material híbrido (SMD/GO) utilizando-se a metodologia descrita por Conzuelo e colaboradores¹⁷: 0,5 g do material híbrido foi disperso em 15 mL de DMF contendo $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AgNO₃. A mistura resultante foi mantida sob ultrassonicação por um período de 60 min na ausência de luz. O produto foi submetido à centrifugação, lavado com DMF e seco na estufa a 100 °C durante 4 h.

4.4 Caracterização morfológica e estrutural

O material híbrido (SMD/GO/AgNPs) foi caracterizado através das técnicas de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), microscopia de eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM), microscopia eletrônica de transmissão com alta resolução (HR-TEM).

4.5 Preparação do sensor

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi polido com suspensões de micropartículas de alumina de 0,30 e 0,05 µm, respectivamente. Em seguida, este foi lavado abundantemente com álcool etílico e água ultrapura. O ECV foi então levado a banho ultra-sônico em álcool isopropílico durante três minutos e posteriormente com água ultrapura por cerca de cinco minutos. Por fim, deixou-se secar à temperatura ambiente.

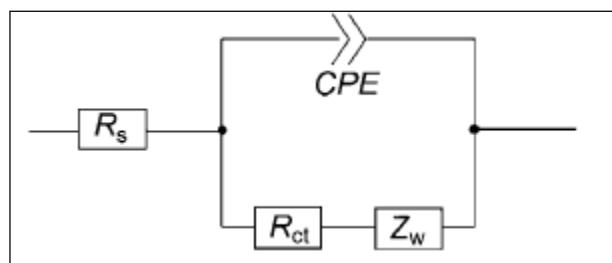
Uma massa de 10,0 mg de SMD/GO/AgNPs foi adicionada a 2,0 mL de água e 5 µL de Nafion® e a mistura submetida a ultrassom durante 60 minutos de modo a formar uma suspensão estável de SMD/GO/AgNPs. Essa suspensão foi armazenada

em frasco âmbar e a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 4, 8 e 12 μL da suspensão do material híbrido sobre a superfície do GCE com o auxílio de uma micropipeta e deixou-se secar à temperatura ambiente até completa evaporação do solvente.

4.6 Caracterização Eletroquímica e Performance Eletroanalítica

Os eletrodos de carbono vítreo não-modificados e modificados com SMD/GO/AgNPs foram caracterizados por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Aplicou-se uma onda senoidal com 10 mV de amplitude no potencial de circuito aberto em uma faixa de freqüência de 100 kHz a 0,1 Hz. O circuito modelo utilizado nesse estudo foi o circuito de Randles R_s ($\text{CPE}[R_{ct}Z_w]$) como apresentado na Figura 7 abaixo.

Figura 7- Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.



Fonte: Autoria própria

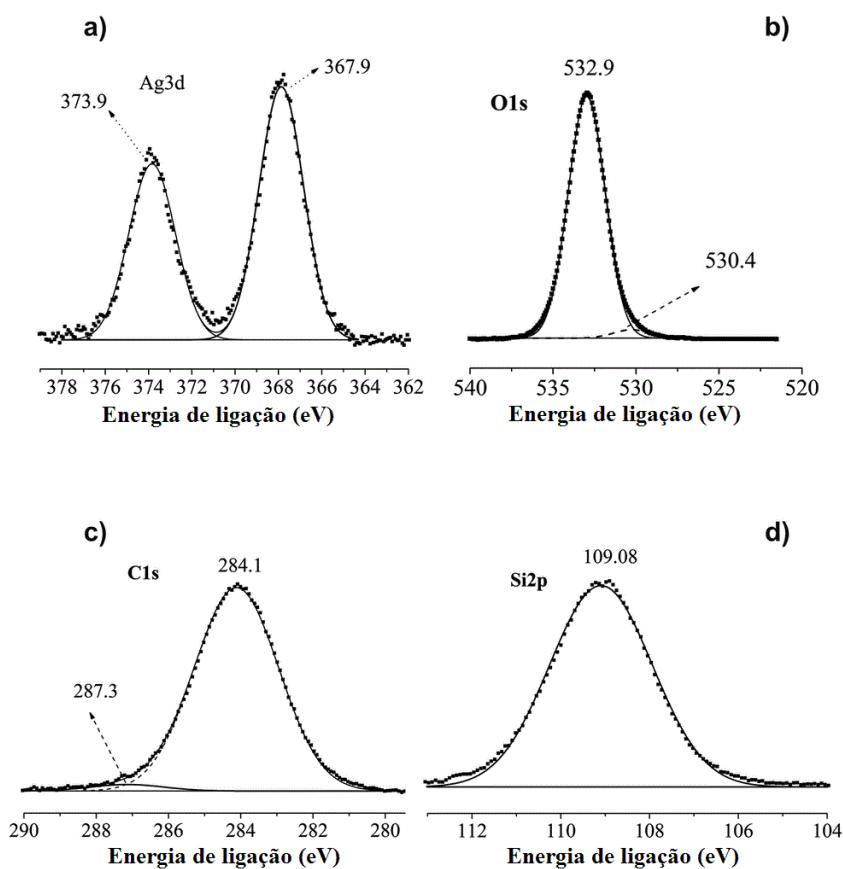
Na figura 7, R_s é a resistência da solução, R_{ct} é a resistência de transferência de carga, Z_w é a impedância de Warburg e CPE é o elemento de fase constante (representa a capacidade da dupla camada). Os estudos da performance eletroanalítica foram realizados utilizando-se voltametria de pulso diferencial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).

A Figura 8a-d apresenta o espectro de XPS e os valores de energia de ligação para os componentes spin-órbita Ag3d, O1s, C1s e Si2p.

Figura 8 - a-d Espectro do material SMD/GO/AgNPs: valores de energia de ligação de camadas eletrônicas internas para Ag3d, O1s, C1s e Si2p.



Fonte: Autoria própria

O espectro da prata Ag3d para o material híbrido Sílica mesoporosa desordenada/ Grafeno oxidado/ Nanopartículas de Prata, (SMD/GO/AgNPs) apresenta dois picos. Os picos relacionados aos componentes spin-órbita Ag3d_{3/2} e Ag3d_{5/2}, com energias de ligação em 373,9 e 367,9 eV, indicando a presença de espécies metálicas de Ag, confirmado a formação de AgNPs.^{18; 19} Também é possível

afirmar que a ausência de energias de ligação próximas de 367,3 eV e 367,6 eV, indica que não houve formação significativa de AgO e Ag₂O, respectivamente.^{18; 20}

O espectro de oxigênio O1s, mostra duas componentes na energia de ligação, o valor de 532,9 eV o qual foi atribuído ao oxigênio ligado aos átomos de carbono (C-O, os grupos funcionais presentes no grafeno)²¹ e uma energia de ligação em torno de 530,4 eV indicando que o oxigênio está ligado a átomos de silício, sugerindo a formação de uma espécie Si-O-Ag.²² A ausência de componentes da energia de ligação O1s próximos de 529 eV e 528 eV reforçam a idéia de que não houve formação significativa de AgO e Ag₂O respectivamente.²⁰

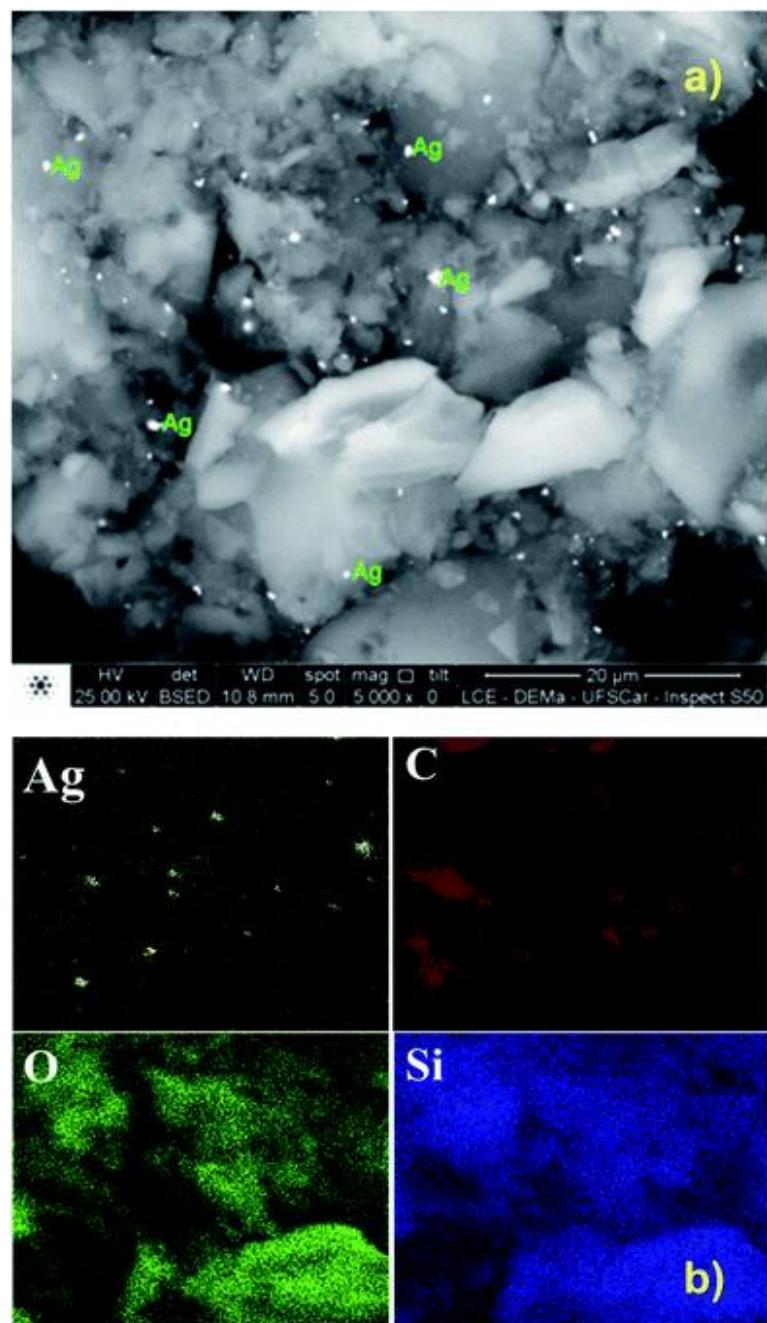
A deconvolução do espectro de XPS relativo ao carbono C1s, mostrou dois componentes correspondendo à átomos de carbono com grupos funcionais distintos: a energia de ligação em torno de 284,1 eV indica átomos de carbono ligados entre si (C-C) em estruturas poli-aromáticas e o pico próximo a 287,3 eV indica a formação de grupos funcionais contendo carbonos ligados ao oxigênio (C-O)²³ durante a síntese do grafeno. Estes grupos funcionais permitem que as AgNPs permaneçam ancoradas no material.

O espectro do silício Si2p, do material híbrido SMD/GO/AgNPs mostrou um pico intenso com uma energia de ligação de 109,08 eV, indicando a formação da matriz de sílica contendo grafeno.²⁴

5.2 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG- SEM)

A Figura 9a apresenta imagens, obtidas através da técnica SEM, do material híbrido SMD/GO/AgNPs, obtidas utilizando elétrons espalhados refletidos a uma ampliação de 5000x.

Figura 9 - (a) imagens do material SMD/GO/AgNPs, obtidas através da técnica de SEM e (b) o mapeamento correspondente a Ag, C e Si.



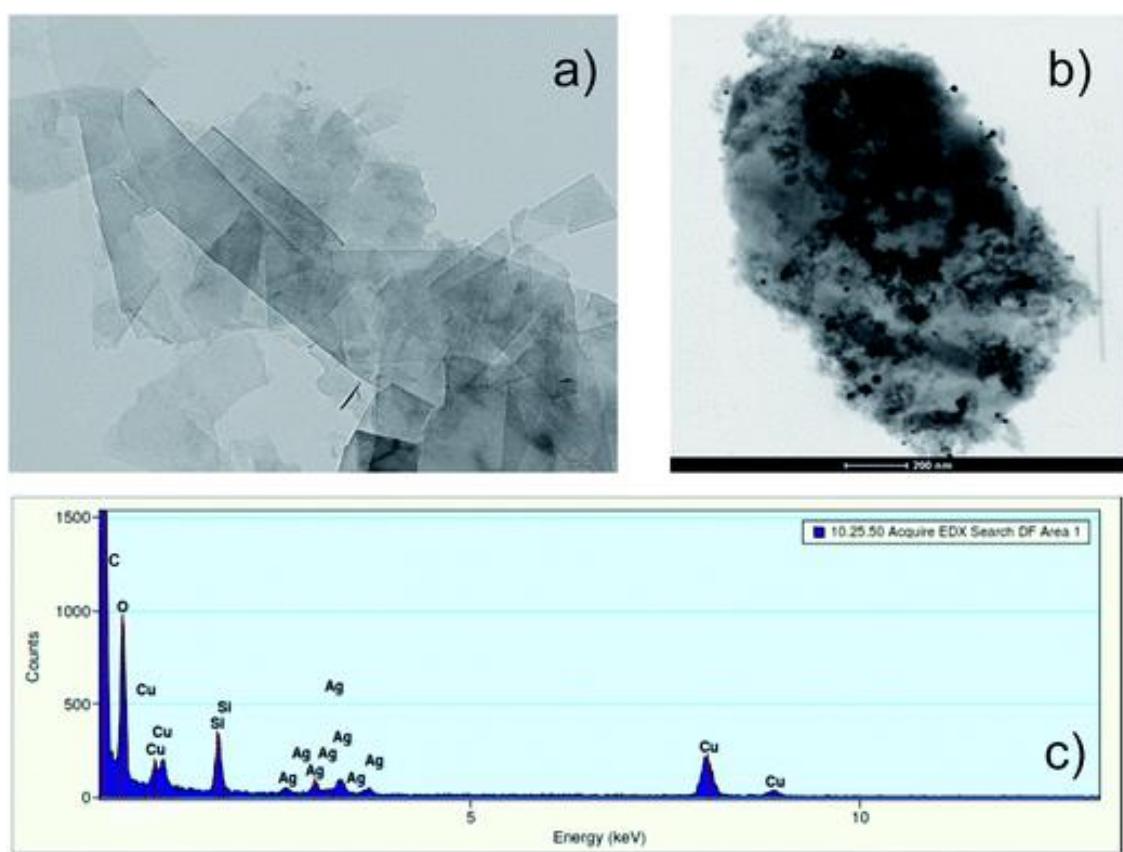
Fonte: Autoria própria

As nanopartículas de prata, representadas por pontos brancos brilhantes, foram distribuídas homogeneamente através do material híbrido SMD/GO. O mapeamento de Ag, como também C e Si, utilizando a sonda de elétrons EDS, evidencia que as AgNPs foram homogeneamente distribuídas no material híbrido (Figura 9b).

5.3 Microscopia eletrônica de transmissão com alta resolução (HR-TEM)

A caracterização estrutural do óxido de grafeno e do material híbrido SMD/GO/AgNPs foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão com alta resolução de alta resolução Figura 10.

Figura 10 - (a) micrografias das folhas de grafeno, (b) várias ampliações do material SMD/GO/AgNPs e (c) o EDX correspondente ao material híbrido SMD/GO/AgNPs.



Fonte: Autoria própria

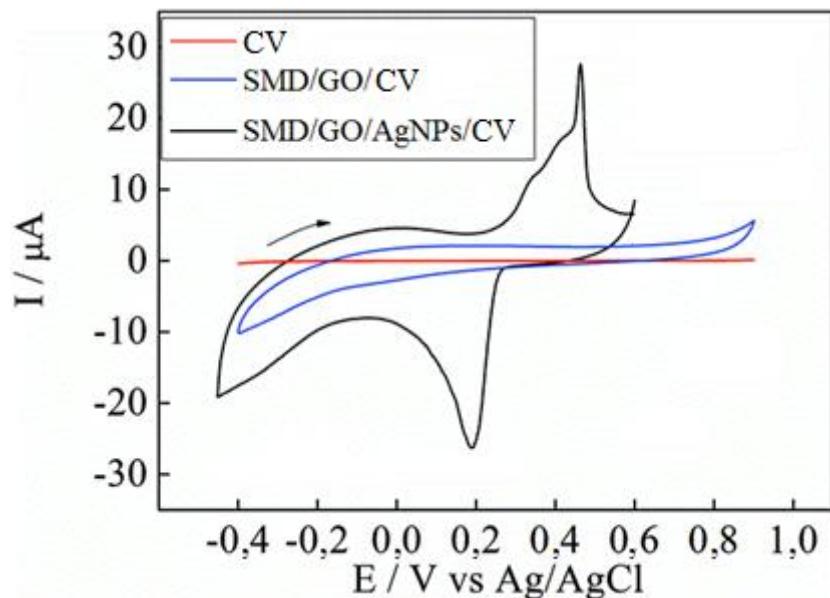
A Figura 10a apresenta as folhas de grafeno, as quais foram sintetizadas e então incorporadas na matriz de sílica, gerando o material híbrido SMD/GO. A Figura 10b apresenta as AgNPs bem distribuídas através do material híbrido, com diâmetros de aproximadamente 20 nanômetros. Sugere-se que as AgNPs se formaram principalmente nas folhas de grafeno devido a presença de grupos funcionais criados durante o processo de síntese. Para confirmar a formação de nanopartículas de prata, como também a presença de sílica e grafeno no material híbrido, foi utilizada a técnica

de Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) (Figura 10c). O sinal de Cu é devido às grades utilizadas para a análise de HR-TEM. A boa distribuição das AgNPs no material híbrido SMD/GO garante boas características eletrocatalíticas para o material híbrido SMD/GO/AgNPs, tornando-o potencialmente útil para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

5.4 Caracterização eletroquímica

A Figura 11 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de carbono vítreo não-modificado (CV) e para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o material híbrido SMD/GO e SMD/GO/AgNPs, em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) a uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. O eletrodo modificado contendo as AgNPs apresentou dois picos redox, diferentemente do carbono vítreo modificado com o material SMD/GO e o carbono vítreo não-modificado, indicando a presença das AgNPs.

Figura 11 - Voltamogramas obtidos para o carbono vítreo (GCE), SMD/GO/GCE e SMD/GO/AgNPs/GCE em PBS (pH = 7,0); velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹



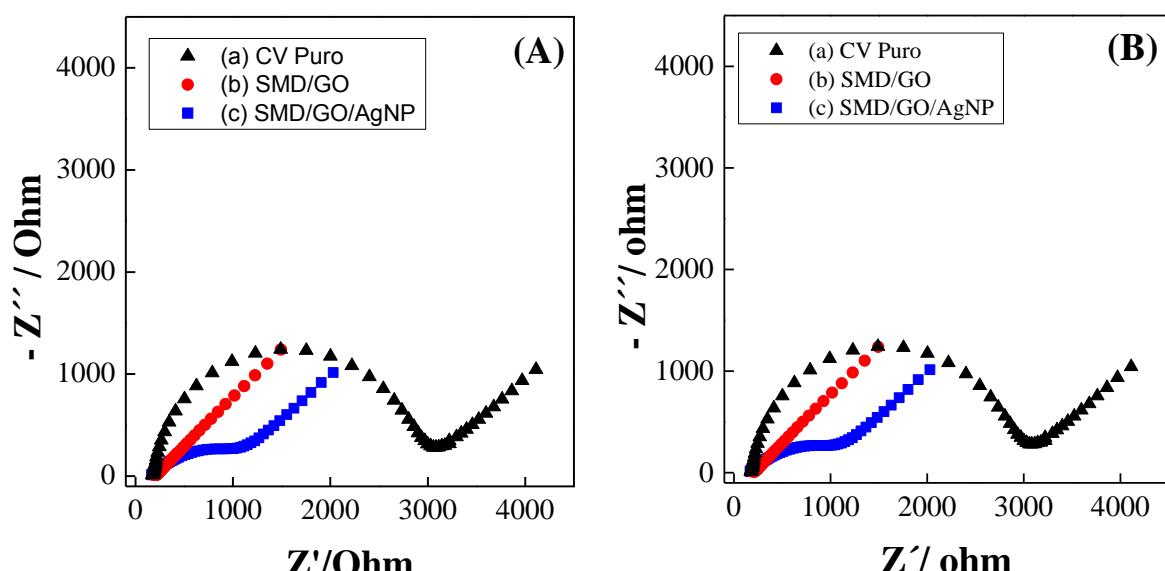
Fonte: Autoria própria

Os picos com potenciais $E_{Ox1} = +0,45$ V e $E_{Red1} = +0,20$ V estão relacionados com o processo redox das espécies Ag^0/Ag^+ e Ag^+/Ag^0 , respectivamente, indicando a formação das AgNPs²⁵ no material SMD/GO, concordando com as imagens obtidas no SEM e nas micrografias obtidas pela HR-TEM. Comparando com outros estudos contendo AgNPs^{22; 25; 26} ocorreu um deslocamento no potencial de deslocamento para a região de valores mais positivos, o que pode estar relacionado com o diâmetro do eletrodo e efeitos sinergéticos entre a sílica, as nanopartículas de prata e o grafeno que constitui o material híbrido.

5.5 Impedância Eletroquímica

A Figura 11 apresenta os espectros de plano complexo (diagrama de Nyquist) para as superfícies de carbono vítreo (CV) puro e para as superfícies híbridas contendo SMD/GO e SMD/GO/AgNPs obtidos em solução contendo 5 mmol de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em 0,1 mol L⁻¹ de KCl utilizando potencial de circuito aberto.

Figura 12 – (A) Espectros de plano complexo obtidos para o eletrodo de carbono vítreo não-modificado (a) e modificado com SMD/GO (b) e SMD/GO/AgNP (c), em potencial de circuito aberto. Faixa de freqüência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV. **(B) Fitting.**



Fonte: Autoria própria

A simulação dos resultados, aplicando-se um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$, com o software *Electrochemistry-ZView2* forneceu os parâmetros listados na Tabela I. R_s consiste na resistência da solução, CPE é o elemento de fase constante e representa um capacitor não ideal, enquanto R_{tc} é a resistência de transferência de carga e Z_w a impedância de Warburg.

A aplicação de ondas senoidais de baixa amplitude possibilitou uma boa separação de regiões de frequência onde a oxi-redução da sonda redox $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ ocorre por controle cinético e por controle de transporte de massa. Sob essas condições a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (K_{app}) da reação pode ser determinada pela equação 1²⁷:

$$K_{app} = \frac{R T}{F^2 R_{tc} C A} \quad (1)$$

onde F é a constante de Faraday (96 485, 3365 C mol⁻¹), C é a concentração de $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ em solução (5,0 mmol L⁻¹), R é a constante física dos gases (8,3145 J K mol), T é a temperatura em Kelvin (298 K), A é a área do eletrodo (0,283 cm²) e R_{tc} é a resistência de transferência de carga obtida com a simulação dos resultados da Figura 11. Os valores de K_{app} obtidos estão listados na Tabela I.

Tabela I – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo para os eletrodos de carbono vítreo puro e modificado com SMD/GO e SMD/GO/AgNPs.

Eletrodo	R_s (Ω)	CPE (μF)	R_{tc} (Ω)	K_{app}
CV	179,7	0,634	2775	1,04x10 ⁻⁶
CV/SMD/GO	166,2	0,572	40,96	1,54 x10 ⁻⁸
CV/SMD/GO/AgNP	154,3	69,6	1141	4,30 x10 ⁻⁷

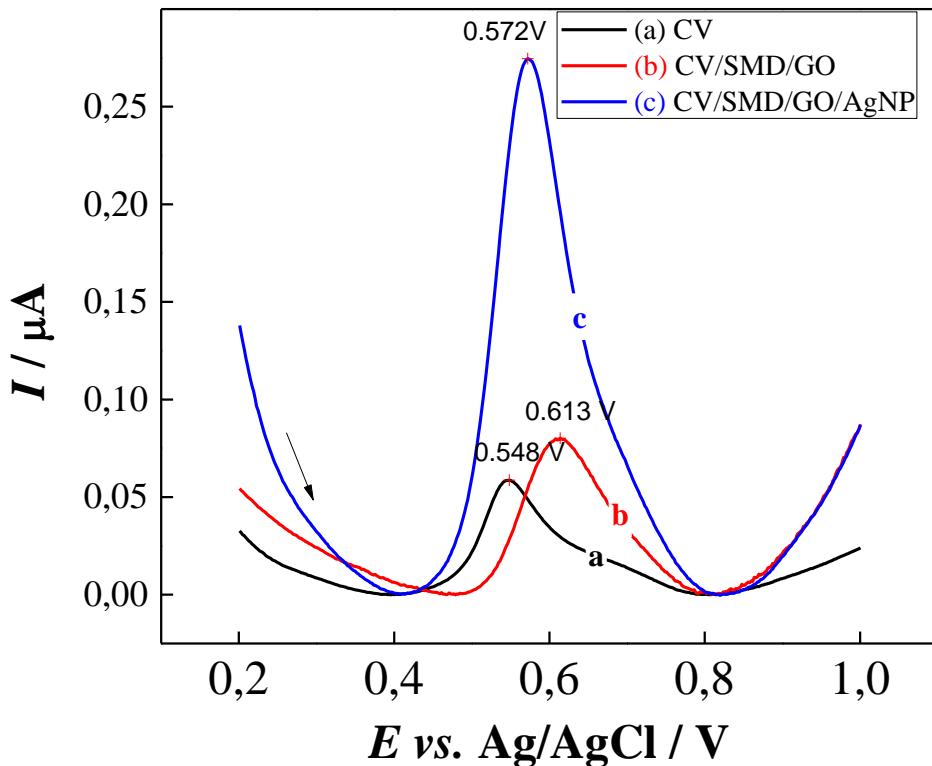
O valor de resistência de transferência de carga referente ao eletrodo de carbono vítreo modificado com SMD/GO apresentou uma drástica diminuição (40,96 Ω) quando comparado ao eletrodo de carbono vítreo puro (2775 Ω). Consequentemente,

a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) apresentou um aumento proporcionalmente a R_{tc} evidenciando o efeito da matriz híbrida nanoestruturada SMD/GO na velocidade de transferência eletrônica. Inesperadamente, o eletrodo modificado com a matriz híbrida nanoestruturada SMD/GO/AgNP apresentou um aumento da R_{tc} quando comparado com a matriz SMD/GO sugerindo um efeito sinergético não favorável das nanopartículas metálicas na matriz SMD/GO²⁸. Ambos os materiais foram avaliados com a relação ao Bisfenol-A e será discutido na sequência. Esta característica da superfície híbrida SMD/GO e SMD/GO/AgNP torna-se interessante para aplicação deste dispositivo em sensores e biossensores eletroquímicos pois pode proporcionar aumento da seletividade e sensibilidade dos sensores eletroquímicos.

5.6 Performance Eletroanalítica

A Figura 13 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial (VPD) para os eletrodos de carbono vítreo puro (**a**), modificado com SMD/GO (**b**) e com SMD/GO/AgNP (**c**) obtidos em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato na presença de 2,0 µmol L⁻¹ de BPA. Os voltamogramas foram ajustados para a linha de base com a finalidade de facilitar a comparação “diminuindo” o efeito da corrente capacitiva.

Figura 13 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ para o carbono vítreo puro e modificado com SMD/GO e SMD/GO/AgNP na presença de 2,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ de BPA. Voltamogramas com ajuste de linha de base.



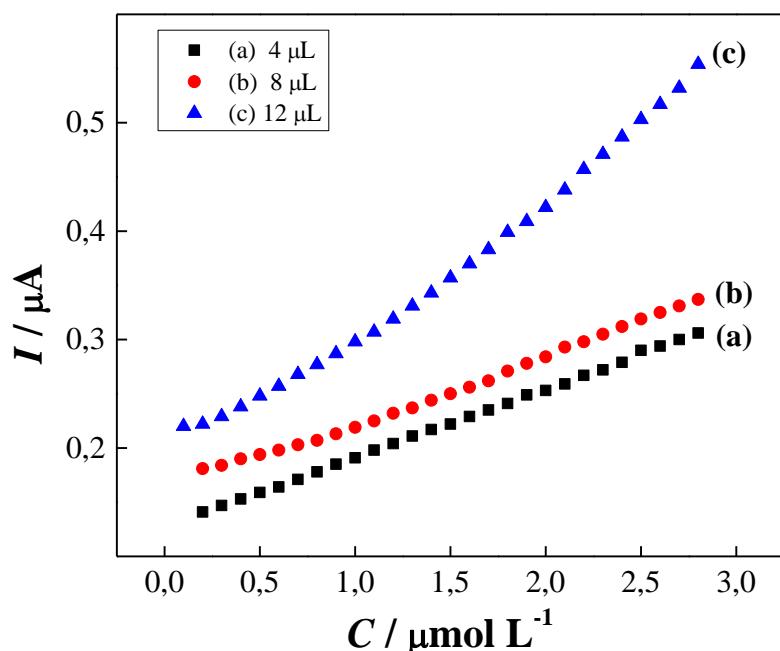
Fonte: Autoria própria

Dentre os materiais estudados, é evidente que a corrente de oxidação presente no voltamograma de pulso diferencial obtido para o eletrodo de carbono vítreo modificado com SMD/GO/AgNP (**c**) apresentou maior magnitude de corrente de pico anódico (0,27 μA) quando comparado com os eletrodos de carbono vítreo puro (0,06 μA) e modificado com SMD/GO (0,08 μA). Este comportamento evidencia o efeito eletrocatalítico das AgNP's presentes na matriz híbrida SMD/GO/AgNP, sugerindo maior sensitividade.

As condições operacionais para o eletrodo proposto GC/SMD/GO/AgNP foram utilizadas de acordo com as otimizadas anteriormente por Cincotto *et al*²⁹. Após estabelecido as melhores condições experimentais foram realizados sucessivos VPD em solução tampão fosfato a 0,1 mol L⁻¹ a uma velocidade de varredura de potenciais de 10 mV s⁻¹.

O efeito do volume de suspensão disperso sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi estudado. A Figura 14 apresenta as curvas analíticas obtidas para o eletrodo de carbono vítreo modificado com 4 (a), 8 (b) e 12 (c) μL , respectivamente, de suspensão SMD/GO/AgNP variando-se a concentração de BPA em solução no intervalo entre 0,1 e 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 14 – Curvas analíticas obtidas para o eletrodo de carbono vítreo modificado com 4 (a), 8 (b) e 12 (c) μL , respectivamente, de suspensão SMD/GO/AgNP.



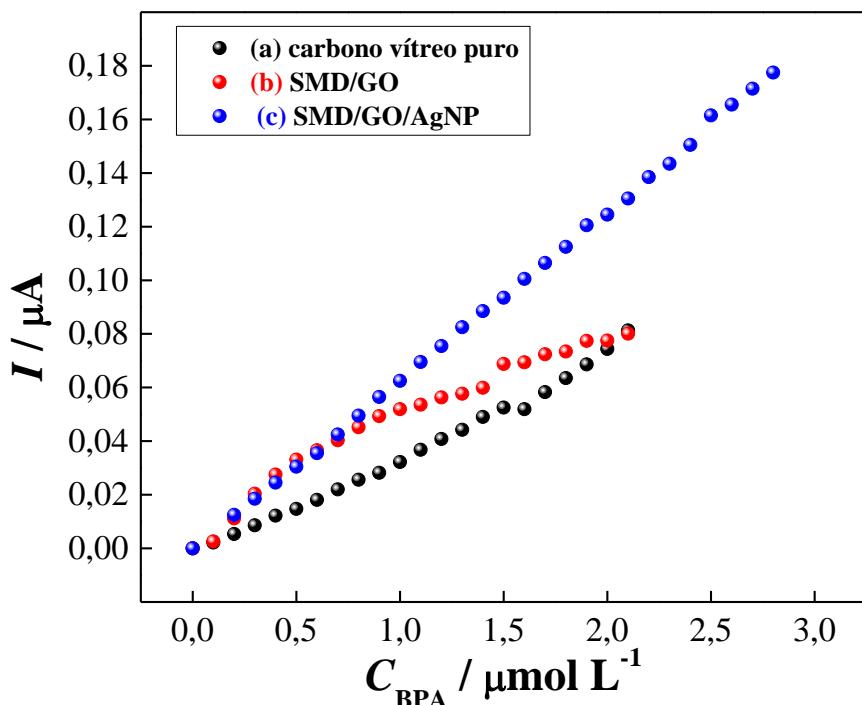
Fonte: Autoria própria

Na Figura 13, as curvas analíticas obtidas utilizando-se 8 (b) e 12 (c) μL apresentaram três regiões lineares distintas enquanto a curva analítica obtida utilizando-se 4 (a) μL apresentou linearidade em toda a faixa estudada compreendida entre 0,1 e 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Portanto, o volume de 4 μL foi selecionado para preparação do sensor na análise da amostra contendo BPA.

Para avaliar a performance analítica do eletrodo modificado frente ao analito, foram realizados os seguintes testes quantitativos. A figura 15 ilustra as curvas de calibração para a oxidação do Bisfenol A no carbono vítreo puro, no eletrodo modificados com SMD/GO e SMD/GO/AgNP, numa faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $2,1 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} . O carbono vítreo puro demonstrou baixos coeficiente

angular e coeficiente de correlação, enquanto o SMD/GO não apresentou coeficiente de correlação frente a oxidação do Bisfenol A. Em termos de sensitividade na curva de calibração, o material híbrido SMD/GO/AgNP exibiu o maior valor de sensibilidade, $0,064 \text{ A M}^{-1}$.

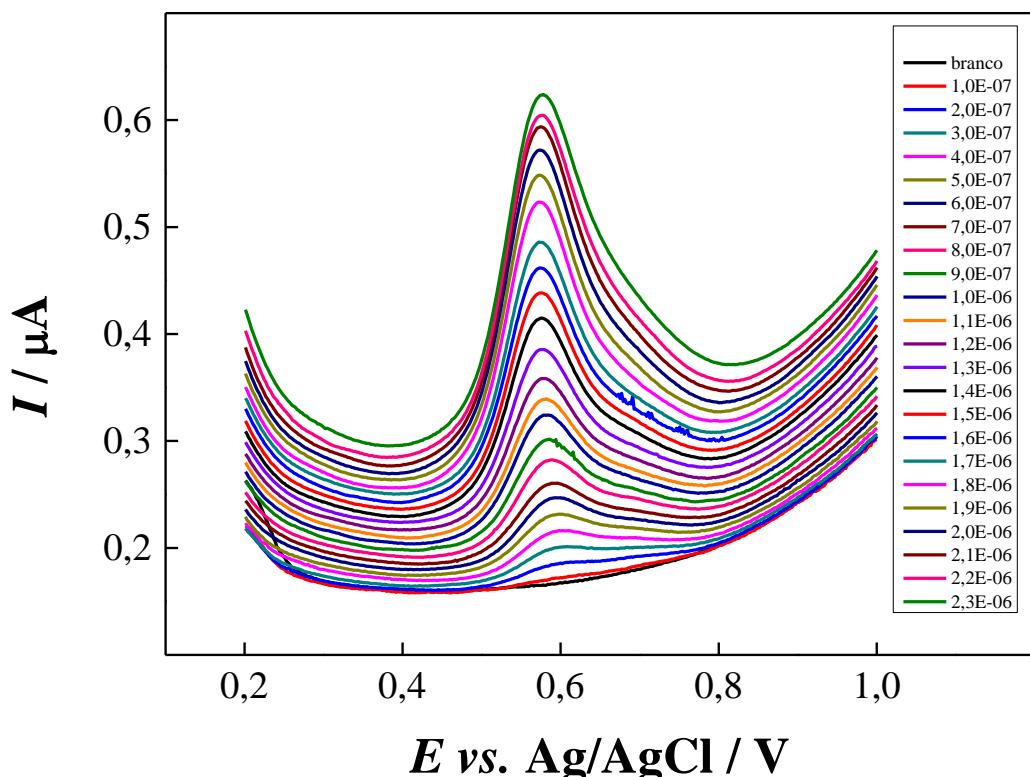
Figura 15 –Curvas de calibração para o BPA no carbono vítreo puro (a), no carbono vítreo modificado com SMD/GO (b) e SMD/GO/AgNPs.



Fonte: Autoria própria

A figura 16 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência e na presença de $0,1 - 2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BPA para a superfície híbrida SMD/GO/AgNP.

Figura 16 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com a matriz híbrida SMD/GO/AgNP com a variação da concentração de BPA de 0,1 a 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

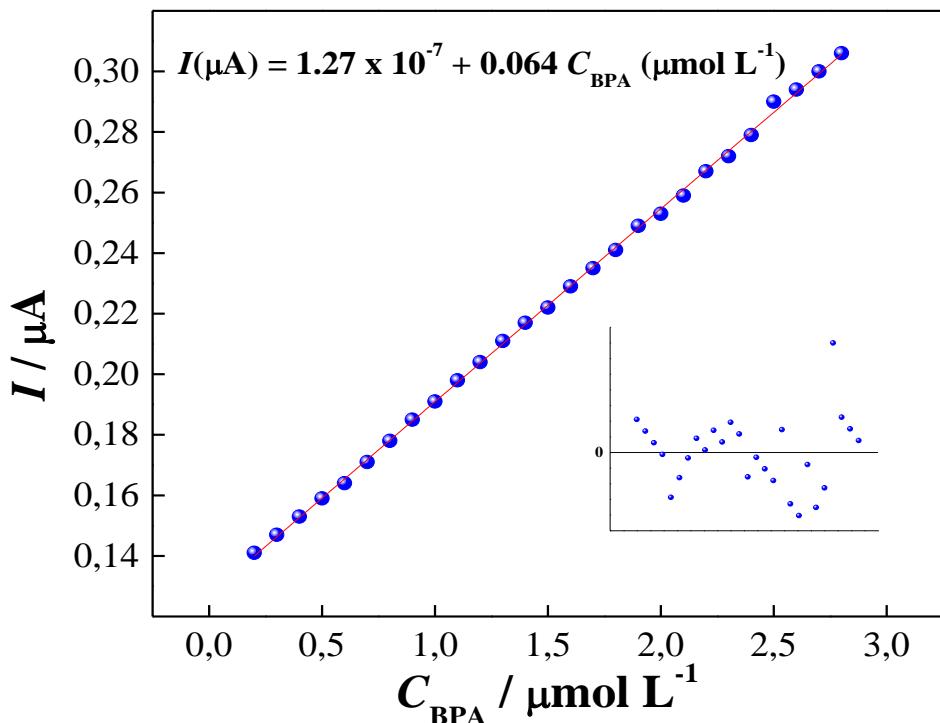


Fonte: Autoria própria

O aumento da concentração de BPA em solução produziu um aumento significativo na magnitude de corrente de pico anódica ($E_{\text{PA}} = 0,60 \text{ V}$), o que mostra claramente o efeito eletrocatalítico da matriz híbrida.

Os valores de corrente de pico anódica produziram uma relação linear de acordo com o aumento da concentração de BPA em solução. A curva analítica (Figura 17) foi linear no intervalo de concentração de BPA entre $1,0 \times 10^{-7}$ e $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ representada pela equação ($I (\text{A}) = 1,27 \times 10^{-7} + 0,064 \cdot C_{\text{BPA}} (\text{mol L}^{-1})$) com um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9995. O gráfico dos resíduos na inserção (figura 15B) demonstrou que a distribuição dos resíduos foi satisfatória.

Figura 17 – Curva analítica obtida para o eletrodo de carbono vítreo modificado com a matriz híbrida SMD/GO/AgNP variando-se a concentração de BPA em solução entre 0,1 e 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserito: gráfico dos resíduos para o diagnóstico da regressão linear.

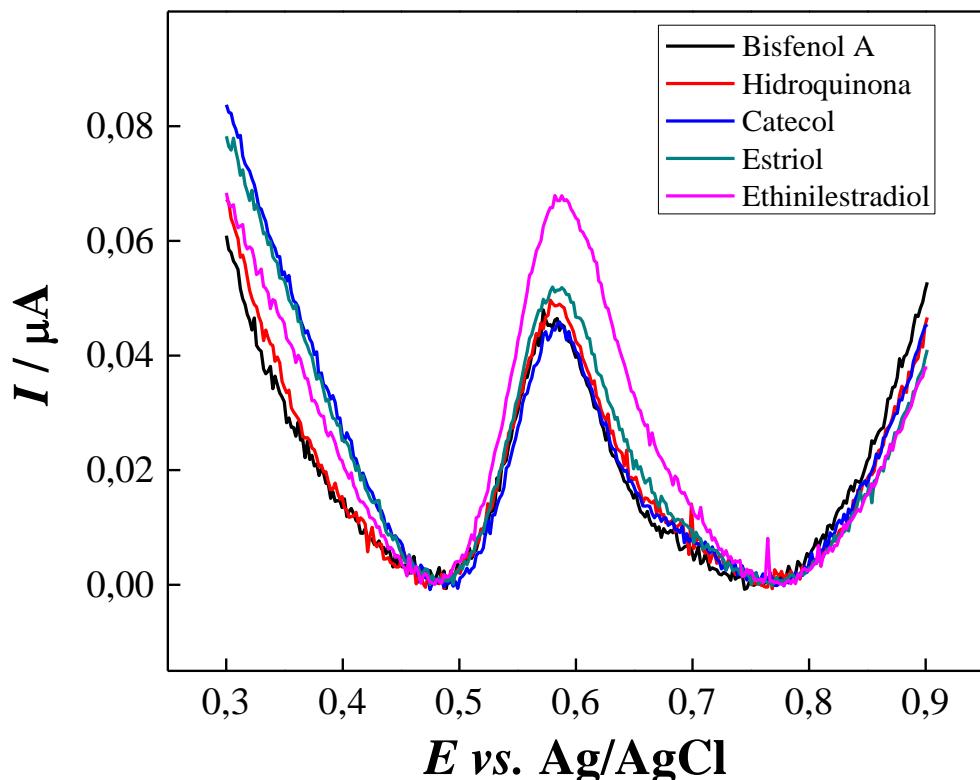


Fonte: Autoria própria

O limite de detecção foi calculado utilizando-se a equação $\text{LOD} = y_b + 3 S_B$ onde y_b é o valor do intercepto da curva de calibração e S_B o desvio padrão¹⁴, o que resultou num valor de $45,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

O efeito de possíveis interferentes na análise de bisfenol A em água, foi realizado monitorando o pico de oxidação de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de BPA, na presença de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ hidroquinona, catecol, estriol e etinilestradiol. Inicialmente adicionou-se $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de BPA e realizou-se uma VPD para promover sua eletro-oxidação. Na sequência os interferentes foram adicionados individualmente e as VPD foram registradas. Estes resultados estão apresentados na figura 18.

Figura 18 – Efeito da presença de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de hidroquinona, catecol, estriol e etinilestradiol no sinal eletroquímico obtido por $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de BPA para o sensor CV/SMD/GO/AgNP.



Fonte: Autoria própria

É possível observar que as adições de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de hidroquinona e catecol na cela eletroquímica resultaram uma pequena variação de corrente próximo ao sinal do BPA. Porém estes compostos não interferem na análise visto que os picos de oxidação da hidroquinona e do catecol ocorrem em 70 e 120 mV, respectivamente, vs Ag/AgCl²², enquanto que o do BPA foi de 572 mV vs Ag/AgCl. Entretanto, estriol e etinilestradiol apresentam uma variação de interferência maior na corrente de oxidação do BPA. Considerando que o sinal do BPA (4.79×10^{-8} A) é livre de interferentes, podemos estimar os percentuais de interferência advindas do estriol e do etinilestradiol, sendo que os valores obtidos foram de 11,7 e 46%, respectivamente. Este fato pode ser explicado devido aos grupos hidroxila presentes nas estruturas aromáticas destas moléculas. Conhecendo-se as contribuições de cada interferente na análise, é possível utilizar o eletrodo proposto na detecção do BPA na presença de estriol e etinilestradiol.

5.7 Análise em amostras reais

Inicialmente o sensor proposto foi utilizado na análise de amostra de água da torneira sem pré-tratamento. Foram realizadas adições consecutivas de alíquotas de 50 µL de água da torneira numa cela eletroquímica contendo 10 mL de solução de tampão fosfato. As amostras não demonstraram picos de oxidação, o que indica que a água não estava contaminada com BPA. Então, a amostra foi propositalmente contaminada com uma concentração conhecida 2,0 µmol L⁻¹ de Bisfenol-A e analisada através do método proposto. A concentração de Bisfenol-A encontrada na análise da amostra contaminada foi de 2,08 µmol L⁻¹, indicando um erro de 4%.

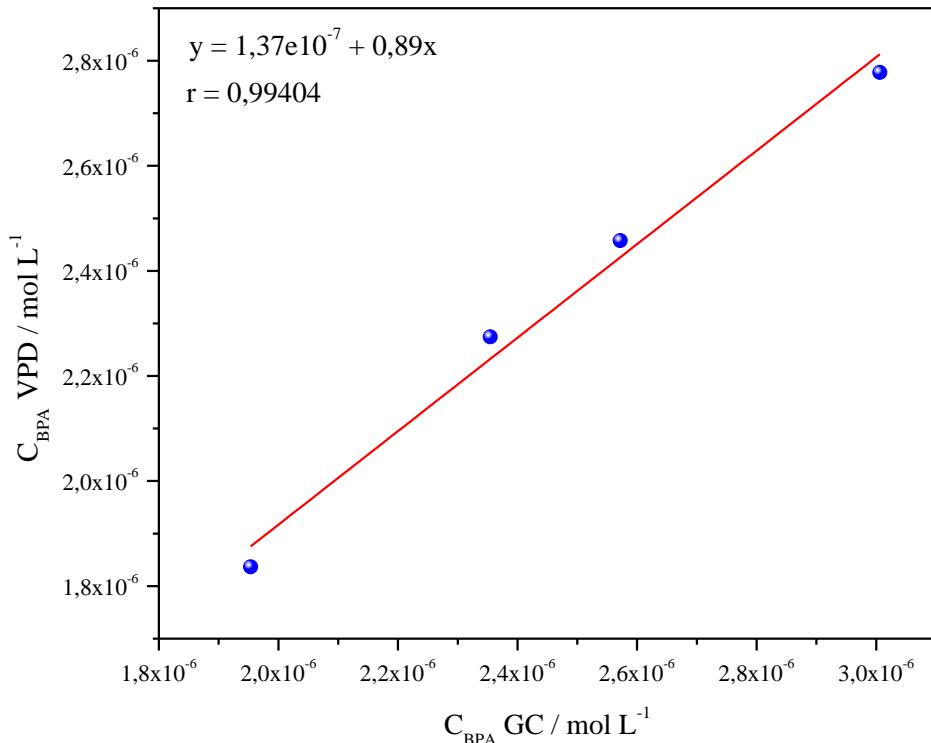
5.8 Comparação estatística

Após a análise inicial de água de torneira, foram realizadas análises de uma amostra ambiental, a qual era composta de diversas amostras dos rios coletadas nas micro bacias da região de São Luiz do Paraitinga. As análises foram realizadas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detector FID (do inglês *Flame Ionization Detector*) (GC-FID)³⁰ como descrito na seção experimental, e pela técnica de voltametria de pulso diferencial, utilizando as mesmas amostras de água.

Após otimizar o sistema de preparo da amostra no GC-FID, analizou-se uma amostra de água ambiental em ambas as técnicas. A amostra do rio não apresentou nenhum sinal no tempo de retenção característico do bisfenol A para a técnica GC - FID e nem de oxidação para VPD, indicando a ausência do composto naquelas amostras. Então, foram separadas alíquotas da água do rio e cada uma delas foi contaminada com uma quantidade conhecida de bisfenol A a fim de analisá-las por ambas as técnicas. Para cada uma das técnicas foi elaborada uma curva de calibração na faixa de trabalho entre 1,6 x 10⁻⁶ e 2,8 x 10⁻⁶ (366 a 639 µg L⁻¹) e as amostras fortificadas foram analisadas.

A comparação estatística foi realizada pela avaliação da regressão linear da equação da reta, onde os resultados da detecção eletroanalítica foram graficados no eixo das ordenadas e os resultados da metodologia padrão de detecção, comotografia gasosa, foram graficados no eixo das abscissas, para cada amostra realizada, na mesma faixa de trabalho. A figura 19 apresenta a correlação obtida entre as duas técnicas para a determinação de BPA em amostra de água fluvial superficial

Figura 19 - Regressão linear obtida pela correlação entre as duas técnicas



Fonte: autoria própria

É possível observar que o valor do intercepto é bem próximo de zero e tanto o coeficiente angular quanto o coeficiente de correlação produto-momento possuem valores próximos de 1, caracterizando a situação próxima da ideal (figura 5a), o que indica que há correlação entre as técnicas, ou seja, são análogas para a detecção de BPA, na faixa de concentração analisada.

Para corroborar com o resultado apresentado, foi realizado a avaliação dos resultados das detecções de ambas as metodologias para cada amostra pelo método estatístico t de Student, utilizando-se a equação $t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$, onde r é o coeficiente de correlação produto-momento, n o número total de medidas realizadas para cada técnica.

O coeficiente de correlação produto-momento pode ser calculado pela equação

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{\sum_i \{(x_i - \bar{x})^2\} [\sum_i \{(y_i - \bar{y})^2\}\}^{1/2}\}},$$

onde x são os valores de concentração das amostras determinadas pela técnica padrão, \bar{x} a média dos valores de concentração das amostras determinadas pela técnica padrão, y são os valores de concentração das amostras determinadas pelo método proposto e \bar{y} a média dos valores de concentração das amostras determinadas pelo método proposto.

O resultado foi de 12,8, valor maior do que o t crítico tabelado, de 4,30 a 95% de confiança para $n = 4$ ($GL = 2$; $\alpha = 0.05$). Desta forma a hipótese nula (que indica que não há correlação entre x e y) pode ser descartada, o que significa que a metodologia eletroanalítica utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial é análoga à técnica de cromatografia à gás, a 95% de confiança e 2 graus de liberdade.

De acordo com o exposto acima, o sensor eletroquímico proposto pode ser utilizado para determinação de bisfenol A em amostras de água de abastecimento e fluviais de maneira alternativa ao método cromatográfico.

6 CONCLUSÃO

As análises por EDX e por SEM confirmaram a presença de prata, grafeno e sílica no material híbrido, além disso, os voltamogramas cíclicos também identificaram a presença de prata no material híbrido SMD/GO/AgNP. As análises por XPS e as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura confirmaram a formação das nanopartículas de prata. Através do XPS foi possível identificar a formação das nanopartículas de prata (picos com energias de 373,9 e 367,9 eV), visto que foram descartadas as possibilidades de formação de óxidos de prata (ausência de picos em 367,3 e 367,6 eV). As imagens HR-TEM identificaram partículas distribuídas sob o material híbrido com tamanhos menores ou iguais a 20 nanômetros, e nas imagens obtidas através de SEM foi possível visualizar pontos brilhantes, homogeneamente distribuídos na matriz. De acordo com o que foi exposto, é possível afirmar que a síntese do material híbrido foi realizada de maneira correta, fato que foi evidenciado por todas as técnicas utilizadas para caracterização do mesmo.

O sensor proposto com a matriz híbrida SMD/GO/AgNP foi aplicado para detecção do interferente endócrino bisfenol-A em amostras reais fortificadas tanto de

de água de torneira quanto de águas fluviais superficiais. Nas análises de amostras de água da torneira o erro da análise foi inferior a 5%. Nas análises de amostras de águas fluviais superficiais, realizaram-se diversos experimentos utilizando a técnica padrão de cromatografia a gás e a técnica eletroquímica de voltametria de pulso diferencial a fim de compará-las. Um extenso tratamento estatístico foi empregado através do método de comparação entre curvas de regressão e posterior avaliação dos resultados das detecções de ambas as metodologias para cada amostra pelo método estatístico t de Student.

Houve êxito na comparação entre as duas técnicas e o valor de t calculado foi de 12,8. Este resultado demonstra que a metodologia eletroanalítica é análoga à técnica de cromatografia gasosa na análise do interferente endócrino bisfenol-A, na faixa de concentração de 366 a 639 µg L⁻¹ em amostras do rio.

Portanto, pode-se concluir que há grande vantagem em utilizar a metodologia eletroquímica para análises pois, além de apresentar a possibilidade de aplicação *in situ*, de monitoramento em tempo real, de possuir equipamentos de fácil manipulação, baixo custo de análise e baixa produção de resíduos, seus resultados são comparáveis às técnicas de cromatografia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ LEE, K. E. et al. Development, characterization and the application of hybrid materials in coagulation/flocculation of wastewater: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 203, p. 370-386, 2012.
- ² JAL, P. K.; PATEL, S.; MISHRA, B. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. **Talanta**, v. 62, n. 5, p. 1005-1028, 2004.
- ³ SING, K. S. W. et al. Reporting Physisorption Data for Gas Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface-Area and Porosity (Recommendations 1984). **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.
- ⁴ MELDE, B. J.; JOHNSON, B. J. Mesoporous materials in sensing: morphology and functionality at the meso-interface. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 4, p. 1565-1573, 2010.
- ⁵ TANG, L. H. et al. Preparation, Structure, and Electrochemical Properties of Reduced Graphene Sheet Films. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 17, p. 2782-2789, 2009.

- ⁶ ZHU, Y. W. et al. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 35, p. 3906-3924, 2010.
- ⁷ PEI, S. F.; CHENG, H. M. The reduction of graphene oxide. **Carbon**, v. 50, n. 9, p. 3210-3228, 2012.
- ⁸ CHAZALVIEL, J. N.; ALLONGUE, P. On the Origin of the Efficient Nanoparticle Mediated Electron Transfer across a Self-Assembled Monolayer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 4, p. 762-764, 2011.
- ⁹ RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. (tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
- ¹⁰ MA, X. Y. et al. Characteristics of BPA removal from water by PACI-Al-13 in coagulation process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 337, n. 2, p. 408-413, 2009.
- ¹¹ GONÇALVES, C. S. **Síntese, caracterização e aplicação de polímeros conjugados derivados de ferroceno e de bisfenol-A**. 2008. 214 (tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo
- ¹² LAFLEUR, A. D.; SCHUG, K. A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, n. 1-2, p. 6-26, 2011.
- ¹³ MILLER, J. N. M., J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5th ed. Harlow-Essex, UK: Pearson Education Limited, 2005.
- ¹⁴ DA SILVA, O. B.; MACHADO, S. A. S. Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2348-2354, 2012.
- ¹⁵ HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.
- ¹⁶ CANEVARI, T. C. et al. Simultaneous electroanalytical determination of hydroquinone and catechol in the presence of resorcinol at an SiO₂/C electrode spin-coated with a thin film of Nb₂O₅. **Analyst**, v. 138, n. 1, p. 315-324, 2013.
- ¹⁷ CONZUELO, F. et al. Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 50, p. 100-105, 2013.
- ¹⁸ LI, Y. A.; CHEN, Y. J.; TAI, N. H. Fast Process To Decorate Silver Nanoparticles on Carbon Nanomaterials for Preparing High-Performance Flexible Transparent Conductive Films. **Langmuir**, v. 29, n. 26, p. 8433-8439, 2013.

- ¹⁹ YUAN, W. H.; GU, Y. J.; LI, L. Green synthesis of graphene/Ag nanocomposites. **Applied Surface Science**, v. 261, p. 753-758, 2012.
- ²⁰ HOFLUND, G. B.; HAZOS, Z. F.; SALAITA, G. N. Surface characterization study of Ag, AgO, and Ag₂O using x-ray photoelectron spectroscopy and electron energy-loss spectroscopy. **Physical Review B**, v. 62, n. 16, p. 11126-11133, 2000.
- ²¹ ZHOU, J. H. et al. Characterization of surface oxygen complexes on carbon nanofibers by TPD, XPS and FT-IR. **Carbon**, v. 45, n. 4, p. 785-796, 2007.
- ²² CANEVARI, T. C. et al. Direct Synthesis of Ag Nanoparticles Incorporated on a Mesoporous Hybrid Material as a Sensitive Sensor for the Simultaneous Determination of Dihydroxybenzenes Isomers. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, n. 33, p. 5746-5754, 2013.
- ²³ BI, H. Q. et al. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid: The effect of functional groups. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 171, p. 1132-1140, 2012.
- ²⁴ ZHOU, X.; SHI, T. J. One-pot hydrothermal synthesis of a mesoporous SiO₂-graphene hybrid with tunable surface area and pore size. **Applied Surface Science**, v. 259, p. 566-573, 2012.
- ²⁵ CUI, K. et al. A novel hydrogen peroxide sensor based on Ag nanoparticles electrodeposited on DNA-networks modified glassy carbon electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 4, p. 663-667, 2008.
- ²⁶ LI, J. H. et al. Green synthesis of silver nanoparticles-graphene oxide nanocomposite and its application in electrochemical sensing of tryptophan. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 42, p. 198-206, 2013.
- ²⁷ SABATANI, E. et al. Organized Self-Assembling Monolayers on Electrodes .1. Octadecyl Derivatives on Gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 219, n. 1-2, p. 365-371, 1987.
- ²⁸ CESARINO, I.; CINCOTTO, F. H.; MACHADO, S. A. S. A synergistic combination of reduced graphene oxide and antimony nanoparticles for estriol hormone detection. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 210, p. 453-459, 2015.
- ²⁹ CINCOTTO, F. H. et al. Simultaneous determination of epinephrine and dopamine by electrochemical reduction on the hybrid material SiO₂/graphene oxide decorated with Ag nanoparticles. **Analyst**, v. 139, n. 18, p. 4634-4640, 2014.
- ³⁰ CHANG, C. M.; CHOU, C. C.; LEE, M. R. Determining leaching of bisphenol A from plastic containers by solid-phase microextraction and gas

chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p. 41-47, 2005.